ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ СОВЕТА МИНИСТРОВ СССР
ПО ПРОДОВОЛЬСТВИЮ И ЗАКУПКАМ

САМАРКАНДСКИЙ ОРДЕНА ПОЧЕТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЙ
ИНСТИТУТ ИМЕНИ В.В.КУЙБЫШЕВА

На правах рукописи

МАМАДЖАНОВ ЮСУФ ИСЛАМОВИЧ

УДК 619:616-006.591,11:576,858

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СЫВОРОТОК КРОВИ ЖИВОТНЫХ НА РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

16.00.03 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология и иммунология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

БИБЛИОТЕКА
Сам. СХИ
Самарканд

Самарканд—1990

Работа выполнена в Узбекском ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательском ветеринарном институте имени академика К.И. Скрябина.

Научные руководители:

Академик ВАСХНИЛ, доктор ветеринарных наук, профессор ШИШКОВ В.П. Доктор ветеринарных наук САЛИМОВ Х.С.

Официальные оппоненты

Доктор ветеринарных наук, профессор Шатохин И.Г.

Кандидат ветеринарных наук ШАДЫБАЕВА Р.Х.

Ведущая организация — НИИЭВ Сибири и Дальнего Востока.

Защита состоится «30» октября 1990 г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного Совета К 120.34.01 при Самаркандском сельскохозяйственном институте им. В.В. Куйбышева (703003, Самарканд, ул. К.Маркса, 77)

С диссертацией можно ознакомится в библиотеке Самар-

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы: Важную роль в решении продовольственной проблемы страны призвана сыграть ветеринарная наука, на которую возложена такая ответственная задача как разработка эффективных методов, средств и научно обоснованных систем мероприятий по диагностике, терапии, профилактике инфекционных заболеваний, среди которых лейкозу крупного рогатого скота отводится особое место (В.П.Шишков, 1986).

Экономический ущерб, причиняемый гемобластозами животноводству, достигает значительных размеров вследствие падежа, снижения продуктивности, вынужденной выбраковки больных животных, утилизации туш и органов с опухолевыми разрастаниями и затрат на проведение противолейкозных мероприятий.

Усилиями многих отечественных и зарубежных исследователей к настоящему времени уже достигнут значительный прогресс в изучении этой патологии. Выделен экзогенный, РНК-содержащий, вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), изучены его физико-химические и биохимические свойства, доказана его этиологическая роль в заболевании (J.M.Miller et al.,1969; А.Ф.Балихов с соавт.,1974; М.К. Парфанович с соавт.1976; Л.Г.Бурба с соавт.,1977; Р.А.Кукаин с соавт.,1977; Х.С.Салимов, 1986 и др.). Расширены представления и о патогенезе болезни (Г.А.Симонян,1974; Г.Ф.Коромыслов,1977; П.Н.Смирнов, 1986; В.И.Тамашюнас, 1987 и др.). Разработаны эффективные методы иммунодиагностики (A.A.Ressang ,1976; В.П.Шишков с соавт.,1978; А.Ф.Балихов,1976; M.Onuma et al. ,1978; Л.И.Нагасева с соавт., 1989 и др.) и меры профилактики по оздоровлению хозяйств, неблагополучных по лейкозу (В.А.Крикун с соавт., 1984; В.А.Бусол, 1982; Л.Г.Бурба с соавт., 1983; В.М.Пахмансон, 1986 и др.).

Важное значение в комплексе мероприятий по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота имеют иммунологические методы диагностики, которые позволяют контролировать персистенцию ВЛКРС у крупного рогатого скота на более ранней стадии развития инфекционного процесса. Однако, широкое использование иммунодиагностики лейкоза крупного рогатого скота сталкивается с трудностями, связанными с получением необходимого количества вируса и вирусных антигенов. Источником этих антигенов являются клеточные культуры, продуцирующие ВЛКРС.

