

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК619:636.2

А.А. Люто, М.М. Филиппев, Н.В. Донкова

МОРФОЛОГИЯ КЛЕТОК КРОВИ КОРОВ С СЕРОПОЗИТИВНОЙ И ГЕМОСОМНИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИЕЙ НА ЛЕЙКОЗ

В статье рассмотрена динамика распространения лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) в ЗАО «Агрофирма Маяк» Сухобузимского района Красноярского края. Установлены особенности проявления лейкоза крупного рогатого скота в хозяйстве. Проанализированы результаты морфологического исследования крови у серонегативных и серопозитивных коров разных возрастов. Предлагаются альтернативные методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, лейкоз, цитологическая диагностика мазков крови.

A.A. Luto, M.M. Filipyev, N.V. Donkova

BLOOD CELLS MORPHOLOGY OF COWS WITH SEROPOSITIVE AND HAEMO-AMBIGUOUS LEUKOSIS REACTION

The dynamics of cattle (ВЛКРС) leukosis distribution in Private Joint Stock Company "MayakAgrofirm" in the Sukhobuzimsky district of Krasnoyarsk Territory is considered in the article. The cattle leukosis manifestation peculiarities at the enterprise are established. The morphological blood test results of different age seronegative and seropositive cows are analyzed. Alternative methods of cattle leukosis diagnostics are offered.

Key words: cattle, leukosis, blood dabs cytological diagnostics.

Введение. Проблема вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) является одной из важнейших в современной биологии, медицине и ветеринарии. Болезнь диагностируют на всех континентах мира. Наиболее широко она распространена в Германии, Польше и США. Отмечена неравномерность поражения животных в отдельных странах и хозяйствах. Лейкозом болеют как молодые, так и взрослые животные всех разводимых пород и их помеси, но чаще он отмечается у животных 4–8-летнего возраста. Болезнь обычно наблюдается среди скота красной и черно-пестрой пород [1–8].

Лейкоз крупного рогатого скота имел широкое распространение в 70–80-е годы во всех странах мира. В США зараженность вирусом лейкоза варьировала от 2 до 10% в центральных, до 20% в северо-восточных штатах страны. В Канаде уровень инфицированности ВЛКРС составлял около 10%. В Бельгии, при исследовании 25 тыс. животных фермерских хозяйств (из 80 имеющихся в стране), выявлено 0,1% инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Во Франции по причине лейкоза было убито 11800 коров, хотя 70% фермерских хозяйств официально объявлены свободными от лейкозной инфекции. По результатам выборочного диагностического исследования, в Великобритании до 10% молочного скота поражены вирусом лейкоза [8].

В Российской Федерации в структуре инфекционной патологии лейкоз крупного рогатого скота занимает лидирующее место и составляет 57% от других нозологий. Ежегодно в стране заболевает 40 тыс. животных (по данным мясокомбинатов), и гематологическими исследованиями выявляют более 100 тыс. больных животных. Так, за период с 1976 по 1980 г. заболело 56643; с 1981 по 1985 – 70537; с 1986 по 1990 – 165146; с 1991 по 1995 – 236089; с 1996 по 2000 – 227967 голов крупного рогатого скота [6].

В Красноярском крае, по данным Министерства сельского хозяйства [1], зараженность (инфицированность) ВЛКРС по результатам исследований крови реакцией иммунодиффузии (РИД) за период с 2000 по 2010 г. варьирует от 1,95 до 4,0%, а заболеваемость по данным гематологических исследований колеблется от 0,9 до 1,5%.

Цель исследований. Изучить динамику инфицированности и заболеваемости ВЛКРС в одном из хозяйств Красноярского края и установить особенности морфологии клеток белой крови коров с серопозитивной и гемосомнительной реакцией на лейкоз.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в период с 2011 по 2012 г. в ЗАО «Агрофирма Маяк» Сухобузимского района Красноярского края.

Объектом исследования являлся крупный рогатый скот в возрасте от 6 месяцев до 7 лет. В ЗАО «Агрофирма Маяк» выращивают крупный рогатый скот молочного направления голштино-фризкой породы: всего 2130 голов, из них коров – 885, молодняка – 760. Средний возраст скота: 4–5 лактаций. В рацион входит: сено – 2кг, концентраты – 5кг, сенаж, все замешивается в кормосмесь. Средний удой составляет 16–18 литров, максимальный суточный удой – 26 литров, сервис-период – 140–180 дней, выход телят – 52%; гибель молодняка до 5–7%.

