

**На правах рукописи**

**МОРОЗОВА**  
**Ольга Владимировна**

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ  
В ОЦЕНКЕ СТАД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ЛЕЙКОЗЕ**

**06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

**Автореферат**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата ветеринарных наук**

**Омск – 2015**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных».

Научный руководитель: **Власенко Василий Сергеевич**  
доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Храмцов Виктор Викторович**  
доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией лейкозов ФГБНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока»  
**Абакин Сергей Стефанович**  
кандидат ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционных, незаразных и паразитарных болезней ФГБНУ «Всероссийский научно исследовательский институт овцеводства и козоводства»

Ведущая организация: ФГБНУ «Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт».

Защита состоится 25 марта 2016 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.002.02 при ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет» по адресу: 656049, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Красноармейский, 98, тел./факс 8 (3852) 31-39-70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет» (656049, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Красноармейский, 98) и на сайте <http://www.asau.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Фёдорова Галина Анатольевна

## 1.ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Лейкоз крупного рогатого скота является серьезной проблемой для скотоводства нашей страны и ряда регионов мира, прочно занимая в структуре инфекционных патологий ведущее место (М.И. Гулюкин с соавт., 2002, 2011; Ю.Н. Смирнов с соавт., 2008; K.G. Trono et al., 2001; J.A. Van Leeuwen et al., 2005, 2006; M. Lavanya et al., 2008; K. Murakami et al., 2011). При этом огромный вред наносимый лейкозом животноводству складывается от преждевременной выбраковки коров, снижения качества продукции, полученной от больных животных, утраты племенной ценности животных из-за подавления функции иммунной системы инфекцией, снижения резистентности как к инфекционным, так и к незаразным болезням, расходов на оздоровительные мероприятия (П.Н. Смирнов, 2007).

За истекший период времени ветеринарной наукой и практикой достигнуты определенные успехи в изучении этиологии, выявлены пути передачи инфекции, установлены и раскрыты некоторые особенности развития инфекционного и эпизоотического процессов, определена роль ряда экологических факторов и наследственной предрасположенности к лейкозу, разработаны и внедряются различные способы ликвидации лейкоза у крупного рогатого скота (Т.П. Кудрявцева, 1974; В.П. Шишков, Л.Г. Бурба, 1988; П.Н. Смирнов, А.Г. Незавитин с соавт., 1992; В.В. Храмцов, 1995; Н.И. Петров, 1999; Р.Ф. Галеев, 2000; И.М. Донник, П.Н. Смирнов, 2001; Н.А. Мальцева, 2002; В.В. Разумовская, 2004; С.И. Логинов, 2005; В.А. Апалькин, М.И. Гулюкин, Н.И. Петров, 2005; Г.А. Симонян, М.И. Гулюкин, 2009; М.А. Амироков, 2011).

Несмотря на определенные успехи в изучении этиологии и патогенеза лейкоза, разработке диагностики, а также системы эффективных и экономически целесообразных мероприятий, ситуация по лейкозу в стране продолжает оставаться напряженной.

Сложность решения проблемы лейкоза диктуется рядом обстоятельств: отсутствие полных данных о причинах и механизмах, вызывающих безудержную пролиферацию клеток лимфоидного ряда с нарушением их созревания. В эпизоотологии лейкоза пока необъяснимы причины и механизмы активации инфекционного процесса, когда между инфицированием и возможным заболеванием существует большой или пожизненный временной срок (А.Ф. Лебедев, 2004; А.А. Евглевский с соавт., 2010).

Все это определяет необходимость дальнейших исследований по оценке иммунологических показателей как инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), так и восприимчивых к вирусу.

**Степень разработанности.** Изучению иммунологических аспектов при инфекции ВЛКРС и лейкозе крупного рогатого скота посвящены многочисленные исследования, которые свидетельствуют о важной роли иммунных механизмов в развитии лейкозного процесса, особенно параметров клеточной системы (Т-лимфоцитов). Нередко опубликованные данные носят противоречивый характер, к тому же остаются малоизученными многие патогенетические аспекты данного заболевания. В частности, недостаточно исследованы иммунологические механизмы, способствующие возникновению

осложнений, не оценена их роль в прогрессировании лейкоза крупного рогатого скота. Все это предопределяет чрезвычайную актуальность дальнейшего изучения иммунопатогенеза лейкоза крупного рогатого скота.

**Цель и задачи исследования.** Цель исследований состояла в изучении особенностей функционального состояния Т-лимфоцитов у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу и испытание эффективности иммунологических методов в оценке стад при данной инфекции.

В соответствии с целью были определены следующие задачи:

- выявить эпизоотическую ситуацию лейкоза крупного рогатого скота в Кемеровской области;

- определить концентрационную зависимость изменения уровня экспрессии рецепторов к эритроцитам барана на поверхности Т-лимфоцитов от содержания левамизола в инкубационной среде у носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных;

- оценить информативность нагрузочного теста с левамизолом и выявить прогностически значимые интервалы сочетаний иммунологических параметров с помощью дискретно-динамического анализа у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу;

- установить связь между функциональным состоянием нейтрофилов и уровнем циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови крупного рогатого скота с различной степенью компрометации к лейкозу;

- изучить особенности экспрессии E-рецепторов на Т-лимфоцитах периферической крови у крупного рогатого скота с повышенной чувствительностью к левамизолу;

- изучить чувствительность Т-лимфоцитов к левамизолу *in vitro* у крупного рогатого скота разного возраста из благополучного и неблагополучного по лейкозу стада.

**Научная новизна.** Изучена степень распространения лейкоза крупного рогатого скота в Кемеровской области. Показана динамика эпизоотической ситуации лейкоза крупного рогатого скота.

Впервые установлена концентрационная зависимость изменения уровня экспрессии рецепторов к эритроцитам барана на поверхности мембран Т-лимфоцитов крупного рогатого скота от содержания левамизола в инкубационной среде. Показано, что левамизол в конечной концентрации 0,5 мкг/мл оказывает иммунокорректирующее действие на экспрессию рецепторов к эритроцитам барана Т-клетками, проявляющееся в увеличении данного показателя у животных с нарушением Т-системы иммунитета.

