

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет ветеринарної медицини
Кафедра інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки

Освітньо-професійна програма Ветеринарна медицина
Спеціальність 211 Ветеринарна медицина
Ступінь вищої освіти магістр

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
_____ Олег КРУЧИНЕНКО
« ____ » _____ 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

тема: «Серологічна діагностика лейкозу великої рогатої худоби в умовах
Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській
області»

ВИКОНАЛА ЗДОБУВАЧКА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Скляр Яна Дмитрівна

Керівник кваліфікаційної роботи к.вет.н., доцент Інна ЛАВРІНЕНКО

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет ветеринарної медицини
Кафедра інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки

Пояснювальна записка
до кваліфікаційної роботи
на здобуття ступеня вищої освіти магістр

на тему: «Серологічна діагностика лейкозу великої рогатої худоби в умовах Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області»

Виконала: здобувач вищої освіти за
освітньо-професійною програмою
Ветеринарна медицина спеціальності
211 Ветеринарна медицина
освітнього ступеня магістр
2 групи
Скляр Я.Д.
Керівник: Інна ЛАВРІНЕНКО
Рецензент: Роман ПЕРЕДЕРА

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет ветеринарної медицини
Кафедра інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки
Освітньо-професійна програма Ветеринарна медицина
Спеціальність 211 Ветеринарна медицина
Рівень вищої освіти другий (магістерський)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

д-р. вет. наук, професор

_____ Олег КРУЧИНЕНКО

«28» вересня 2023 року

З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Скляр Яна Дмитрівна

Тема роботи: «Серологічна діагностика лейкозу великої рогатої худоби в умовах Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області»

керівник роботи к.вет.н, доцент Лавріненко І.В.

Затверджено засіданням кафедри № 3 від «28» вересня 2023 р.

2. Строк подання здобувачем вищої освіти роботи «10» червня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи: лабораторія ветеринарної медицини, біопрепарати та інструкції щодо їх використання.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

Розділ 1. Огляд літератури: проаналізувати вітчизняні та зарубіжні дослідження щодо особливостей лейкозу ВРХ: охарактеризувати збудника, патогенез захворювання, навести епізоотологічні дані, клінічні та патологоанатомічні ознаки, розглянути особливості ліквідації та профілактики хвороби.

Розділ 2. Власні дослідження: здійснити діагностику лейкозу ВРХ методом РІД та ІФА.

Розділ 3. Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях: з'ясувати організацію робіт з охорони праці у лабораторії ветеринарної медицини, стан виробничих приміщень, умови праці та план локалізації і ліквідації аварійних ситуацій.

Розділ 4. Екологічна експертиза: проаналізувати відомості про стан і здійснення природоохоронних законів у галузі ветеринарної медицини.

5. Перелік графічного матеріалу: схеми, рисунки, графіки, діаграми за темою та об'єктом дослідження.

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видано	завдання перевірено

Економічної ефективності ветеринарних заходів	КРУЧИНЕНКО О., професор кафедри інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки	28 вересня 2023 р.	
Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях	ОПАРА Н., професор кафедри механічної та електричної інженерії (40 осіб) або КОСТЕНКО О., професор кафедри механічної та електричної інженерії (25 осіб)	28 вересня 2023 р.	
Екологічна експертиза	САМОЙЛІК М., професор кафедри екології, збалансованого природокористування та захисту довкілля	28 вересня 2023 р.	

7. Дата видачі завдання: «25» вересня 2023 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Вибір і затвердження теми роботи	вересень 2023 р.	
2	Складання та погодження розгорнутого плану та завдання на кваліфікаційну роботу	28 вересня 2023 р.	
3	Опрацювання літературних джерел	вересень – листопад 2023 р.	
4	Збір, вивчення і обробка інформації, необхідної для виконання роботи	грудень 2023 р. – лютий 2024 р.	
5	Виконання теоретичного розділу роботи	грудень 2023 р. – січень 2024 р.	
6	Виконання аналітичних розділів роботи	грудень 2023 р. – лютий 2024 р.	
7	Виконання спеціальних розділів	грудень 2023 р. – лютий 2024 р.	
8	Оформлення тексту роботи	березень – квітень 2024 р.	
9	Перевірка роботи на виявлення академічного плагіату	14-17 травня 2024 р.	
10	Попередній захист роботи на кафедрі	21-24 травня 2024 р.	
11	Доопрацювання роботи з урахуванням зауважень і пропозицій	27-31 травня 2024 р.	
12	Нормоконтроль	01 – 07 червня 2023 р.	
13	Захист кваліфікаційної роботи	червень 2024 р.	

Здобувач вищої освіти _____ Яна Скляр
(підпис)

Керівник роботи _____ Інна Лаврінченко
(підпис)

Зміст

1. Реферат.....	6
2. Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів	7
3. Вступ.....	8
4. Розділ 1 Огляд літератури.....	10
1.1 Історія досліджень.....	10
1.2 Епізоотологія.....	10
1.3 Патогенез.....	11
1.4 Симптоми та клінічний перебіг.....	12
1.5 Патологоанатомічні зміни.....	14
1.6 Діагностика.....	15
1.7 Диференційна діагностика.....	16
1.8 Профілактика і заходи боротьби.....	17
1.9 Ветеринарно санітарна експертиза.....	23
1.10 Моноклональні антитіла в тесті ІФА (ELISA).....	25
1.11 Висновок з огляду літератури.....	31
5. Розділ 2 Власні дослідження.....	33
2.1 Матеріал та методи досліджень.....	33
2.2 Характеристика місця виконання роботи.....	35
2.3 Результати власних досліджень.....	38
2.4 Розрахунок економічної ефективності ветеринарних заходів.....	46
2.5 Обговорення результатів власних досліджень.....	46
6. Розділ 3 Охорона праці.....	48
7. Розділ 4 Екологічна експертиза.....	53
8. Висновок.....	56
9. Список джерел.....	57
10. Додатки.....	63

Реферат

Дипломна робота викладена на 79 сторінках комп'ютерного тексту, містить 1 таблицю. Складається зі вступу, огляду літератури, власних досліджень, їх обговорення, розділів з охорони праці та безпеки в надзвичайних ситуаціях та екологічної експертизи, висновків, списку використаних джерел, додатків.

Тема роботи: Лабораторна діагностика сироватки крові ВРХ на лейкоз.
Об'єкт досліджень: поголів'я великої рогатої худоби.

Мета: визначення ефективності лабораторних досліджень поголів'я великої рогатої худоби у господарствах Полтавської області.

Методи: імуноферментний аналіз, реакція імунодифузії.

Результати досліджень: встановлено, що за період з 2019 по 2024 рік найбільша кількість позитивних випадків захворювання лейкозом великої рогатої худоби в Полтавській області була зареєстрована у 2019 році. За результатами власних досліджень підтверджено велике значення проведення планової лабораторної діагностики у системі заходів профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу. Також був проведений аналіз з охорони праці та безпеки в надзвичайних ситуаціях і екологічній експертизі. На основі експериментальних даних зроблені висновки. Список використаної літератури містить 54 джерела.

Галузь використання - ветеринарна медицина.

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів

ІФА - Імуноферментний аналіз

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція

ВЛВРХ- вірус лейкозу великої рогатої худоби

ЛВРХ- лейкоз великої рогатої худоби

ССА- сольова суміш агару

РІД - реакція імунодифузії

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК - рибонуклеїнова кислота

РЗК - реакція зв'язування комплекменту

ДСТУ - державний стандарт України

ДНАОП - державні нормативні акти з охорони праці

ЗІЗ – засоби індивідуального захисту

Вступ

Лейкоз - це хронічна інфекційна хвороба великої рогатої худоби, інших ссавців та різних видів птахів, що характеризується порушенням процесу дозрівання клітинних елементів крові, злоякісним розростанням кровотворної та лімфоїдної тканин, утворенням у різних органах пухлин.

В Україні лейкоз великої рогатої худоби реєструється майже у всіх областях країни, в тому числі й у Полтавській. Ця хвороба з'являється як у приватному секторі, так і у великих фермерських господарствах.

До появи сучасних методів діагностики хвороби та розробки ефективних методів боротьби і профілактики лейкоз великої рогатої худоби був дуже поширений через його вірусну етіологію. Новітні методи діагностики дозволяють виявити інфікованих тварин на ранніх стадіях розвитку хвороби ще до прояву клінічних ознак, що не міг забезпечити раніше гематологічний метод. Це робить більш ефективною боротьбу із цією хворобою. До таких методів відносять РІД, ІФА та ПЛР.

Під час перебігу лейкозу відбувається зміна якісних показників молока та м'яса, а також накопичення в них шкідливих для людей і тварин продуктів обміну, в тому числі і метаболітів триптофану, які мають канцерогенну дію. Ця хвороба є небезпечною і для людини, особливо для дітей, так як у м'ясі та молоці від серопозитивних тварин є токсини, які, на відміну від самого вірусу лейкозу, не знешкоджуються термічною обробкою. Тому тема захворюваності тварин на лейкоз великої рогатої худоби буде актуальна до того часу, поки вірус буде існувати. На сьогоднішній день захворювання наносить численні збитки власникам корів, бо є невиліковним і усі тварини які є позитивно реагуючими ідуть на забій раніше строку, а молоко таких корів не можна реалізовувати без попереднього знезараження, тому що це сприяє швидкому розповсюдженню даного захворювання.

Тому обрана тема роботи «Лабораторна діагностика сироватки крові ВРХ на лейкоз» є досить актуальною. Метою досліджень було визначення

ефективності проведення лабораторних досліджень поголів'я великої рогатої худоби господарств Полтавської області.

Для досягнення зазначених цілей було поставлено наступні задачі:

1. Вивчити епізоотичну ситуацію у Полтавській області щодо лейкозу великої рогатої худоби за останні 6 років;
2. Дослідити лабораторно проби сироваток крові від великої рогатої худоби із застосуванням методу імуноферментного аналізу та в реакції імунодифузії;
- 3 Проаналізувати ефективність лабораторних досліджень поголів'я великої рогатої худоби господарств Полтавської області;

Розділ 1 Огляд літератури

1.1. Історична довідка

Лейкоз (Leucosis) великої рогатої худоби - хронічна злоякісна вірусна хвороба, що характеризується неопластичною проліферацією кровотворної та лімфоїдної тканини (лімфоцитозом), розвитком патологічних вогнищ кровотворення (мегаплазією) та порушенням процесу дозрівання кров'яних клітин (анаплазією), смертельним результатом. Виявляється у вигляді інфекційного ензоотичного лейкозу великої рогатої худоби та спорадичного лейкозу молодняка [1, 2, 3].

Над визначенням лейкозу тварин і розробкою заходів боротьби з цією хворобою плідно працювали дослідники з усього світу, зокрема М. Доронін, М. Мандігра, В. Бусол, Н. Субаєв, Б. Ярчук, Г. Кудрявцев. Допускається до виробництва вакцина проти лейкозу великої рогатої худоби, запропонована акад. Бусолом В. О., а також д-р вет. наук С. В. Аранчієм. [4]

1.2 Епізоотологія

Збудником захворювання є онкогенний РНК-вірус лейкозу великої рогатої худоби (корів) - Bovine Leukemia virus (BLV) типу С, який відноситься до родини Retroviridae. Віріони вірусу лейкозу мають сферичну форму, діаметром 73-120 нм, вкриті зовнішньою ліпопротеїдною оболонкою. Ядро віріону включає ікосаедричний капсид, спіральний нуклеокапсид, дві молекули одноланцюгової РНК і 6 структурних білків. [5]

Вірус лейкозу проявляє тропність до лімфоцитів, аглютинуює еритроцити мишей. Розмножується в лейкоцитах, відрізняється від інших ретровірусів антигенними властивостями, морфогенезом, здатністю утворювати синцитії в одношарових культурах. Виявлено в молозиві та клітинах молочної залози спонтанно хворих тварин. Вірус лейкозу великої рогатої худоби неможливо виділити зі слини, носового слизу, сечі або сперми. Велика рогата худоба, експериментально або спонтанно заражена вірусом лейкозу, залишається інфікованою на все життя, незважаючи на наявність в її організмі специфічних антитіл. Нездатність організму

елімінувати вірус лейкозу великої рогатої худоби пов'язана з його перебуванням в непродуктивному стані в інфікованих лімфоцитах. [6]

Доведено, що вірус чутливий до температурних впливів, руйнується при заморожуваннях, що повторюються, і відтаваннях і при прогріванні при 56°C протягом 15 хв. Пастеризація (74°C протягом 16 с.) руйнує вірус лейкозу. Повна інактивація вірусу в молоці чи інших рідинах (кров, молозиво) встановлена при +50°C протягом 70 с, при +70 . 74°C - за 17 с [6]. Передача вірусу відбувається різними шляхами, а саме: при безпосередньому контакті здорової та хворої тварин, через медичний інвентар, через комах (кліщів, сліпнів, комарів), через сперму бугаїв, трансплацентарно [7, 8, 9].

1.3. Патогенез

Перебуваючи в клітині, вірус лейкозу може залишатися тривалий час приховано, не провокуючи захворювання. Основним фактором патогенезу лейкозів є порушення нормального процесу проліферації та диференціювання клітин. кровотворної тканини. Найчастіше уражаються лейкобластні клітини, що призводить до інтенсивного розмноження різних видів лейкоцитів в органах кровотворення. Неконтрольоване розмноження клітин крові. поширюються по всьому організму і потрапляють в різні органи і тканини, утворюють пухлини, які викликають зміни в структурі і функції уражених органів внаслідок атрофії специфічних клітин. Порушення виявлено на на молекулярному, клітинному та органному рівнях, що призводить до порушення гемопоезу та збільшення кількості лімфоцитів [10]. У тварин, хворих на лейкоз, спостерігаються зміни в структурі лімфоїдних клітин і рибонуклеопротейнових комплексів, що призводить до більш міцного зв'язку між РНК і білками. У геномі бласттрансформовані клітинні зміни розглядаються як фактори, що впливають на диференціацію клітин. У деяких, найчастіше дорослих тварин, які є носіями спадкової схильності, з додатковими молекулярно-біологічними та імунобіологічними змінами в клітині захворювання

проявляється гематологічними, рідше пухлинними змінами в органах кровотворення [11, 12, 13].

1.4 Симптоми та клінічний перебіг

Інкубаційний період при спонтанному зараженні великої рогатої худоби триває 2 - 6 років, при експериментальному - від 2 місяців до 2 років. У дорослих тварин перебіг хвороби хронічний (місяці, роки) без певних порушень загального стану організму. Часто діагностується лімфобластний лейкоз, лімфо- і ретикулосаркома. При лейкозах, залежно від інтенсивності розростання лейкозної тканини та залучення до процесу певних життєво важливих органів, симптоми захворювання в одних випадках нарастають протягом днів і тижнів, в інших — протягом місяців і років.