Наиболее оптимальными и премиссивными системами считаются перевиваемые линии клеток почки эмбриона овцы - FLK (Fetal lamb Kidney) (Д.К.Залевский, 1979; M.J.Van der Masten et al., 1974) и тимуса эмбриона коровы - ТЭК-МВА-76 (В.А.Крикун с соавт., 1979), хронически инфицированные ВЛКРС. При выращивании клеток в питательную среду в качестве ростового компонента добавляют остродефицитную сыворотку крови эмбрионов коров (J.M.Miller et al., 1977; Р.А.Кукаин и др., 1982), процесс получения которой трудоемкий и дорогой. Коммерческие сыворотки крови взрослого крупного рогатого скота и телят для этих целей не пригодны из-за возможного содержания в них специфических антител к вирусу лейкозы, что связано с широким распространением инфекции ВЛКРС, а также из-за возможно низкого содержания в них ростовых факторов (А.Г.Коломиец с соавт., 1976; D.M.Driscoll et al. , 1976).

Использование сывороток крови взрослых овец в культивировании перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK продуцирующих ВЛКРС, указало на явные преимущества ростообеспечивающих свойств этих видов сывороток перед другими (Е.З.Иткин с соавт.,1985).

Известно, что в крови молодых животных содержится большое количество питательных веществ (макро- и микроэлементов, витаминов, белков, гормонов и т.п.), необходимых для нормального роста и развития организма (Бокар, 1954; Москалев, 1963 и др.).

Учитывая эти обстоятельства и принимая во внимание то, что в Узбекской ССР имеются крупные овцеводческие комплексы по выращиванию и откорму каракульских овцематок, с целью коммерческого получения каракульских смушек - "каракульчи", не нарушая производственного цикла, можно организовать промышленную заготовку сывороток крови овцематок 130-135 -дневной суягности, а также сыворотку крови их эмбрионов.

В связи с этим, работа, направленная на использование в качестве сывороточного компонента питательных сред разных видов сывороток крови каракульских овец, свободных естественных условиях от инфекции ВЛКРС, является актуальной.

Цель и задачи исследования. настоящая работа посвящена изучению влияния различных видов сывороток крови овец на ростовую и антигенпродуцирующую способность хронически инфицированных ВЛКРС клеточных культур ТЭК-МВА- 76 и FLK , с целью изыскания возможности замены дорогостоящей сыворотки крови эмбрионов коров, используемой

при производстве лейкозного диагностикума. В связи с этим, перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние сывороток крови суягных овцематок каракульской породы, их эмбрионов и новорожденных ягнят на ростовую и антигенпродуцирующую способность хронически инфицированных ВЛКРС клеточных культур ТЭК-ЧВА-76 и РЫК .

2. Провести сравнительный цитоморфологический анализ препаратов клеточных культур ТЭК-ЧВА-76 и РЫК , выращенных на средах с использованием сывороток крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят.

3. Изучить динамику репликации ВЛКРС и продукции вирусных антигенов в перевиваемых культурах клеток ТЭК-ЧВА-76 и РЫК .

4. Дать качественную оценку антигенов ВЛКРС, приготовленных из вирусосодержащей культуральной жидкости клеточных линий ТЭК-ЧВА-76 и , выращенных на средах, содержащих сыворотки крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят.

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное изучение использования различных видов сывороток крови каракульских овец в качестве сывороточного компонента питательной среды в клеточных культурах, продуцирующих ВЛКРС, взамен эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота.

Изучена возможность получения ВЛКРС и его антигенов при культивировании перевиваемых клеточных линий ТЭК-ЧВА-76 и РЫК на средах, содержащих сыворотки крови каракульских суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят.

Впервые установлено, что сыворотки крови каракульских суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят могут быть использованы как заменители сыворотки крови эмбрионов коров при культивировании перевиваемых клеточных линий ТЭК-ЧВА-76 и РЫК . Установлено также, что перевиваемые клеточные линии ТЭК-ЧВА-76 и РЫК , выращенные на средах с сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, по показателям сроков формирования монослоя, индексам клеточной пролиферации, по репродукции ВЛКРС и продукции вирусных антигенов существенно превосходят перевиваемые культуры обеих линий клеток, выращенных на средах с сыворотками крови крупного рогатого скота и эмбрионов коров.

Дана морфологическая характеристика перевиваемых линий клеток

ТЭК-МВА-76 и FLK, продуцирующих ВЛКРС в средах, содержащих сыворотки крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят.

Выяснено, что перевиваемая культура клеток FLK лучше адаптируется к средам, содержащим сыворотки крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, чем клеточная культура ТЭК-МВА -76.