Ретроспективный анализ инфицированности и заболеваемости животных, по данным статистической отчетности, проведен за период с 2008 по 2011год.

Было сформировано 2 группы: первая группа (опытная), состоящая из инфицированных ВЛКРС (по РИД) гематологически сомнительных коров, и вторая группа (контрольная) из клинически здоровых отрицательных по РИД коров.

Для исследования у животных отбирали пробы крови из яремной вены. Цельную кровь, полученную при добавлении антикоагулянта, подвергли морфологическому анализу на кафедре анатомии и гистологии животных Красноярского государственного аграрного университета, а серологические исследования проб сыворотки крови, в реакции иммунодиффузии (РИД), проводили в КГБУ «Краевая ветеринарная лаборатория» (г. Красноярск, ул. Дудинская, 5г).

Для подсчета уровня лейкоцитов пробы цельной крови разводили в жидкости Тюрка, далее исследовали в камере Горяева и производили подсчет лейкоцитов в 100 больших квадратах.

Мазки крови окрашивали по Паппенгейму (предварительно фиксировали метиленовым синим по Май-Грюнвальду и докрашивали в растворе азур2-эозина по Романовскому) и далее проводили подсчет форменных элементов методом Филлипченко, микрофотосъемку на микроскопе Микмед-5.

Результаты исследований оценивали согласно «Методическим рекомендациям по диагностике лейкоза крупного рогатого скота» от 23.08 2000 г. № 13-7-2/2130.

Результаты серологических и гематологических исследований проб крови крупного рогатого скота представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты серологических и гематологических исследований крупного рогатого скота на лейкоз в ЗАО «Агрофирма Маяк»

Показатель	2008 г.	2009 г.	2010 г.	2011 г.
Число исследованных животных, всего:	1859	1744	1456	1055
по РИД	469	482	390	470
по ГЕМО	1390	1242	1066	591
РИД положительные	161	128	146	88
ГЕМО подозрительные	46	53	39	12
ГЕМО положительные	11	10	12	11

Уровень инфицированности животных (положительно реагирующих по РИД) составил в 2008 г. – 34,3%, 2009 – 26,5; 2010 – 37,4; 2011 г. – 18,7 %, что свидетельствует о высокой зараженности ВЛКРС (рис. 1).

Уровень гематологических больных животных составил в 2008 г. – 0,7%; 2009 – 0,8%; 2010 – 1,1%; 2011 – 1,8%; уровень сомнительной реакции: в 2008 г. – 3,3%, 2009 г. – 4,2, 2010 г. – 3,6, 2011 г. – 2% (рис. 2).

За период с 2008 по 2011 год в ЗАО «Агрофирма Маяк» произошло сокращение поголовья крупного рогатого скота, что отразилось на количестве исследуемых животных.



Рис. 1. Динамика РИД позитивных животных по годам, %

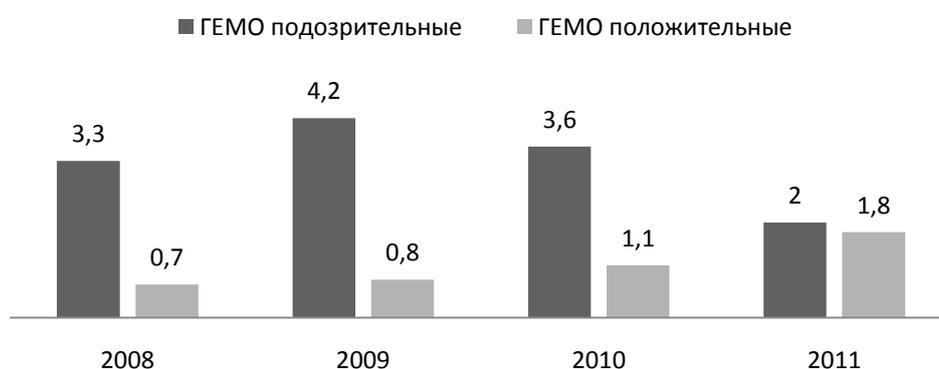


Рис. 2. Динамика гемопозитивных животных по годам, %

Показатели абсолютного количества лейкоцитов и уровня лимфоцитов в первой и второй группах приведены в таблице 2.

Результаты исследований лейкограммы животных первой группы (серопозитивной) отражены в таблице 3, показатели контрольной группы (серонегативной) – в таблице 4.

