

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**ІЩЕНКО ЛЮДМИЛА МАР'ЯНІВНА**

УДК 577.115:591.85:636.2.09:616:9

**ЛІПІДИ КРОВІ ЖУЙНИХ ЗА СПОНТАННОГО ТА  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ТА  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКА**

03.00.04 – біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НААН  
**Мельничук Сергій Дмитрович**

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук,  
старший науковий співробітник  
**Чумаченко Володимир Володимирович**,  
Державний науково-контрольний інститут  
біотехнології і штамів мікроорганізмів,  
завідувач відділу науково-інформаційного  
забезпечення, стандартизації та  
патентно-ліцензійних досліджень

доктор ветеринарних наук,  
професор, член-кореспондент НААН  
**Мандигра Микола Станіславович**,  
Національна академія аграрних наук України,  
академік-секретар відділення ветеринарної медицини

Захист відбудеться «16» травня 2016 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.08 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Генерала Родимцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус 4, кімната 41а

Автореферат розісланий «15» квітня 2016 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Є. А. Деркач

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** За даними Міжнародного епізоотичного бюро (МЄБ) лейкоз великої рогатої худоби належить до однієї з найбільш поширених і дотепер невирішених проблем промислового скотарства багатьох країн світу. Крім того, захворювання має і загальнобіологічне значення, оскільки вірус лейкозу великої рогатої худоби є морфологічно та еволюційно спорідненим із вірусом Т-клітинного лейкозу людини (*Human T-cell lymphotropic virus*) і часто використовується як модельний об'єкт для вивчення молекулярних механізмів, викликаних ретровірусами неоплазій (Gillet N. et al., 2007).

Впливу персистенції вірусу лейкозу великої рогатої худоби на біохімічні процеси в організмі інфікованих тварин присвячено значну кількість наукових робіт. Достатньо дослідженими за розвитку лейкозного процесу є показники обміну білків, вуглеводів та мінеральних речовин (Бусол В. А., 1988; Бурба Л. Г., 1988; Голубець Р. А., 2003; Кісера Я. В., 2011; Малинин М. Л., 2013), проте практично не вивченим залишається обмін ліпідів. Водночас дані наукової літератури свідчать про важливу роль ліпідів у біологічному циклі ретровірусів, зокрема у процесах, пов'язаних із їхньою взаємодією з мембраною клітини-мішені (Оно А., 2005; Abdul A., 2010; Lingwood D., 2010). Крім того, встановлено участь ліпідів у регуляції експресії вірусу лейкозу великої рогатої худоби (Pyeon D., 2000).

Виходячи з вищесказаного, дослідження обміну ліпідів у тварин за лейкозної інфекції є актуальним питанням не тільки у фундаментальному аспекті, але й має важливе практичне значення, оскільки порушення обміну ліпідів в організмі інфікованих корів може змінювати якість та впливати на безпечність молока – продукту харчування людей.

Варто зазначити, що існуючі дані про порушення біохімічних процесів в організмі великої рогатої худоби за лейкозу здебільшого стосуються серологічно реагуючих і гематологічно хворих тварин (Голубець Р. А., 2003, Кісера Я. В., 2011). В той же час метаболічні процеси в організмі інфікованих тварин на латентній стадії захворювання, коли відбувається взаємодія вірусу та клітини-мішені й поєднання їх генетичного матеріалу, є маловивченими. Існує думка, що саме на цій стадії в інфікованій вірусом лейкозу клітині виникають порушення метаболізму, які призводять до розвитку неопластичного процесу (Gillet N. et al., 2007). Для поглиблення розуміння лейкозного процесу на латентній стадії його перебігу, доцільним є використання молекулярно-генетичних методів, які дозволяють встановити провірусну ДНК збудника у інфікованих тварин. Згідно рекомендацій МЄБ, з цією метою використовують двостадійну полімеразну ланцюгову реакцію, яка має вищу чутливість порівняно з іншими її модифікаціями. Однак висока чутливість двостадійної полімеразної ланцюгової реакції одночасно є її недоліком через високий ризик контамінації на етапі розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі. Тому актуальним є удосконалення методу двостадійної полімеразної ланцюгової реакції з метою зменшення ризику контамінації та попередження отримання хибнопозитивних результатів дослідження щодо лейкозу тварин.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є частиною науково-дослідних тем відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України «Розробка флуоресцентних ДНК-зондів для полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу» (номер державної реєстрації 0106U006300, 2006–2008 рр.) та «Вивчення епізоотичної ситуації щодо лейкозу ВРХ із застосуванням сучасних методів діагностики на прикладі ПРО Підсобне господарство Свято-Успенської Києво-Печерської Лаври» (номер державної реєстрації 0107U012050, 2007 р.).

**Мета і задачі дослідження.** Метою роботи було дослідження складу ліпідів сироватки крові жуйних за спонтанного та експериментального інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби та удосконалення методу двостадійної полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації провірусної ДНК збудника лейкозу.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні задачі:

- дослідити лейкограму крові, біохімічні показники, що характеризують функціональний стан печінки і нирок та ліпідний склад сироватки крові овець на різних стадіях лейкозного процесу за експериментального інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби;

- дослідити лейкограму крові, біохімічні показники, що характеризують функціональний стан печінки і нирок та ліпідний склад сироватки крові корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби;

- дослідити ліпідний склад молока корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби;

- удосконалити двостадійну полімеразну ланцюгову реакцію для ідентифікації провірусної ДНК збудника лейкозу великої рогатої худоби, провести її валідацію та дослідити ефективність використання порівняно із одностадійною полімеразною ланцюговою реакцією в реальному часі;

- визначити ефективність використання двостадійної полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації провірусної ДНК збудника на латентній стадії лейкозної інфекції на прикладі овець, що були експериментально інфіковані вірусом лейкозу великої рогатої худоби;

- визначити нуклеотидну послідовність ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, виділених від інфікованих тварин різних областей України.

*Об'єкт дослідження* – ліпідний склад сироватки крові і молока овець та корів за експериментального та спонтанного інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби та молекулярно-генетична ідентифікація збудника захворювання.

*Предмет дослідження* – ліпіди сироватки крові овець, великої рогатої худоби та молока корів інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби, вдосконалення двостадійної полімеразної ланцюгової реакції для виявлення провірусної ДНК збудника лейкозу.

**Методи дослідження** – морфологічні (підрахунок кількості лейкоцитів і визначення лейкограми), біохімічні (визначення у сироватці крові вмісту індивідуальних ліпідів і жирних кислот, концентрації креатиніну, сечовини і активності ферментів), біотехнологічні (клонування фрагментів ДНК), молекулярно-генетичні (секвенування, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі),

імунологічні (реакція радіальної імунодифузії, імуноферментний аналіз) та статистичні (визначення середніх значень та вірогідності різниці між ними).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше досліджено та науково обґрунтовано зміни ліпідного складу сироватки крові овець на різних стадіях лейкозного процесу за експериментального інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби. Встановлено, що на стадії провірусу в сироватці крові овець підвищується вміст естерифікованого холестеролу, а на стадії провірусу – вміст загальних фосфоліпідів та величина співвідношення загальних фосфоліпідів до холестеролу. Характерним для лейкозного процесу є зниження в сироватці крові овець вмісту арахідонової кислоти.

Встановлено, що в сироватці крові корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби підвищується вміст фосфоліпідів, загального і естерифікованого холестеролу та вільних жирних кислот. У молоці корів спонтанно інфікованих вірусом лейкозу зменшується вміст вільних жирних кислот, триацилгліцеролів, а також знижується вміст усіх мононенасичених і поліненасичених жирних кислот. У сироватці крові та в молоці корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби зростає рівень *транс*-ізомерів олеїнової та лінолевої кислот із зменшенням вмісту їх *цис*-ізомерів.

Вперше секвеновано нуклеотидну послідовність фрагменту гену *ENV* ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, виділених від тварин із різних областей України і, на основі філогенетичного дерева, визначено їх генетичну спорідненість з ізолятами, виділеними від інфікованих тварин в інших країнах. Нуклеотидні послідовності фрагменту гену *ENV* ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, виділених із господарств Рівненської та Кіровоградської областей, депоновано у *GenBank* центру біотехнологічної інформації (*National Center for Biotechnological Information NCBI*) під номерами *KR063245* та *KR063246*.

Наукова новизна дисертаційної роботи підтверджена деклараційним патентом України на корисну модель «Спосіб прижиттєвої діагностики лейкозу великої рогатої худоби двостадійною полімеразною ланцюговою реакцією», № 53223, U201004652 від 20.04.2010 р.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати дослідження доповнюють існуючі уявлення щодо перебігу метаболічних процесів в організмі тварин за експериментального та спонтанного лейкозу великої рогатої худоби.

Удосконалено двостадійну полімеразну ланцюгову реакцію для ідентифікації вірусу лейкозу великої рогатої худоби та проведено її валідацію. Доведено високу ефективність застосування модифікованої двостадійної полімеразної ланцюгової реакції для виявлення інфікованих тварин на латентній стадії лейкозної інфекції.