Проведена сравнительная характеристика функционального состояния Т-лимфоцитов у коров и молодняка крупного рогатого скота различных периодов постнатального развития в благополучном и неблагополучном по лейкозу хозяйствах. Показано, что индекс сдвига, определяемый как отношение процента E-РОК после инкубации с левамизолом к числу E-РОК до обработки препаратом, у здорового крупного рогатого скота не превышает 0,95, а у животных с инфекционной патологией и с предрасположенностью к заболеванию лейкозом составляет  $\geq 1,2$ . Научная новизна исследований

подтверждена патентом РФ № 2465588 «Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота» от 27.10.2012 г.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Научные положения диссертационной работы расширяют и углубляют современные представления об особенностях изменения функционального состояния Т-лимфоцитов у крупного рогатого скота, инфицированного ВЛКРС, и больного лейкозом.

Материалы диссертации использованы для разработки методического пособия по методам оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных.

Методические приемы по оценке функционального состояния Т-лимфоцитов могут быть использованы при выполнении научно-исследовательских работ аналогичной направленности и апробированы в учебном процессе ВУЗов ветеринарного профиля.

**Методология и методы исследования.** Экспериментальная часть работы была выполнена в 2011-2014 гг. в лаборатории эпизоотологии и мер борьбы с туберкулезом, секторе иммунитета и специфической профилактики туберкулеза Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных и на базе ФГУ «Кемеровской МВЛ».

Диссертация выполнена в соответствии с тематическим планом НИР ВНИИБТЖ VII Ветеринарная медицина: 22.2. «Разработка новых и усовершенствование существующих средств и методов иммунопрофилактики, иммунотерапии, диагностики туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота, а также дифференциальной диагностики микобактериозов».

Эпизоотологический материал собран по данным ветеринарной отчетности Главного управления ветеринарии и документации районных ветеринарных лабораторий о распространении лейкоза крупного рогатого скота на территории Кемеровской области в 2007-2013 гг.

Объектом исследования являлся крупный рогатый скот (около 1500 голов) разного возраста и пола, периферическая кровь и сыворотка крови 350 голов молодняка крупного рогатого скота, нетелей и коров из благополучного и неблагополучного по лейкозу хозяйства.

Популяцию Т-лимфоцитов (Е-рок) определяли в реакции спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана, популяцию В-лимфоцитов (ЕАС-рок) определяли в реакции комлементарного розеткообразования с эритроцитами быка, образовавшими иммунные комплексы с гетерофильными антителами и комлементом, и популяцию лимфоцитов-киллеров (ЕА-рок) в реакции непрямого глобулинового розеткообразования с эритроцитами быка, образовавшими иммунные комплексы лишь с гетерофильными антителами (Г.Ф. Коромыслов с соавт., 1980). Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 (Ю.А. Гриневич, А.Н. Алферов, 1981). Функциональную активность нейтрофилов оценивали в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ) в спонтанном (без нагрузки) варианте с последующей фиксацией реакции с помощью многоканального

иммунохимического анализатора «Fluorofot STD Less-486-M». Оценку концентрации образовавшегося диформаза в нейтрофилах определяли по разнице экстинкций при длине волны 630 нм и 490 нм (М.А. Годков, В.Ю. Зинкин, 2003).

Для определения чувствительности Т-лимфоцитов крупного рогатого скота ставили нагрузочный пробирочный тест Е-розеткообразования с левамизолом при помощи метода В.Е. Казмирчука с соавт. (1984), модифицированный нами для выявления животных с повышенной чувствительностью к лейкозу. Для оценки влияния препарата на функциональную активность Т-лимфоцитов животного определяли индекс сдвига (ИС) по формуле:

$$ИС = \frac{\% E - РОК \text{ после инкубации с левамизолом}}{\% E - РОК \text{ до инкубации с левамизолом}}$$

Для выявления серопозитивных животных – носителей вируса лейкоза крупного рогатого скота применяли реакцию иммунодиффузии (РИД), для выявления больных лейкозом животных применяли гематологический метод исследования. Лейкограмму выводили по результатам дифференцированного подсчета 100 клеток в окрашенных мазках крови под микроскопом с иммерсионной системой. Абсолютное количество лимфоидных элементов в 1 мкл крови определяли путем умножения количества лейкоцитов на общий процент лимфоцитов в лейкоцитарной формуле и деления полученного произведения на 100. Показатель абсолютного количества лимфоцитов оценивали по «лейкозному ключу» (Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота, М., 2000).

Биометрическую обработку цифрового материала экспериментальных исследований проводили с помощью дискретно-динамического анализа. Математическая обработка цифровых данных включала определение средней арифметической ( $M$ ), ошибки средней арифметической ( $m$ ). Для оценки существенности различий между двумя средними величинами  $M_x$  и  $M_y$  использовали  $t$ -критерий Стьюдента. Различие между контролем и опытом считалось статистически достоверным только для  $P \leq 0,05$  (В.Ю. Урбах, 1964; А.Т. Усович, П.Т. Лебедев, 1970; В.С. Власенко с соавт., 2010).

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Кемеровской области;
2. Результаты сравнительных исследований по оценке функционального состояния Т-лимфоцитов у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу;
3. Результаты экспериментального исследования эффективности способа выявления повышенной чувствительности к инфекции ВЛКРС у крупного рогатого скота в хозяйствах с различной эпизоотической обстановкой по лейкозу.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов подтверждается большим объемом исследований, проведенных в лабораторных и производственных условиях в динамике с 2011 по 2014 г.г. с применением современных методов оценки иммунного статуса, математической обработки цифрового материала на персональном компьютере с использованием стандартных программ, а также варианта регрессионного

метода – дискретно-динамического анализа. Степень достоверности полученных показателей оценена путем сравнения величин вариационных рядов с помощью критерия Стьюдента.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных (Омск, 2011-2014), на Международных научно-практических конференциях: «Инфекционная патология животных» (Омск, 2011); «Научный поиск – животноводству России» (Ставрополь, 2013); «Обеспечение ветеринарного благополучия в животноводстве и птицеводстве» (Омск, 2013) и «Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса» (Ставрополь, 2014).

**Публикации результатов исследований.** По материалам диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертационных работ («Ветеринарный врач», «Вестник ветеринарии»), методическое пособие и патент РФ на изобретение.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 135 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, списка литературы, списка иллюстративного материала и приложений. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 11 рисунками. Список литературы включает 223 источника, из них 83 иностранных авторов.

**Личный вклад соискателя.** Работа выполнена соискателем самостоятельно, участие соавторов отражено в совместно изданных научных статьях. Автор приносит глубокую благодарность за оказание научно-методической помощи доктору ветеринарных наук, профессору М.А. Бажину и кандидату биологических наук Т.С. Дудолодовой.

