

У контрольних пробах спостерігався добре виражений ріст культури *Bac. anthracis* UA – 07 (рис. 4).

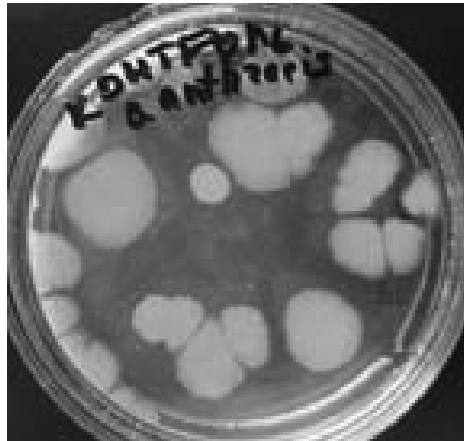


Рис. 4. Ріст культури *Bac. anthracis* у контролі

Висновки. Бактерицидний препарат «Аргіцид» за експозиції 60 хвилин у концентрації 3 %, при нормі витрати дезінфікуючого розчину 250 мл/м³ ефективно діє на спори та вегетативну форму *Bac. anthracis* UA – 07

Список літератури

1. Афиногенов, Г.Е. Оценка методов изучения эффективности дезинфектантов и антисептиков [Текст] / Г.Е. Афиногенов, А.А. Домород, М.В. Краснова // Актуальные проблемы дезинфектологии в профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний. – М., 2002. – С. 104–105. 2. Дудницкий, И.А. Оценка дезинфицирующих средств [Текст] / И.А. Дудницкий, О.Н. Шувалова // Сельское хозяйство за рубежом. – 1977. – № 12. – С. 40–45. 3. Соколова, Н.Ф. Методические основы определения устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам [Текст] / Н. Ф. Соколова // Материалы 8-го съезда Рос. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2002. – С. 55–56. 4. Ветеринарна дезінфекція, дезодорація, дезінсекція, дезінвазія, дератизація [Текст] : інструкція схвалена та затв. наук.-метод. радою Держ. департаменту вет. медицини Мінагрополітики України, протокол № 3, 23.12.2005 р. від 11.01.2006 р. 5. Рекомендації щодо санітарно-мікробіологічного дослідження змивів з поверхонь тест-об'єктів та об'єктів ветеринарного нагляду і контролю [Текст] : метод. рек. / О.М. Якубчак [та ін.]. – К., 2005. – 18 с.

RESEARCH OF THE BACTERICIDAL PREPARATION “ARGITSID” ON AN ACAPSULAR STRAIN OF *BACILLUS ANTHRACIS*

Gnatenko A.V.

Institute of veterinary medicine of NAAN of Ukraine, Kyiv

Investigated bactericidal properties of the preparation “Argitsid” on a sporous form of the causative agent of anthrax of *Bac. anthracis*. Effective concentration, and also preparation “Argitsid” exposition for use at compulsory disinfection on production are defined.

УДК 619-616.98:616.682-002

ПОРІВНЯЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СИРОВАТОК ВИРОБНИЧОЇ БРУЦЕЛАОВІСНОЇ ПАНЕЛІ У РІД, РТЗК ТА ІФА

Гончаренко-Прокоф'єва В.В.

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

Вітчизняна система моніторингу інфекційного епідемії баранів дозволяє контролювати поширення бруцелозної інфекції із застосуванням серологічних (РІД і РТЗК) і бактеріологічних методів діагностики, здійснювати виявлення та ізоляцію хворих тварин. Ефективність системи залежить від чутливості та специфічності методів.

На початку 1970 р. пошуки простих та чутливих методів виявлення якісного та кількісного визначення антигенів та антитіл сприяли розробці твердо фазного імуноферментного аналізу (ІФА). Закордоном ІФА є найпоширенішим скринінговим методом діагностики інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин та птиці. Популярність ІФА зумовлена безпекою при використанні, чутливістю та специфічністю виявлення антитіл; стабільністю реагентів, автоматизацією постановки та обліку результатів реакції [2, 3].

Враховуючи, що серед сучасних способів імунодіагностики хвороб найбільш перспективним є ІФА ми розробили компоненти набору для виявлення антитіл до *Brucellaovisy* сироватці крові дрібної рогатої худоби методом непрямого імуноферментного аналізу.