Результати досліджень впроваджені і використовуються в науковій роботі та навчальному процесі на кафедрах біохімії імені академіка М. Ф. Гулого, епізоотології та організації ветеринарної справи та у відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Матеріали досліджень дисертаційної роботи увійшли до методичних рекомендацій «Діагностика лейкозу великої рогатої худоби методом двостадійної

полімеразної ланцюгової реакції» (затверджено Державним комітетом ветеринарної медицини України, протокол № 1 від 23 грудня 2010 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом особисто проведено пошук та аналіз літературних джерел за темою дисертаційної роботи, освоєно описані в роботі методики, самостійно виконано експериментальні дослідження та здійснено статистичну обробку отриманих результатів дослідження. За участі наукового керівника визначено напрям наукових досліджень та порядок виконання експериментальних робіт, проведено узагальнення отриманих результатів, їх обговорення та формулювання висновків.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи доповідалися на: 1-му Конгресі східно-західної ветеринарної медицини (м. Рига, Латвійська Республіка, 2005 р.); VI Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Молекулярная диагностика-2007» (м. Москва, Російська Федерація, 2007 р.); V Міжнародній конференції «Біоресурси і віруси» (м. Київ, 2007 р.); Міжнародній конференції «Актуальные проблемы здоровья скота, завозимого в Россию в рамках нацпроекта «Развитие агропромышленного комплекса» (м. Казань, Російська Федерація, 2008 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Моніторинг, прогнозування, діагностика та профілактика інфекційних хвороб тварин із використанням сучасних методів епізоотології, молекулярної біології та біотехнології» (м. Феодосія, 2009 р.); наукових конференціях професорсько-викладацького складу та аспірантів Національного університету біоресурсів та природокористування України (м. Київ, 2010–2011 рр.); Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми наук про життя та природокористування» (м. Київ, 2015 р.).

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 20 наукових праць: 4 статті у наукових фахових виданнях України, стаття у науковому фаховому виданні України, включеному до міжнародної наукометричної бази даних, стаття у науковому виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази даних, 10 матеріалів і тез наукових доповідей, деклараційний патент на корисну модель, 2 нуклеотидні послідовності ділянки гену *ENV* вірусу лейкозу великої рогатої худоби депоновані у центр біотехнологічної інформації (*National Center for Biotechnological Information NCBI*), методичні рекомендації.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаної літератури, який включає 229 джерел, з яких 143 латиницею та 6 додатків. Дисертація викладена на 148 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 29 таблицями та 21 рисунком.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд наукової літератури.** Узагальнено та проаналізовано дані літератури щодо загальнобіологічного значення лейкозу великої рогатої худоби. Охарактеризовано організацію геному та особливості життєвого циклу вірусу лейкозу великої рогатої худоби. Викладено наукові дані стосовно значення ліпідів у біологічному циклі ретровірусів. Наведено основні відомості про ліпіди та жирні

кислоти, їх роль в організмі тварин. Проаналізовано існуючі молекулярно-генетичні методи ідентифікації збудників інфекційних захворювань та їх значення у прижиттєвій діагностиці лейкозу великої рогатої худоби. На основі даних літератури показано актуальність теми дисертаційної роботи та доцільність проведення досліджень.

**Матеріали і методи дослідження.** Експериментальна частина роботи виконана впродовж 2007–2016 рр. Дослідження проводились у відділі хроматографічного та спектрального аналізу та у відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України). Окремі дослідження було проведено на базі кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи НУБіП України та у відділі імунологічних і молекулярно-генетичних досліджень ДНДІ лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Експериментальне інфікування овець вірусом лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) проводили на базі віварію ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків.

Зразки крові у тварин для досліджень відбирали в підсобному господарстві Свято-Успенського собору Києво-Печерської Лаври (с. Вороньків, Київська обл.), ВП НУБіП України НДГ «Великоснітинське ім. О. В. Музиченка» (с. Велика Снітинка, Київська обл.), СПП «Хлібороб» (с. Миляч, Рівненська обл.), ПП «Крюківщина» (с. Крюківщина, Київська обл.).

Дослідження складу ліпідів сироватки крові та молока проводили на експериментально інфікованих ВЛ ВРХ вівцях та спонтанно інфікованих коровах. Для проведення експериментального інфікування овець ВЛ ВРХ було сформовано дві групи ПЛР- та РІД-негативних щодо лейкозу великої рогатої худоби тварин романівської породи з масою тіла 30–35 кг, по 3 вівці у кожній групі. Тваринам першої (контрольної) групи внутрішньом'язово вводили 1 см<sup>3</sup> ізотонічного розчину натрію хлориду, тваринам другої (дослідної) групи внутрішньом'язово вводили 1 см<sup>3</sup> крові від РІД- та ПЛР-позитивної на лейкоз великої рогатої худоби корови (*St FAM* – 10,21; титр антитіл – 1:8; кількість лейкоцитів – 50 Г/дм<sup>3</sup>). Тварин дослідної і контрольної груп утримували в окремих приміщеннях. Годівлю проводили згідно основного раціону.

Кров для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), реакції імунодифузії (РІД) та морфологічних досліджень від овець дослідної та контрольної груп відбирали на 3 добу після інфікування і, надалі, з інтервалом 3 доби, до виявлення в крові інфікованих тварин провірусної ДНК збудника та антитіл проти нього, а потім – один раз у два тижні впродовж 3 місяців (до виявлення у всіх тварин антитіл проти ВЛ ВРХ). Кров для біохімічних досліджень відбирали наступного дня після підтвердження методом двостадійної ПЛР в реальному часі наявності провірусної ДНК збудника у крові інфікованих тварин (10 доба після інфікування) і на 72 добу, коли у всіх інфікованих тварин за допомогою РІД було виявлено антитіла проти збудника.

Для дослідження складу ліпідів сироватки крові та молока у спонтанно інфікованих тварин було сформовано дві групи корів чорно-рябої породи 3-річного віку на 3–4 місяці лактації, масою тіла 400–450 кг, по 6 голів у кожній. У першій

(контрольній) групі були клінічно здорові, а у другій (дослідній) групі – тварини інфіковані ВЛ ВРХ. Утримували тварин в однакових умовах, а годівлю здійснювали згідно раціону типового для зони Полісся України. Кров для морфологічних та біохімічних досліджень відбирали до годівлі тварин. Ліпідний склад молока корів дослідної і контрольної груп досліджували у пробах, які відбирали під час ранкового доїння.

Дослідження з удосконалення двостадійної ПЛР для ідентифікації провірусної ДНК збудника лейкозу великої рогатої худоби склалися з кількох етапів. На першому етапі, встановлювали доцільність використання методу ПЛР для діагностики лейкозу великої рогатої худоби. На наступному етапі здійснювали конструювання праймерів та флуоресцентних зондів на основі аналізу ізолятів вірусу лейкозу, представлених у центрі біотехнологічної інформації (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*) та секвенованих українських ізолятів. Потім проводили оптимізацію умов застосування запропонованої модифікації двостадійної ПЛР та досліджували показники валідації. На заключному етапі проводили апробацію запропонованої модифікації двостадійної ПЛР на тваринах різних дослідних груп.

Морфологічні дослідження включали визначення кількості лейкоцитів (методом підрахунку в 100 великих квадратах лічильної камери із сіткою Горяєва за малого збільшення мікроскопу) та виведення лейкограми (дослідження мазків крові, зафарбованих за Романовським-Гімза).

Концентрацію сечовини, креатиніну, активність аланінамінотрансферази (АлАТ, КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (АсАТ, КФ 2.6.1.1) та гаммаглутамілтранспептидази (ГГТП, КФ 2.3.2.2) у сироватці крові визначали на біохімічному аналізаторі «*Sinnova BS3000 P*» (Китайська народна Республіка), згідно з методиками, запропонованими фірмою «*RANDOX*».

Екстракцію ліпідів сироватки крові та молока здійснювали за методом I. Folch et al. (1957 р.), з використанням системи розчинників хлороформ-метанол у співвідношенні 2:1. Розділення ліпідів на фракції проводили методом тонкошарової хроматографії (Петровський В. И. и др., 1986 р.) на стандартних платівках фірми «*Sorbfil*» (Чеська Республіка). Ідентифікацію індивідуальних фракцій ліпідів проводили з використанням маркерів фірми «*Sigma*» (США). Кількісне визначення ліпідів проводили методом спектрофотометрії (загальний і естерифікований холестерол (ЗХЛ і ЕХЛ) визначали за допомогою феруму трихлорного, вміст фосфоліпідів і триацилгліцеролів (ФЛ і ТАГ) – гідроксаматним методом, вміст вільних жирних кислот (ВЖК) – за допомогою 1,5 дифенілкарбазиду (Петровський В. И. и др., 1986 р.). Жирні кислоти (ЖК) сироватки крові аналізували методом газорідинної хроматографії), з використанням приладу «Кристал-Люкс 4000» (Російська Федерація) з полум'яно-іонізаційним детектором на капілярній колонці *SP-2560 (Supelco)*. Ідентифікацію ЖК здійснювали з використанням стандартної суміші метилових естерів ЖК (ДСТУ ISO 5509).

Виявлення антитіл методом РІД проводили за допомогою «Набору компонентів рідких стабілізованих для серологічної діагностики лейкозу ВРХ в реакції імунодифузії (РІД)», ДП «Ветеринарна медицина» ННЦ «ІЕКВМ», (м. Харків). Детекцію антитіл методом ІФА здійснювали за допомогою діагностичного набору «*Bovine leukemia virus antibody test kit*» (*VMRD inc.*, США).

Для детекції провірусної ДНК збудника лейкозу великої рогатої худоби використовували запропоновану нами модифікацію двостадійної ПЛР.

Для статистичної обробки результатів досліджень користувалися програмою *Microsoft Office Excel*. Вірогідність показників оцінювали за критерієм Стьюдента з урахуванням малого числа вибірок (Кокунин В. А., 1975).