## **2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **2.1 Эпизоотическая обстановка по лейкозу крупного рогатого скота в Кемеровской области.**

С целью изучения степени распространения инфекции и эффективности проводимых профилактических мероприятий мы провели изучение эпизоотических особенностей лейкоза крупного рогатого скота в Кемеровской области. С помощью проведенных диагностических исследований на лейкоз (РИД) за 7 лет было выявлено свыше 143 тысяч животных-вирусоносителей, что составило 7,7 % от общего числа. Наибольший процент носителей ВЛКРС выявлен среди телок перед случкой (14,31 %), наименьший – среди телок 6-12-месячного возраста (9,7 %). Кроме того, за этот период было проведено 297377 гематологических исследований, в результате чего было выявлено 4625 животных, находящихся в гематологической стадии заболевания, что составило в среднем  $1,76 \pm 0,30$  % от числа исследований.

Инфицированность вирусом лейкоза крупного рогатого скота в Кемеровской области за 2007-2013 годы равномерно снижается. Так, наибольшее число животных-вирусоносителей установлено в 2007 году (9,9 %),

наименьшее – в 2013 году (5,6 %). В тоже время по данным гематологических исследований в Кемеровской области наблюдался рост количества больных животных с 2007 по 2011 год (от 1,5 % до 3,2 %) со значительным уменьшением их числа в 2012 и 2013 годах (соответственно: 1,0 и 1,4 %).

Несмотря на позитивные сдвиги, анализ эпизоотических данных по разным зонам Кемеровской области в ретроспективе показывает, что в регионе нет ни одного района, где бы ни выявлялись животные носители ВЛКРС.

Степень инфицированности в среднем за 7 лет превышала 10 % в Крапивинском, Ижморском, Юргинском, Мариинском и Тяжинском районах. В Новокузнецком, Беловском, Ленинск-Кузнецком и Яшкинском районах, а также по результатам исследований Кемеровской МВЛ суммарный показатель вирусносительства у крупного рогатого скота за эти годы составил менее 5 %. Самый высокий уровень был в Ижморском районе и достигал 26 %, а самый низкий – 1,95 % в Новокузнецком районе.

Средний процент выявленных в гематологической стадии заболевания за 7 лет оказался самым высоким в Ленинск-Кузнецком (4,24 %), Беловском (3,8 %) и Юргинском (3,3 %), самым низким в Мариинском (0,11 %), Ижморском (0,27 %) и Прокопьевском (0,57 %) районах.

Таким образом, анализ результатов серологических и гематологических исследований, проведенных в Кемеровской области с 2007 по 2013 гг., показал, что несмотря на снижение числа выделенных животных-вирусоносителей, эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в регионе остается достаточно напряженной.

## **2.2 Разработка способа выявления повышенной чувствительности у крупного рогатого скота к инфекции ВЛКРС.**

Известно, что развитие Т-клеточного иммунодефицита чревато повышенной восприимчивостью организма животных к инфекционным заболеваниям, особенно вирусной этиологии. Восстановить содержание в крови у больных различными заболеваниями с исходным дефицитом розеткообразующих Т-клеток, по мнению некоторых авторов, возможно с помощью левамизола. При этом этот препарат способен усиливать активность Т-лимфоцитов в иммунологически дефектном организме, но не у здоровых.

В связи с вышесказанным мы поставили задачу подобрать оптимальную концентрацию левамизола для оценки чувствительности лимфоцитов в реакции спонтанного розеткообразования (Е-РОК) у инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом крупного рогатого скота. Затем на следующем этапе с помощью дискретно-динамического анализа оценить информативность метода и выявить интервалы значений, характерные для здоровых животных, и провести сравнительное исследование крови крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу путем постановки Е-РОК с чистой взвесью лимфоцитов и с лимфоцитами, обработанными левамизолом, с последующим вычислением индекса сдвига.

### **2.2.1 Оценка чувствительности лимфоцитов в реакции спонтанного розеткообразования к разным концентрациям левамизола.**

С целью выбора оптимальной концентрации для изучения действия левамизола *in vitro* на Т-лимфоциты провели опыт по следующей схеме. В неблагополучном по лейкозу хозяйстве исследовали 20 коров, из которых сформировали 3 группы: 1 группа – 6 коров вирусоносителей (РИД-

положительные); 2 группа – 4 больные коровы, положительно реагирующие в РИД и подтвержденные гематологическим методом исследования, и 3 группа – 10 здоровых (не реагирующих в РИД) коров. В периферической крови определили число Т-лимфоцитов с помощью спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК) при постановке реакции со средой №199 (контроль), а также количество Е-РОК при воздействии левамизола *in vitro*, используя различные его концентрации: 50 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,01 мкг/мл.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Изучение действия различных концентраций левамизола в реакции Е-РОК на лимфоциты *in vitro* у инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом крупного рогатого скота

Группа животных	Символы статистики	Е-РОК, %			
		Контроль (без левамизола)	с левамизолом, мкг/мл		
			50	0,5	0,01
Носители ВЛКРС	M±m P	20,16±1,08	12,66±1,3 <0,001	32,83±3,34 <0,01	21,16±2,36 >0,05
Гембольные	M±m P	19,5±2,06	15,0±1,15 >0,05	32,0±1,22 <0,01	21,25±2,53 >0,05
Здоровые (РИД-)	M±m P	30,0±2,30	10,7±1,50 <0,001	22,8±2,84 >0,05	19,8±1,92 <0,01

При определении чувствительности *in vitro* Е-РОК к левамизолу в концентрации 50 мкг/мл отмечено подавление розеткообразования у животных всех групп, наиболее выраженное при повышенном уровне этих клеток в периферической крови (30,0±2,30, 10,7±1,50 %; P<0,001).

При воздействии левамизола на Т-лимфоциты *in vitro* в концентрации 0,5 мкг/мл у вирусоносителей и больных лейкозом животных наблюдается достоверное повышение Т-розеткообразования (соответственно: 20,16±1,08, 32,83±3,34 % и 19,5±2,06, 32,0±1,22 %; P<0,01), тогда как у РИД-отрицательных их количество оказалось сниженным.

Концентрация левамизола 0,01 мкг/мл существенно не повышала количества Е-РОК у вирусоносителей и больных лейкозом коров, в то же время подавляла розеткообразование у РИД-отрицательных животных (30,0±2,30, 19,8±1,92 %; P<0,01).