В результате проведенных морфологических исследований крови в первой опытной группе (серопозитивной) выявлено 2 пробы животных, признанных гематологически больными (табл. 3, пробы № 6, 8). В контрольной группе (серонегативной) выявлена по лейкозному ключу подозрительная на лейкоз проба (табл. 4, проба №7).

Таблица 2

Соотношение лейкоцитов и лимфоцитов в исследуемых пробах крови

Номер группы	Номер животного	Кличка	Номер пробы	Лейкоциты, мкл	Лимфоциты, %	Лимфоциты, мкл	Возраст	Диагноз на лейкоз
1	319	Марта	1	9075	66,05	5994,0	8	Сомнительное
	54	Умница	3	11925	55	6558,8	5	Сомнительное
	74	Рулетка	6	16175	69,5	11241,6	6	Больное
		Рада	8	20700	84,5	17491,5	6	Больное
2	81	Люська	2	7600	68	5168,0	7	Здоров
	192	Газель	4	8825	59	5206,8	8	Здоров
	25	Нина	5	7300	60	4380,0	8	Здоров
	246	Радуга	7	7375	73	5383,8	9	Сомнительное

Таблица 3

Лейкограмма крови серопозитивных коров, реагирующих сомнительно

Номер пробы	Гемосомнительные (группа 1)							Итого
	Моноцит	Юный нейтрофил	Палочкояд.	Сегментоядерн.	Базоф.	Эозиноф.	Лимфоцит	
1,1	1,0	0,0	9,0	18,0	0,0	7,0	65,0	100
1,2	0,0	0,0	6,8	21,9	1,4	2,7	67,2	100
3,1	2,0	2,0	12,0	27,0	0,0	7,0	50,0	100
3,2	0,0	4,0	8,0	18,0	0,0	10,0	60,0	100
6,1	1,0	1,0	6,0	14,0	1,0	9,0	68,0	100
6,2	8,0	1,0	2,0	10,0	0,0	8,0	71,0	100
8,1	2,0	2,0	1,0	7,0	0,0	5,0	83,0	100
8,2	3,0	0,0	1,0	2,0	1,0	7,0	86,0	100
Средние	2,1±5,9	1,3±2,7	5,7±6,3	14,7±12,3	0,4±0,6	7,0±3,0	68,8±18,8	100

Таблица 4

Лейкограмма крови серонегативных коров (контроль)

Номер пробы	Контроль (группа 2)							Итого
	Моноцит	Юный нейтрофил	Палочкояд.	Сегментоядерн.	Базоф.	Эозиноф.	Лимфоцит	
4,1	2,0	0,0	4,0	30,0	0,0	8,0	56,0	100
4,2	7,0	0,0	5,0	22,0	0,0	4,0	62,0	100
2,1	4,5	0,0	4,5	26,0	0,0	6,0	59,0	100
2,2	4,0	0,0	4,0	14,0	0,0	8,0	70,0	100
7,1	0,0	0,0	6,0	19,0	0,0	7,0	68,0	100
7,2	2,0	0,0	5,0	16,5	0,0	7,5	69,0	100
5,1	2,9	0,0	1,6	23,4	0,2	11,5	60,4	100
5,2	3,0	0,0	4,0	21,0	1,0	8,0	63,0	100
Средние	3,2±0,8	0,0	4,3±1,7	21,5±8,5	0,2±0,8	7,5±4	63,4±6,6	100

Из представленных данных следует, что различия в показателях крови серопозитивных и подозрительных по заболеванию животных и контрольной группы имеют наибольшие отличия по составу лимфоцитов (на 5,4%; $p \leq 0,05$), сегментоядерных нейтрофилов (7,2%; $p \leq 0,05$), палочкоядерных нейтрофилов (1,4%; $p \leq 0,05$) и моноцитов (1,1%; $p \leq 0,05$). При этом в пробах крови серопозитивных животных в сравнении с контролем наблюдается относительное увеличение лимфоцитов при одновременном снижении уровня моноцитов и нейтрофилов. Проведенный математический анализ по t-критерию Стьюдента показал достоверную разницу в процентном отношении клеток крови, при исключении проб №7 из контрольной группы и №8 из опытной как наиболее неоднородных в выборке и неудовлетворяющих условиям опыта ($t=2,36$, при $p=0,02$, $n=6$)

С возрастом абсолютное и относительное количество лейкоцитов и лимфоцитов снижается, что является физиологическим процессом, и это необходимо учитывать при постановке диагноза у разновозрастных групп животных.