Мета роботи. Визначити активність та чутливість компонентів експериментальних зразків набору ІФА для виявлення антитіл до *Brucellaovis*. Дослідити на моделі позитивних і нормальних сироваток виробничої бруцелозної панелі у реакції імунодифузії (РІД), реакції тривалого зв'язування комплексу (РТЗК) та непрямого ІФА.

Матеріали та методи. У дослідженнях використано імуносорбент, виготовлений шляхом сорбції протягом 16 годин за температури (5,0±1,0) °С у стандартних плоскодонних полістерольних планшетах фірми «Nunc MaxiSorp», термоекстрагованого антигену з виробничих штамів *B. ovis* 67/Б, 76/982, 156/7807. Культури *B. ovis* були вирощені впродовж 4 діб за температури (37,0±1,0) °С на м'ясопептонному печінковому-глюкозо-гліцериновому агарі без використання сироватки крові великої рогатої худоби та без збільшення кількості CO₂ в атмосфері культивування. Суспензії культур змивали фізіологічним розчином з рН (7,2–7,4) та доводили до концентрації 50Ч10⁹ м.к./см³ за стандартом каламутності ім. Тарасевича. Антиген термоекстрагували за температури 100,0 °С упродовж 30 хвилин. Для досліджень антигени штамів *B. ovis* 67/Б, 76/982, 156/7807 з'єднували у рівних частинах і сенсibilізували в планшетах у розведенні 1:100 та 1:200. Для контролю використовували стандартні позитивну та нормальну сироватки крові з комерційного набору «Набір для серологічної діагностики інфекційного епідемії баранів в РТЗК», робочий титр 1:5, серія №1, контроль № 1, виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина». Як індикатор для виділення комплексу антиген-антитіло використовували експериментальні зразки антитілу кролика проти Ig вівці мічених пероксидазою хрому ННЦ «ІЕКВМ» і комерційний біопрепарат «Антитіла кролика

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

проти *Ig* вівці мічені пероксидазою хрону виготовлені ООО фірма «ІМТЕК» (м. Москва, Російська Федерація). Активність кон'югантів визначали методом послідовних розведень. Для експериментального зразка використовували розведення від 1:50 до 1:1200, для комерційного – від 1:5000 до 1:12000 у непрямому ІФА з використанням позитивних та нормальних сироваток.

Постановку непрямого методу ІФА проводили у планшетах за загально прийнятим методом [6] з дотриманням контролів: контроль неспецифічної сорбції антитіл, контроль субстрату, контроль неспецифічного зв'язування антигену. Облік результатів реакції провели спектрофотометрично за довжиною хвилі 492 нм на аналізаторі імуноферментному «Sunrise» (Tecan) з використанням програми автоматичного комп'ютерного обліку «Magellan» у лабораторії вивчення бруцельозу ННЦ «ІЕКВМ».

Проведено порівняльний аналіз результатів дослідження сироваток виробничої бруцелаовісної панелі у реакції імунодифузії (РІД) [5], реакції тривалого зв'язування комплекменту (РТЗК) (Триленко П.А., 1976) [4] та непрямому ІФА [6].

Результати досліджень. При постановці ІФА було попередньо підібрано буферну систему для оптимальної сенсibiliзації планшетів у бруцелаовісним антигеном, декабонатно-бікарбонатний буфер (рН 9,5–9,6) мав у середньому в 1,5 рази більшу здатність до імобілізації носія за фосфатно-сольовий буфер (рН 7,2–7,4). Даний результат показує доцільність використання карбонатно-бікарбонатного буферу (рН 9,5–9,6) при імобілізації планшетів антигеном, бо за умов використання даного буферу збільшується інтенсивність сенсibiliзації антигену та зберігається відтворюваність у результатах реакції.

Підбір оптимальних температурних режимів і часу сенсibiliзації у планшетах бруцелаовісного антигену проводили за двома температурними режимами: (37,0±0,5)°С протягом 30 хв, 1 год, а також (5,0±1,0)°С протягом 16 та 18 год. Оптимальним режимом фіксації бруцелаовісних антигенів, що не впливав на чутливість реакції визначено за отриманими результатами, де максимальна інтенсивність реакції була за температури (37,0±0,5)°С через 1 год та 5°С через 16 год.