Летальний кінець може настати швидко або через тривалий час (6 і більше років). Виділяють три стадії захворювання: початкову, гостру і термінальну.

Початковий етап характеризується систематичністю або ураження органів кровотворної системи (лімфовузли, селезінка, кістковий мозок) зустрічаються рідко. На цій стадії клінічні ознаки лейкозу відсутні. При гематологічному дослідженні спостерігаються кількісні зміни клітинного складу крові - збільшення кількості лейкоцитів, підвищення вмісту лімфоцитів, поява незрілих і патологічно змінених форм клітин. На цьому етапі наявність інфекції встановлюється імунологічними дослідженнями.

У запущеній стадії уражається вся кровотворна тканина. Проліферація клітин відзначається не тільки в органах кровотворення, але і в інших. Характерні гематологічні зміни в крові, які залежно від форми лейкозу супроводжуються збільшенням кількості лімфоцитів, лімфобластів, гемоцитобластів і одночасним зменшенням кількості нейтрофілів. У цей час з'являються різноманітні клінічні ознаки, пов'язані з пухлинними розростаннями в різних органах і лімфатичних вузлах: екзофтальм,

прогресуюче збільшення лімфатичних вузлів, селезінки, печінки, пухлини в різних частинах тіла.

У термінальній стадії у тварин з'являються специфічні клінічні ознаки лейкозу, які в нездорових стадах є достатніми показниками для визнання їх хворими, а в здорових - приводом для встановлення попереднього діагнозу та обов'язкового додаткового дослідження на лейкоз. Характерними клінічними ознаками лейкозу вважаються: симетричне (при лейкозі) або асиметричне (при ретикульозі) збільшення поверхневих лімфатичних вузлів (підщелепних, привушних, передлопаткових, надпоперекових, підколінних), а також глибоких пахових лімфатичних вузлів; утворення окремих пухлин або конгломератів в лімфовузлах, внутрішніх органах і тканинах; помутніння склоподібного тіла і рогівки. Пухлини в зобі зустрічаються і у молодих тварин. Уражені лімфовузли рухливі, безболісні, щільні, іноді досягають розміру кулака дорослої людини. При ректальному дослідженні виявлені лейкозні зміни в печінці, селезінці, матці, яєчниках, при перкуторному дослідженні - збільшення меж печінки. Можливі розриви селезінки і раптова смерть тварини внаслідок внутрішньої кровотечі. Серед неспецифічних супутніх ознак лейкозу слід відзначити виснаження, ціаноз або жовтяницю слизових оболонок, зниження молочної продуктивності. Спостерігаються серцева слабкість, падіння артеріального тиску, набряк підшкірної клітковини в ділянці міжщелепного проміжку та нижньої частини грудної клітки. Іноді спостерігаються розлади травного тракту (діарея, запор, атонія, тимпанія).

Якісні гематологічні показники в цій стадії мають постійний, іноді прогресуючий характер з високим рівнем лімфоцитозу. На відміну від лейкемії ретикульоз не супроводжується значними змінами картини крові, за винятком окремих форм, для яких характерна поява в крові клітин моноцитарного типу і підвищений вміст еозинофілів. Алейкемічні форми, як з групи ретикульозів, так і з групи лейкозів важко діагностуються гематологічними методами.

У овець і кіз лейкоз найчастіше спостерігається у віці 3-7 років. Перебіг захворювання прихований, у лімфоїдній формі, з сублейкемічним або алейкемічним проявом. У хворих тварин спостерігаються слабкість, підвищена спрага, збільшення поверхневих лімфатичних вузлів, поганий апетит [14, 15].

1.5 Патологоанатомічні зміни

При розтині трупів тварин, які загинули від лейкозу великої рогатої худоби, виявлені численні патологічні розростання лімфоїдних і кровотворних тканин. У більшості випадків спостерігається патологічний ріст пухлини захоплює лімфатичні вузли, ступінь ураження яких може досягати 98% [10].

При ураженні лімфатичні вузли зберігають форму, найчастіше залишаються м'якими і не мають підвищеної місцевої температури, але значно збільшуються в розмірах, рідко мають тверду консистенцію. Вони мають щільну капсулу, яка перешкоджає зрощенню пухлини з прилеглими тканинами. При розрізі такого лімфовузла може витікати густа білувата рідина, поверхня цього розрізу матиме сірувато-білий або жовтий відтінок, іноді з точковими крововиливами, що нагадують мозаїчний малюнок [6].

Характерні зміни селезінки при лейкозі - орган збільшується в 7-10 разів, капсула напружується. Однією з можливих причин раптової смерті тварини при цьому захворюванні є розрив селезінки внаслідок її надмірного збільшення і виникнення внутрішньої кровотечі. Зовні капсула може бути нерівномірно потовщеною, внаслідок розростання пухлинної тканини. На розрізі поверхня гладка, пульпа насичено-малинового кольору, пухкої консистенції, іноді видно зрощені лейкозні вузлики пухлинного походження. Внаслідок захворювання може спостерігатися сильна інфільтрація пульпи, трабекул і капсули селезінки лімфоїдними клітинами.

Також вірус негативно впливає на кістковий мозок, викликаючи розростання лейкозної тканини в губчасту речовину. Тоді ви можете

спостерігати червоні та темно-червоні з біло-сірими пухлинними тканинами, іноді з жовтим відтінком [13].

Патологічні зміни в серці носять дифузний, рідше вогнищевий характер. Дифузне ураження серця характеризується потовщенням стінки за рахунок розростання вузликів лейкозної тканини різної величини, як правило, сірувато-білого кольору. Часто виявляються утворення у вигляді скупчень або поліпів в порожнині передсердь. Вогнищеві ураження серця характеризуються появою вогнищ мозаїчної структури без видимих чітких меж. Волокна атрофовані [13, 6].

Також печінка може бути збільшена в результаті патологічного процесу. Краї заокруглені, консистенція щільна, колір може наближатися до глини. [13, 6].

У корів часто спостерігається ураження матки та яєчників, що супроводжується потовщенням стінок рогів, тіла та шийки матки, а також патологічним розростанням тканини в яєчниках, що нагадує саркому [13, 6].

1.6 Діагностика

Включає гематологічні, цитологічні, гістологічні та серологічні дослідження. Основним методом прижиттєвої діагностики лейкозів є серологічно - імунодифузійна реакція (РІД). Їх відправляють в лабораторію для серологічного дослідження 2 - 3 мл сироватки крові, для гематологічного дослідження - кров з яремної вени, яку збирають у пробірки з антикоагулянтом. Для цитологічного дослідження мазки готують зі свіжої або стабілізованої крові на знежирених предметних скельцях. Для патологоанатомічного дослідження вирізають шматочки (2 x 1,5 см) селезінки, лімфатичних вузлів, печінки, нирок, легенів, серця і правого передсердя серцевого м'яза, сичуга, тонкої і товстої кишок, матки і скелетних м'язів. [16, 17, 18]

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. [17]

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.

1.7 Диференційна діагностика

З метою диференційної діагностики необхідно виключити такі інфекційні захворювання, як актиномікоз, туберкульоз, паратуберкульоз, бруцельоз, а також паразитарні (бабезіоз) і неінфекційні захворювання. Актиномікоз супроводжується ураженням переважно лімфатичних вузлів голови і грудної порожнини, які мають щільну консистенцію і містять інкапсульовані абсцеси. При туберкульозі частіше інфікуються легені і кишечник, виявляються туберкульозні вузлики з характерною гістологічною будовою. Бактеріологічне дослідження встановлює конкретного збудника. Необхідно пам'ятати про можливість одночасного захворювання на туберкульоз і лейкоз. При паратуберкульозі спостерігається ураження кишечника і мезентеріальних лімфовузлів. На відміну від лейкозу паратуберкульоз часто супроводжується лейко- і лімфопенією. [17]

Паратуберкульозну паличку виявляють при мікроскопії пофарбованих мазків зі стінок слизової оболонки кишки та бактеріологічному дослідженні.

Перебіг бруцельозу характеризується абортами, дослідження на РЗК і РА дають змогу достовірно діагностувати це захворювання. Різноманітні неінфекційні захворювання диференціюють на підставі їх тимчасового характеру і помірної проліферації клітин ретикулогістіоцитарної системи. Бабезіоз диференціюють за виявленням кров'яних паразитів у мазках крові. Гепатити різної етіології, які також змінюють показники крові, діагностуються на підставі результатів відповідних досліджень. [16, 17]

1.8 Профілактика і заходи боротьби

Включають комплексні ветеринарно-санітарні, оздоровчі та спеціальні протилейкозні заходи. Сприятливий при лейкозі. У державних стадах раз на рік корів перевіряють на лейкоз. Кожні 6 місяців перевіряють репродукторів бугаїв на племінних підприємствах і кров'яних тварин на біофабриках. Тварин, завезених у господарство з метою вирощування та використання, в період карантину серологічно досліджують на лейкоз. При виявленні в імпортованих тварин позитивних серологічних реакцій на лейкоз усе імпортоване поголів'я повертають у господарство постачальника або за погодженням з ним направляють на забійний пункт. Категорично заборонено завозити серологічно позитивних тварин у здорові стада. Формування ферм, орендних та одноосібних господарств проводиться тільки з серологічно негативних тварин. [19]

Господарство, в якому за результатами двох серологічних досліджень з інтервалом 30 - 45 днів виявлено лейкоз, оголошується неблагополучним щодо лейкозу і в ньому вводяться карантинні обмеження. При виявленні в окремих тварин патоморфологічних змін, характерних для лейкозу, проводять дворазове серологічне дослідження з інтервалом 30 - 45 днів у всього поголів'я старше 4 - 6 місяців. За негативними результатами дослідження господарство визнано благополучним. При виявленні РІД-позитивних тварин їх ізолюють в окремі приміщення. Заборонено використовувати в неблагополучному стаді без попередньої дезінфекції молоко для громадського споживання, згодовування ним тваринам, продаж

державі та ринкам. Реалізація тварин на розведення, використання та відгодівлю, використання бугаїв-плідників для злучки корів і телиць, використання сперми серологічно позитивних бугаїв-плідників, перегрупування тварин без відома ветеринарного лікаря не допускається. Стада, уражені лейкозом, лікуються при зараженні корів до 6% шляхом забою всіх серопозитивних тварин. [20, 21]

Заходи в благополучних щодо лейкозу стадах, фермах, господарствах.

Благополучним щодо лейкозу ВРХ є стадо, ферма, господарство, у яких при дослідженнях за допомогою РІД, ІФА або ПЛР отримані негативні результати.

Серологічні дослідження тварин проводять за допомогою РІД і ІФА починаючи з 6-місячного віку. У разі потреби використовують ПЛР. [22, 23, 24]

Періодичність досліджень тварин У господарствах різних форм власності та населених пунктах, які є благополучними 5 років і більше, - один раз на рік, а менше 5 років.

Бугаїв-плідників у племпідприємствах, корів у господарствах-постачальниках молока для виготовлення продуктів дитячого харчування, корів у племінних господарствах та тварин - продуцентів крові для біофабрик та біоцехів - через кожні шість місяців.

Тварин, завезених з племінною і господарчою метою, досліджують на лейкоз за допомогою РІД, ІФА або ПЛР: у господарстві-постачальнику - не раніше ніж за 30 днів до реалізації; у господарстві-покупці - у період карантинування. [22]

При встановленні позитивного діагнозу на лейкоз у період карантинування у завезених тварин все поголів'я, яке надійшло, повертається господарству-постачальнику (продавцю) або забивається (при його згоді). Забороняється введення інфікованих вірусом лейкозу тварин у благополучні стада. Формування фермерських, орендних та індивідуальних господарств проводять тільки серологічно негативними тваринами.

Тварин, завезених з інших країн, у період карантинування в країні-експортері та після завезення досліджують згідно Інструкції.

Реалізація тварин з благополучних господарств дозволяється без обмежень за умови, що такі тварини за 30 днів до цього були досліджені серологічно з негативним результатом.

Заходи в неблагополучному щодо лейкозу господарстві, фермі, стаді, господарство, ферму, стадо, присадибне господарство, у яких лейкоз встановлено методами, перерахованими в Інструкції, оголошують неблагополучними щодо лейкозу і встановлюють карантинні обмеження. У неблагополучному господарстві розробляється план організаційно-господарських, ветеринарно-санітарних і спеціальних заходів з ліквідації лейкозу, у якому вказують терміни оздоровлення, призначають відповідальних осіб, який затверджується головним державним інспектором ветеринарної медицини району (міста), та додається до рішення державної надзвичайної протиепізоотичної комісії при райдержадміністрації чи міській раді щодо введення карантинних обмежень.

У разі встановлення в окремих тварин тільки клініко-гематологічних, патолого-анатомічних або гістологічних змін, характерних для хвороби, проводять двократне серологічне дослідження тварин стада старше шестимісячного віку з інтервалом 30-45 днів. Якщо при цьому не виявлені антитіла до вірусу лейкозу, господарство вважається благополучним.

Виявлених при дослідженні хворих тварин таврують літерою "Л" на лівому масетері або мітять іншим способом, ізолюють в окремі приміщення. У неблагополучному щодо лейкозу стаді, фермі, присадибному господарстві забороняється: використовувати молоко без попереднього знезараження для громадського харчування і згодовування тваринам, реалізовувати його переробним підприємствам та на ринках; молоко корів неблагополучних на лейкоз присадибних господарств громадян використовується лише після знезараження в межах цього господарства; випасати хворих на лейкоз тварин разом із здоровими в загальних стадах; реалізовувати тварин з

племінною та користувальною метою; проводити повторні дослідження хворих тварин, використовувати бугаїв-плідників для парування корів і телиць; використовувати сперму інфікованих ВЛВРХ бугаїв-плідників. Запаси сперми, отримані від таких бугаїв за 6 місяців до встановлення діагнозу на лейкоз, підлягають знищенню; перегруповувати тварин без відома спеціалістів державних установ ветеринарної медицини; заготовляти кров і молозиво для виготовлення ветеринарних і медичних лікувально-профілактичних препаратів, проводити гемотерапію; вивозити велику рогату худобу з гематологічними та клінічними ознаками лейкозу за межі господарства для відтворення чи відгодівлі; використовувати нестерильні інструменти, прилади, апарати при проведенні лікувально-профілактичних, зоотехнічних і технологічних заходів; доїти одними доїльними апаратами корів, заражених та вільних від ВЛВРХ; використовувати одне родильне приміщення для хворих на лейкоз та здорових корів; використовувати молозиво хворих на лейкоз корів для напування телят, отриманих від здорових корів; використовувати хворих на лейкоз телиць для відтворення стада.