В крови коров в норме содержится $5-9 \cdot 10^{12}/л$ эритроцитов, $6-11 \cdot 10^6/л$ лейкоцитов и $269-700 \cdot 10^6/л$ кровяных пластинок. Преобладающими клетками являются лимфоциты [7].

В исследуемых мазках крови обеих групп в поле зрения наиболее часто встречаются лимфоциты (до 2-15). Лимфоциты многообразны по форме и размеру, преобладают среднего размера клетки с грубым, неправильной формы светло-вишневого цвета ядром, ободком светло-голубой цитоплазмы по краям клетки.

Крупные лимфоциты напоминают по строению моноциты, однако отличаются сравнительно более темной цитоплазмой с перинуклеарной зоной просветления, а также менее грубой поверхностью ядер, изредка в лимфоцитах просматривается крупная азурофильная зернистость по краю цитоплазмы.

Малые лимфоциты имеют округлое светооптически плотное ядро темно-фиолетового цвета, иногда малозаметный ободок темно-синей цитоплазмы. Клетки малых лимфоцитов в мазках имеют правильную круглую форму.

Периодически встречаются патологические формы лимфоцитов с неправильным исчерченным, набухшим, сегментированным ядром – ридеровские лимфоциты, и активированные лимфоциты, имеющие псевдоподии или многочисленные нитевидные выросты цитоплазмы. При этом в сомнительных пробах наиболее часто встречаются крупные и средние лимфоциты, а также намного чаще, чем в контроле, патологические формы лимфоцитов.

Также встречаются моноциты – крупного размера клетки с крупным сегментированным светло-вишневого цвета ядром, грубой бугристой кариолеммой, светло-серой цитоплазмой и мелкой пылевидной зернистостью, рассыпанной в перинуклеарном пространстве.

Среди гранулоцитов преобладают нейтрофилы и эозинофилы, главным образом зрелые клетки с двухлопастным ядром, соединенным перешейком, а также крупной круглой зернистостью, не выходящей за пределы цитоплазмы. Нейтрофилы встречаются как взрослые сегментоядерные, так и молодые палочкоядерные – с червеобразными ядрами. Базофилы в мазках встречаются крайне редко. В исследуемых мазках морфологических отличий контрольных и сомнительных проб между моноцитами и гранулоцитами не наблюдалось.

Выводы. В ОАО ЗАО «Агрофирма Маяк» уровень РИД-позитивных животных остается на протяжении последних четырех лет стабильно высоким и составляет в среднем 29%, уровень реагирующих гематологически положительно животных – 1,1%, сомнительно реагирующих – 13%.

Разница между исследованными серопозитивными гематологически сомнительными и контрольными пробами мазков крови в относительном составе лейкоцитов достоверна, однако в лейкограммах в обоих случаях не превышает верхних пределов нормы. При этом состав и структура форменных элементов морфологически, при окраске общепринятыми способами, также не имеет существенных различий. Таким образом, гематологически сомнительные пробы при подозрении на лейкоз требуются перепроверять через определенный промежуток времени (1–2 месяца) либо использовать иные методы диагностики гемобластозов крупного рогатого скота, в частности цитохимический или (и) иммуноцитохимический методы диагностики форменных элементов крови, а также гистологический и гистохимический методы диагностики.

Литература

1. Агропромышленный комплекс Красноярского края в 2006–2010 гг. – Красноярск, 2001. – С. 60.
2. Правила по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота // Приказ от 11 мая 1999 г. №359.
3. Гулюкин М.И., Замараева Н.В. Медико-биологические аспекты вируса лейкоза крупного рогатого скота // Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с лейкозами сельскохозяйственных животных и птиц. – Екатеринбург, 2000. – С. 12.
4. Апалькин В.А., Гулюкин М.И., Петров Н.И. Лейкоз крупного рогатого скота. – СПб.: Петролазер, 2005. – С. 106.
5. Дифференциальная диагностика гемобластозов и онкорнавирусной инфекции у сельскохозяйственных животных / В.П. Шишков [и др.]. – М., 1991. – С. 88.
6. Гулюкин М.И., Иванова Т.А., Грек К.П. Ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в племенных хозяйствах Российской Федерации // Состояние и перспективы внедрения достижений ветеринарной науки и практики в сельскохозяйственное производство. – Вологда, 2002. – С.15–17.
7. Карпуть И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. – Минск: Ураджай, 1986. – 90 с.
8. Grimshaw W.T.R., Wiseman A., Petrie L. A confirmed clinical case of enzootic bovine leucosis in Britain // Vet. Rec. – 1980. – V.107. – N 5. – P. 110.