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Морфологічні показники крові овець за експериментального інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби.** Зважаючи на тропність ВЛ ВРХ до клітин крові, важливе значення у дослідженні лейкозного процесу має підрахунок кількості лейкоцитів та виведення лейкограми. Встановлено, що на 6, 9 та 12 добу після інфікування (стадія провірусу) в крові овець дослідної групи збільшувалася кількість сегментоядерних нейтрофілів відповідно на 26,6 %, 20,4 та 25,6 % і зменшувалася кількість лімфоцитів відповідно на 26,6 %, 20,4 та 25,6 %, порівняно із тваринами контрольної групи. Починаючи з 23 доби експерименту, коли в сироватці крові двох тварин дослідної групи було виявлено антитіла проти ВЛ ВРХ, спостерігали поступове збільшення кількості лейкоцитів, яка на 90 добу виявилась більшою у 2 рази, ніж у контролі. Слід відмітити, що із зміною стадії перебігу лейкозного процесу в організмі експериментально інфікованих ВЛ ВРХ овець змінювався характер прояву лейкоцитозу. На стадії провірусу лейкоцитоз був нейтрофільним, а на стадії утворення антитіл проти ВЛ ВРХ – лімфоцитним. Так, на 23 та 57 добу експерименту в крові овець дослідної групи виявляли вірогідне зменшення кількості сегментоядерних нейтрофілів відповідно на 41,2 та 26,1 % та збільшення кількості лімфоцитів – на 14,6 та 5,6 %, відповідно порівняно з показниками овець контрольної групи. Такі зміни у лейкограмі овець дослідної групи є характерними для серологічно позитивних тварин.

**Функціональний стан печінки та нирок овець за експериментального інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби.** Оскільки в метаболізмі ліпідів провідна роль відводиться печінці, було досліджено біохімічні показники сироватки крові, які характеризують функціональний стан даного органу, а одночасне визначення концентрації креатиніну дозволило виключити патологію нирок. На стадії провірусу в сироватці крові овець дослідної групи порівняно із вівцями контрольної групи було виявлено збільшення концентрації сечовини на 15,9 %, а на стадії утворення антитіл – її зменшення на 20,0 %. На обох стадіях розвитку лейкозного процесу після експериментального інфікування овець ВЛ ВРХ у сироватці крові дослідних тварин було встановлено вірогідне зростання активності АсАТ та ГГТП, на стадії провірусу – на 31,3 і 22,7 %, а на стадії утворення антитіл – відповідно на 18,7 і 28,5 %, порівняно із тваринами контрольної групи, що підтверджує наявність функціональних розладів гепатобіліарної системи у таких тварин.

**Вміст ліпідів у сироватці крові овець за експериментального інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби.** В сироватці крові овець дослідної групи на стадії провірусу відмічали збільшення на 8,0 % вмісту ЕХС. На стадії утворення антитіл встановлено збільшення вмісту ФЛ на 5,9 %, що призвело до зменшення на 6,9 % величини співвідношення ЗХС/ФЛ порівняно із тваринами контрольної групи.

Під час дослідження жирнокислотного складу сироватки крові овець встановлено, що на стадії провірусу у тварин дослідної групи вірогідно збільшується вміст маргаринової кислоти (в 1,19 раза) порівняно із тваринами контрольної групи. На обох стадіях перебігу лейкозного процесу в сироватці крові овець дослідної групи встановлено вірогідне зменшення вмісту арахідонової кислоти: на стадії провірусу – в 1,28 раза, а на стадії утворення антитіл в – 1,16 раза. Це може бути пов'язано із синтезом простагландину  $E_2$ , який утворюється з арахідонової кислоти в макрофагах у відповідь на подразнення медіаторами запалення (інтерлейкін-2, фактор некрозу пухлин-альфа), та роль якого показана у регуляції експресії ВЛ ВРХ (Pyeon D., 2000). Крім того, на стадії утворення антитіл у сироватці крові овець дослідної групи відмічали вірогідне збільшення вмісту лінолевої кислоти (в 1,06 раза).

**Функціональний стан печінки та нирок корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби.** В сироватці крові корів, спонтанно інфікованих ВЛ ВРХ за тенденції до зниження активності АЛАТ на 11,4 %, встановлено зростання на 20,7 % активності АсАТ. Подібні зміни активності ферментів відмічали також і у сироватці крові овець після їх експериментального інфікування ВЛ ВРХ, що свідчить про порушення функціонального стану печінки за розвитку лейкозного процесу у жуйних. Істотних змін концентрації сечовини, креатиніну та активності ГГТП в сироватці крові корів дослідної та контрольної груп не відмічали.

**Вміст ліпідів у сироватці крові корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби.** У сироватці крові корів, спонтанно інфікованих ВЛ ВРХ, порівняно із тваринами контрольної групи було встановлено вірогідне збільшення вмісту ФЛ на 6,0 %, ЗХС і ЕХС відповідно на 4,3 і 4,2 % та вмісту ВЖК – на 83,3 % (рис. 1).

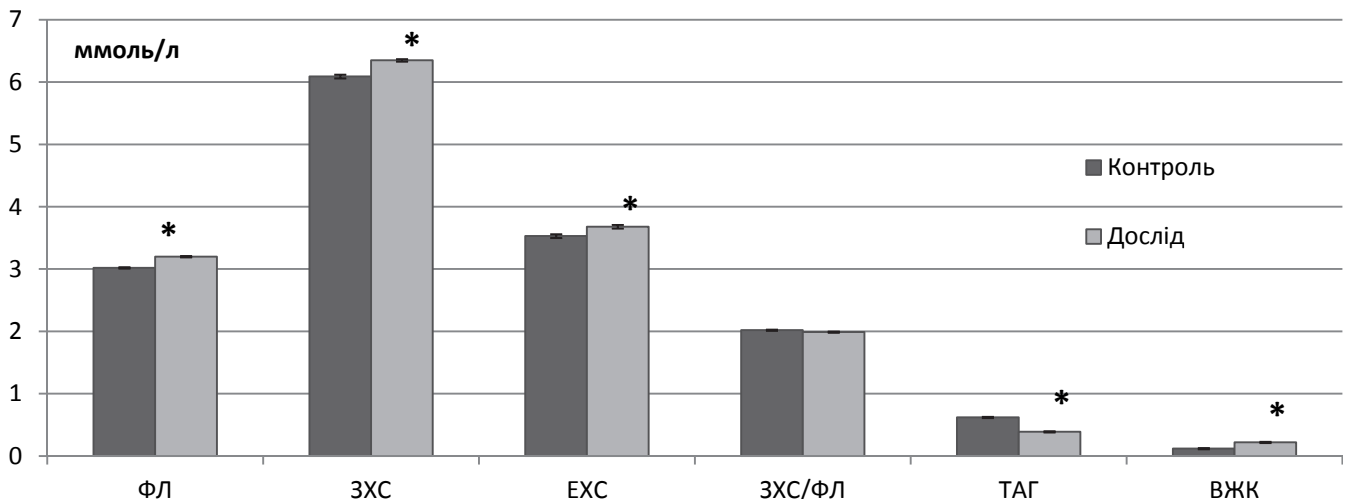


Рис. 1. Вміст ліпідів у сироватці крові корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу ВРХ,  $M \pm m$ ,  $n = 6$  (ФЛ – фосфоліпіди, ЗХС – холестерол загальний, ЕХС – холестерол естерифікований, ЗХС/Ф – загальний холестерол/фосфоліпіди, ТАГ – триацилгліцероли, ВЖК – вільні жирні кислоти)

Примітка. Рис. 1, 2: \* –  $p \leq 0,05$  порівняно із показниками тварин контрольної групи

Водночас величина співвідношення ФЛ/ЗХС у сироватці крові тварин обох груп залишалася незмінною. Концентрація ТАГ у сироватці крові інфікованих ВЛ ВРХ корів була на 37,1 % нижчою порівняно з тваринами контрольної групи.

Під час дослідження жирнокислотного складу сироватки крові корів, спонтанно інфікованих ВЛ ВРХ, встановлено збільшення вмісту міристинової (в 1,37 раза), стеаринової (в 1,17 раза) та ейкозанової (в 1,45 раза) жирних кислот порівняно з клінічно здоровими тваринами (табл. 1).

Таблиця 1

**Вміст жирних кислот у сироватці крові корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу ВРХ, %,  $M \pm m$ , n = 6**

Кислота		Контроль	Дослід
Міристинова	C14:0	1,06±0,13	1,45±0,12*
Міристоолеїнова	C14:1	0,87±0,13	0,81±0,06
Пальмітинова	C16:0	8,94±0,58	10,52±0,54
Пальмітоолеїнова	C16:1	2,94±0,29	2,18±0,2*
Стеаринова	C18:0	17,29±0,66	19,31±0,64*
Олеїнова, <i>цис</i> -ізомер	C18:1	9,22±0,51	7,52±0,51*
<i>транс</i> -ізомер	C18:1	0,78±0,06	0,82±0,05
Лінолева, <i>цис</i> -ізомер	C18:2	47,12±2,20	46,81±1,09
<i>транс</i> -ізомер	C18:2	0,19±0,04	0,27±0,04
Ліноленова $\omega$ -6	C18:3	0,79±0,09	0,44±0,07*
Ліноленова $\omega$ -3	C18:3	3,88±0,61	3,64±0,31
Ейкозанова	C20:0	0,46±0,06	0,67±0,07*
Ейкозатриєнова $\omega$ -6	C20:3	1,87±0,10	1,70±0,09
Ейкозатриєнова $\omega$ -3	C20:3	0,26±0,05	0,19±0,02
Арахідонова	C20:4	1,69±0,13	1,35±0,08*
Ейкозапентаєнова	C20:5	0,80±0,05	0,63±0,07
Докозанова	C22:0	0,36±0,07	0,55±0,08
Докозапентаєнова	C22:5	0,29±0,04	0,20±0,05
Докозагексаєнова	C22:6	1,20±0,09	0,93±0,07*
Насичені ЖК		28,10±1,04	32,50±1,22*
Ненасичені ЖК		71,90±1,04	67,57±1,22*
Насичені/ненасичені ЖК		0,39±0,02	0,48±0,03*
Мононенасичені ЖК		58,09±1,56	56,13±1,36*
Поліненасичені ЖК		13,81±0,54	11,34±0,67
Мононенасичені/поліненасичені ЖК		0,24±0,02	0,20±0,01

Примітка. У табл. 1, 2 \* –  $p \leq 0,05$  порівняно із показниками тварин контрольної групи

В сироватці крові цих тварин встановлено також зниження рівня мононенасичених жирних кислот (МНЖК), а саме: пальмітоолеїнової кислоти в 1,35 раза, *цис*-ізомеру олеїнової кислоти – в 1,23 раза; поліненасичених жирних кислот (ПНЖК): ліноленової – в 1,80 раза, арахідонової – в 1,25 раза та докозагексаєнової – в 1,29 раза. За вказаних змін вміст насичених ЖК у сироватці крові корів дослідної групи збільшувався в 1,16 раза, а вміст ненасичених –

зменшувався в 1,06 раза порівняно із тваринами контрольної групи. Таким чином, індекс насичення ЖК сироватки крові корів дослідної групи збільшився в 1,23 раза.