Оздоровлення неблагополучних щодо лейкозу стад (ферм) проводять: Шляхом одночасної повної заміни неблагополучного стада, при його інфікуванні більше 30 відсотків, тваринами з благополучних щодо лейкозу господарств.

Шляхом проведення систематичних досліджень з виділенням із стада хворих тварин. Серопозитивних тварин досліджують клініко-гематологічно протягом 15 днів після розділення стада, а надалі один раз на рік. Тварин з гематологічними або клініко-гематологічними ознаками лейкозу не пізніше ніж через 15 днів після їх виявлення здають на забій. Система оздоровчих заходів залежить від діагностичних засобів.

Дослідження тварин старше 6-місячного віку проводять з інтервалом 10-30 діб до отримання негативного результату по стаду. Наступні дослідження проводять через 30-45 діб до отримання двох поспіль

негативних результатів. У разі виконання усіх заходів, передбачених цією Інструкцією, господарство оголошують благополучним. Протягом двох років після оздоровлення серологічний контроль проводять щокварталу.

4.5.4. Оздоровчі заходи на основі ІФА: Дослідження тварин старше 6-місячного віку проводять через 30-45 діб до отримання підряд двох негативних результатів. За умови виконання інших заходів, передбачених цією Інструкцією, господарство оголошують благополучним. Протягом двох років після оздоровлення серологічний контроль проводять через кожні 6 місяців. 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, як указано в підпункті цієї Інструкції. Оздоровчі заходи проводять згідно Інструкції до отримання негативного результату, надалі виконують вимоги Інструкції. 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. Молоко від серопозитивних тварин, яких утримують ізолювано від серонегативного стада, пастеризують у господарстві при температурі не нижче 80 град.С (тільки при такому режимі можна контролювати якість пастеризації за допомогою реакції на пероксидазу), після чого його можна використовувати для згодовування телятам або здавати на молокозавод. Молоко від корів серонегативного стада можна реалізовувати переробним підприємствам без попередньої пастеризації. У разі, коли серопозитивні на лейкоз тварини не відділені від загального стада, молоко від усього поголів'я ферми підлягає пастеризації в зазначених режимах. В окремих випадках допускається з письмового дозволу головного державного інспектора ветеринарної медицини Автономної Республіки Крим, областей, міст Києва та Севастополя, районів, міст тимчасове вивезення сирого молока окремим

транспортом на молокозавод для технологічної пастеризації і подальшої переробки за наявності на молокопереробному підприємстві окремої лінії для приймання такого молока. Молоко від серопозитивних тварин, яких утримують ізольовано від серонегативного стада, може піддаватися сепарації в господарстві. При цьому на молокопереробне підприємство вивозять тільки пастеризовані вершки, відвійки кип'ятять і згодовують тваринам. Молоко від корів з клініко-гематологічними ознаками лейкозу забороняється використовувати з харчовою метою та згодовувати тваринам. Таке молоко знешкоджують додаванням до нього 5-процентного формальдегіду або іншої дезінфекційної речовини.

У неблагополучних щодо лейкозу господарствах телят до 7-денного віку випоюють материнським молозивом (молоком), а надалі – пастеризованим молоком оздоровленого стада або серонегативних корів неблагополучного стада.

При виявленні хворих тварин у племінних господарствах або фермах такі господарства оголошуються неблагополучними.

Після кожного дослідження та ізоляції хворих тварин проводять дезінфекцію приміщень і обладнання. Для дезінфекції застосовують 2% розчин їдкого натрію, 2% розчин хлорного вапна та хлорвмісних препаратів, 5% розчин кальцинованої соди, 2% розчин формаліну, інші дезінфекційні засоби, зареєстровані в Україні.

Хворих тварин забороняється забивати в господарствах, їх забій проводиться на бойнях та м'ясопереробних підприємствах під контролем офіційних лікарів. Приміщення та обладнання після забою хворих тварин підлягають старанному прибиранню та дезінфекції. Усі випадки виявлення лейкозу, а також пухлин різного походження при здійсненні ветеринарно-санітарної експертизи реєструються у відповідних журналах та подаються у звітах. Про виявлення у забитих тварин патолого-анатомічних змін, характерних для лейкозу, повідомляють їх власника та головного державного інспектора ветмедицини району, де знаходиться господарство.

Ветеринарно-санітарна оцінка туш, внутрішніх органів та інших продуктів забою хворих на лейкоз тварин здійснюються відповідно до правил передзабійного ветеринарного огляду тварин і ветеринарно-санітарної експертизи м'яса та м'ясних продуктів, затверджених наказом Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України від 07.06.2002 № 28 та зареєстрованих у Міністерстві юстиції України 21.06.2002 за № 524/6812. 4.11. Господарство, ферму, стадо вважають оздоровленими після вивезення усіх хворих тварин та отримання двох поспіль негативних результатів (з інтервалом 30-45 днів) серологічного дослідження худоби старше 6-місячного віку. У перший рік після оздоровлення серологічні дослідження проводять щокварталу. [16, 25, 26, 27]

1.9. Ветеринарно санітарна експертиза

Хвора й підозрювана в захворюванні тварина підлягає забою лише на санітарних бойнях, але трапляються випадки, коли лейкоз доводиться діагностувати на конвеєрі забійного цеху. Для лейкозу характерне: збільшення лімфатичних вузлів, набрякла поверхня розрізу, сіро-білого або сіро-чорного кольору, а інколи з казеозними осередками некрозу, жовтого і коричневого забарвлення. Такі ж зміни спостерігаються в селезінці, печінці, серцевому м'язі та в інших органах. Часто буває уражена мускулатура. М'язи в'ялі, світло-червоного кольору з жовтуватим або білуватим відтінком. На їх розрізі виявляють салоподібні й лейкомічні розростання та дегенеративні зміни. У свиней лімфатичні вузли збільшені в 10—40 разів, на поверхні розрізу помітні мозкоподібні набухання і характерне жовтувато-зеленувате забарвлення. Селезінка при лейкозі значно збільшена, у великої рогатої худоби досягає 18—40 кг, у свиней — більше 5 кг, має щільну консистенцію, поверхня розрізу горбиста з різко помітними розрослими фолікулами сіро-білого кольору. Печінка при дифузному ураженні крихкої й ламкої консистенції, різко збільшена: у великої рогатої худоби досягає 35 кг і більше, у свиней — 7—8 кг. Нирки

пошкоджуються часто (до 56 %). При дифузному ураженні в корковому шарі виявляють численні сіро-білі салоподібні вузлики з крововиливами; маса нирок досягає 8—10 кг. Санітарна оцінка м'яса. При будь-якій формі лейкозу у випадках ураження м'язів, лімфатичних вузлів туші, декількох паренхіматозних органів або у разі виявлення лейкозних розростань (бляшок) на серозних покриттях, незалежно від вгодованості, тушу та інші продукти забою (крім шкір) утилізують. За умов ураження окремих лімфатичних вузлів або органів, але за відсутності змін у скелетній мускулатурі, такі лімфатичні вузли й органи направляють на утилізацію, а туші та неуразені органи використовують залежно від результатів мікробіологічного дослідження. У разі виявлення сальмонел тушу і неуразені органи направляють на проварку або виготовлення консервів, а за їх відсутності — на виготовлення ковбасних виробів. Якщо результат гематологічного дослідження тварини на лейкоз позитивний, але патологічних змін, властивих лейкозу, немає, тушу й органи направляють на виготовлення варених ковбасних виробів, м'ясних хлібів, консервів. Якщо ж позитивний результат дає тільки імунологічне дослідження тварини, продукти забою використовують для виготовлення варених ковбас. Шкури у разі шкіряної форми лейкозу утилізують, а за інших форм — дезінфікують. Ветеринарно-санітарні заходи. Тварин, хворих або підозрюваних у захворюванні, забивають на санітарній бойні. Якщо її немає, забій проводять на загальному конвеєрі після забою здорових тварин. Після забою хворих (підозрюваних) тварин приміщення і обладнання дезінфікують: спочатку зрошують 2 %-м розчином їдкого натру (70—80 °C), потім миють гарячою водою і знову зрошують 4 %-м гарячим розчином їдкого натру або розчином хлорного вапна, що містить 2 % активного хлору. Після годинного провітрювання приміщення промивають водою (70—80 °C) і дозволяють їх експлуатацію. Інструменти знезаражують 2 %-м розчином їдкого натру (70—80 °C) або 2 %-м розчином хлорного вапна (в перерахунку на активний хлор)

Лейкоз. При будь-якій формі лейкозу у випадках ураження м'язів, лімфатичних вузлів туші, декількох паренхіматозних органів або у разі виявлення лейкозних розростань (бляшок) на серозних покриттях, незалежно від вгодованості, тушу та інші продукти забою (крім шкур) утилізують. За умов ураження окремих лімфатичних вузлів або органів, але за відсутності змін у скелетній мускулатурі, такі лімфатичні вузли й органи направляють на утилізацію, а туші та неуразені органи використовують залежно від результатів мікробіологічного дослідження. У разі виявлення сальмонел тушу і неуразені органи направляють на проварювання або виготовлення консервів, а за їх відсутності — на виготовлення ковбасних виробів. Якщо результат гематологічного дослідження тварини на лейкоз позитивний, але патологічних змін, властивих лейкозу, немає, тушу й органи направляють на виготовлення варених ковбасних виробів, м'ясних хлібів, консервів. Якщо ж позитивний результат дає тільки імунологічне дослідження тварини, продукти забою використовують для виготовлення варених ковбас. Шкури у разі шкіряної форми лейкозу утилізують, а за інших форм — дезінфікують. [28, 30]

1.10. 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.

Історія створення

Історію розробки антитіл можна простежити до вісімнадцятого століття, коли було виявлено, що рідина, отримана з пустули віспи, коли її вводять реципієнту, забезпечує імунітет від захворювання. Едвард Дженнер, який, як відомо, використовував рідину з пустул коров'ячої віспи для імунізації проти віспи, просунув ці дослідження. Відкриття антитіл можна віднести до фон Берінга та Кітасато, які в 1890 році опублікували знаменний висновок про те, що перенесення сироватки від тварин, які були імунізовані проти дифтерії, тваринам, інфікованим дифтерією, змінювало перебіг хвороби. У двадцятому столітті новаторська робота Пауля Ерліха та Еміля Фішера щодо конфігурації антитіла була чудовим прогнозом поточного розуміння структури антитіла. У 1972 році Нобелівська премія була присуджена Джеральду Едельману та Родні Портеру за їхній внесок у розуміння хімічної структури антитіл.

Концепція моноклональних антитіл була заснована в 1930-х роках, коли Макмастер і Худак виділили аглютиніни з лімфатичних вузлів. Подальша робота Харріса ідентифікували лімфоцити як джерело продукції антитіл. У 1942 році Vjorneboe і Gormsen порівняли проліферацію плазматичних клітин із виробництвом антитіл, дійшовши висновку, що плазматичні клітини є основним джерелом виробництва антитіл. У тому ж році Мур, Кабат і Гутман опублікували революційне дослідження характеристик білків Бенс-Джонса, характерних для мієломи. Багато досліджень 1940-1960-х років були зосереджені на фізичних описах цих білків із припущеннями про їхнє моноклональне походження, з першим підтвердженням їх походження з одного клону плазматичних клітин, опублікованому Awdeh з Національного інституту медичних досліджень у Лондоні (NIMR).

Антитіла традиційно отримували шляхом імунізації піддослідних тварин антигеном з подальшим очищенням сироватки з метою виділення фракції антитіл. У 1970 році Бріжит Асконас з NIMR описала методику, за якою вони виділили один клон плазматичних клітин, який генерував

однорідне антитіло, розмножене повторним пасажем клітин селезінки в опромінених сингенних мишей, очевидно, перший опис лабораторного виробництва моноклональних антитіл. У 1975 році Келер і Мільштейн опублікували революційну статтю, в якій вони об'єднали плазматичні клітини, що виробляють антитіла, з клітинами міеломи, останніми, які через свою трансформовану природу можна було розмножувати в культурі нескінченно довго. Перевага цієї методики полягає в тому, що вона дозволила виробляти необмежену кількість антитіл *in vitro*. Таким чином, «гібридома» народилася з її обіцянкою виробляти необмежену кількість моноспецифічних антитіл, інновація, яка назавжди змінила сферу імунології, визнана присудженням Нобелівської премії в 1984 році Келеру та Мільштейну. З 1975 року удосконалення техніки дозволило виробляти сконструйовані, повністю гуманізовані антитіла, придатні для терапії людей. Моноклональні антитіла перебували на стадії клінічної розробки, і згодом були схвалені Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA) для клінічного використання в 1985 році.

Отримання моноклональних антитіл. Гібридомна технологія, розроблена Колером і Мільштейном (1975), дозволяє отримати серологічний реагент, який є не тільки однорідним і передбачуваним, але також адаптованим до потреб кожного з багатьох застосувань імунологічних реагентів (для повного огляду див. Мільштейном, 1980).

Основою гібридомної технології є іморталізація В-лімфоцитів із здатністю виробляти антитіла, але обмеженими характеристиками росту *in vitro*. Лімфоцити зливаються з клітинами з лінії пухлинних клітин, які не продукують антитіла та постійно зростають, або клітинної лінії міеломи, щоб гібриди продовжували виділяти антитіла, зберігаючи безсмертя батьківської пухлинної клітини. Оскільки кожен В-лімфоцит виробляє молекулу імуноглобуліну з фіксованою специфічністю, клони, отримані з гібридизованих популяцій клітин, є однорідними за своєю природою, і

кожен із клонів секретує імуноглобулін з єдиною молекулярною структурою та антигенною специфічністю. Таким чином, усі молекули антитіл, що секретуються однією клітинною лінією, демонструють ідентичну специфічність, афінність та ізотип (клас або підклас). Антитіла, отримані за допомогою процедури злиття, відомі як моноклональні антитіла, що відрізняє їх від гетерогенних поліклональних антитіл, отриманих шляхом звичайного виробництва антитіл. Клони, що продукують антитіла, можна зберігати в рідкому азоті в життєздатному стані та вилучати за бажанням для культивування та виробництва відповідного антитіла. [31]

Технологія гібридом

Перший крок: імунізація

Дослідники вводять ссавцю, як правило, миші, цільовий антиген, стимулюючи імунну відповідь. Ін'єкція антигену може відбуватися серією протягом кількох тижнів. Потім дослідники збирають селезінку миші, щоб отримати В-клітини, які виробляють бажане антитіло.