Титром кон'югантів вважали їх кінцеве розведення, в якому оптична екстинкція (ОЕ) позитивної сироватки перевищувала ОЕ нормальної сироватки не менше, ніж у 2 рази. Дане співвідношення зберігалось при розведенні експериментального зразка антитілу кролика проти *Ig* вівці мічених пероксидазою хрону ННЦ «ІЕКВМ» від 1:50 до 1:1200. Контролі субстрату та неспецифічних зв'язувань були на рівні ОЕ нормальних сироваток, що свідчило про відсутність неспецифічних фонів при взаємодії кон'юганту з компонентами реакції. Отримані результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Визначення активності експериментального зразка антитілу кролика проти *Ig* вівці мічених пероксидазою хрону у непрямому методі ІФА.

	Розведення кон'юганту								
	Сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000	1:1200	Контроль субстратів
Розведення антигена 1:100 Розведення сироваток 1:100	Позит.	0,735	0,792	0,455	0,668	0,322	0,191	0,184	0,052
	Позит.	0,659	0,693	0,316	0,456	0,241	0,265	0,203	0,058
	Норм.	0,311	0,281	0,23	0,298	0,119	0,145	0,151	0,053
	Норм.	0,27	0,289	0,142	0,164	0,08	0,121	0,13	0,047
Контроль антигена	Без сироватки	0,106	0,095	0,07	0,076	0,069	0,085	0,127	0,053
Розведення антигена 1:200 Розведення сироваток 1:200	Позит.	0,6	0,612	0,606	0,761	0,14	0,151	0,122	0,047
	Позит.	0,696	0,628	0,43	0,423	0,184	0,208	0,097	0,048
	Норм.	0,404	0,295	0,166	0,141	0,109	0,155	0,16	0,05
	Норм.	0,447	0,291	0,15	0,179	0,079	0,13	0,084	0,049
Контроль антигена	Без сироватки	0,107	0,105	0,074	0,083	0,084	0,063	0,11	0,044

У результаті титрування кон'югантів методом послідовних розведень було встановлено оптимальне розведення для експериментального зразка антитілу кролика проти *Ig* вівці мічених пероксидазою хрону ННЦ «ІЕКВМ» – 1:100. Для визначення активності комерційного біопрепарату «Антитілу кролика проти *Ig* вівці мічених пероксидазою хрону» фірми «ІМТЕК» були обрані розведення від 1:5000 до 1:12000, де отримано оптимальний результат, який становив 1:10000, що відповідає рекомендованому робочому розведенню. Дані розведення запобігають підвищенню неспецифічних фонових реакцій (ОЕ > 0,14) та не знижують їх активність (табл. 2).

Таблиця 2 – Визначення активності комерційних антитілу кролика проти *Ig* вівці мічених пероксидазою хрону, фірми «ІМТЕК», у непрямому методі ІФА.

	Розведення кон'юганту								
	Сироватки	1:5000	1:6000	1:7000	1:8000	1:9000	1:10000	1:12000	Контроль субстратів
Розведення антигена 1:100 Розведення сироваток 1:100	Позит.	0,722	0,607	0,432	0,367	0,382	0,568	0,208	0,054
	Позит.	0,755	0,589	0,354	0,513	0,678	0,47	0,219	0,057
	Норм.	0,237	0,218	0,202	0,188	0,103	0,102	0,142	0,053
	Норм.	0,245	0,259	0,194	0,247	0,174	0,135	0,166	0,049
Контроль неспецифічні зв'язування антигена	Сироватки відсутні	0,127	0,098	0,094	0,091	0,062	0,14	0,117	0,06
Розведення антигена 1:200 Розведення сироваток 1:200	Позит.	0,566	0,527	0,253	0,649	0,182	0,393	0,178	0,052
	Позит.	0,603	0,519	0,391	0,639	0,134	0,354	0,177	0,05
	Норм.	0,314	0,235	0,17	0,159	0,096	0,139	0,174	0,053
	Норм.	0,256	0,218	0,204	0,332	0,087	0,104	0,15	0,05
Контроль неспецифічні зв'язування антигена	Сироватки відсутні	0,102	0,101	0,081	0,15	0,061	0,116	0,122	0,049

При порівняльних дослідженнях експериментального зразка антитілу кролика проти *Ig* вівці мічених пероксидазою хрону ННЦ «ІЕКВМ» та комерційних антитілу кролика проти *Ig* вівці мічених пероксидазою хрону, фірми «ІМТЕК» в ІФА з позитивними та нор-

маленькими сироватками виробничої бруцелаовісної панелі та контрольними сироватками з «Набору для серологічної діагностики інфекційного епідемії баранів в РТЗК» були отримані результати, що свідчать про активність та чутливість експериментальних зразків компонентів набору. Так, при постановці реакцій із свідомо позитивними та нормальними сироватками в обох варіантах результати були аналогічними. У таблиці 3 наведені результати, які свідчать, що з 13 позитивних сироваток бруцелаовісної панелі ННЦ «ІЕКВМ» усі реагували позитивно, з 11 нормальних сироваток бруцелаовісної панелі ННЦ «ІЕКВМ» усі реагували негативно.