**Ліпідний склад молока корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби.** Під час дослідження індивідуальних ліпідів молока корів, спонтанно інфікованих ВЛ ВРХ, встановлено збільшення вмісту ФЛ на 9,3 %, ЗХС і ЕХС – на 25,3 та 10,1 %, а також величини співвідношення ЗХС/ФЛ на 15,0 % порівняно з аналогічними показниками у тварин контрольної групи. Водночас у молоці корів дослідної групи відмічали зменшення вмісту ВЖК на 53,0 %, ТАГ – на 19,3 % і ДАГ – на 11,8 % (рис. 2).

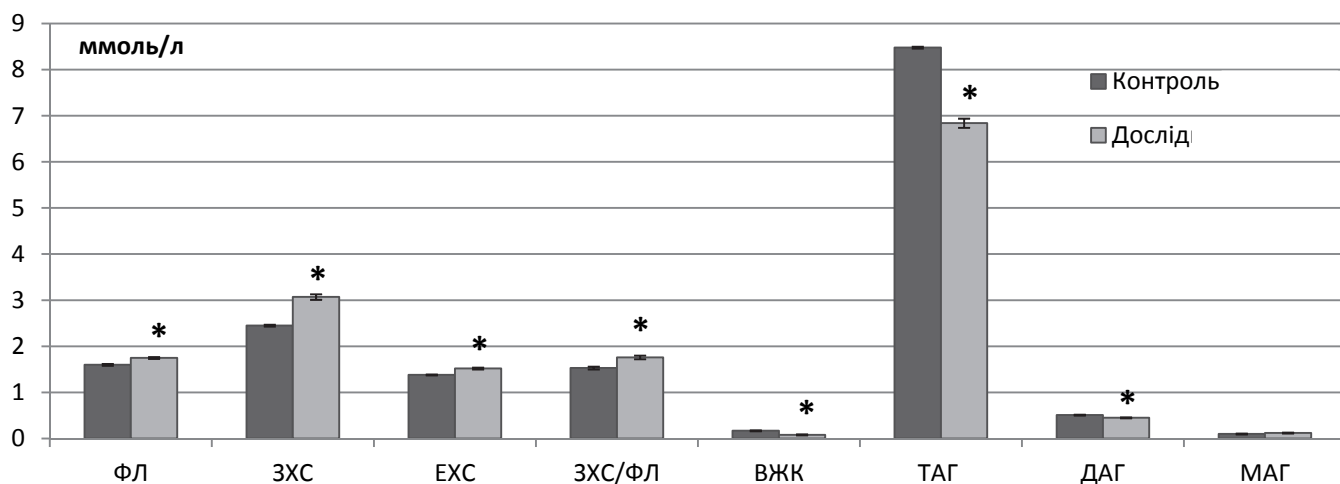


Рис. 2. Вміст ліпідів у молоці корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу ВРХ,  $M \pm m$ ,  $n = 6$  (ФЛ – фосфоліпіди, ЗХС – холестерол загальний, ЕХС – холестерол естерифікований, ЗХС/ФЛ – загальний холестерол/фосфоліпіди, ВЖК – вільні жирні кислоти, ТАГ – триацилгліцероли, ДАГ – діацилгліцероли, МАГ – моноацилгліцероли)

Із насичених ЖК у складі молока корів за спонтанного інфікування вірусом ВЛ ВРХ відмічали вірогідне збільшення вмісту масляної (в 1,48 раза), пальмітинової (в 1,35 раза), маргаринової (в 1,87 раза) та стеаринової кислот (в 1,14 раза), порівняно із клінічно здоровими тваринами контрольної групи (табл. 2).

Слід зазначити, що вміст пальмітинової та стеаринової ЖК був більшим і в сироватці крові корів інфікованих ВЛ ВРХ. Зміни вмісту мононенасичених ЖК у молоці корів дослідної групи мали таку ж тенденцію, що і в сироватці крові цих корів. Так, уміст міристоолеїнової кислоти вірогідно зменшувався в 1,61 раза, а вміст пальмітоолеїнової кислоти – в 1,17 раза порівняно із тваринами контрольної групи.

У молоці корів інфікованих ВЛ ВРХ встановлено вірогідні зміни вмісту олеїнової та лінолевої кислот, та їх *цис*- і *транс*-ізомерів. Сумарний вміст ізомерів олеїнової кислоти в молоці тварин контрольної групи був меншим за рахунок вірогідного зменшення вмісту її *цис*-ізомеру (в 1,31 раза), тоді як уміст *транс*-ізомеру олеїнової кислоти збільшувався (в 1,32 раза). Подібні зміни було встановлено і під час визначення вмісту лінолевої кислоти у молоці корів дослідної групи. За зниження сумарного вмісту ізомерів вказаної кислоти рівень її

*цис*-ізомеру вірогідно зменшувався в 1,63 раза, а вміст *транс*-ізомеру збільшувався в 1,35 раза.

Таблиця 2

**Вміст жирних кислот у молоці корів за спонтанного інфікування вірусом лейкозу ВРХ, %,  $M \pm m$ ,  $n = 6$**

Кислота		Контроль	Дослід
Масляна	C4:0	3,22±0,08	4,77±0,14*
Капронова	C6:0	1,80±0,04	2,15±0,07
Каприлова	C8:0	1,14±0,03	0,90±0,03*
Капринова	C10:0	2,88±0,06	3,13±0,06
Лауринова	C12:0	1,61±0,03	1,51±0,04
Міристинова	C14:0	8,13±0,09	5,19±0,20*
Міристоолеїнова	C14:1	0,74±0,02	0,46±0,03*
Пентадеканова	C15:0	3,44±0,06	2,65±0,07*
Пальмітинова	C16:0	21,58±0,31	29,20±0,38*
Пальмітоолеїнова	C16:1	1,99±0,07	1,69±0,05
Маргарінова	C17:0	0,71±0,02	1,33±0,06*
Стеаринова	C18:0	14,22±0,20	16,20±0,09*
Олеїнова, <i>цис</i> -ізомер	C18:1	27,19±0,49	20,70±0,29*
<i>транс</i> -ізомер	C18:1	3,09±0,08	4,07±0,05*
Лінолева, <i>цис</i> -ізомер	C18:2	5,88±0,09	3,59±0,09*
<i>транс</i> -ізомер	C18:2	0,74±0,02	1,00±0,04*
Ліноленова	C18:3	1,30±0,05	0,97±0,04*
Ейкозанова	C20:0	0,23±0,05	0,34±0,06
Докозанова	C22:0	0,11±0,04	0,15±0,02
Насичені ЖК		59,07±0,91	67,52±0,74*
Ненасичені ЖК		40,93±0,82	32,48±0,74*
Насичені/ненасичені ЖК		1,44±0,05	2,08±0,07*
Мононенасичені ЖК		8,92±0,26	5,56±0,32*
Поліненасичені ЖК		33,01±1,11	26,92±0,73*
Мононенасичені/поліненасичені ЖК		4,19±0,12	4,86±0,12

Вміст ліноленової кислоти у молоці корів дослідної групи, як і в сироватці їх крові, зменшувався в 1,34 раза порівняно із тваринами контрольної групи.

Зазначені зміни жирнокислотного складу молока корів, інфікованих ВЛ ВРХ, призвели до збільшення сумарного вмісту насичених ЖК в 1,14 раза і зменшення вмісту ненасичених ЖК в 1,26 раза, що призвело до збільшення в 1,44 раза індексу насичення ЖК, порівняно з відповідним показником у тварин контрольної групи.

**Зв'язок результатів дослідження з інфекційним процесом за лейкозу великої рогатої худоби.** Результати проведених досліджень з експериментальним інфікуванням овець ВЛ ВРХ вказують на те, що в лейкозній інфекції можна виділити дві стадії: стадію провірусу і стадію виявлення антитіл. Перша стадія триває від моменту введення в організм тварин крові інфікованих вірусом лейкозу корів до моменту виявлення антитіл проти ВЛ ВРХ. Було встановлено, що антитіла

проти ВЛ ВРХ з'являються у сироватці крові овець на 23 добу після їх інфікування. На стадії провірусу у інфікованих ВЛ ВРХ овець виникає нейтрофільний лейкоцитоз, який найбільш виражений на 12 добу після інфікування. Можна припустити, що причиною таких змін є розвиток запальної реакції внаслідок пошкоджуючого впливу ВЛ ВРХ на тканини і клітини організму під час проникнення вірусу в клітини-мішені. Зміни кількості лейкоцитів і лейкограми супроводжувалися також змінами біохімічних показників крові тварин, які характеризують функціональний стан печінки – органу, який відіграє основну роль в метаболізмі ліпідів. На нашу думку, продукти запалення, що утворюються, призводять до порушення функціонального стану печінки і перебігу обмінних процесів у ній. Підвищення активності «маркерних» ензимів печінки (АсАТ і ГГТП) свідчить про можливий цитоліз гепатоцитів, що призводить до підвищення активності ензимів у сироватці крові інфікованих овець.