Другий крок: злиття клітин

Дослідники зливають В-клітини, що виробляють антитіла, з клітинами мієломи в культурі клітин. Поліетиленгліколь (ПЕГ) сприяє злиттю плазматичних мембран обох клітин, утворюючи одну гібридомну клітину з двома або більше ядрами. Крім того, можуть використовувати вірус Сендай для злиття клітин.

Третій крок: ріст гібридомних клітин

Менше 1% початкових клітин зливаються з утворенням клітин гібридами. Невикористані В-клітини в культурі перестають ділитися природним шляхом. Дослідники використовують середовище НАТ (гіпоксантин-аміноптерин-тимідин), щоб забезпечити селективну проліферацію клітинних ліній безсмертних моноклональних антитіл. НАТ блокує основний шлях синтезу ДНК. Аміноптерин у середовищі НАТ зупиняє синтез нуклеотидів, тоді як гіпоксантин і тимідин можуть

використовуватися клітинами, такими як В-клітини, що несуть фермент HGPRT (гіпоксантин-гуанін фосфорибозил трансфераза). Клітини гібридами з функціональним ферментом HGPRT можуть виживати та рости, тоді як клітини мієломи, у яких його немає, зрештою гинуть.

Четвертий крок: скрінінг

Дослідники часто перевіряють гібридомні клітини на моноклональні антитіла, що цікавлять, за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Непрямий ELISA ідентифікує антитіла з відповідною специфічністю шляхом іммобілізації антигену на поверхні та інкубації його з супернатантом клітин гібридами. Дослідники також використовують такі методи, як вестерн-блот, проточна цитометрія та імунопреципітаційна мас-спектрометрія для скрінінгу своїх гібридомних культур.

П'ятий крок: культивування гібридом

Останній етап включає клонування бажаних гібридомних клітин для отримання стабільної клітинної популяції та вирощування культури для збору великої кількості моноклональних антитіл. Цього можна досягти одним із двох методів: вирощування гібридних клітин в культурі тканин *in vitro*, зростання *in vivo* після інокуляції клітин гібридами в черевну порожнину миші. [31, 32]

Використання моноклональних антитіл

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.

Моноклональні антитіла в діагностиці та терапії

Захворювання пов'язані з імунною системою

Моноклональні антитіла зробили революцію в лікуванні аутоімунних захворювань, і за останні три десятиліття було запущено декілька моноклональних антитіл для лікування цих захворювань. Аутоімунні захворювання характеризуються активацією аутореактивних CD4+

лімфоцитів у периферичних лімфатичних вузлах, де Т-клітини взаємодіють з антигенпрезентуючими клітинами (АРС) і В-клітинами. Активовані Т-клітини проліферують і мігрують у паренхіму органу-мішені захворювання, де розпізнавання ендогенних лігандів призводить до вироблення цитокінів і прозапальних молекул, що призводить до пошкодження клітин і прогресування захворювання. Моноклональні антитіла можуть націлюватися на різні компоненти імунної системи для придушення надмірних реакцій, характерних для аутоімунних захворювань. Деякі з механізмів моноклональних антитіл для лікування аутоімунних розладів включають блокаду та виснаження Т-клітин та/або В-клітин, пригнічення взаємодії між Т-клітинами та антигенпрезентуючими, блокада рекрутування Т- і В-клітин, блокада диференціювання або активації Т-клітин і блокада прозапальних цитокінів. Останній є найбільш широко використовуваним підходом, особливо використання моноклональних антитіл, націлених на TNF- α , цитокін, який відіграє важливу роль в аутоімунітеті, який індукує вазодилатацію та запалення. Ці антитіла використовуються для лікування ревматоїдного артриту більше десятиліття, а також демонструють ефективність при псоріатичному артриті, хворобі Крона, виразковому коліті, псоріазі та анкілозуючому спондиліті. [32,33]

Онкологія

Було розроблено низку моноклональних антитіл для лікування різних неоплазій, включаючи як гематологічні злоякісні новоутворення, так і солідні пухлини. Перший підхід полягає у використанні моноклональних антитіл для націлювання на пухлинні антигени та знищення ракових клітин. Основними мішенями для терапевтичних МАТ для протипухлинних показань є рецептори фактора росту, які надмірно експресуються в пухлинних клітинах, такі як члени рецептора епідермального фактора росту (EGFR) сім'ї, включаючи EGFR і HER2, МАТ блокують ці рецептори, у свою чергу блокуючи зв'язування ліганду/передачу сигналів, що може зменшити швидкість росту, індукувати апоптоз і підвищити чутливість

пухлин до хіміотерапії. Прикладом такого терапевтичного підходу є блокада рецептора HER2 трастузумабом (Герцептин) та іншими МАТ, що використовуються для лікування HER2-позитивного раку молочної залози. Гіперекспресія HER2 спостерігається у 30% випадків інвазивного раку молочної залози. Трастузумаб пригнічує димеризацію та інтерналізацію рецептора, що призводить до ендоцитного руйнування рецептора та імунної активації. Інші мішені, окрім факторів росту, включають антигени гемопоетичної диференціації (CD20, CD30, CD33, CD52), які є глікопротеїнами, що знаходяться на поверхні нормальних і пухлинних клітин. МАТ також можна використовувати для селективної доставки радіоізотопів до ракових клітин. Інші МАТ націлені на мікрооточення пухлини з такими ефектами, як інгібування ангиогенезу. Іншим підходом до протипухлинної терапії на основі МАТ є цільове імунних клітин. Ці моноклональні антитела, які також називають інгібіторами імунних контрольних точок, посилюють протипухлинні імунні відповіді. Основні інгібітори імунної контрольної точки націлені на цитотоксичний Т-лімфоцит-асоційований антиген 4 (CTLA-4) і білок програмованої клітинної смерті може бути експресується регуляторними Т-клітинами, що інфільтрують пухлинні ураження, і опосередковує імуносупресію шляхом пригнічення функцій Т-клітин. [33]

1.12.Висновок з огляду літератури

Сьогодні в Україні є багато ферм з різною кількістю великої рогатої худоби. У різних регіонах країни епізоотична ситуація щодо захворюваності на лейкоз неоднакова. Лейкоз — хронічна інфекційна хвороба великої рогатої худоби та ссавців і різних видів птахів, яка характеризується порушення процесу дозрівання клітинних елементів крові, злякисний ріст кровотворних клітин і лімфоїдної тканини, утворення пухлин в різних органах.

Лейкоз завдає великих економічних збитків через вимушений передчасний забій, загибель тварин, значне зниження продуктивності стада

(високопродуктивна худоба часто хворіє на лейкоз), виділення окремих приміщень для хворих на лейкоз, закупівлю окремого обладнання для них. Або додаткова кількість дезінфікуючих засобів. Наразі важлива небезпека – загроза повернення епізоотичного лейкозу на територію господарств, які раніше були відновлені в Україні. Неадекватне проведення реабілітаційних заходів та їх кінцеві результати можуть стати поштовхом до рецидиву. У таких випадках тварини-вірусоносії можуть залишитися в стаді, що може призвести до відновлення інфекційного процесу та повторного його поширення серед сприйнятливих тварин.

В Україні всі заходи щодо лейкозу проводяться відповідно до «Інструкції про профілактика та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу».

В Україні основним методом прижиттєвої діагностики лейкозів є реакція імунодифузії (РІД) та імуноферментний метод (ІФА). Крім того, ELISA використовується у здорових стадах для дослідження об'єднаного зразка молока від групи тварин. Для вивчення особливо цінних тварин і за висновки арбітражу, використовується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Діагноз лейкозу вважається встановленим за наявності одного з таких позитивних результатів: при серологічному дослідженні в РІД; під час дослідження за допомогою ІФА та ПЛР.

Розділ 2. Власні дослідження

2.1. Матеріал та методи досліджень

Робота виконана на базі імунологічного відділу Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області та на кафедрі інфекційної патології, гігієни, санітарії та біобезпеки Полтавського державного аграрного університету.

Об'єктами для дослідження були тваринницькі господарства та поголів'я великої рогатої худоби, що підлягали дослідженню в Полтавській області;

Був проведений збір звітних даних про проведення планових лабораторних досліджень в імунологічному відділі Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області за останні 5 років. Проводилася постановка серологічних реакцій на виявлення антитіл до вірусу лейкозу великої рогатої худоби у реакції імунодифузії (РІД) та шляхом імуноферментного аналізу (ІФА).

Достовірність постановки лабораторного діагнозу багато в чому залежить від правильного відбору та підготовки зразків для дослідження.

Кров (сироватку) направляють в лабораторію на імуноферментний аналіз на лейкоз. При відборі дослідницьких зразків від тварин необхідно дотримуватись правил, наведених у таких 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", "Загальні етичні принципи експериментів на тваринах" (I Національний конгрес з біоетики, Київ, 2001 р.), які зводяться до таких загальних принципів:

- проводити всі маніпуляції з тваринами з дотриманням правил особистої гігієни та техніки безпеки;
- Необхідно запобігати надмірному стресу та випадковому травмуванню тварин, застосовуючи, за необхідності, механічні обмеження або знеболюючі 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.
- Пробірки і ємності з молоком і сироваткою нумерують і упаковують та оформлюють супровідний документ з описом зразків за встановленим зразком.
- У супровідному листі зазначаються вид, стать і вік тварини, від якої взято біологічний матеріал для дослідження, інвентарний номер або кличка, кількість проб і для якого дослідження направляється матеріал, стислий опис клінічних ознак. вказано хвору тварину та патологічні зміни.
- Якість досліджуваних зразків є дуже важливою складовою для отримання коректних результатів імуноферментного аналізу. Чим він вищий, тим точнішими та коректнішими є результати дослідження.
- Якісна сироватка крові повинна мати солом'яно-жовтий або блідо-червонуватий колір. Не повинно бути вираженої гіперліпідемії (хільозу) і

ознак контамінації. Незначний гемоліз не впливає на результати реакції. При дослідженні пулів сироваток крові проби змішують в лабораторії безпосередньо перед дослідженням в рівних об'ємах.

- Під час постановки реакції не допускається потрапляння в лунки мікропланшет тромбу (підвищення фонові реакції в окремих лунках планшета), а також дослідження сироваток, до яких додано консерванти (знижена фонові реакція в окремих лунках планшета).
- Сироватки крові можна зберігати при температурі 4-8°C до 7 днів або -20°C необмежений період часу (до розморожування). Після розморожування зразок необхідно ретельно перемішати і досліджувати протягом 3-4 днів (цей час зразок повинен зберігатися при температурі 4-8 °C)
- У разі виявлення під час здавання матеріалу до лабораторії невідповідності товаросупровідному документу або пошкодження проб складається протокол, копія якого надсилається ветеринарному лікарю, який направив проби до лабораторії. Якщо матеріал надійшов без супровідного листа для дослідження, він не приймається. Значна перевага методу ІФА перед рутинними (РБП, РЗК, РА та ін.) та новітніми (ПЛР, АПФ) реакціями для діагностики лейкозів.

На сьогодні наявна можливість досліджувати не тільки окремі проби, а й пули (проби, взяті від групи тварин, об'єднані в одну пробу). Це дозволяє використовувати наявні у продажу імуноферментні тест-системи для скринінгових досліджень у господарствах (комплексах) із значним поголів'ям худоби.

2.2. Характеристика місця виконання роботи

Регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби в Полтавській області знаходиться за адресою вул. Миру, 2, с. Горбанівка Полтавського району, Полтавської області.

Регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби в Полтавській області 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).

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/EC 17025, ДСТУ ISO 17025.

Основними завданнями Лабораторії є: проведення лабораторних досліджень щодо діагностики хвороб тварин, безпечності та окремих показників харчових продуктів та інших об'єктів санітарних заходів, побічних продуктів тваринного походження, кормових добавок, преміксів, кормів, 4 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; 2) профілактика і діагностика інфекційних, інвазійних та незаразних хвороб тварин; забезпечення організації та проведення планових і непланових діагностичних досліджень. контроль за дотриманням ними методик та виконанням обов'язкового обсягу досліджень (випробувань), режиму роботи і техніки безпеки; захист населення від хвороб, спільних для тварин і людей; сприяння забезпеченню технічної компетентності та/або

проведенню акредитації районних, міських, міжрайонних державних лабораторій ветеринарної медицини, державних лабораторій ветеринарно-санітарної експертизи на ринках, лабораторій суб'єктів господарювання, проведення на своїй базі лабораторних досліджень (випробувань) матеріалів та видача в установленому порядку результатів досліджень (випробувань); підвищення кваліфікації спеціалістів Лабораторії; впровадження в практику досягнень ветеринарної медицини.

До компетенції Лабораторії належать:

- Організація та проведення лабораторно-діагностичних (вірусологічних, бактеріологічних, мікробіологічних.
- Хіміко-токсикологічних, патолого-анатомічних, гістологічних, паразитологічних, радіологічних) та інших досліджень з метою діагностики хвороб тварин.
- Визначення 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; мікробіологічний, радіологічний, паразитологічний, хіміко-токсикологічний контроль та інший лабораторний контроль на потужностях з виробництва та/або обігу об'єктів санітарних заходів; участь у відборі зразків; проведення клінічних досліджень тварин з метою профілактики, установлення причин захворювання або загибелі тварин, проведення державної ветеринарно-санітарної експертизи на агропродовольчих ринках та ярмарках; участь у проведенні державної санітарно-епідеміологічної експертизи; видача експертних висновків, звітів, протоколів досліджень (випробувань) з

рекомендаціями відповідно до законодавства; надання практичної, методичної, консультативної допомоги територіальним органам Держпродспоживслужби, районним, міським, міжрайонним державним лабораторіям Держпродспоживслужби, державним лабораторіям ветеринарно-санітарної експертизи на агропродовольчих ринках, спеціалістам державних установ Держпродспоживслужби, ліцензованим лікарям ветеринарної медицини та у разі звернення - фізичним та юридичним особам області з питань профілактики, діагностики та боротьби з хворобами тварин, проведення відбору зразків та лабораторних досліджень (випробувань), державної ветеринарно-санітарної експертизи харчових продуктів та їх оцінки;

2.3. Результати власних досліджень

Реакція імунодифузії в агаровому гелі (РІД). Суть методу полягає у виявленні в сироватці крові досліджуваних тварин специфічних преципітувальних антитіл до антигенів вірусу лейкозу великої рогатої худоби. Специфічні антитіла з'являються в крові за (2-8) тижнів після інфікування тварини ВЛВРХ і зберігаються в організмі тварин пожиттєво.