Затем для оценки влияния препарата на функциональную активность Т-лимфоцитов животного определили индекс сдвига (ИС), в результате чего было установлено, что этот показатель у носителей ВЛКРС и больных лейкозом по сравнению со здоровыми животными с высокой степенью достоверности увеличивается (P<0,001).

Таким образом, для изучения чувствительности *in vitro* Е-РОК к левамизолу у носителей вируса лейкоза и больных лейкозом животных предпочтительно применение препарата в количестве 0,5 мкг/мл, что и послужило основанием к использованию этой концентрации в дальнейшей работе.

### **2.2.2 Оценка иммунного статуса здорового, инфицированного ВЛКРС и больного лейкозом крупного рогатого скота с помощью дискретно-динамического анализа.**

Для выяснения информативности нагрузочного теста с левамизолом (Елев-РОК) и индекса сдвига (ИС) в отношении выявления животных с повышенной чувствительностью к лейкозной инфекции, а также тех интервалов значений параметров в сочетаниях, где они имеют резкие различия у здоровых животных и у индивидуумов с функциональным напряжением иммунной системы, мы применили дискретно-динамический анализ. Для установления более объективной картины в различии взаимосвязей между иммунологическими параметрами, помимо указанных методов у экспериментальных животных в периферической крови, мы определили процентное содержание иммунокомпетентных клеток (ЕА-РОК и ЕАС-РОК), функциональную активность нейтрофилов в НСТ-тесте (спонтанный вариант) (ед. оп. пл.) и концентрацию ЦИК в сыворотке крови (у. е.).

С этой целью в опыт было отобрано 30 голов крупного рогатого скота, в том числе 10 больных лейкозом коров (гематологическая стадия), 10 носителей ВЛКРС и 10 здоровых животных.

Исследование иммунологических параметров животных всех групп с помощью дискретно-динамического анализа показало, что наиболее значимыми являются 26 из 42 возможных сочетаний показателей. Изучение доли участия каждого определяемого показателя с другими позволило установить, что наибольшим их количеством обладают ИС (6 раз в качестве базисного и 5 раз в качестве варибельного параметров), наименьшим – Е-РОК (1 раз в качестве базисного и 2 раза в качестве варибельного параметров). Помимо индекса сдвига важными оказались Елев-РОК (9), ЕАС-РОК (9), ЕА-РОК (8) и ЦИК (8).

На основании выявленных достоверно различающихся ( $P \leq 0,05$ ) сочетаний параметров с помощью компьютерной программы составили дифференциально-прогностическую таблицу (табл. 2) в результате чего были определены интервалы значений параметров в их сочетаниях, характерные для здоровых животных.

Информацию дифференциально-прогностической таблицы можно представить в виде графика. Например, рассмотрим взаимосвязь параметров Елев-РОК/Е-РОК – индекс сдвига и ЕАС-РОК – процент В-лимфоцитов (рис. 3). В координатах (Е-РОК, Елев-РОК/Е-РОК) построим все точки, соответствующие значениям этих параметров у опытных животных. Весь график разбит вертикальными и горизонтальными линиями на 4 прямоугольника: граница базиса и варибельного показателя минимальная (GB min, GP min); граница базиса и варибельного показателя максимальная (GB max, GP max); граница базиса максимальная, граница варибельного показателя минимальная (GB max, GP min); граница базиса минимальная, граница варибельного показателя максимальная (GB min, GP max). В каждом из прямоугольников подсчитывали число точек в соответствующей группе и

вычисляли относительную частоту. Так, в прямоугольник GB min, GP min попало 10 точек, задаваемые неравенствами  $EAC \leq 38,0$ ,  $Елев-РОК/Е-РОК \leq 0,95$ , причем все точки (100%) соответствовали группе здоровых животных.

Таблица 2. Интервалы значений параметров в их сочетаниях, характерные для крупного рогатого скота, имеющего повышенную устойчивость к лейкозной инфекции

№ п/п	Сочетание: базис (вариабельный параметр)	Интервалы значений параметров сочетания
1	Елев-РОК/Е-РОК (ЕАС-РОК)	$\leq 0,95 (\leq 38,0)$
2	Елев-РОК/Е-РОК (Елев-РОК)	$\leq 0,95 (\leq 18,0)$
3	Елев-РОК/Е-РОК (НСТ)	$\leq 0,95 (\leq 32,0)$
4	ЕАС-РОК (Елев-РОК)	$\leq 38,0 (\leq 8,0)$
5	ЕАС-РОК (ЕА-РОК)	$\leq 38,0 (\geq 16,0)$
6	ЛС-Е-РОК/Е-РОК (ЕА-РОК)	$\leq 0,95 (\leq 22,0)$
7	Елев-РОК/Е-РОК (Е-РОК)	$\leq 0,95 (\geq 15,0)$
8	ЦИК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\leq 73,0 (\leq 0,95)$
9	ЕА-РОК (Елев-РОК)	$\leq 30,0 (\leq 18,0)$
10	ЕА-РОК (ЕАС-РОК)	$\leq 30,0 (\leq 29,0)$
11	ЕАС-РОК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\leq 38,0 (\leq 0,95)$
12	Елев-РОК/Е-РОК (ЦИК)	$\leq 0,95 (\leq 73,0)$
13	Елев-РОК (ЕА-РОК)	$\leq 18,0 (\leq 39,0)$
14	Елев-РОК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\leq 18,0 (\leq 1,19)$
15	Елев-РОК (НСТ)	$\leq 18,0 (\leq 47,0)$
16	ЦИК (ЕА-РОК)	$\leq 73,0 (\leq 22,0)$
17	ЕА-РОК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\leq 30,0 (\leq 0,95)$
18	Е-РОК (Елев-РОК/Е-РОК)	$\geq 19,0 (\leq 0,95)$
19	ЕАС-РОК (НСТ)	$\leq 38,0 (\leq 48,0)$
20	ЦИК (Елев-РОК)	$\leq 73,0 (\leq 18,0)$
21	ЦИК (Е-РОК)	$\leq 73,0 (\geq 14,0)$
22	ЕАС-РОК (ЦИК)	$\leq 38,0 (\leq 71,0)$
23	ЦИК (ЕАС-РОК)	$\leq 73,0 (\leq 25,0)$
24	Елев-РОК (ЕАС-РОК)	$\leq 18,0 (\leq 38,0)$
25	ЕА-РОК (ЦИК)	$\leq 30,0 (\leq 51,0)$
26	НСТ (Елев-РОК)	$\leq 47,0 (\leq 18,0)$

Анализ дифференциально-прогностической таблицы (табл. 2) показал, что наиболее информативными являются рассмотренное соотношение и следующие: Елев-РОК/Е-РОК в качестве базисного параметра с вариабельными Елев-РОК и Е-РОК и в качестве вариабельного с базисными параметрами ЕАС-РОК и Елев-РОК, а также базисный Елев-РОК с вариабельным ЕА-РОК. Интервалы значений параметров этих сочетаний соответствовали 100 % здоровых животных.