Подальший розвиток інфекційного процесу за експериментального інфікування овець вірусом ВЛ ВРХ і перехід його у стадію утворення антитіл проти збудника, призвів до появи характерних для лейкозу великої рогатої худоби змін кількості лейкоцитів крові дослідних тварин. На фоні гранулоцитопенії розвивається виражений лімфоцитоз. Аналізуючи отримані результати, можна висловити припущення, що на стадії провірусу починається перехід хвороби у клінічну стадію, що супроводжується ослабленням функціонального стану печінки та біосинтетичних процесів у ній, на що вказує зменшення концентрації сечовини у сироватці крові овець.

Безсумнівно, що персистенція ВЛ ВРХ впливає на обмін речовин у інфікованій клітині, оскільки реплікація вірусу здійснюється шляхом залучення ресурсів клітини-хазяїна. Передусім це стосується ліпідів, так як ліпідний бішар нових вірусних частин утворюється із плазматичної мембрани інфікованої клітини шляхом брунькування. Встановлено, що до складу бішару входять переважно ФЛ і неестерифікований холестерол (НХС). Зміни вмісту ліпідів у сироватці крові овець на стадії утворення антитіл після експериментального інфікування їх ВЛ ВРХ були подібними до змін у сироватці крові спонтанно інфікованих корів. Разом з тим встановлено достовірне підвищення вмісту в сироватці крові цих тварин як ЗХС, так і ЕХС, а відповідно і НХС. Це підтверджує нашу думку про детермінованість таких змін необхідністю синтезу ліпідного бішару вірусу за розвитку лейкозної інфекції. Підтвердженням цього також є те, що вміст ліпідів, які не відіграють структурної функції (ТАГ і ВЖК), був незмінним у сироватці крові овець за експериментального інфікування їх ВЛ ВРХ.

Підтвердженням припущення, що на стадії утворення антитіл у овець порушуються синтетичні процеси в печінці, може бути встановлений факт підвищення вмісту в сироватці крові тварин тих ЖК, з яких може утворюватися арахідонова кислота. Водночас зміни жирнокислотного складу сироватки крові корів мали певні особливості. Передусім, як і в овець, привертає увагу зменшення рівня арахідонової кислоти в сироватці крові інфікованих ВЛ ВРХ корів. Поряд з тим в сироватці крові корів встановлено не підвищення, а зниження рівня жирних кислот – попередників синтезу арахідонової кислоти. Поясненням цього явища є більш тривалий розвиток змін за спонтанного інфікування корів ВЛ ВРХ порівняно

із швидким розвитком змін у овець після їх експериментального інфікування. Проте у корів і овець можна виділити спільну реакцію організму на персистенцію вірусу лейкозу у вигляді зниження рівня в сироватці крові арахідонової кислоти внаслідок посиленого продукування відповідних ейкозаноїдів.

Таким чином, за відносно стабільного співвідношення сумарної кількості насичених і ненасичених жирних кислот у сироватці крові інфікованих ВЛ ВРХ овець і корів встановлено суттєві відмінності у співвідношенні різних класів ненасичених жирних кислот, що може свідчити про порушення обміну ліпідів в організмі тварин за лейкозного процесу. Безсумнівно, що зміни у складі крові мають вплив і на склад молока, оскільки його поживні речовини відфільтровуються молочною залозою із крові для подальшого синтезу жиру молока. Тому жирнокислотний склад сироватки крові корів позначається і на складі жиру молока.

Отже, за експериментального та спонтанного інфікування ВЛ ВРХ у тварин змінюється склад ліпідів сироватки крові та молока. Виходячи із результатів дослідження, такі зміни негативно впливають на стан організму інфікованих тварин, а також призводять до зниження якості і біологічної цінності молока, отриманого від них.

**Удосконалення двостадійної ПЛР для ідентифікації вірусу лейкозу великої рогатої худоби та її апробація.** Враховуючи переваги двостадійної ПЛР та з метою зменшення ризиків контамінації продуктами ампліфікації запропоновано двостадійну ПЛР із проведенням другої стадії ампліфікації в режимі реального часу. Окрім того, враховуючи можливість проведення за допомогою ПЛР в реальному часі мультиплексного аналізу, для другої стадії запропонованої модифікації двостадійної ПЛР було розроблено систему детекції ділянки гену, специфічного для великої рогатої худоби (внутрішній контроль). Такий підхід дозволяє контролювати якість екстрагованої ДНК і попереджувати отримання псевдонегативних результатів дослідження.

**Конструювання праймерів та флуоресцентних зондів.** Для першої стадії двостадійної ПЛР у реальному часі використано нуклеотидну послідовність праймерів, рекомендованих протоколом МЕБ. Підбір праймерів та флуоресцентного зонду для другої стадії ПЛР проводили на основі аналізу нуклеотидних послідовностей ділянки гену *ENV* відомих на сьогодні ізолятів вірусу лейкозу за даними центру біотехнологічної інформації (*NCBI*) та ізолятів, виділених від інфікованих тварин із господарств різних областей України. Для внутрішнього контролю було підібрано праймери та флуоресцентний зонд на основі аналізу консервативної ділянки гену специфічного для великої рогатої худоби.

**Визначення основних валідаційних показників для запропонованої двостадійної ПЛР у реальному часі.** Для валідації запропонованої модифікації двостадійної ПЛР досліджували параметри, що рекомендовані для якісних методик (ефективність і лінійність ампліфікації, чутливість, специфічність). Встановлено, що чутливість двостадійної ПЛР у реальному часі становить 86 геномних еквівалентів для цільової послідовності (провірусна ДНК ВЛ ВРХ) та 3 геномні еквіваленти для внутрішнього контролю. Відмічено пряму залежність значень граничного циклу *Ct* кривих ампліфікації цільової послідовності та внутрішнього контролю від логарифму початкової концентрації субстрату ( $R^2 \geq 0,98$ ). Отримані значення нахилу

калібрувальних графіків (-3,27– -3,62) свідчать про високу ефективність ампліфікації як цільової послідовності, так і внутрішнього контролю.

**Дослідження аналітичної чутливості двостадійної ПЛР та одностадійної ПЛР у реальному часі.** Для оцінки чутливості двостадійної ПЛР у реальному часі порівняно з одностадійною ПЛР у реальному часі, було досліджено 90 зразків крові, відібраної у корів, які мали позитивну реакцію на лейкоз за результатами РІД та ІФА. За допомогою одностадійної ПЛР у реальному часі було отримано 23,0 % хибнонегативних результатів дослідження, що свідчить про її недостатню чутливість для діагностики лейкозу у великої рогатої худоби. Крім того, за використання двостадійної ПЛР в реальному часі інтерпретація результатів дослідження є більш зручною порівняно із одностадійною ПЛР в реальному часі (рис. 3).

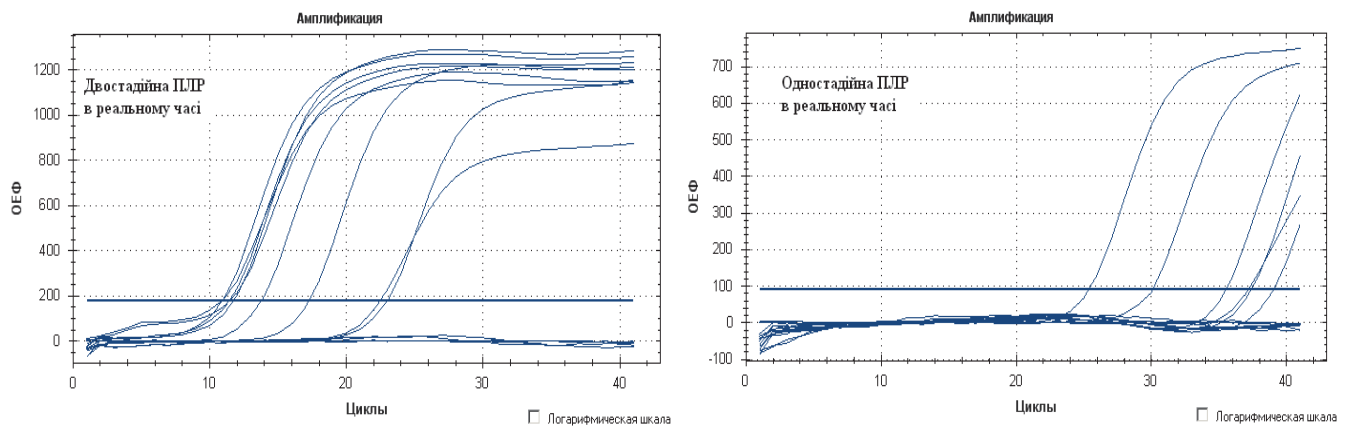


Рис. 3. Криві ампліфікації за барвником *FAM* (провірусна ДНК ВЛ ВРХ)

**Ефективність діагностики латентної стадії лейкозної інфекції методом двостадійної ПЛР у реальному часі на прикладі овець, експериментально інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби.** За експериментального інфікування овець ВЛ ВРХ провірусну ДНК у крові тварин методом двостадійної ПЛР у реальному часі було виявлено на 9 добу після інфікування одночасно у всіх тварин. Антитіла проти ВЛ ВРХ у двох овець були виявлені на 23 добу, а в третьої вівці – на 70 добу після інфікування. Варто зазначити, що за спонтанного інфікування час появи провірусу та антитіл у крові тварин ймовірно є іншим, однак, незалежно від кількості інфекційного матеріалу та способу інфікування, провірусну ДНК у крові тварин можна детектувати на 2–3 тижні раніше, ніж антитіла проти збудника, що доводить цінність ПЛР для діагностики ранньої (латентної) стадії лейкозної інфекції у тварин.