Таблиця 3–Порівняльний аналіз результатів дослідження сироваток виробничої бруцелаовісної панелі у РІД, РТЗК та ІФА

№ сироватки	Бруцелаовісна панель(позитивні та нормальні сироватки)						
	Результат у РІД	Результат у РТЗК		Результат в ІФА, розведення сироваток 1:200			
		Титр сироваток	Висновок	Кон'югант ННЦ «ІЕКВМ» Cutoff 0,25		Кон'югант фірма «ІМТЕК» Cutoff 0,2	
				Оптична екстинкція (ОЕ)	Висновок	Оптична екстинкція (ОЕ)	Висновок
1	+	1:40 #	Позитивна	0,528	Позитивна	0,44	Позитивна
2	+	1:40 #	Позитивна	0,446	Позитивна	0,364	Позитивна
3	+	1:20 #	Позитивна	0,408	Позитивна	0,367	Позитивна
4	+	1:40 #	Позитивна	0,441	Позитивна	0,373	Позитивна
5	+	1:40 #	Позитивна	0,433	Позитивна	0,342	Позитивна
6	+	1:10 #	Позитивна	0,359	Позитивна	0,369	Позитивна
7	+	1:20 #	Позитивна	0,376	Позитивна	0,364	Позитивна
8	+	1:5 #	Позитивна	0,346	Позитивна	0,338	Позитивна
9	+	1:20 #	Позитивна	0,435	Позитивна	0,394	Позитивна
10	+	1:40 #	Позитивна	0,465	Позитивна	0,39	Позитивна
11	+	1:5 #	Позитивна	0,355	Позитивна	0,338	Позитивна
12	+	1:20 #	Позитивна	0,434	Позитивна	0,378	Позитивна
13	+	1:5 #	Позитивна	0,377	Позитивна	0,4	Позитивна
14	-	1:5 -	Негативна	0,153	Негативна	0,12	Негативна
15	-	1:5 -	Негативна	0,129	Негативна	0,114	Негативна
16	-	1:5 -	Негативна	0,122	Негативна	0,146	Негативна
17	-	1:5 -	Негативна	0,126	Негативна	0,108	Негативна
18	-	1:5 -	Негативна	0,107	Негативна	0,104	Негативна
19	-	1:5 -	Негативна	0,113	Негативна	0,12	Негативна
20	-	1:5 -	Негативна	0,1	Негативна	0,13	Негативна
21	-	1:5 -	Негативна	0,146	Негативна	0,093	Негативна
22	-	1:5 -	Негативна	0,126	Негативна	0,102	Негативна
23	-	1:5 -	Негативна	0,136	Негативна	0,146	Негативна
24	-	1:5 -	Негативна	0,113	Негативна	0,124	Негативна
Контроль позит. сироватка	+	1:40 #	Позитивна	0,519	Позитивна	0,387	Позитивна
Контроль норм. сироватка	-	1:5 -	Негативна	0,147	Негативна	0,134	Негативна

Примітка: S/P $\geq 0,25$ (сироватки, значенняS/Pяких було 0,25і більше, вважали такими, що містять антитіла до *Brucellaovis*).

Базуючись на отриманих результатах, встановлено, що твердо фазний бруцелаовісний імуносорбент є чутливим (чутливість склала 100 %) [1] та може бути використаний у непрямому ІФА як компонент набору, незважаючи на те, що граничний рівень позитивності (*Cutoff*) був дещо різним при використанні різних кон'югантів: антитіла кролика проти *Ig* вівці мічених пероксидазою хрому ННЦ «ІЕКВМ» *Cutoff* 0,25 та комерційні антитіла кролика проти *Ig* вівці мічені пероксидазою хрому виготовлені ООО фірма «ІМТЕК» (м. Москва, Російська Федерація) *Cutoff* 0,2. Проте результати досліджень позитивних і нормальних сироваток виробничої бруцелаовісної панелі в непрямому ІФА з обома кон'югантами були аналогічними та збіглися з результатами в РІД та РТЗК.

Висновки. 1. При порівняльних дослідженнях сироваток виробничої бруцелаовісної панелі у непрямому ІФА результати були аналогічними з РІД та РТЗК.