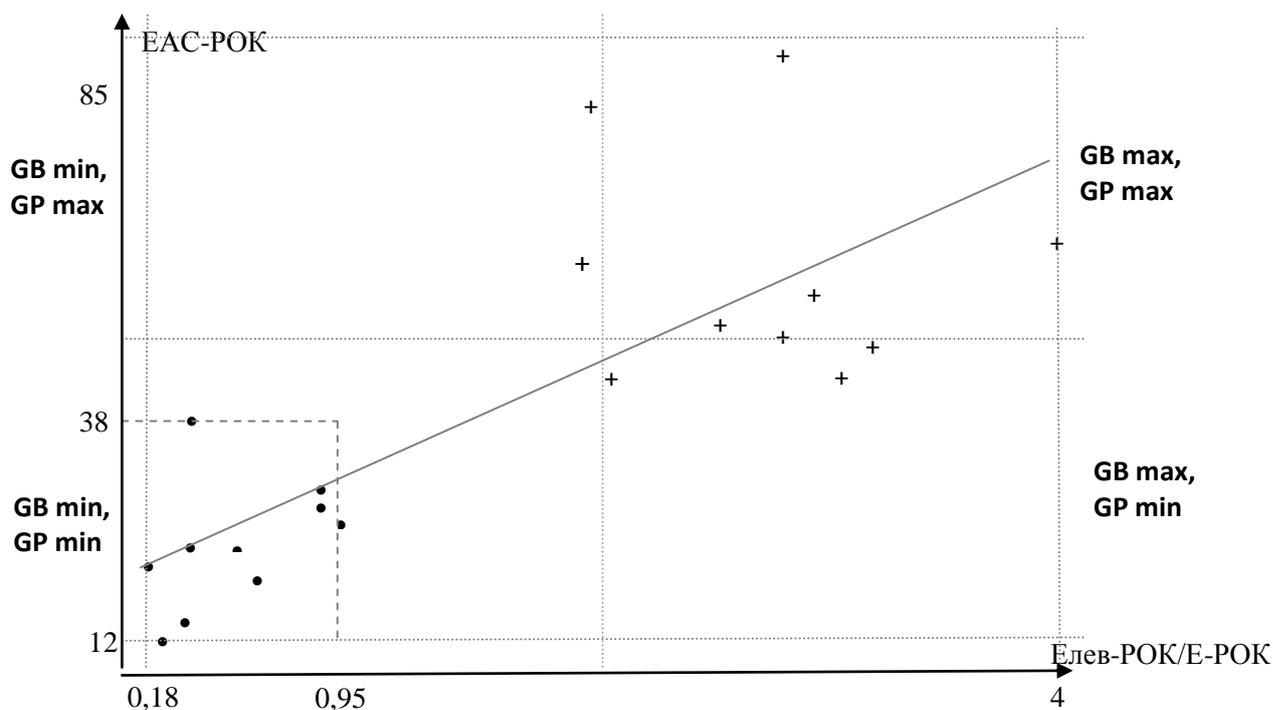


Рис. 1. Зависимость содержания В-лимфоцитов (ЕАС-РОК) от индекса сдвига у здоровых (•), носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных (+).

В остальных случаях, за редким исключением, интервалы значений параметров соответствовали 50-90% здоровым животным. Следует отметить, что при некоторых сочетаниях, указанных в дифференциально-прогностической таблице, встречаются носители ВЛКРС и больные лейкозом животные, у которых интервалы соответствующих пар параметров совпадают с таковыми у здоровых животных. Особенно это касается пар, в которых присутствуют ЦИК и НСТ. Такая ситуация возникает по причине того, что у некоторых больных, находящихся в гематологической стадии, число гранулоцитов, способных восстанавливать НСТ было резко снижено, возможно, за счет угнетения гранулопоэза лейкозным процессом, тогда как у носителей ВЛКРС и основной части больных животных отмечено повышение функционально-метаболической активности нейтрофилов. Учитывая тот факт, что разрушению образующихся иммунных комплексов в циркуляции способствует фагоцитарная активность нейтрофилов, то очевидна взаимосвязь этих двух показателей, для изучения механизма которой необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, результаты анализа сочетаний взаимосвязей в системе иммунитета свидетельствует о важной роли в определении показателей функционального состояния Т-лимфоцитов в оценке предрасположенности к заболеванию крупного рогатого скота лейкозом. С помощью дифференциально-прогностической таблицы, построенной на основании дискретно-динамического анализа, выявлены интервалы значений сочетаний параметров, которые существенно различались в группе здоровых и больных животных.

### **2.2.3 Изучение взаимосвязи между уровнем циркулирующих иммунных комплексов и функциональным состоянием лейкоцитов у крупного рогатого скота при лейкозе.**

Оценка иммунного статуса с помощью дискретно-динамического анализа показала, что у животных с предрасположенностью к лейкозной инфекции интервалы пар сочетаний с участием ЦИК и функциональной активностью нейтрофилов в НСТ-тесте соответствовали животным с повышенной устойчивостью к лейкозной инфекции. Поэтому мы с целью изучения взаимосвязи между этими показателями отобрали 40 голов крупного рогатого скота, которых разделили на 3 группы: 1-ю группу составили 16 коров носителей ВЛКРС; 2-ю группу – 9 больных лейкозом; 3-ю – 15 отрицательно реагирующих в РИД (интактные). В периферической крови определили функциональную активность нейтрофилов в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) в спонтанном варианте в единицах оптической плотности (ед. оп. пл.) и в сыворотке крови количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в условных единицах (у.е.).