**Філогенетичний аналіз ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, виділених від корів із господарств різних областей України.** Секвенування ізолятів ВЛ ВРХ дало можливість проаналізувати генетичну різноманітність вірусу на території нашої держави та з'ясувати їх філогенетичний зв'язок з ізолятами, виділеними в інших країнах. Довжина отриманих нуклеотидних послідовностей складала 723 нуклеотидних пар і відповідає ділянці вірусного геному з 4928 по 5651 нуклеотид. Більшість ізолятів ВЛ ВРХ, виділених від тварин з господарств різних областей України (Рівненська, Кіровоградська, Дніпропетровська, Чернігівська та Харківська області), в еволюційному відношенні є близькими до бельгійського

ізоляту, який циркулює в країнах Європи. Ці дані підтверджують припущення науковців, що в Україну ВЛ ВРХ був завезений із племінними тваринами з Естонської Республіки та Латвійської Республіки (рис. 4).

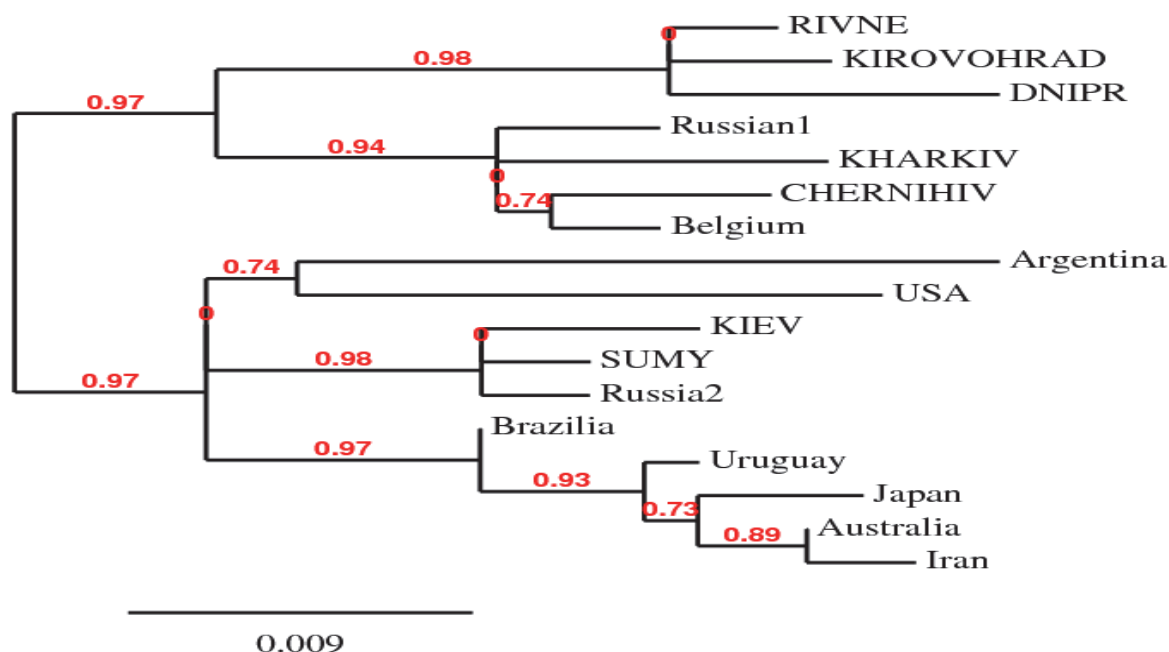


Рис. 4. Філогенетичне дерево ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, виділених від тварин із різних областей України та представлених у базі даних *NCBI* (числами показано відсоток дивергенції проаналізованих нуклеотидних послідовностей)

Разом з тим, як показує філогенетичний аналіз, ізоляти ВЛ ВРХ, що були виділені від тварин із господарств Київської та Сумської областей, за генетичною структурою є спорідненими з ізолятами ВЛ ВРХ, виділених в Австралійському Союзі, США та країнах Азії, що вказує про різні шляхи занесення збудника на територію нашої країни.

## ВИСНОВКИ

На основі узагальнення та аналізу результатів досліджень встановлено зміни ліпідного складу сироватки крові овець, великої рогатої худоби та молока корів за експериментального і спонтанного лейкозу великої рогатої худоби, про що свідчить збільшення вмісту насичених жирних кислот, зменшення рівня моно- та поліненасичених кислот та зміна співвідношення різних класів ліпідів. Виявлено, що характерною ознакою розвитку лейкозного процесу є зниження в сироватці крові інфікованих тварин *цис*-ізомерів олеїнової і лінолевої кислот та вмісту арахідонової кислоти. Для молекулярно-генетичної ідентифікації вірусу лейкозу великої рогатої худоби вдосконалено двостадійну полімеразну ланцюгову реакцію, проведено її валідацію та апробацію.

1. В експериментально інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби овець стадія провірусу (6, 12 доба після інфікування) характеризується нейтрофільним лейкоцитозом без зсуву ядра вліво (кількість лейкоцитів на 12 добу більша на 30,3 %, а вміст сегментоядерних нейтрофілів – на 25,6 % порівняно із

тваринами контрольної групи). За розвитку лейкозного процесу стадія утворення антитіл у овець характеризується вираженням лейкоцитозом, що характерно для тварин із позитивною серологічною реакцією.

2. Стадія провірусу лейкозного процесу характеризується збільшенням на 15,9 % концентрації сечовини в сироватці крові овець експериментально інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби, а стадія утворення антитіл – її зменшенням – на 20,0 %. На обох стадіях розвитку лейкозного процесу в сироватці крові тварин дослідної групи зростає активність аспаратамінотрансферази та гаммаглутамілтранспептидази: на стадії провірусу відповідно на 31,3 і 22,7 %, а на стадії утворення антитіл – на 18,7 і 28,5 % порівняно із тваринами контрольної групи.

3. В сироватці крові овець на стадії провірусу збільшується концентрація естерифікованого холестеролу на 8,0 %, а на стадії утворення антитіл – концентрація фосфоліпідів на 5,9 %, та зменшується на 6,9 % величина співвідношення загального холестеролу до фосфоліпідів. У сироватці крові овець на стадії провірусу збільшується вміст маргаринової кислоти в 1,19 раза, а на стадії утворення антитіл – лінолевої кислоти в 1,06 раза. На обох стадіях перебігу лейкозного процесу в сироватці крові овець зменшується вміст арахідонової кислоти: на стадії провірусу в 1,28 раза, а на стадії утворення антитіл – в 1,16 раза.

4. У корів, спонтанно інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби, в сироватці крові підвищується активність аспаратамінотрансферази на 20,7 %, збільшується концентрація фосфоліпідів на 6,0 %, вільних жирних кислот на 83,3 %, загального і естерифікованого холестеролу – відповідно на 4,3 і 4,2 % та зменшується концентрація триацилгліцеролів на 37,1 % порівняно із тваринами контрольної групи.

5. В сироватці крові корів, спонтанно інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби, вищий вміст міристинової (в 1,37 раза), стеаринової (в 1,17 раза) та ейкозанової (в 1,45 раза) жирних кислот, і менший рівень пальмітоолеїнової (в 1,35 раза), ліноленої (в 1,80 раза), арахідонової (в 1,25 раза) і *цис*-ізомеру олеїнової (в 1,23 раза) кислот порівняно із клінічно здоровими тваринами. Загальний вміст насичених жирних кислот у сироватці крові корів збільшується в 1,16 раза, а ненасичених зменшується в – 1,06 раза, в зв'язку з чим індекс насичення жирних кислот збільшується в 1,23 раза порівняно із таким показником у тварин контрольної групи.

6. В молоці корів, спонтанно інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби, збільшується концентрація фосфоліпідів на 9,3 %, загального і естерифікованого холестеролу – відповідно на 25,3 і 10,1 %, тоді як концентрація вільних жирних кислот, триацилгліцеролів і діацилгліцеролів зменшується відповідно на 53,09 %, 19,3 та 11,75 % порівняно із тваринами контрольної групи. Загальний вміст насичених жирних кислот у молоці корів збільшується в 1,14 раза за рахунок стеаринової і пальмітинової кислот, а вміст ненасичених жирних кислот зменшується в 1,26 раза. В молоці корів, інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби, збільшується вміст *транс*-ізомеру олеїнової (в 1,32 раза) і лінолевої (в 1,35 раза) жирних кислот і зменшується вміст їх *цис*-ізомеру відповідно в 1,31 та 1,63 раза порівняно із клінічно здоровими тваринами.