Засоби та допоміжні пристрої:

- чашки Петрі діаметром 90 мм — згідно з чинним нормативним документом;
- стандартний штамп-пробійник для утворення лунок в агарі — згідно з чинним нормативним документом;
- піпетки пастерівські або автоматичні зі змінними наконечниками — згідно з чинним нормативним документом;
- рН-метр — згідно з чинним нормативним документом;
- освітлювач — згідно з чинним нормативним документом;
- волога камера з температурою (22—27) °С — згідно з чинним нормативним документом;
- хлорид натрію — згідно з чинним нормативним документом;
- вода дистильована — згідно з ГОСТ 6709;

- набір застандартизованих сироваток крові специфічних до вірусу лейкозу — згідно з чинним нормативним документом;
- комерційний набір для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в РІД, що містять антиген - згідно з ДСТУ 7058,
- специфічну сироватку та агаросольову суміш — згідно з ДСТУ 7059.

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.

Дослідження проводять відповідно до листівки-вкладки до комерційних тест-наборів для РІД. Контролюють специфічну активність антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби згідно з національним стандартом щодо лейкозних сироваток, до складу якого входять:

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

Для встановлення РІД з метою виявлення специфічних антитіл до ВЛВРХ необхідно використовувати 2 АО антигену ВЛВРХ. Розчинений антиген зберігають за температури (2—8) °С не більше двох тижнів. Наважку ССА 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, що має температуру (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 (Додаток А). 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.

Дослідження в РІД на наявність антитіл до ВЛВРХ Антиген, контрольну і випробовувані сироватки вносять до лунок кожної фігури пастерівськими або автоматичними піпетками зі змінними наконечниками. Антиген вносять до центральної лунки, дві діаметрально протилежні лунки заповнюють контрольною специфічною преципітувальною сироваткою крові. Чотири периферичних лунок, що залишилися у фігурі, заповнюють випробовуваними сироватками.

Лунки заповнюють доверху, не допускаючи переливання рідини через край. Після заповнення всіх лунок чашки Петрі закривають кришками й інкубують у вологій камері за температури (22—27) °С (Додаток Б).

Облік результатів Реакцію враховують не раніше ніж за 48 год і не пізніше ніж за 96 год (Додаток В). Чашки переглядають на темному фоні, направляючи сфокусований промінь освітлювача на дно чашки під кутом (30—45)°. Специфічність реакції оцінюють по контрольній лінії преципітації (Додаток Г). Якщо вона відсутня або слабо виражена, то реакцію потрібно повторити. Специфічна лінія преципітації, що сформована преципітувальною контрольною сироваткою та антигеном, повинна бути чітка, мати пряму форму, розташовуватися на однаковій відстані від лунок з антигеном і контрольною сироваткою. Неспецифічною вважають лінію преципітації, яка утворюється між лунками з випробовуваною сироваткою і антигеном, але не зливається з контрольною лінією преципітації, а перетинає її або впирається в неї, утворюючи кут (Додаток Д).

Оцінювання результатів залежно від наявності специфічних антитіл проти антигенів ВЛКРС у випробовуваній сироватці реакцію оцінюють як позитивну або негативну. Позитивною вважають реакцію, якщо між лунками з антигеном і випробовуваною сироваткою утворюється смуга преципітації, яка з'єднується зі смугою преципітації контрольної сироватки, утворюючи безперервну лінію, тобто ідентична їй. Різко позитивною вважають сироватку, якщо контрольна лінія значно укорочена з боку лунки з випробовуваною сироваткою і має розмитий вигин до лунки з антигеном або утворює лінію преципітації, що розташована дуже близько від лунки з антигеном. Слабопозитивною вважають реакцію, якщо лінія преципітації між лунками з випробовуваною сироваткою і антигеном відсутня, але контрольна лінія преципітувальної сироватки утворює поблизу лунки з випробовуваною сироваткою вигин, що направлений у бік лунки з антигеном. Позитивно реагуюча сироватка може утворювати подвійну лінію преципітації, одна з яких розташовується ближче до лунки з випробовуваною сироваткою. Ця лінія указує на наявність в досліджуваній сироватці преципітувальних антитіл не тільки проти глікопротеїдного антигену др51, а проти іншого антигену ВЛКРС - р24. У разі утворення товстої, короткої, без загинів контрольної лінії преципітації, що не доходить до лунки з випробовуваною сироваткою, необхідно провести розтитрування цієї випробовуваної сироватки фізіологічним розчином до отримання результату, який можна буде оцінити як негативний, позитивний або неспецифічний. Для цього необхідно фізіологічний розчин в об'ємі (0,10,5) см³ розлити в пробірки або в лунки стандартних пластикових мікропланшетів для постановки серологічних реакцій (кількість пробірок або лунок відповідає кількості необхідних розведень). У першу пробірку або лунку з фізіологічним розчином вносять рівний об'єм сироватки, ретельно перемішують і переносять тією самою піпеткою в тому самому об'ємі в наступну пробірку або лунку, потім після перемішування в наступну і т. д. Унаслідок цього в першій пробірці або лунці випробовувана

сироватка розведена в 2 рази, - у 4 рази, в третій — у 8 разів тощо. Реакцію вважають негативною, якщо контрольна лінія сягає лунки з випробовуваною сироваткою без загину. Якщо лінія преципітації погано візуалізується або є зона опалесценції навколо лунок, реакцію потрібно переставити. Зрушення контрольної лінії преципітації у бік лунки з антигеном або з контрольною сироваткою указує на порушення співвідношення антигену й антитіл у тест-системі. У цьому випадку необхідно використовувати іншу серію діагностичного набору.

Дослідження щодо виявлення антитіл до вірусу лейкозу великої рогатої худоби проводили методом імуноферментного аналізу за допомогою тест-системи ID Screen BLV Competition (Додаток Е). Дослідження проводили згідно з інструкцією та звикористанням відповідного обладнання [39]. ID Screen BLV Competition - конкурентний імуноферментний аналіз для виявлення антитіл проти BLV gP51 в сироватці чи плазмі крові великої рогатої худоби (окремі зразки або пулів до 10).

На сьогодні для ефективної діагностики бруцельозу та лейкозу ВРХ розроблено значну кількість імуноферментних тест-систем (прямий, непрямий, конкурентний ІФА, тощо). Однак всі вони зводяться до виявлення специфічних антитіл до збудників зазначених зоонозів.

Принцип цих тест-систем заснований на взаємодії антигена з антитілом у лунках спеціальних полістиролових планшетів з подальшим ферментативним виявленням утвореного специфічного імунного комплексу за допомогою ферментного субстрату.

Необхідні реактиви та обладнання для проведення аналізу (Додаток Ж) :

- набір діагностичної імуноферментної тест-системи;
- деіонізована або дистильована вода;
- розчин етилового спирту (70 %);
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1-20 мкл, 50-200 мкл,

- 200-1000 мкл та накінечники до них;
- багатоканальні дозатори (8- або 12-канальні) з перемінним об'ємом на
- 50-300 мкл та накінечники до них;
- мірні циліндри та стакани;
- ванночки для реагентів;
- мікропробірки для попереднього розведення сироваток (за необхідності);
- термостат, з температурою 21 ± 5 °С;
- холодильник; вошер для промивання мікропланшетів;
- 96-луночний електрофотометр (імуноферментний аналізатор) з довжиною хвилі 450-620 нм;
- лабораторний таймер;
- вортекс;
- лабораторний маркер або ручка;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливання відпрацьованих забруднених рідин.

Підготовка до проведення дослідження: перед початком роботи всі компоненти набору та зразки сироваток крові чи молока необхідно довести до кімнатної температури (20-25 °С).

Після цього реагенти ретельно шутлюються до однорідності за допомогою вортекса або обертальними рухами перевертаючи вміст флаконів.

У таблицю, секції якої відповідають номерам лунок мікропланшетів, вноситься нумерація досліджуваних проб (Додаток К). Всі реагенти, необхідні для проведення ІФА, потрібно готувати у ході постановки, щоб мінімізувати їхній контакт зі світлом та повітрям приміщення, враховуючи необхідний об'єм для кількості досліджуваних зразків.

Постановка імуноферментних реакцій, облік та інтерпретація одержаних результатів проводиться згідно настанов та листівок-вкладок до наборів і включає наступні загальні етапи:

1. Внесення у лунки із сорбованим антигеном досліджуваних проб (чи пулів), а також негативного (Додаток Л) та позитивного контролів (Додаток М).

Піпетувати потрібно молочну сироватку, оскільки тільки в ній містяться антитіла. За постановки деяких тест-систем досліджувані зразки та контролі розводяться спеціальними буферними розчинами, що входять до тест-наборів згідно листівок-вкладок (англ. Dilution buffer).

Якщо в сироватці крові (сироватці молока) містяться антитіла (АТ I) до антигену інфекційного агента, вони розпізнають відповідні антигени (АГ), зв'язуються з ними і утворений комплекс залишається в лунці після подальших відмивань. Перша стадія є «специфічною», тому що саме під час неї відбувається специфічне розпізнавання антигену антитілами. (Додаток Н)

2. Відмивання лунок від антитіл та антигенів, що не утворили імунний комплекс із застосуванням спеціального буфера, що містить детергент (поверхнево-активну речовину) (англ. Wash solution). (Додаток П)

Примітка: розчин для відмивання лунок мікропланшета готується із концентрату, що входить до набору тест-системи згідно листівки-вкладки до неї (англ. Wash concentrate).

3. Внесення розчину кон'югату (вторинні антитіла, або антитіла 2-го порядку, кон'юговані з ферментом (АТ II) (англ. Conjugate). (Додаток Р)

Примітка: розчин кон'югату готується із концентрату, що входить до набору тест-системи згідно листівки-вкладки до неї (англ. Concentrated conjugate).

Вторинні антитіла специфічно розпізнають первинні (специфічні антитіла у сироватці крові чи молоці), що утворили комплекс з сорбованим антигеном і у лунці мікропланшета виникає «молекулярний ланцюг»

4. Повторне відмивання лунок від елементів, які не утворили структуру «молекулярного ланцюга» із застосуванням спеціального буфера (англ. Wash

solution).

5. Додавання проявника (субстрату-хромогену чи ферментного субстрату) (англ. Chromogen solution or Substrate solution).

Найчастіше у якості проявника застосовують тетраметилбензидин (ТМБ).(Додаток С)

Його використовують для виявлення мітки антитіл 2-го порядку (Додаток Т). Хромоген за участю ферменту кон'югату перетворюється в речовину, оптичне поглинання якої визначають на планшетному спектрофотометрі (рідері).

Зупинення ферментативної реакції стоп-реактивом.(Додаток У)

Детекція утвореного продукту шляхом вимірювання оптичної густини вмісту лунок мікропланшету на спектрофотометрі.

Результати теста вважаються достовірними, якщо:

- Середнє значення оптичної густини негативного контролю $>0,7$
- Співвідношення між середнім значенням позитивного контролю, та негативного контролю, менше ніж $0,3$.

Для кожного зразку, а також пулів (до 10 проб) розраховується наступним чином: оптична густина зразка ділиться на оптичну густина негативного контролю, результат множиться на 100%.

Результат вважається позитивним, якщо значення $<50\%$;

Результат вважається сумнівним, якщо значення $<50\%$ і $<60\%$;

Результат вважається негативним, якщо значення $>60\%$;(Додаток Ф)

Результати лабораторних досліджень в Полтавській області за період 2019-2024 роки відображені у таблиці 1.

Таблиця 1.

Рік	Всього досліджено проб	Позитивно реагуючих проб
2019	195026	1132
2020	169368	799
2021	106149	231

2022	99523	340
2023	107045	109
2024	79880	72

2.4. Розрахунок економічної ефективності ветеринарних заходів

Витрати на ветеринарні заходи складаються з трудових і матеріальних ресурсів у грошовому виразі, які можуть бути плановими та вимушеними. Їх визначають згідно з даними ветеринарного та бухгалтерського обліку, а також з діючими тарифами вартості ветеринарних заходів.

Економічна ефективність ветеринарних заходів являє собою суму запобіжних збитків у тваринництві, додаткову вартість, одержану за рахунок збільшення кількості і підвищення якості продукції, економію трудових та матеріальних ресурсів внаслідок застосування більш ефективних засобів та методів профілактики хвороб і лікування тварин, а також економію в суміжних галузях виробництва.

Вартість дослідження однієї проби методом РІД сягає 84,77 гривень.

Вартість дослідження однієї проби методом ІФА сягає 310,31 гривень.

За перший квартал 2024 року в Полтавській області було проведено 61540 досліджень на лейкоз методом ІФА.

Тому, було витрачено на дослідження лейкозу методом ІФА 19096477,40 гривень.

За другий квартал в Полтавській області методом РІД проводиться 18340 досліджень.

Тому, витрачається на дослідження лейкозу методом РІД 1554681,80 гривень.

2.5. Обговорення результатів власних досліджень

Аналізуючи Таблицю 1, можна зробити висновок, що з кожним роком позитивно реагуючих голів стає меншим. Якщо порівнювати дані 2019 та 2024 року – кількість інфікованих тварин зменшилась на 0,49%.

Проведеними дослідженнями встановлено, що постановка реакції

методом ІФА є більш точною, ніж – РІД.

Свою думку можу аргументувати такими даними:

- ІФА є кількісним методом аналізу, а РІД – якісним. Тому ІФА є точним методом оцінки інфікованих тварин у поголів'ях.

- Для читання реакції методом ІФА потрібен тільки один оператор, а для читання реакції методом РІД потрібно 2 оператори, щоб уникнути суб'єктивної думки.

- Підготовка до реакції ІФА набагато легша і швидша ніж – РІД. В ІФА при постановці потрібно тільки зробити розчини для промивання та кон'югату (на це витрачається приблизно 5 хвилин). Проте, для підготовки до РІД потрібно розвести агаро-сольовий розчин, витримувати в киплячій водяній бані, розлиття по чашкам Петрі (попередньо їх знежиривши), витримка до повного застигання, вирізання лунок та видалення агаро-сольових дисків (на це витрачається більше 2-х годин).

- Інтубація методом ІФА становить півтори години, інкубація методом РІД становить 48-72 години.

- Отримання результатів при постановці реакції методом ІФА становить 2 години, РІД – 50-74 год (з урахуванням підготовки до постановки реакції).

Розділ 3. Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Лабораторія - це установа, яка забезпечує контрольовані умови, в яких проводяться наукові чи технологічні дослідження, експерименти та засоби [39].

Співробітником лабораторії є будь-яка особа, яка бере участь у вашій діяльності в лабораторії. А також особи, які проводять дослідження тощо, сюди входять роботи з обслуговування та монтажу [40, 50].