2. Виготовлені експериментальні зразки компонентів набору для виявлення антитіл до *Brucellaovis* непрямим ІФА є активними та чутливими.

Список літератури

- Гончаренко-Прокоф'єва, В.В. Визначення критеріїв оцінки (*Cutoff*) компонентів набору для виявлення антитіл до *Brucellaovis* непрямим методом імуноферментного аналізу [Текст] / В.В. Гончаренко-Прокоф'єва // Вет. біотехнологія : бюл. – 2013. – № 22. – С. 89–94.
- Гусева, А. А. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных иммуноферментным методом [Текст] / А.А. Гусева, А.Н. Панина. – Владимир : ОКНИИиМС ВНИИЗЖ, 1998. – 179 с.
- Плотникова, Э.В. Иммуномониторинг бруцеллез животных [Текст] / Э.В. Плотникова, К.В. Салмаков, А.В. Иванов // Ветеринария. – 2010. – № 5. – С. 26–30.
- Триленко, П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных [Текст] / П.А. Триленко. – М. : Колос, 1976. – 280 с.
- Іструкція про заходи з профілактики та боротьби з бруцельозом тварин [Текст] / затв. Держ. Деп. вет. медицини МАП України 25.01.2000, № 4. – К., 1998. – 58 с.
- Chapter 2.7.9 OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) [Text]. – 7th ed. – Paris, 2009. – Vol. 2. – P. 1–9.

COMPARATIVE STUDY OF SERA OF PRODUCTION BRUCELLA OVIS PANEL IN THE AGID,
PROLONGED COMPLEMENT FIXATION TEST AND I-ELISA

Goncharenko-Prokof'yeva V.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

This paper presents the preliminary results of comparative study of sera of production Brucella ovis panel in response agar gel immunodiffusion test (AGID), prolonged complement fixation test and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA), which show the activity and sensitivity of experimental models of kit components for the detection of antibodies to Brucella ovis in i-ELISA, where all of 13 positive sera of Brucella ovis panel of the NSC "IECVM" reacted positively, all of 11 normal sera of Brucella ovis panel of the NSC "IECVM" reacted negatively.

УДК 578:579:636.2:619.9

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ЗАРАЖЕННЯ ОВЕЦЬ ВІРУСОМ ЛЕЙКОЗУ ВРХ – МОДЕЛЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ЗАСОБІВ, ЩО
ВПЛИВАЮТЬ НА ПЕРЕБІГ ВІРУСІНДУКОВАНИХ ПУХЛИН

Гриневич О.Й., Маркович І.Г.

ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», м. Київ,

Коваленко Л.В., Руденко О.П., Горбатенко С.К., Шаповалова О.В., Зданевич П.П., М'ягких Н.В., Корнєйков О.М.,
Ареф'єв В.Л., Гема І.О.

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

Онкогенез є багатоетапним і багаторівневим процесом, який залежить від геномної нестабільності, ендогенних та екзогенних факторів. До злоякісної трансформації клітин призводить накопичення незалежних мутацій та епігенетичних порушень, які ведуть до дисбалансу регуляції сигнальних шляхів, що контролюють проліферацію, ріст клітин, диференціювання та апоптоз [1, 2]. У з'ясуванні причин «запуску» пухлиноутворення вагомим підґрунтям є вивчення особливостей росту пухлин, індукованих вірусами. Згідно даних літератури, етіологічними агентами близько 15 % новоутворень людини є РНК- та ДНК-вмісні віруси [3, 4]. Серед РНК-вмісних вірусів добре відомими є віруси, що ініціюють розвиток лейкозів і лімфом [5, 6]. До даної групи належить вірус лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ), а загальновідомою моделлю при вивченні його дії є організм овець [7]. Патогенез вірусіндукованого лейкозу та механізми розвитку інфекційного процесу у овець добре вивчені, але залишаються до кінця не розв'язаними питання про вплив імуностимулюючих препаратів на перебіг інфекційного процесу у заражених ВЛ ВРХ тварин. Одним з перспективних сучасних препаратів, маючих імуностимулюючий ефект, є вітчизняний препарат ZG-2011. Тому метою даного дослідження було вивчення впливу імуностимулюючого препарату ZG-2011 на розвиток інфекційного процесу, індукованого вірусом лейкозу великої рогатої худоби у овець.

Матеріали та методи дослідження. Для формування дослідних груп було використано 12 овець романівської породи віком 10–12 місяців з середньою живою масою 30–35 кг (2 групи по 4 тварини, які було підібрано по принципу аналогів).