7. Удосконалена двостадійна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі для виявлення провірусної ДНК збудника лейкозу великої рогатої худоби дозволяє виявляти на 23,0 % більше інфікованих тварин порівняно із одностадійною полімеразною ланцюговою реакцією у реальному часі. Валідація запропонованої модифікації полімеразної ланцюгової реакції показує, що чутливість аналізу для ідентифікації вірусу лейкозу становить 86 геномних еквівалентів для провірусу лейкозу та 3 геномні еквіваленти для внутрішнього контролю; коефіцієнт лінійної регресії калібрувальної кривої за постановки розведень дезоксирибонуклеїнової кислоти, екстрагованої з крові інфікованої на лейкоз тварини, становить  $R^2 \geq 0,98$  як для вірусу лейкозу великої рогатої худоби, так і для внутрішнього контролю, а значення кута нахилу калібрувальних графіків (-3,27– -3,47) свідчать про високу ефективність ампліфікації обох мішеней.

8. В овець, експериментально інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби, за використання двостадійної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі провірусну дезоксирибонуклеїнову кислоту збудника детектували на 9 добу після інфікування, а антитіла в сироватці крові овець проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби виявляли методом радіальної імунодифузії, починаючи з 23 доби, що свідчить про цінність полімеразної ланцюгової реакції для діагностики латентної стадії лейкозної інфекції.

9. Філогенетичний аналіз ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, виділених від тварин із різних областей України, вказує на генетичну спорідненість більшості з них (Рівненська, Кіровоградська, Дніпропетровська, Чернігівська та Харківська області) із бельгійським ізолятом. Разом з тим ізоляти, що були виділені від тварин із Київської та Сумської областей, мають генетичну спорідненість з ізолятами вірусу лейкозу великої рогатої худоби, що циркулюють серед поголів'я тварин в Австралійському Союзі, США та країнах Азії.

## **ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

1. Для діагностики лейкозу великої рогатої худоби пропонується двостадійна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, використання якої у комплексі із серологічними методами діагностики дозволить практикуючим лікарям ветеринарної медицини суттєво удосконалити діагностику лейкозної інфекції та підвищити ефективність проведення протиепізоотичних заходів щодо лейкозу великої рогатої худоби в Україні.

2. З метою впровадження у практику ветеринарних діагностичних лабораторій пропонуються науково-методичні рекомендації «Діагностика лейкозу великої рогатої худоби методом двостадійної полімеразної ланцюгової реакції» *(затверджено Науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України, протокол № 1 від 23 грудня 2010 р.)*.

3. Отримані результати дослідження щодо складу ліпідів у молоці корів за лейкозу великої рогатої худоби можуть бути використані для ветеринарно-санітарної оцінки молока, одержаного від інфікованих тварин.

## СПИСОК ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Порівняльна ефективність діагностики лейкозу великої рогатої худоби при використанні різних методів дослідження / [Абрамов А. В., Король Д. М., Мельничук С. Д., Спиридонов В. Г., **Іщенко Л. М.**] // Ветеринарна медицина України. – 2007 – № 2. – С. 33–34. *(Здобувач здійснювала відбір зразків та проводила дослідження).*

2. Діагностика лейкозу у тільних корів і телят / [**Іщенко Л.**, Спиридонов В., Бусол В., Іщенко В., Мельничук С.] // Тваринництво України. – 2011. – № 6. – С. 22–26. *(Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала статтю до друку).*

3. Показники молекулярно-генетичного та серологічного методів діагностики за експериментального зараження овець вірусом лейкозу великої рогатої худоби / [**Іщенко Л. М.**, Спиридонов В. Г., Іщенко В. Д., Бусол В. О., Мельничук С. Д., Коваленко Л. В. ] // Науковий вісник ветеринарної медицини. – 2012. – Вип. 9 (92). – С. 70–74. *(Здобувач брала участь у проведенні досліджень та написанні статті).*

4. Ліпідний склад сироватки крові овець за експериментального зараження вірусом лейкозу ВРХ / [**Іщенко Л. М.**, Мельничук С. Д., Іщенко В. Д., Сисолятін С. В., Спиридонов В. Г.] // Біологія тварин. – 2014. – Т. 16. – № 4. – С. 43–49. *(Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала статтю до друку).*

5. Валідація ПЛР-методики для діагностики лейкозу великої рогатої худоби / [**Іщенко Л. М.**, Спиридонов В. Г., Іщенко В. Д., Мельничук С. Д.] // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. – 2014. – Т. 16. – № 2 (59). – С. 96–102. *(Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала статтю до друку до друку).*

### Стаття у науковому виданні України,

#### включеному до міжнародної наукометричної бази даних

6. Жирнокислотний спектр ліпідів молока корів інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби / [**Іщенко Л.**, Мельничук С., Іщенко В., Сисолятін С.] // Тваринництво України. – 2015. – № 10. – С. 22–26 *(Здобувач провела планування експерименту, здійснила аналіз результатів дослідження та підготувала статтю до друку).*

### Патент

7. Патент на корисну модель № 53223, Україна МПК (2009) и 2010 04652, G01N 33/48. Спосіб прижиттєвої діагностики лейкозу великої рогатої худоби двостадійною полімеразною ланцюговою реакцією / В. Г. Спиридонов, **Л. М. Іщенко**, С. Д. Мельничук; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – заявл. 20.04.2010; опубл. 27.09.2010. – Бюл. № 18, 2010 р. *(Здобувач брала участь у проведенні експериментальних досліджень, підготовці та оформленні патенту).*

### Методичні рекомендації

8. Діагностика лейкозу великої рогатої худоби методом двостадійної полімеразної ланцюгової реакції: [методичні рекомендації] / [Спиридонов В. Г., **Ищенко Л. М.**, Рибальченко Д. Ю., Мартиненко Д. Л., Мельничук С. Д., Мельничук М. Д., Бусол В. О., Григорюк І. П.]. – К.: НУБіП України, 2010. – 29 с. (Здобувач брала участь у підготовці та написанні методичних рекомендацій).

### Нуклеотидні послідовності гену *ENV* вірусу лейкозу великої рогатої худоби депоновані у центр біотехнологічної інформації (*National Center for Biotechnological Information, NCBI*):

9. Bovine leukemia virus isolate Rivne envelope glycoprotein (env) gene, partial cds: [електронний ресурс] / [**Ischenko L. M.**, Spirydonov V. G., Ischenko V. D., Melnychuk S. D.] // GenBank. – VERSION KR063245.1 GI:930624043 – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KR063245>. (Здобувач провела експериментальні дослідження).

10. Bovine leukemia virus isolate Kirovograd envelope glycoprotein (env) gene, partial cds: [електронний ресурс] / [**Ischenko L. M.**, Spirydonov V. G., Ischenko V. D., Melnychuk S. D.] // GenBank. – VERSION KR063246.1 GI:930624045. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KR063246>. (Здобувач провела експериментальні дослідження).

### Матеріали і тези наукових доповідей:

11. Development of Real-Time PCR Assay Using SYBR Green I for Large-Scale Routine Diagnostic of Enzootic Bovine Leucosis in Dairy Cattle / [Spirydonov V. G., Daskaliuk Y. A., Melnychuk M. D., **Ischenko L. M.**, Melnychuk S. D.] // 1st east-west veterinary medicine and feeding stuff congress, October 13–15, 2005. – Riga, Latvia. – P. 22. (Здобувач здійснювала відбір зразків та проводила дослідження).

12. Диагностика провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота с использованием диагностического набора «Лейко-ПЛР» / [**Ищенко Л. М.**, Парий Ю. О., Новак Н. Б., Облап Р. В., Спиридонов В. Г., Мельничук М. Д., Мельничук С. Д.] // Біоресурси і віруси: V Міжнародна конференція, Київ, 10–13 вересня 2007 р.: тези доповіді. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – С. 142. (Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала тези до друку).

13. Спиридонов В. Г. Применение ПЦР в реальном времени для диагностики лейкоза КРС / В. Г. Спиридонов, **Л. М. Ищенко**, С. Д. Мельничук // Генодиагностика инфекционных болезней – 2007 («Молекулярная диагностика – 2007»): 6-я Всероссийская научно-практическая конференция, Москва, 28–30 ноября 2007 г.: тезисы доклада. – М., 2007. – Т. 2. – С. 60–62. (Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала тези до друку).

14. Организация диагностики лейкоза крупного рогатого скота в Украине / [Спиридонов В., **Ищенко Л.**, Мадисон Л., Антипов И., Мельничук С.] // Актуальные проблемы здоровья скота, завозимого в Россию в рамках нацпроекта «Развитие агропромышленного комплекса»: Международная конференция, Казань, 28–30 ноября 2007 г.: тезисы доклада. – Казань, 2008. – С. 116–118. (Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала тези до друку).