Загальні правила гігієни на робочому місці для профілактики у всіх лабораторіях слід дотримуватися наступних правил перекресне забруднення спричинене небезпечними речовинами [41, 42]:

- У лабораторіях забороняється їсти, пити і жувати жуйку;
- Не наносити на робоче місце косметичні засоби, в тому числі бальзам для губ;
- Не носити своєчасно контактні лінзи (крім екстрених прийомів);
- Перед виходом з лабораторії повністю вимийте руки;
- Довге волосся необхідно закрутити назад;
- Слід уникати вільного одягу (наприклад, рукавів) і звисаючих прикрас;
- Не носіть відкрите взуття (шльопанці, сандалі);
- Заклеїти порізи і рани, наприклад, пластиром;
- я не користуюся мобільними телефонами;
- Усі працівники лабораторії відмовляються підтримувати чистоту та порядок на своєму робочому місці:
- Встановлюйте та використовуйте лише обладнання/хімікати тощо, які заважають поточній роботі;
- Зберігайте невикористане обладнання/хімічні речовини належним чином у визначених місцях;
- негайно викидайте відходи у відповідні контейнери для сміття – не залишайте предмети на лавках/підлозі;
- Тримайте проходи/аварійні виходи вільними - хімікати тощо не можна

зберігати на підлозі;

- негайно прибирайте розливи;
- Закінчивши, приберіть робочу зону та залиште її в безпечному стані [41, 42] 521.

Засоби індивідуального захисту Працівники лабораторії повинні:

- Щодо засобів індивідуального захисту - гумові рукавички, капюшони, шапки, халати, лабораторні костюми, капюшони, маски, окуляри; - За потреби використовувати відповідні засоби індивідуального захисту (ЗІЗ);
- Зберігайте ЗІЗ належним чином, коли він не використовується,
- Не надягайте негативно забруднені рукавички, після зняття їх викидайте; - Замініть ЗІЗ, якщо він пошкоджений/зламаний [40, 45, 46];

Робоче обладнання

Перевірка робочого обладнання перед початком роботи:

- Переконайтеся в справності та справності робочого обладнання;
- Переконайтеся, що робоче обладнання використовується відповідно до інструкції з експлуатації / виробника;
- Перед використанням переконайтеся в безпечності робочого обладнання
- використання та в хорошому стані, наприклад, що електричні дроти не пошкоджені;
- Зверніть увагу на те, що електрообладнання залежить від легкозаймистих матеріалів і води;
- Знати, як безпечно вимкнути обладнання в екстреній ситуації. Перед використанням перевірте скляний посуд на наявність тріщин, подряпин і гострих країв. Викиньте, якщо посуд непридатний [40,49].

Вимоги газової безпеки

Використання газових балонів у лабораторії зведено до мінімуму для контролю ризиків пожежі/задухи - невикористані балони слід повертати до зовнішнього газового сховища;

всі газові балони закріплюються окремо і не залишаються на візках;

Регулятори газових балонів замінюють кожні 5 років згідно інструкції;
 Монітори кисню встановлюються в лабораторіях, де оцінка ризику виявила можливу асфіксію. Дотримуйтеся їх правильно! Користувачі лабораторних газів отримують відповідну інформацію, інструкції та навчання щодо безпечного використання та поводження з газами балонів, у тому числі дії в аварійних ситуаціях Працівники лабораторії зобов'язані:

- Використовувати газові балони відповідно до їх підготовки;
- Знати, що робити в разі надзвичайної ситуації, наприклад, газовий вітер, звук моніторингу кисню;
- Періодично перевіряйте пристрої безпеки, такі як кисневі монітори, щоб переконатися, що вони функціонують належним чином.

Безпечне поводження з кріогенними матеріалами:

- Використання корисного азоту/кардісу в будівлях зведено до мінімуму та в добре провітрювані приміщення для запобігання ризику асфіксії;
- Розлив Дьюара з ємностей для безтарного зберігання здійснюється тільки навченими користувачами;
- Користувачі кріогенних матеріалів отримують відповідну інформацію, інструкції та навчання щодо безпечного використання, включаючи реагування на надзвичайні ситуації.
- Кріогенні контейнери слід зберігати в добре провітрюваних приміщеннях, морозильні камери/холодильники не підходять.

Працівники лабораторії повинні:

- Використовуйте кріогенні матеріали відповідно до вашої підготовки; - Носіть відповідний ЗІЗ;
- Використовуйте щипці, щоб дістати предмети;
- Виймайте повільно - уникайте бризок/кипіння;
- Користуватися кришками, які не закриваються, ніколи їх не закривати;
- Використовуйте лише кріогенні контейнери використовуючи;

Періодично перевіряйте пристрої безпеки, такі як кисневі монітори щоб

переконатися, що вони функціонують правильно [40, 49].

- Забезпечення та дотримання знаків безпеки
- Забезпечити відповідні знаки та сигнали, якщо це визначено оцінкою ризику;
- Переконайтеся, що знаки та сигнали чисті та розбірливі та залишаються такими;
- Це стосується форм оперативних інструкцій для нічних дослідів і
- досліди без нагляду;
- Дотримуйтеся знаків і сигналів, дотримуйтеся попереджень/інструкцій,
- представлені на знаку.

Запобіжні заходи при проведенні лабораторних досліджень методом імуноферментного аналізу:

1. Не слід піпетувати розчини ротом;
2. Розчин субстрату може викликати подразнення шкіри контакт з нею;
3. Стоп-реагент (0,5 М) може бути небезпечним при проковтуванні.
4. Уникайте контакт зі шкірою (S24-37).
5. Можливий контакт зі шкірою гіперчутливість (R22-43);
6. Не слід залишати розчин субстрату під впливом прямих сонячних променів і не допускати його окислення;
7. Слід дезактивувати всі розчини перед утилізацією.

Особливі застереження для осіб та обслуговуючого персоналу під час проведення реакції імунодифузії:

- 1) Розкриття флаконів і робота з компонентами проводиться в спеціалізованих приміщеннях;
- 2) При роботі з антигеном і сироватками уникати контакту зі шкірою та слизовими оболонками;
- 3) Інфіковані зразки вірусів нейтралізують автоклавуванням під тиском 2 кг/см при температурі 130°C протягом 45 хв.

Недотримання елементарних правил безпеки на виробництві може

призвести до виникнення надзвичайних ситуацій різного ступеню тяжкості, в першу чергу правил, спрямованих на збереження життя та здоров'я кожного працівника закладу.

Розділ 4. Екологічна експертиза

Екологічна експертиза — особливий науково-практичний вид діяльності, який базується на дослідженні, оцінці та аналізі екологічних міжгалузевих зв'язків об'єктів на різних етапах їх будівництва та пов'язаних з ними поточних чи майбутніх впливи на навколишнє середовище, викликані їхньою роботою [51].

У нашій країні ці питання регулюються Законом України «Про оцінку впливу на довкілля» [52] та Законом «Про охорону навколишнього природного середовища». [53].

Після проведення даної експертизи видається відповідний висновок, щодо поточну або перспективну діяльність об'єкта в межах вимог природоохоронного законодавства. Залежно від результату (позитивного чи негативного) вносяться подальші корективи в роботу підприємств з можливістю повторення проведення екологічної експертизи після усунення виявлених напередодні недоліків [51].

Законом України передбачено, що експлуатація об'єктів або далі проведення певних видів діяльності, які мають високу екологічність небезпека забороняється без позитивного висновку комісії державної екологічної експертизи. Адміністративна відповідальність передбачені для осіб, які порушують встановлені норми [53, 54].

Існують різні види екологічної експертизи, в тому числі державна і громадська. Кожен новий об'єкт підлягає експертизі і отримання відповідного остаточного висновку на підставі законодавства України [52].

Так, експертизі підлягають:

- усі проекти розміщення нових виробництв у галузі економіка,
- схеми забудови населених пунктів, районів та будь-які передпроектні схеми документація;
- проекти реконструкції об'єктів, будівництва нових підприємств будь-якої форми власності, які в майбутньому можуть мати негативний вплив на навколишнє середовище,

- нові речовини, технічні засоби, матеріали та документи на них тощо
- Територія регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області, що знаходиться за адресою: вул. Миру, 2, с. Горбанівка, огорожена високим суцільним парканом, має чотири окремі будівлі:
1. Будівля, в якій є дві приймальні (для патологічного матеріалу та для відбору та реєстрації проб продукції), а також різні відділення для дослідження матеріалу (патоморфологічне, хіміко-токсикологічне, вірусологічне, бактеріологічне, паразитологічне, імунологічне);
 2. Будівля, в якій розташовані радіологічне відділення та епізоотологічне відділення;
 3. Приміщення для розведення та утримання піддослідних тварин;
 4. Будівля з бухгалтерськими та іншими приміщеннями.

Усі входи до відділень, де проводяться дослідження, закриті, двері відмикаються індивідуальними ключами-картками. Біля під'їзду має стояти засіб для чищення килимів, який потрібно мити не менше двох разів на день разом із підлогою дезінфекція у відділеннях розчином Велідез [54]. В кінці кожного робочого дня приміщення дезінфікують ультрафіолетовими лампами.

Кожен працівник має кілька індивідуальних комплектів спецодягу, які 1-2 рази на тиждень дезінфікують в автоклаві, а також комплекти одноразового одягу, які після зняття утилізують.

Усі речовини, що використовуються під час досліджень, одноразовий інструментарій, а також експериментальний біологічний матеріал, у тому числі трупи тварин, необхідно утилізувати в крематорії (утилізаційній печі).

Кожне відділення обладнане мийками з централізованим водопостачанням, обладнані котлами. Після миття багаторазового посуду вода знезаражується і тільки потім потрапляє в загальну каналізацію.

У відділеннях є холодильні та морозильні камери, окремі для зберігання патологічного матеріалу для досліджень та діагностики при

температурах, що відповідають інструкціям. Деякі відділення мають спеціальні витяжки та ламінарні шафи.

Балони з різними газами постійно проходять планові перевірки спеціальні датчики кисню та інших газів розміщуються на складах на спеціальних підприємствах.

Висновок. Держпродспоживслужба в Полтавській області здійснює всі заходи для забезпечення безпеки навколишнього природного середовища.

Висновки

Посилаючись на дані, отримані під час виконання кваліфікаційної роботи можна зробити такі висновки: по-перше, завдяки впровадженню методу ІФА у 2019 році було діагностовано більше позитивно реагуючих корів. Були проведені епізоотологічні методи по оздоровленню господарств. Завдяки цьому впродовж 6 років стрімко зменшились випадки позитивно реагуючих голів.

РІД – менш чутливе порівняно з ІФА, тому рекомендовано проводити планові дослідження тварин приватного сектору методом ІФА.

Хоч ІФА більш вартісна за РІД, проте, є більш точним методом, тому ціна повністю виправдовує якість та чутливість. Підтвердженням цього є результати досліджень , які наведені в кваліфікаційній роботі.

Список використаних джерел

1. Романишина Т. О., Фещенко Д. В., Риняк Г. О. та ін. Патогенетичні аспекти експериментальної інфекції кролів зумовленої вірусом лейкозу великої рогатої худоби. Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2020. т. 22, № 100. С. 16-22.
2. Nekouei, O.; Vanleeuwen, J.; Stryhn, H.; Kelton, D.; Keefe, G. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 2016, 133, 1–9.
3. Evermann J. Cause for Concern: Bovine Leukemia Virus. *Ag animal health Veterinary Medicine Extension. Washington State University.* 2014. 5 p.
4. Макаров В.В. Лейкоз крупного рогатого скота. *РВЖ No2(6).* 2020. С. 18- 26.
2. Корольов А.Г. Історія лабораторії вивчення лейкозів в національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». 2013. С. 37 - 44.
5. Juliarena M. A., Barrios C. N., Lützelshwab C. M., Esteban E. N., Gutiérrez S. E. 2017. Bovine leukemia virus: current perspectives. P. 44-47.
6. Frie, M.C.; Coussens, P.M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015, 163, 103–114.
7. Ярчук Б. М., Білик С. А., Довгаль, О. В., Довгаль, А. В., Шульга, П. І. 2019. Закономірності розвитку епізоотичного та інфекційного процесів за лейкозу ВРХ та методологія системи профілактичних та оздоровчих заходів. С. 32-34.
8. Ruggiero, V.J.; Norby, B.; Benitez, O.J.; Hutchinson, H.; Sporer, K.; Droscha, C.; Swenson, C.L.; Bartlett, P.C. Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *J. Dairy Sci.* 2019, 102, 9165–9175.
9. Mekata, H.; Sekiguchi, S.; Konnai, S.; Kirino, Y.; Honkawa, K.; Nonaka, N.; Horii, Y.; Norimine, J. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine

- leukaemia virus. *Vet. Rec.* 2015, 176, 254.
10. Патогенетичні аспекти експериментальної інфекції кролів зумовленої вірусом лейкозу великої рогатої худоби. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки.* 2020. т. 22, № 100. С. 16-22
 11. Plant, E.; Bellefroid, M.; Van Lint, C. A complex network of transcription factors and epigenetic regulators involved in bovine leukemia virus transcriptional regulation. *Retrovirology* 2023, 20, 11.
 12. comparison of screening, incidence, survival and mortality. D.R. Youlden et al. *Cancer Epidemiol.* 2012. P. 237-248. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus [Електронний ресурс]. <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-017-0876-4>.
 13. Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo / Achachi A. et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005. P. 10309 - 10314.
 14. Корольов А.Г. Історія лабораторії вивчення лейкозів в національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». 2013. С. 37 - 44.
 15. Шаповалова О.В., Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». м. Харків. 2013. С. 169 - 172.
 16. Гусев О. В., Блудова А. О. 2020. Вдосконалення засобів діагностики та профілактики щодо лейкозу великої рогатої худоби за допомогою скринінгу та моніторингу. С. 15-28.
 17. Серологічні методи діагностики лейкозу великої рогатої худоби. Кісера Я.В., *Науковий вісник ЛНУВМБТ м. С.З. Гжицького.* 2012. 38 с.
 18. Інструкція до «Набір компонентів рідких стабілізованих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» м. Харків. РП No ВВ-00555-06-13.
 19. Наказ про затвердження «Правил перед забійного ветеринарного огляду

- тварин і ветеринарно-санітарної експертизи м'яса та м'ясних продуктів» № 28 від 07.06 2002 р.
20. Загальнонаукові методи дослідження і їх застосування в економічних і фінансових дослідженнях [Електронний ресурс]. <https://elearn.nubip.edu.ua/mod/book/tool/print/index.php?id=151271>
 21. Ветеринарне законодавство України. Збірник нормативно-правових актів. Книга перша «Особлива частина». Яценко .І В. та ін. Харків: ХДЗВА. 2012. 326 с. 57.
 22. Іщенко Л. М., Спиридонов В. Г., Іщенко В. Д., Мельничук С. Д. 2014. Валідація ПЛР-методики для діагностики лейкозу великої рогатої худоби. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького. С.95-102.
 23. Wu, X.; Notsu, K.; Matsuura, Y.; Mitoma, S.; El, D.H.; Norimine, J.; Sekiguchi, S. Development of droplet digital PCR for quantification of bovine leukemia virus proviral load using unpurified genomic DNA. *J. Virol. Methods* 2023, 315, 114706, Erratum in *J. Virol. Methods* 2023, 315, 114708.
 24. De Brun, M.L.; Cosme, B.; Petersen, M.; Alvarez, I.; Folgueras-Flatschart, A.; Flatschart, R.; Panei, C.J.; Puentes, R. Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2022, 34, 439–447.
 25. Довгаль О. В., Тирсін Р. В., Шульга П. Г., Тирсіна Ю. М., Білик С. А., Ярчук Б. М. 2018. Епізоотологічний моніторинг та основні засади щодо заходів профілактики і боротьби з лейкозом великої рогатої худоби. Науковий вісник ветеринарної медицини. С. 86-93.
 26. Кондратенко А. О., Ярчук, Б. М. 2020. Епізоотологічний моніторинг та організаційно-методичні засади профілактики та боротьби з лейкозом великої рогатої худоби. С. 176-185.
 27. Шульга П. Г., Бусол В. О., Ярчук Б. М., Білик С. А., Тирсін Р. В., Довгаль О. В. 2017. Моніторинг впливу природно-географічних факторів України на поширення вірусу лейкозу великої рогатої худоби. С.13-15.