А результате проведенных исследований установлено, что у носителей ВЛКРС по сравнению с интактными животными наблюдается увеличение концентрации ЦИК в сыворотке крови ( $84,93 \pm 9,40$ ,  $98,25 \pm 9,61$  у.е.;  $P > 0,05$ ), а также усиление функциональной активности нейтрофилов ( $0,52 \pm 0,01$ ,  $0,54 \pm 0,009$  ед. оп. пл.;  $P > 0,05$ ). Аналогичную тенденцию отмечали и у больных лейкозом животных.

Анализ показателей ЦИК и НСТ-теста у носителей ВЛКРС и больных животных в сравнении со средними значениями интактных животных показал, что у 31,25 % носителей ВЛКРС повышению уровня ЦИК в сыворотке крови соответствует повышение показателей НСТ-теста. Еще в 37,5 % случаев нормальное содержание ЦИК сопровождается повышенной функциональной активностью нейтрофилов. У больных лейкозом в гематологической стадии у 44,44 % накопление концентрации ЦИК в сыворотке крови также сопровождается усилением функциональной активности нейтрофилов в НСТ-тесте, в тоже время у 33,33 % – угнетением.

Таким образом, повышенный уровень ЦИК сочетается с усиленной функциональной активностью лейкоцитов в НСТ-тесте у 31,25 % носителей ВЛКРС и 44,44 % больных лейкозом животных. Снижение числа гранулоцитов, способных восстанавливать НСТ, у третьей части больных животных при одновременном увеличении ЦИК, возможно, за счет угнетения гранулопоэза лейкозным процессом. Случаи повышенной функциональной активности нейтрофилов у носителей ВЛКРС и больных лейкозом с нормальным содержанием ЦИК указывают на роль и других механизмов, участвующих в активации нейтрофилов.

### **2.2.4 Исследование чувствительности лимфоцитов к левамизолу у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу.**

С целью сравнительного исследования крови крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу путем постановки реакции

спонтанного розеткообразования с чистой взвесью лимфоцитов и с лимфоцитами, обработанными левамизолом, с последующим вычислением индекса сдвига было использовано 50 коров. По результатам серологических (РИД) и гематологических исследований выявлен 21 носитель ВЛКРС, 4 больные лейкозом коровы и 25 здоровых, не реагирующих в РИД животных. Затем исследовали кровь путем постановки реакции розеткообразования параллельно с двумя пробами лимфоцитов: чистой взвесью (контрольная) и после экспозиции с левамизолом (опытная). Лимфоциты опытной пробы обработали левамизолом в концентрации 0,5 мкг/мл среды 199, содержащей  $1 \times 10^5$  лимфоцитов, и инкубировали 1 час при 37°C. Затем вычисляли индекс сдвига (ИС).

По результатам исследования с помощью дискретно-динамического анализа оказалось, что прогностически важным интервалом значений индекса сдвига в качестве базисного параметра является  $\leq 0,95$ , а в качестве варибельного -  $\leq 1,19$  для животных, имеющих устойчивость к лейкозной инфекции (табл. 2). Поэтому по результатам вычисления индекса сдвига всех исследуемых животных разделили на 3 группы. В 1-ю группу были включены коровы с низкой чувствительностью Т-лимфоцитов к левамизолу ( $ИС \leq 0,95$ ); во 2-ю – с ИС от 0,96 до 1,19 и 3-ю - с высокой чувствительностью ( $ИС \geq 1,20$ ). Полученные данные были сопоставлены с результатами диагностических исследований на лейкоз. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Показатели чувствительности Т-клеток к левамизолу *in vitro* у крупного рогатого скота с разной степенью компрометации к лейкозу

Группа животных	РИД (-)	Носители ВЛКРС	
		всего	в т.ч. гембольные
1-я группа ( $ИС \leq 0,95$ )	12	-	-
2-я группа (от 0,96 до 1,19)	1	2	-
3-я группа ( $ИС \geq 1,20$ )	12	23	4

Из таблицы 3 видно, что процесс изменений экспрессии Е-рецепторов лимфоцитов осуществляется как у РИД-отрицательных, так и инфицированных ВЛКРС. Однако при наличии вируса повышенная чувствительность к левамизолу ( $ИС \geq 1,20$ ) встречается в 2 раза чаще (у 23-х из 25-и носителей ВЛКРС (92 %) и у 12-и из 25-и РИД-отрицательных (46 %)). Необходимо отметить, что все 12 РИД-отрицательных животных 3-й группы имели исходно сниженное содержание Т-лимфоцитов, несущих рецептор к эритроцитам барана.

Другой особенностью характера реакции Е-рецепторов на Т-клетках с повышенной чувствительностью к левамизолу является повышение доли Е-РОК в виде морул, несущих на поверхности от 7 и выше эритроцитов, тогда как у животных, имеющих низкую чувствительностью лимфоцитов к этому препарату, преимущественно наблюдали клетки, присоединившие от 3 до 5 эритроцитов.

Наши исследования подтвердили данные ряда авторов о том, что после экспозиции лимфоцитов *in vitro* в среде с левамизолом у индивидуумов с нарушением Т-системы иммунитета отмечается повышение уровня Т-клеток и нормализация их количества.

Результаты исследования позволяют предполагать, что определение чувствительности Т-клеток к левамизолу *in vitro* может служить одним из критериев иммунологического контроля по выявлению животных не только с явной инфекционной патологией, но и предрасположенностью к лейкозу крупного рогатого скота.

Таким образом, на основании проведенных исследований разработан способ выявления повышенной чувствительности у крупного рогатого скота к инфекции ВЛКРС. Критерием, способствующим выделению животных с предрасположенностью к данному заболеванию, является индекс сдвига, который у здорового крупного рогатого скота составляет  $\leq 0,95$ , а у животных группы риска  $\geq 1,2$ .

### **2.3 Испытание способа выявления крупного рогатого скота с повышенной чувствительностью к лейкозной инфекции.**

С целью испытания способа выявления крупного рогатого скота с предрасположенностью к заболеванию лейкозом, основанного на оценке функционального состояния Т-лимфоцитов, мы поставили перед собой задачу провести экспериментальные исследования на коровах и молодняке различного периода постнатального развития из хозяйств с различной эпизоотической обстановкой по данной инфекции.