15. Особливості прижиттєвої діагностики лейкозу великої рогатої худоби при використанні полімеразної ланцюгої реакції / [Іщенко Л. М., Спиридонов В. Г., Мельничук С. Д., Абрамов А. В., Король Д. М.] // Моніторинг, прогнозування, діагностика та профілактика інфекційних хвороб тварин із використанням сучасних методів епізоотології, молекулярної біології та біотехнології: Міжнародна науково-практична конференція. – Харків, 2009. – № 92. – С. 218–221. *(Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала тези до друку).*

16. Молекулярно-генетичний та серологічний контроль лейкозної інфекції у овець за експериментального зараження вірусом лейкозу ВРХ / [Іщенко Л. М., Спиридонов В. Г., Мельничук С. Д., Бусол В. О.] // Конференція науково-педагогічних працівників, наукових співробітників та аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва НУБіП України, Київ, 16–17 березня 2011 р.: тези доповіді. – К.: НУБіП України. – С. 215–216. *(Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала тези до друку).*

17. Жирнокислотний склад сироватки крові та молока корів спонтанно інфікованих вірусом лейкозу ВРХ / [Іщенко Л. М., Мельничук С. Д., Іщенко В. Д., Сисолятин С. В.] // Zbiór raportów naukowych. «Knowledge society». Wykonane na materiałach Międzynarodowej NaukowoPraktycznej Konferencji 30.10.2014 – 31.10.2014 roku, Łódź. – Warszawa: Diamond trading tour, 2014. – Str. 19–22. *(Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала тези до друку).*

18. Разработка nested-PCR в реальном времени для диагностики лейкоза крупного рогатого скота / [Іщенко Л. М., Спиридонов В. Г., Іщенко В. Д., Мельничук С. Д.] // Zbiór raportów naukowych. «Nauka dzisiaj. Oferty» Wykonane na materiałach Międzynarodowej NaukowoPraktycznej Konferencji 29.11.2014 – 30.11.2014 roku, Szczecin. – Warszawa: Diamond trading tour, 2014. – Str. 46–49. *(Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала тези до друку).*

19. Іщенко Л. М. Ліпідний склад молока корів спонтанно інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби / Л. М. Іщенко, С. Д. Мельничук, В. Д. Іщенко // Актуальні проблеми наук про життя та природокористування: III Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, Київ, 28–31 жовтня 2015 р.: тези доповіді. – К.: НУБіП України. – 2015. – С. 288–289. *(Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала тези до друку).*

20. Діагностика лейкозу великої рогатої худоби – сучасний погляд на проблему / [Іщенко Л. М., Спиридонов В. Г., Іщенко В. Д., Мельничук С. Д.] // Сучасні інформаційні технології управління екологічною безпекою, природокористуванням, заходами в надзвичайних ситуаціях: 14-та Міжнародна науково-практична конференція, 5–9 жовтня 2015 р.: матеріали конференції. – Пуща-Водиця, 2015. – С. 373–378. *(Здобувач провела експериментальні дослідження та підготувала тези до друку).*

## АНОТАЦІЯ

**Ищенко Л. М. Ліпіди крові жуйних за спонтанного та експериментального лейкозу великої рогатої худоби та молекулярно-генетична ідентифікація збудника.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2016.

В роботі досліджено ліпіди сироватки крові овець та науково обґрунтовано їх зміни на різних стадіях лейкозного процесу за умов експериментального інфікування вірусом лейкозу великої рогатої худоби. Показано, що для стадії провірусу та стадії утворення антитіл характерним є зменшення вмісту арахідонової жирної кислоти у сироватці крові цих тварин.

Встановлено, що за спонтанного інфікування корів вірусом лейкозу великої рогатої худоби і розвитку лейкозного процесу, жирнокислотний склад ліпідів молока та сироватки крові тварин зазнає змін. Підвищується вміст насичених жирних кислот, зростає індекс їх насичення. В молоці корів зменшується вміст усіх мононенасичених і поліненасичених жирних кислот, зростає вміст *транс*-ізомерів олеїнової і лінолевої кислот та знижується вміст їх *цис*-ізомерів.

Удосконалено двостадійну полімеразну ланцюгову реакцію для виявлення провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби за рахунок проведення другої стадії в режимі реального часу. Проведено валідацію та апробацію запропонованої модифікації полімеразної ланцюгової реакції, які свідчать про доцільність її використання для діагностики лейкозної інфекції у тварин.

Проведено аналіз нуклеотидної послідовності гену ENV ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби, виділених від тварин у різних областях України, та встановлено їх філогенетичний зв'язок із відомими на сьогодні ізолятами збудника.

**Ключові слова:** велика рогата худоба, вівці, лейкоз, сироватка крові, ліпіди, жирнокислотний спектр, полімеразна ланцюгова реакція, валідація, провірусна ДНК, філогенетичний аналіз.

## АННОТАЦИЯ

**Ищенко Л. М. Липиды крови жвачных при спонтанном и экспериментальном лейкозе крупного рогатого скота и молекулярно-генетическая идентификация возбудителя.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2016.

В работе исследованы показатели содержания липидов и их изменения в сыворотке крови жвачных на разных стадиях лейкозного процесса в условиях экспериментального и спонтанного инфицирования вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Усовершенствована двухстадийная полимеразная цепная реакция для обнаружения провирусной ДНК возбудителя лейкоза.

Показано, что при экспериментальном инфицировании овец вирусом лейкоза крупного рогатого скота на стадии провируса и на стадии выработки антител против

возбудителя в сыворотке крови достоверно снижается содержание арахидоновой жирной кислоты (C20:4), что, скорее всего, связано с синтезом простагландина E<sub>2</sub>, принимающего участие в регуляции экспрессии возбудителя лейкоза.

В сыворотке крови коров, инфицированных вирусом лейкоза в естественных условиях, увеличивается содержание фосфолипидов, общего и этерифицированного холестерина, а также свободных жирных кислот, в то время как содержание триацилглицеролов уменьшается по сравнению с этими показателями у животных контрольной группы. Существенно изменяется и жирнокислотный состав липидов сыворотки крови коров, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Отмечено увеличение содержания насыщенных жирных кислот, снижение содержания мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот, в результате чего увеличивается индекс насыщения жирных кислот.

Изменения в составе липидов молока коров, инфицированных вирусом лейкоза, в сравнении с клинически здоровыми животными более выражены, чем изменения состава липидов в сыворотке крови. Отмечено увеличение содержания общих фосфолипидов, общего и этерифицированного холестерина. Вместе с тем, в молоке коров уменьшается концентрация свободных жирных кислот, диацил- и триацилглицеролов. В молоке коров, инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота, как и в сыворотке их крови, повышается содержание насыщенных жирных кислот, увеличивается индекс их насыщения, что обусловлено повышением содержания пальмитиновой (C16:0) и стеариновой кислот (C18:0). Кроме того, в молоке инфицированных коров увеличивается содержание *транс*-изомеров олеиновой (C18:1) и линолевой (C18:2) жирных кислот на фоне снижения содержания их *цис*-изомеров, что влияет на его качественные показатели.

Усовершенствовано двухстадийную полимеразную цепную реакцию для детекции провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота путем проведения второй стадии в режиме реального времени. Такой подход позволяет снизить риск контаминации продуктами амплификации и предупредить ложноположительные результаты исследования. Кроме того, для предупреждения ложноотрицательных результатов исследования подобраны праймеры и флуоресцентный зонд для детекции гена, специфического для крупного рогатого скота (внутренний контроль).

Проведена внутрилабораторная валидация предложенной модификации двухстадийной полимеразной цепной реакции, которая свидетельствует о ее высокой чувствительности и специфичности. Показано, что предложенная двухстадийная ПЦР в реальном времени позволяет выявить на 23,0 % больше инфицированных животных по сравнению с одностадийной ПЦР в реальном времени.

С помощью предложенного метода у овец, экспериментально инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота, провирусную ДНК детектировали на 9 сутки после инфицирования. Антитела против возбудителя с помощью реакции иммунодиффузии начали детектировать только на 23 сутки после инфицирования. Полученные результаты свидетельствуют о преимуществе метода ПЦР по сравнению с серологическими методами для выявления инфицированных животных на ранней стадии лейкозного процесса.

Секвенирована нуклеотидная последовательность гена ENV изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота, выделенных от животных в разных областях Украины, и установлена их филогенетическая связь с известными сегодня изолятами возбудителя. Показано, что большинство украинских изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота генетически близки к бельгийскому изоляту, который циркулирует в странах Европы. Полученные данные подтверждают мнение некоторых ученых, что в Украину вирус лейкоза крупного рогатого скота был завезен с племенными животными в 1949–1972 гг. из Эстонской Республики и Латвийской Республики. Вместе с тем, изоляты вируса лейкоза крупного рогатого скота, выделенные от животных из хозяйств Киевской и Сумской областей, по генетической структуре сходны с изолятами, выделенными в Австралийском Союзе, США и странах Азии, что указывает на различные пути занесения возбудителя на территорию Украины.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, овцы, лейкоз, сыворотка крови, липиды, жирнокислотный спектр, полимеразная цепная реакция, валидация, провирусная ДНК, филогенетический анализ.

## ANNOTATION

**Ischenko L. M. Lipids in the blood of ruminants at spontaneous and experimental bovine leukemia, and the molecular genetic identification of the bovine leucosis virus.** – The Manuscript.

The dissertation thesis for the degree of candidate of veterinary Sciences on specialty 03.00.04 – biochemistry. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

The study scientifically explains changes of the lipids composition in the ovine serum at different stages of leukemia after the experimental infection with bovine leukemia virus. It was detected a decrease of arachidonic acid level at the stage of proviral DNA and at the stage of BLV antibodies detection.

After spontaneous infection of the cows with bovine leukemia virus, there was significant changes of the lipids composition in milk and serum of cows and the increase of fatty acids saturation index of saturated. In milk cows, it was registered the decrease of all monounsaturated and polyunsaturated fatty acids levels, and the increase of oleic and linoleic fatty acids trans-isomers levels with a lower content of cis-isomers.

It was improved nested polymerase chain reaction for detection of proviral DNA bovine leukemia virus on the ground of the second stage in real time PCR. It was conducted the evaluation of suitability and practical testing of the proposed modification of the polymerase chain reaction, which indicates the efficiency of its use for the diagnostic of leukemia infections in animals.

It was analysed of the nucleotide sequences of isolates leukemia virus isolated in different regions of Ukraine, and their phylogenetic relationship of the recognized for today isolates of the pathogen.

**Key words:** cattle, sheeps, leukosis, serum, lipids, fatty acid spectrum, polymerase chain reaction, validation, proviral DNA, phylogenetic analysis.

Підписано до друку 14.04.16  
Ум. друк. арк. 0,0  
Наклад 100 прим.

Формат 60x84\16  
Обл.-вид.арк. 0,9  
Зам. № 8438

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України  
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041  
тел.: 527-81-55