28. Вплив лейкозної інфекції на резистентність великої рогатої худоби та якість продукції в Україні. Башенко М.І., Горбатенко С.К., Корнейков О.М., Вісний аграрної науки. 2015. С. 5 - 10.
29. Напрацювання нових методів профілактики та ліквідації небезпечних інфекційних хвороб тварин [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://consumer-cv.gov.ua/blog/2018/01/22/na-chasi-napratsyuvannya-novyh-metodiv-profilaktyky-ta-likvidatsiyi-nebezpechnyh-infektsijnyh-hvorob-tvaryn-dnprk/> (звернення: 22.12.2018)
30. Наказ про затвердження «Правил перед забійного ветеринарного огляду тварин і ветеринарно-санітарної експертизи м'яса та м'ясних продуктів» No 28 від 07.06 2002 р.
31. THOMAS A. WALDMANN. Monoclonal Antibodies in Diagnosis and Therapy [Електронний ресурс] / THOMAS A. WALDMANN // SCIENCE. – 2014.
32. Pamela J. Hornby. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies [Електронний ресурс] / Pamela J. Hornby // Department of Physiology and Pharmacology, College of Medicine, Drexel University, Philadelphia, PA, USA. – 2019.
33. Wayne M. Yokoyama M. G. Production of Monoclonal Antibodies [Електронний ресурс] / Michelle Christensen Gary Dos Santos Wayne M. Yokoyama // Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri. – 2013.
34. Jonathan D. Kaunitz. Development of Monoclonal Antibodies: The Dawn of mAb Rule [Електронний ресурс] / Jonathan D. Kaunitz // Springer Science+Business Media New York. – 2017.
35. Загальнонаукові методи дослідження і їх застосування в економічних і фінансових дослідженнях [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://elearn.nubip.edu.ua/mod/book/tool/print/index.php?id=151271>
36. Організація та економіка ветеринарної справи: підручник. Євтушенко А. Ф., Радіонов М. Т. для студентів вищих навчальних закладів]. Київ: Арістей. 2004. 284 с. 62

37. Кручиненко О. В., Вітязь М. В. Методичні рекомендації по визначенню економічної ефективності ветеринарних заходів для семінарських занять та самостійної роботи студентів. Полтава, 2010. с. 20.
38. Бегас В. Л. Організація та економіка ветеринарної справи: практикум [для студентів вищих навчальних закладів]. Житомир: Полісся. 2017. 128 с.
39. Основи цивільного захисту: навчальний посібник / Бикова О. В. та ін. Київ. 2008. 223 с.
40. Захист населення і територій від надзвичайних ситуацій. За заг. ред. Могильниченка В.В. Київ: КІМ, 2010. Т.5. Небезпечні хімічні речовини та заходи захисту від них: методичний посібник. 442 с.
41. Федоров М. І., Дрожжана О. У. Охорона праці в галузі. Полтава: РВВ ПДАА. 2014. 240 с.
42. Захист населення і територій від надзвичайних ситуацій. За заг. ред. Могильниченка В. В. Київ: КІМ; 2008. Т. 3. Інженерно-технічні заходи цивільного захисту та містобудування: методичний посібник. 152 с.
43. Захист населення і територій від надзвичайних ситуацій. За заг. ред. Могильниченка В.В. Київ: КІМ, 2008. Т.4. Евакуація населення в надзвичайних ситуаціях: методичний посібник. 288 с.
44. Кодекс цивільного захисту України від 02.10.2012 № 5403-VI.
45. Бегас В. Л. Організація та економіка ветеринарної справи: практикум [для студентів вищих навчальних закладів]. Житомир: Полісся. 2017. 128 с. 54.
46. Ветеринарне законодавство України. Збірник нормативно-правових актів. Книга перша «Загальна частина» / Яценко .І В. та ін. Харків: Стиль Издат, 2012. 286 с.
47. Сусло С. .Т Цивільний захист. Київ : Арістей, 2007. 386 с.
48. Ветеринарне законодавство України. Збірник нормативно-правових актів. Книга перша «Особлива частина». Яценко .І В. та ін. Харків: ХДЗВА. 2012. с. 326.
49. Русаловський А. В. Цивільний захист. Київ: АМУ. 2008. с. 250.

50. Захист населення і територій від надзвичайних ситуацій. За заг. ред. Могильниченка В.В. Київ: КІМ, 2010. Т.6. Захисні споруди цивільного захисту: методичний посібник. с. 560.
51. Оцінка впливу на довкілля [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://eco.kiev.ua/poslugy/ocinka_vplivu_na_dovkillya/
52. Закон України «Про охорону навколишнього природного середовища» від 1 липня 1991 року.
53. Закон України «Про оцінку впливу на довкілля» від 18 грудня 2017 року.
54. Лабораторія оцінки впливу на навколишнє середовище та екологічної експертизи [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.niiep.kharkov.ua/node/177>

Додатки
Додаток А



Чашки Петрі з агаровим гелем

Додаток Б



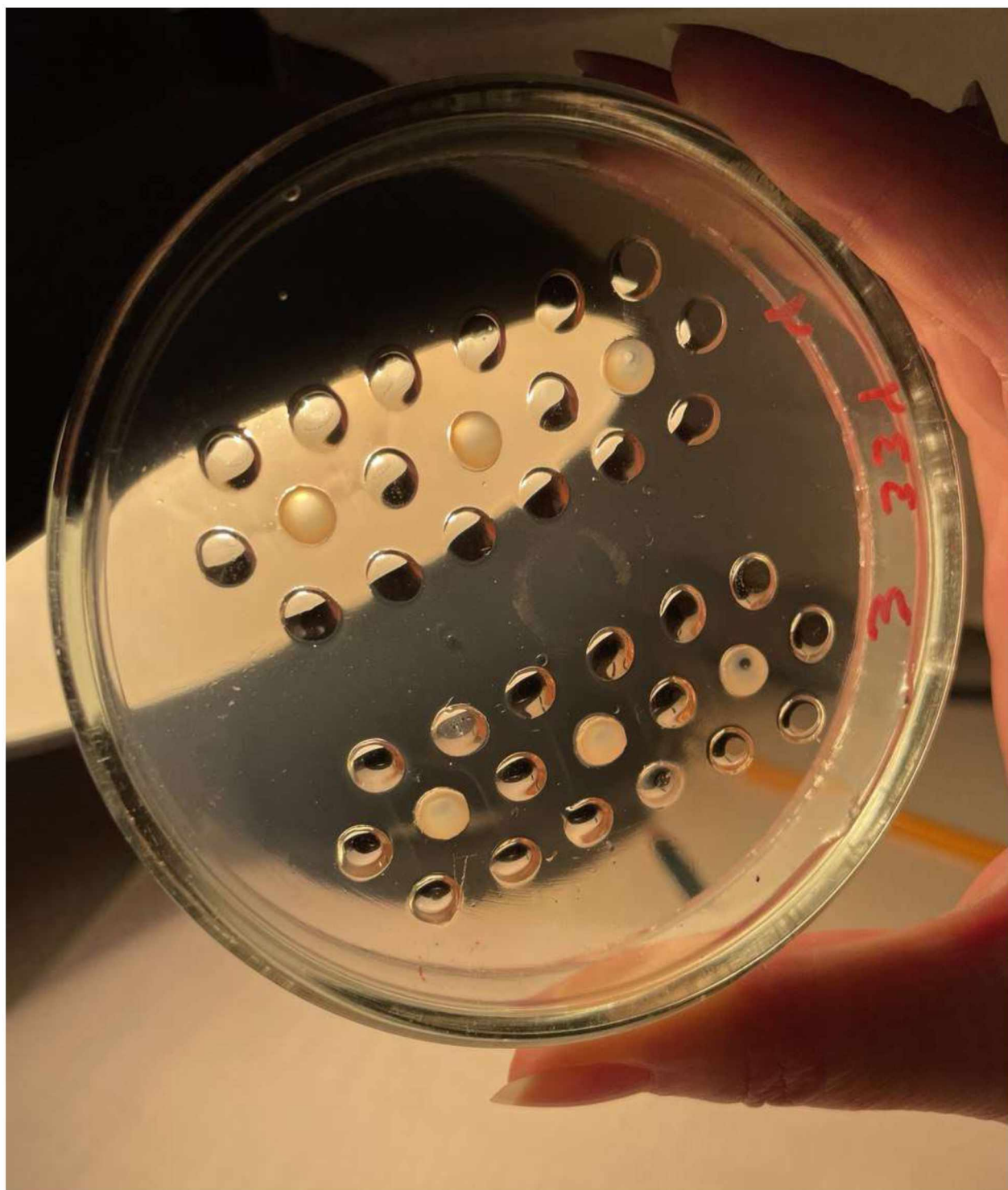
Постановка реакції імунодифузії

Додаток В



Інкубація чашок Петрі у вологій камері

Додаток Г



Лінії преципітації

Додаток Д



Облік результатів дослідження РІД

Додаток Е



Тест-система ID Screen BLV Competstson

Додаток Ж



Реактиви тест-системи ІФА

Додаток К

РДЛДПСС в Полтавській області

Відділ Імунологічний

РОЗПОДІЛ ЗРАЗКІВ НА РОБОЧІЙ ПЛАНШІ

Дата _____

Показник Лейкоз ВРХ

Ідентифікаційні № № _____

Виконавць С.М.Р.Д.
(П.І.Б. Прізвище)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
B	P	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
C	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
D	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
E	1 2	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
F	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
G	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
H	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92