1 група. Інтактний контроль. Вівцям дворазово вводили фізіологічний розчин підшкірно (у верхню третину шиї), в об'ємі 2 см³, з інтервалом 21 день.

2 група. Вівці були штучно інфіковані введенням лімфоцитів хворої на хронічний лімфолейкоз корови (підшкірно в верхню третину шиї, одноразово, в об'ємі 2,0 см³, кількість лімфоцитів – 1500).

При проведенні експерименту використовували біохімічні, гематологічні, молекулярно-генетичні, серологічні методи досліджень та методи статистичної обробки одержаних даних.

У сироватці крові тварин було визначено: рівень загальних протеїнів, білковий профіль (альбуміни, глобуліни) спектрофотометрично загальноприйнятими методами, а також вміст імуноглобулінів класів А, G, M (IgA, IgG, IgM) за Манчестера. Активність лізоциму вимірювали турбідиметричним методом за Перрі в модифікації Гранта Х.Я. та спів. Дослідження кількості циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси проводили за методом Гриневича Ю.А. шляхом осадження білкових комплексів антиген-антитіло ПЕГ–6000. Вміст серомукоїдів (Sm) у сироватці крові встановлювали спектрофотометрично за різницею оптичної густини за довжини хвиль 260 нм та 280 нм. Визначення концентрації цитокінів (інтерлейкін-1-β (IL-1-β) та γ-інтерферон (IF- γ)) проводили з використанням наборів для імуноферментного аналізу виробництва ЗАТ «ВЕКТОР-БЕСТ» Новосибірськ (Росія).

У частині гематологічних досліджень для контролю клітинного стану організму дослідних і контрольних тварин за загальноприйнятими методами визначали кількість великих гранулоцитів (ВГЛ), активність фагоцитозу нейтрофілів периферичної крові, гемоглобін, вміст і співвідношення клітин лейкоцитарної фракції різної функціональної орієнтації в окремі терміни досліджень.

Сумарну ДНК із периферичної крові тварин виділяли за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-Б» (Центральний НДІ епідеміології МОЗ РФ, Москва, Росія) згідно з протоколом виробника.

Для запобігання згортання крові як антикоагулянт використовували розчин 0,056 М цитрату натрію, 0,166 М глюкози, які додавали до крові тварин із периферичних судин у співвідношенні 1:5.

Детекцію вірусної ДНК ВЛ ВРХ у клінічних зразках здійснювали шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням розробленої у лабораторії молекулярної епізоотології та діагностики ННЦ «ІЕКВМ» у 2008 р. пари праймерів III-BLV та базового набору для проведення ПЛР «GenPakPCRMasterMix» ("Isogene", Москва, Російська Федерація) за наступною програмою:

1 крок: денатурація – 94 °С – 2 хвилини – 1 цикл;

2 крок: денатурація – 94 °С – 1 хвилина, відпал – 58 °С – 1 хвилина, синтез – 74 °С – 1 хвилина; усього – 45 циклів;

3 крок: елонгація – 74 °С – 2 хвилини – 1 цикл.

Довжина амплікона дорівнює 440 парі нуклеотидів.

Склад суміші, розрахований на одну реакцію: 10ЧПЛР-буфер – 8 мкл, праймери – по 1 мкл кожного, зразок – 10 мкл. Загальний об'єм – 20 мкл.

Як позитивний контроль використовували ДНК, екстраговану з культури клітин FLK, інфікованої вірусом лейкозу ВРХ.

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5 %-му агарозному гелі, забарвленому етидієм бромистим, за напруги електричного поля U = 120 В протягом 30–40 хвилин та подальшої їх візуалізації в УФ-світлі з використанням трансліюмінатора. Наявність на електрофореграмі червоної смуги, що відповідає смугі позитивного контролю, свідчить про наявність збудника лейкозу в даному клінічному зразку і, отже, про інфікованість тварини вірусом лейкозу ВРХ.

Довжину отриманих ампліконів контролювали за допомогою маркера молекулярної ваги MassRules виробництва фірми Fermentas.

Наявність антитіл проти вірусу лейкозу у сироватках крові тварин визначали в реакції імунодифузії (РІД). Методично схема постановки та обліку показників РІД відповідає стандартам вимогам стосовно настанови діагностичного набору ТОВ «НДП «Ветеринарна Медицина».

Проби периферичної крові тварин досліджували в динаміці з інтервалом 2–4 тижні.