Практическая ценность. Материалы диссертации использованы при разработке "Методических рекомендаций по использованию сывороток крови суягных овцематок для получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота", которые утверждены на заседании секции "Лейкозы, сравнительная и экспериментальная онкология животных" ВАСХНИЛ (1989 г.).

Результаты проведенных исследований позволяют также использовать сыворотку крови эмбрионов овец и новорожденных ягнят для культивирования клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK , продуцирующих ВЛКРС и его антигены, с целью замены сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота в производстве лейкозных диагностикумов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на конференции молодых ученых Узбекского НИВИ, посвященной 70-летию ВЛКСМ (1988); на заседании Ученого Совета УзНИВИ (1988,1989); на заседании секции животноводства и ветеринарии СЗО ВАСХНИЛ (1989); на заседании секции "Лейкозы, сравнительная и экспериментальная онкология животных" ВАСХНИЛ (1989).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 4 научные работы.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (3 главы), собственных исследований (2 главы), анализа результатов исследований, выводов, практических предложений и приложения.

Материалы диссертации иллюстрированы 10 таблицами и 24 рисунками. Список литературы включает 279 работ, в том числе 140 - зарубежных источников.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Методы выращивания клеток на средах с использованием сывороток крови суягных овцематок каракульской породы, их эмбрионов и новорожденных ягнят.

2. Способ получения антигенов ВЛКРС из перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK , выращенных на средах с добавлением сывороток крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят.

3. Серологическая оценка антигенов ВЛКРС, полученных при культивировании перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK на средах, содержащих различные виды сывороток крови овец и крупного рогатого скота.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Исследования проводились в лаборатории по изучению лейкоза УзНИВИ и в лаборатории по изучению лейкоза МВА совместно с сотрудниками к.в.н. В.А.Крикуном и мл.н.с.Н.В.Рожновой.

Материалом для исследований служили перевиваемые культуры клеток почки эмбриона овцы-Fetal lamb Kidney (FLK) и тимуса эмбриона коровы (ТЭК-МВА-76), хронически инфицированные ВЛКРС. В качестве сывороточного компонента питательных сред использовали сыворотки крови каракульских суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят. Контролем служили сыворотки крови крупного рогатого скота, свободные от антител к ВЛКРС, и эбрионов коров, производства института микробиологии и эпидемиологии им.Гамалеи (Москва).

В опытах использовались коммерческие сыворотки крови каракульских суягных овцематок и их эмбрионов, производства САЖВНИИЖ (г.Душанбе), а также полученные нами на мясокомбинатах гг.Катта-Курган и Навои в период массового убоя (февраль-март) каракульских овцематок 130-135-дневной суягности, выращенных на специализированных овцеводческих комплексах по производству "каракульчи".

Сыворотки крови новорожденных ягнят получали в условиях овцеводческих хозяйств Самаркандской и Навоийской областей из крови 3-5 суточных ягнят. Сбор и оценку качества приготовленных образцов сывороток проводили согласно методике, изложенной во "Временном наставлении по получению, контролю и использованию сывороток крови животных для культивирования клеток и вирусологических исследований" (утв.ГУВ МСХ СССР 20.VI.-1983 г.).

В опытах были также использованы несколько серий стандартных сывороток крови крупного рогатого скота, свободных от антител к ВЛКРС, производства Московского и Киевского мясокомбинатов.

Наличие в сыворотках специфических антител к ВЛКРС определяли в реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) общепринятым методом.

Для культивирования перевиваемых клеточных линий использовали питательные среды, состоящие из среды Игла с глютамином (50%) и 0,5% гидролизата лактальбумина (ГЛА) (50%), или среды Игла с глютамином и среды № 199 в том же соотношении, с добавлением 10% сыворотки крови животных и антибиотиков (пенициллин, стрептомицин по 100 ЕД мл). Посевная концентрация клеток на каждом пассаже для обеих культур составляла $5x10^4$кл мл среды. Клетки культивировались в 250 мл матрасах, в термостате при 37°С в течение 3-5 суток, с ежедневными наблюдениями за ростом клеток под малым (х56) увеличением микроскопа.

Для получения антигенов использовали вируссодержащую культуральную жидкость, которую концентрировали методом ускоренного диализа с полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000). Полученный таким способом концентрат служил антигеном ВЛКРС.