QR code

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

Сторінка 1 з 1

РДЛДПСС в Полтавській області

Відділ Імунологічний

РОЗПОДІЛ ЗРАЗКІВ НА РОБОЧІЙ ПЛАНШІ

Показник Лейкоз ВРХ

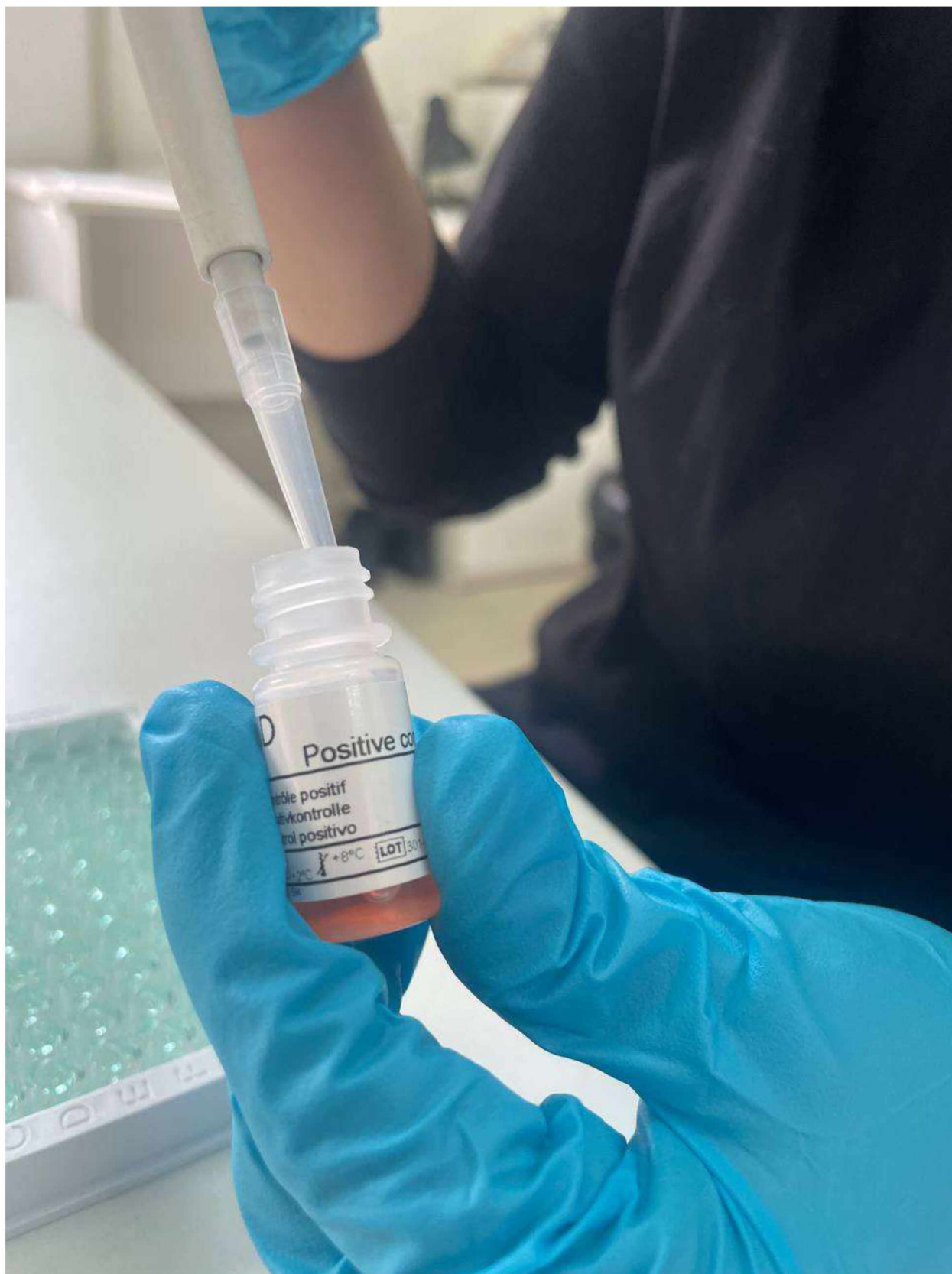
Нумерація досліджуваних проб

Додаток Л



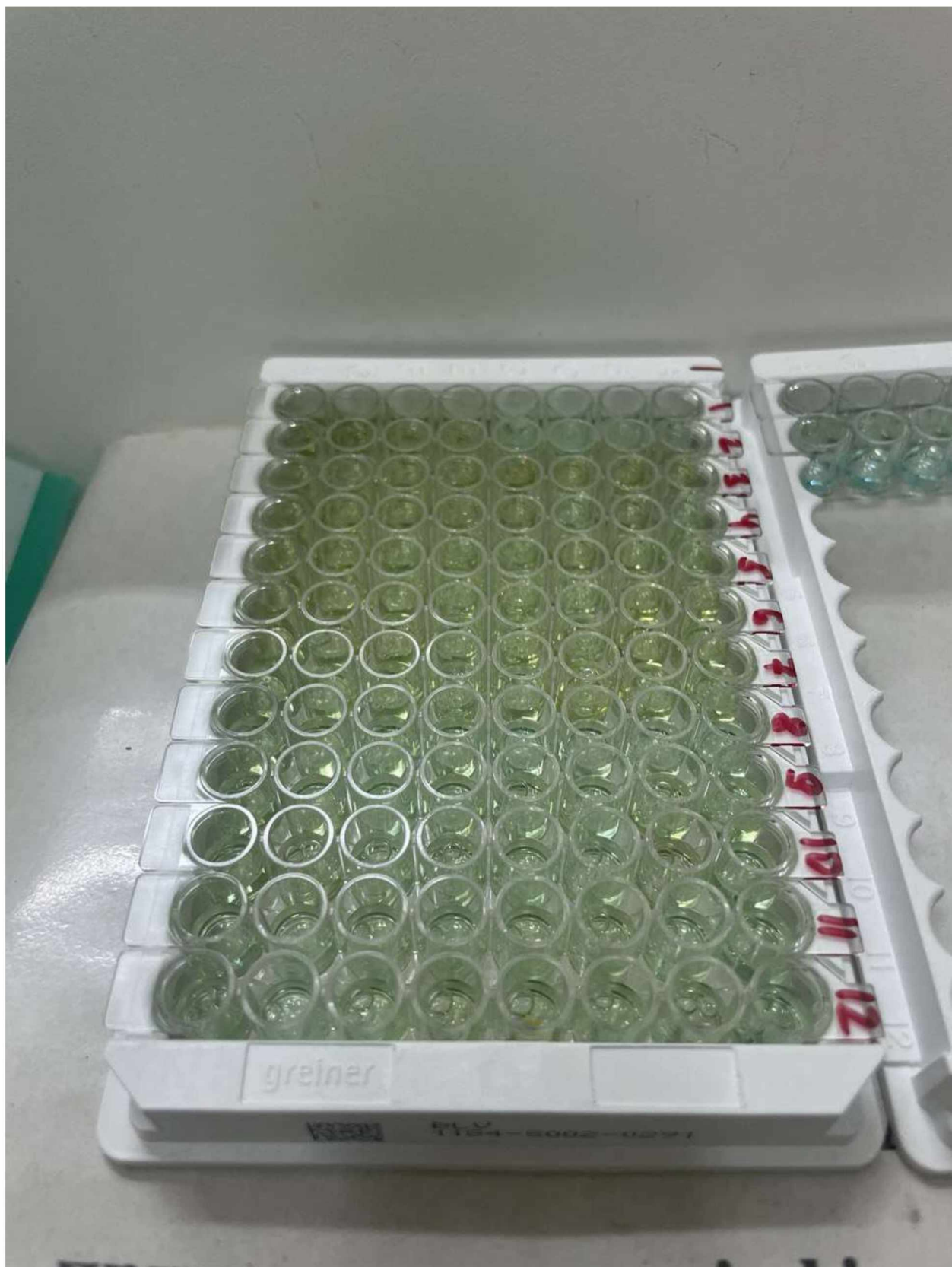
Внесення в лунки негативного контролів

Додаток М



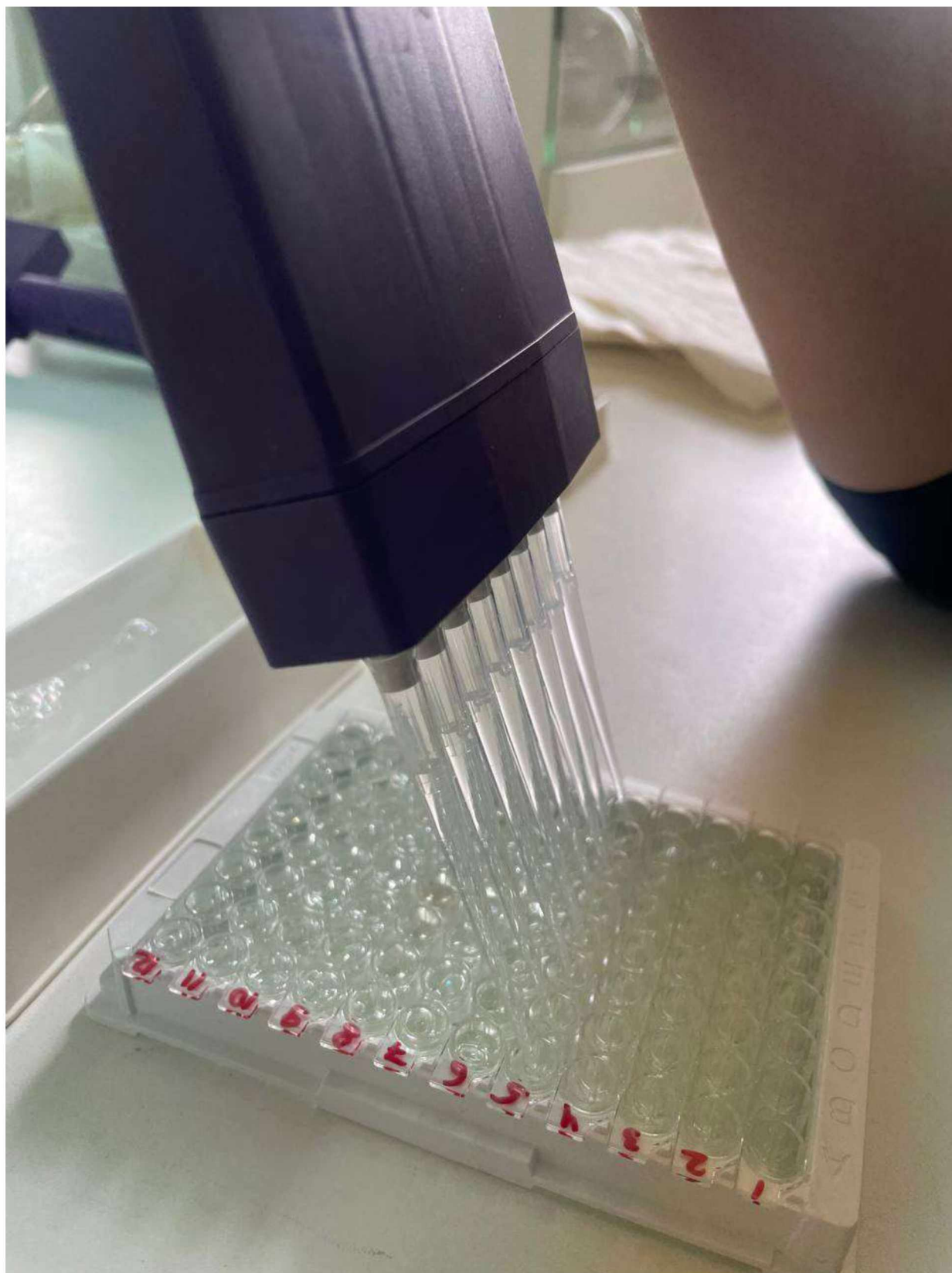
Внесення в лунки позитивного контролів

Додаток Н



Перша інкубація. Специфічне розпізнавання антигену антитілами

Додаток П



Відмивання лунок від антитіл та антигенів

Додаток Р



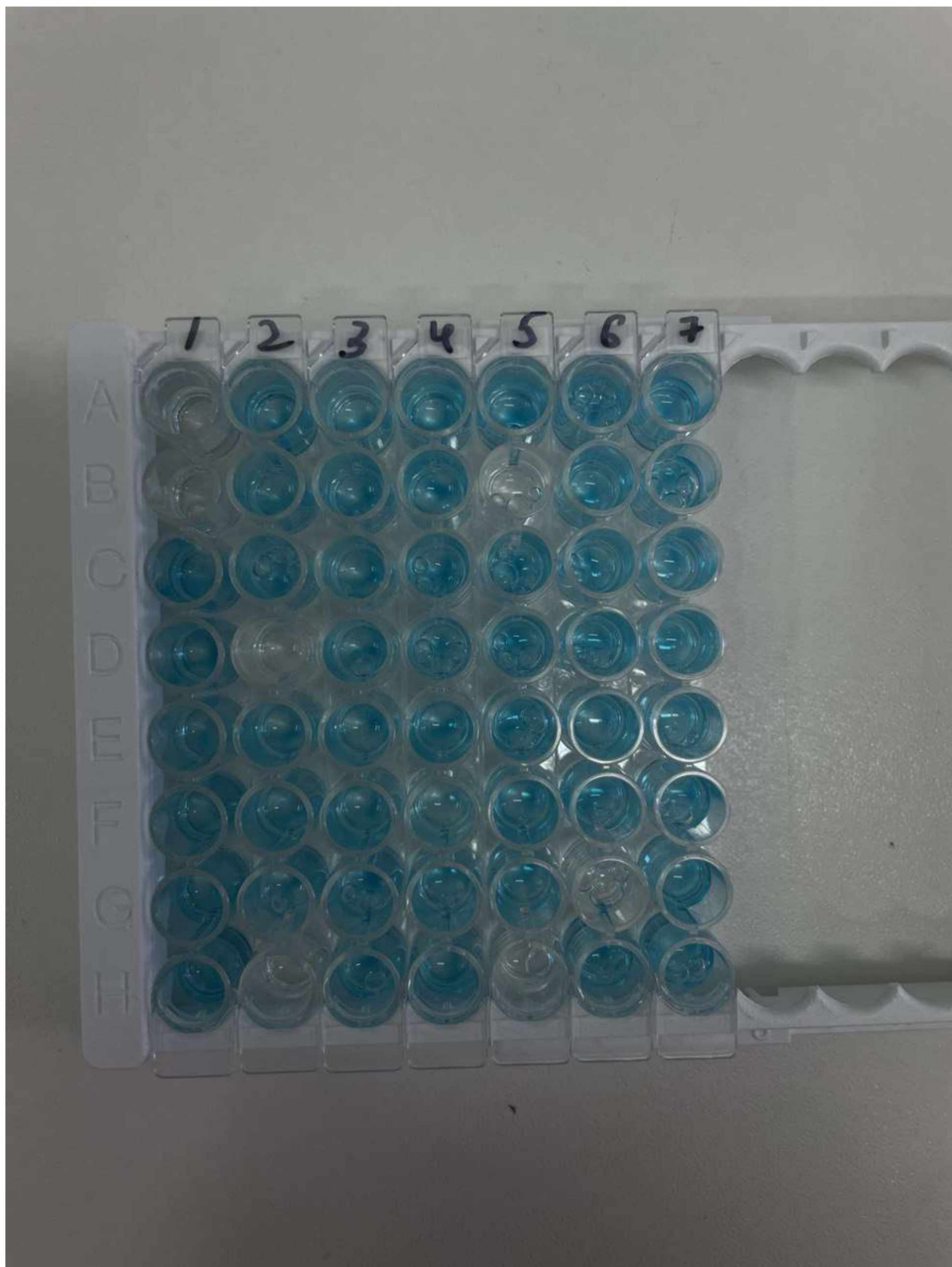
Внесення розчину кон'югату

Додаток С



Додавання проявника

Додаток Т



Плaшка пiсля внесення субстрaтного розчину

Додаток У



Зупинення ферментативної реакції стоп-реактивом

Додаток Ф

Region DLDAPSS v PO Report

Date: 02/12/2024 Time: 14:36:55

Well	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Program	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2					
Sample	001	009	017	025	033	041	049					
Abs	0.127	0.805	0.654	0.822	0.816	0.793	0.818					
QTA	0.127	0.805	0.654	0.822	0.816	0.793	0.818					
QLA												

Well	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
Program	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2					
Sample	002	010	018	026	034	042	050					
Abs	0.171	0.746	0.781	0.786	0.129	0.787	0.798					
QTA	0.171	0.746	0.781	0.786	0.129	0.787	0.798					
QLA												

Well	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
Program	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2					
Sample	003	011	019	027	035	043	051					
Abs	0.783	0.753	0.765	0.771	0.775	0.756	0.768					
QTA	0.783	0.753	0.765	0.771	0.775	0.756	0.768					
QLA												

Well	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
Program	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2					
Sample	004	012	020	028	036	044	052					
Abs	0.765	0.131	0.736	0.646	0.754	0.777	0.771					
QTA	0.765	0.131	0.736	0.646	0.754	0.777	0.771					
QLA												

Well	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
Program	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2					
Sample	005	013	021	029	037	045	053					
Abs	0.631	0.738	0.723	0.764	0.760	0.746	0.767					
QTA	0.631	0.738	0.723	0.764	0.760	0.746	0.767					
QLA												

Well	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Program	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2					
Sample	006	014	022	030	038	046	054					
Abs	0.755	0.772	0.764	0.549	0.768	0.760	0.780					
QTA	0.755	0.772	0.764	0.549	0.768	0.760	0.780					
QLA												

Well	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
Program	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2						
Sample	007	015	023	031	039	047						
Abs	0.745	0.730	0.793	0.737	0.747	0.130						
QTA	0.745	0.730	0.793	0.737	0.747	0.130						
QLA												

Well	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Program	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2	id. vet2						
Sample	008	016	024	032	040	048						
Abs	0.793	0.149	0.794	0.777	0.148	0.822						
QTA	0.793	0.149	0.794	0.777	0.148	0.822						
QLA												

Operator: *Ковалюк* Checker: *МВ*
Print date: 02/12/2024

$$K\# = \frac{0,127 + 0,131}{2} = 0,149$$

$$K\# = \frac{0,783 + 0,765}{2} = 0,774$$

Роздрукований результат постановки реакції методом ІФА