#### **2.3.1 Оценка чувствительности лимфоцитов к левамизолу *in vitro* у здорового крупного рогатого скота в возрастном аспекте.**

Для оценки чувствительности лимфоцитов к левамизолу в периферической крови 100 голов крупного рогатого скота из благополучного по лейкозу хозяйства в разные возрастные периоды (у 20-и животных в возрасте до 2-х мес, у 20-и животных в возрасте 5-6 мес, у 20-и в возрасте 12 мес, у 20-и в возрасте 17-18 мес и у 20-и коров) определили количество Т-лимфоцитов, несущих рецептор к эритроцитам барана (Е-РОК), затем их количество после экспозиции с левамизолом *in vitro* (Елев-РОК).

Наибольшее число Т-лимфоцитов содержится в крови молодняка крупного рогатого скота в возрасте до 2-х месяцев и сохраняется на этом уровне до 5-6-месячного возраста. Достоверное снижение числа Е-РОК наблюдается с 12-месячного возраста (соответственно:  $34,26 \pm 2,78\%$ ,  $19,20 \pm 0,91\%$ ,  $P < 0,01$ ), достигая минимального значения у коров. При определении числа Т-лимфоцитов, идентифицированных в нагрузочном тесте с левамизолом, отмечается аналогичная тенденция в траектории показателей, однако разница в том, что наиболее низкий уровень левамизолстимулированных лимфоцитов выявлен у животных в возрасте 12 мес ( $16,79 \pm 1,35\%$ ,  $9,86 \pm 0,92\%$ ,  $P < 0,01$ ).

Индекс сдвига, определяемый как отношение Елев-РОК к Е-РОК, у молодняка крупного рогатого скота до 12-месячного возраста находился в одинаковых пределах и только к 17-18-месячному возрасту его значения увеличивались, однако не достигали достоверной разницы. Повышенная

чувствительность к левамизолу ( $IS \geq 1,2$ ) была выявлена только у одного животного в возрасте 17-18 месяцев и у одной коровы.

Таким образом, при оценке функционального состояния Т-лимфоцитов у здорового крупного рогатого скота разного возраста дефицит Т-клеток, обусловленный блокадой поверхностных маркеров, выявлен у 5 % коров и 5 % молодняка 17-18-месячного возраста.

### 2.3.2 Оценка чувствительности лимфоцитов к левамизолу *in vitro* у крупного рогатого скота из неблагополучного по лейкозу стада в возрастном аспекте.

В периферической крови 110-и голов крупного рогатого скота разного возраста (до 2-х мес, 5-6 мес, 12 мес, 17-18 мес и коровы) определили количество Т-лимфоцитов, несущих рецептор к эритроцитам барана (Е-РОК), затем их количество после экспозиции с левамизолом *in vitro* (Елев-РОК). Результаты проведенных исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4. Количество Е-РОК до и после обработки левамизолом лимфоцитов периферической крови у крупного рогатого скота разного возраста,  $M \pm m$

Возрастная группа	Количество животных	Е-РОК, %	Елев-РОК, %
до 2-х мес	15	22,2±0,95	12,53±1,22
5-6 мес	15	18,46±1,01*	12,26±1,34
12 мес	20	16,0±0,92*	10,79±0,92*
17-18 мес	30	16,95±0,55*	18,52±1,97*
Коровы	30	13,05±1,22*	20,84±0,92*

\* изменения достигают достоверной разницы ( $P < 0,05$ )

Установлено, что наибольшее количество Т-лимфоцитов содержится в крови молодняка крупного рогатого скота в возрасте до 2-х месяцев. У животных с 5-6-месячного возраста по сравнению с телятами младшего возраста наблюдается достоверное снижение числа Т-лимфоцитов, которое достигает минимума у коров (соответственно: 22,2±0,95; 13,05±1,22 %,  $P < 0,001$ ). В тоже время число Т-лимфоцитов, идентифицированных в нагрузочном тесте с левамизолом, напротив, с высокой степенью достоверности увеличивается с 17-18-месячного возраста, достигая максимального уровня у коров (соответственно: 12,53±1,22; 20,84±0,92 %, 12,53±1,22).

В дальнейшем, по результатам диагностического исследования на лейкоз в реакции иммунной диффузии (РИД), крупный рогатый скот всех возрастных категорий разделили на 2 группы: 1-ю составили РИД-отрицательные; 2-ю – носители ВЛКРС. У всех животных был подсчитан индекс сдвига. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Из таблицы 5 видно, что признаки блокады Е-рецепторов обнаружены у РИД-отрицательных животных с 12-месячного возраста (10,5 %) и более резко выражены у крупного рогатого скота старшего возраста (у 36,4 % в возрасте 17-18 мес и у 41,2 % коров).

Таблица 5. Результаты оценки чувствительности лимфоцитов к левамизолу в реакции спонтанного розеткообразования у РИД-отрицательных и инфицированных ВЛКРС животных разного возраста

Группа	возраст								
	12 мес			17-18 мес			коровы		
	n	ИС $\geq$ 1,2	%	n	ИС $\geq$ 1,2	%	n	ИС $\geq$ 1,2	%
РИД-отрицательные	19	2	10,5	22	8	36,4	17	7	41,2
Носители ВЛКРС	1	-	-	8	8	100,0	13	11	84,6

Обработка левамизолом лимфоцитов крови носителей ВЛКРС в возрасте 17-18 мес привела к ликвидации дефицита Т-клеток у 100 %, тогда как среди коров – у 84,6 %. Также отмечено, что блокада Т-клеток не проявлялась у одного носителя ВЛКРС в возрасте 12 месяцев.

Таким образом, признаки блокады поверхностных маркеров Т-клеток отмечаются как у РИД-отрицательных животных неблагополучного по лейкозу стада, так и носителей ВЛКРС, преимущественно у молодняка с 17-18-месячного возраста (соответственно: 36,4 % среди РИД (–) и 100 % среди РИД (+)) и взрослого поголовья (41,2 и 84,6 %).

### 3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов проделанной работы нами сделаны следующие выводы:

1. Лейкоз крупного рогатого скота имеет широкую и неодинаковую тенденцию к распространению во всех районах Кемеровской области со средними показателями инфицированности от 1,95 до 26% и выявления гематологически больных от 0,11 до 4,24% за период 2007-2013 гг.

2. Исследование чувствительности лимфоцитов в реакции спонтанного розеткообразования к левамизолу показало, что применение препарата в конечной концентрации 0,5 мкг/мл в инкубационной среде оказывает иммунокорректирующее действие на экспрессию рецепторов к эритроцитам барана Т-клетками у носителей ВЛКРС и больных лейкозом животных. Этот эффект при использовании иммуностимулятора в других концентрациях (0,01 и 50 мкг/мл) не наблюдается.

3. С помощью дифференциально-прогностической таблицы, составленной на основе дискретно-динамического анализа установлено, что индекс сдвига (ИС) является наиболее важным показателем, при этом прогностически значимыми интервалами значений ИС, характерными для крупного рогатого скота, имеющего повышенную устойчивость к лейкозной инфекции является  $\leq 0,95$  в качестве базисного и  $\leq 1,19$  в качестве варибельного параметров.

4. Установлено, что повышенный уровень ЦИК сочетается с усиленной функциональной активностью лейкоцитов в НСТ-тесте у 31,25 % носителей ВЛКРС и 44,44 % больных лейкозом животных. Снижение числа гранулоцитов,

способных восстанавливать НСТ, у 33% больных животных при одновременном увеличении ЦИК указывает на участие иммунных комплексов в механизме прогрессирования заболевания.

5. Индекс сдвига, определяемый как отношение процента Е-РОК после инкубации с левамизолом к числу Е-РОК до обработки препаратом является критерием, способствующим выделению животных с дефицитом Т-клеток, обусловленного блокадой поверхностных маркеров Т-клеток, который у здорового крупного рогатого скота составляет  $\leq 0,95$ , а у особей с предрасположенностью к заболеванию лейкозом от 1,2 и выше.

6. Содержание Т-лимфоцитов в периферической крови телят в возрасте до 2 месяцев из благополучного по лейкозу хозяйства составило  $34,26 \pm 2,78$  %, у молодняка с 12-месячного возраста их число существенно уменьшается ( $19,20 \pm 0,91$  %,  $P < 0,01$ ) и сохраняется на этом уровне в последующие сроки исследования. Количество Т-лимфоцитов, чувствительных к левамизолу, также с возрастом подвержено снижению, особенно у животных в возрасте 12 мес. Повышенная чувствительность к левамизолу была выявлена у 5 % молодняка 17-18-месячного возраста и коров.

7. Снижение в крови Т-лимфоцитов у молодняка крупного рогатого скота с 5-6-месячного возраста неблагополучного по лейкозу стада сопровождается увеличением числа левамизолчувствительных лимфоцитов с максимальной выраженностью при наиболее значительном дефиците Т-клеток. Признаки блокады ( $ИС \geq 1,2$ ) выявлены у 100 % молодняка 17-18-месячного возраста и у 84,6 % коров, имеющих положительную реакцию в РИД, а также у 36,4-41,2 % РИД-отрицательных животных этих же возрастных групп.

На основании полученных результатов рекомендовать следующие практические предложения:

1. Методическое пособие «Методы оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных», утверждено Ученым советом ГНУ ВНИИБТЖ Россельхозакадемии (протокол № 3 от 5 мая 2014 г.) и на заседании подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол №3 от 19 ноября 2014 г.). Предназначено для специалистов ветеринарных научно-исследовательских институтов, ВУЗов и лабораторий, проводящих исследования в области разработки новых методов и средств иммунологической защиты животных.

2. Патент РФ на изобретение №2465588 «Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота».

3. Теоретические и экспериментальные материалы по оценке функционального состояния Т-лимфоцитов целесообразно использовать при выполнении научно-исследовательских работ аналогичной направленности, а также в учебном процессе ВУЗов ветеринарного профиля.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи в ведущих научных журналах РФ, рекомендованных ВАК РФ:

1. Морозова, О.В. Оценка чувствительности лимфоцитов к левамизолу у крупного рогатого скота при лейкозе / О.В. Морозова, В.С. Власенко, Т.С. Дудолодова // Ветеринарный врач. – 2012. – №5. – С. 36-39.

2. Власенко, В.С. Взаимосвязь между уровнем циркулирующих иммунных комплексов и функциональным состоянием лейкоцитов у крупного рогатого скота при лейкозе / В.С. Власенко, О.В. Морозова, Т.С. Дудолодова // Вестник ветеринарии. – 2013. – №3. – С. 5-7.

### Статьи и тезисы докладов в других изданиях:

1. Морозова, О.В. Иммунная недостаточность при лейкозе (обзор литературы) / О.В. Морозова // Инфекционная патология животных: Матер. Междунар. науч.-практич. конф., посвященной 90-летию СибНИВИ-ВНИИБТЖ. – Омск: Амфора, 2011. – С. 189-193.

2. Иванов, А.И. Особенности экспрессии E-рецепторов на T-лимфоцитах периферической крови у коров, инфицированных ВЛКРС / А.И. Иванов, О.В. Морозова, В.С. Власенко // Обеспечение ветеринарного благополучия в животноводстве и птицеводстве: Матер. Матер. Междунар. науч.-практич. конф., посвященной ветеранам ветеринарной науки (Омск, 2-3 октября 2013 г.). – Омск, 2013. – С. 99-101.

3. Морозова, О.В. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Кемеровской области / О.В. Морозова, В.С. Власенко // Обеспечение ветеринарного благополучия в животноводстве и птицеводстве: Матер. Матер. Междунар. науч.-практич. конф., посвященной ветеранам ветеринарной науки (Омск, 2-3 октября 2013 г.). – Омск, 2013. – С. 87-88.

4. Морозова, О.В. Чувствительность к левамизолу иммунокомпетентных клеток у крупного рогатого скота из неблагополучного по лейкозу хозяйства / О.В. Морозова, В.С. Власенко // Матер. III междунар. конф. «Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса»: Сб. науч. тр. СНИИЖК. – Ставрополь, 2014. – Т. 2. – Вып. 7. – С. 394-397.

### Методические пособия:

1. Власенко, В.С. Методы оценки функциональной активности лейкоцитов при туберкулезе и лейкозе животных (методическое пособие) / В.С. Власенко, Н.А. Донченко, Ю.И. Пацула, М.А. Бажин, А.И. Иванов, О.В. Морозова, Т.С. Дудолодова / ФГБНУ ВНИИБТЖ. – Омск, 2015. – 16 с.

### Патенты:

1. Пат. 2465588 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Власенко В.С., Морозова О.В., Бажин М.А., Новиков А.Н., Дудолодова Т.С., заявитель и патентообладатель Всерос. науч.-исслед. ин-т бруцеллеза и туберкулеза животных. – №2011116025, заявл. 22.04.11; опубл. 27.10.12, Бюл. № 30. – 6 с.