Морфологическую оценку клеток проводили на нативных или окрашенных по методу Романовского-Гимза или гематоксилинэозином препаратах, под малым (х70) и под большим (х 280) увеличением микроскопа, по общепринятой методике.

Индикацию ВЛКРС в тесте синцитиеобразования (ТСО) проводили совместно с сотрудниками лаборатории иммунологии и биотехнологии УзНИВИ к.б.н.Расулевым О.Ш., согласно "Методическим рекомендациям по определению инфекционного бычьего вируса (БЛВ) методом синцитиеобразования" (В.А.Крикун с соавт.,1980).

Продукцию антигенов ВЛКРС определяли в реакции иммунодиффузии (РИД) со специфической серопозитивной сывороткой. Активность приготовленных антигенов оценивалась по результатам лабораторных и производственных испытаний, где в качестве контроля использовались стандартные антигены, приготовленные на Курской биофабрике и в лаборатории по изучению лейкозы КВА.

Результаты исследований обрабатывали методом вариационной статистики (Н.В.Садовский, 1975).

Результаты исследований

Культивирование перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK на средах с различными сыворотками крови овец и крупного рогатого скота.

Исходя из цели и задач нами было изучено влияние сывороток крови суягных овцематок каракульской породы, их эмбрионов и новорожденных ягнят на ростовую и антигенпродуцирующую способность хронически инфицированных БВДРС перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK. Критерием оценки качества исследуемых образцов сывороток при этом являлись средние статистические показатели сроков формирования монослоя, индекса клеточной пролиферации, репродукции вируса и продукции вирусных антигенов в течение всего срока наблюдения (10 пассажей).

Средние статистические данные сроков формирования монослоя и индекса клеточной пролиферации приведены в табл.1.

Из представленных в таблице данных видно, что лучшая адаптация клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK к сывороточному компоненту питательной среды прослеживалась в отношении сывороток крови суягных овцематок. С использованием этих видов сывороток, клеточные культуры ТЭК-МВА-76 и FLK , по показателям сроков формирования монослоя и индексам клеточной пролиферации существенно опережали как контрольные клеточные культуры, выращенные на средах с сыворотками крови эмбрионов коров и крупного рогатого скота, так и опытные, выращенные на средах с сыворотками крови эмбрионов овец и новорожденных ягнят.

Высокий уровень жизнеспособности и адгезии клеток в этих культурах прослеживался на протяжении всего срока наблюдений (10 пассажей).

Клеточная культура ТЭК-МВА-76, выращенная с сыворотками крови суягных овцематок, на разных уровнях пассажа к моменту образования монослоя (74±1,8 часа) имела одинаковую морфологию и состояла в основном из эпителиоподобных типов клеток. Ядра этих клеток имели округлую форму и зачастую располагались эксцентрично.

Клеточная культура FLK в монослое (58±3,43 часа), имела характерную рельефность и была представлена преимущественно фибробластоподобным типом клеток. Нативные клетки внешне оставались светлыми, рефрактильными, с ярко очерченными границами. В окрашенных

Таблица I.

Сроки формирования монослоя и индексы клеточной пролиферации в перевиваемых культурах клеток ТЭК-МВА-76 и РЦК, выращенных на средах с сыворотками крови разных видов животных.

п.п.	Сыворотка крови	№ серии сыворотки	Культуры клеток: ТЭК-МВА-76: Сроки формирования монослоя (час.)	ТЭК-МВА-76: Индексы пролиферации	РЦК: Сроки формирования монослоя (час)	РЦК: Индексы пролиферации
I.	Овечьих эмбрионов	I-5	74±1,80	6,45±0,23	58±2,43	7,35±0,14
2.	Эмбрионов овец	I-6	76±1,98	5,0 ±0,04	73±2,50	6,5±0,09
3.	Новорожденных ягнят	I-6	80±1,37	4,91± 0,04	73±2,25	6,41±0,09
4.	Крупного рогатого скота	I-3	147±0,63	2,37±0,06	I33±4,76	3,05±0,16
5.	Эмбрионов коров	I-4	92±0,52	4,7±0,04	77±2,54	6,25±0,06

препаратах большинство клеток имело центральное расположенное ядро овальной формы, в котором различались 5-6 ядрышек. Цитоплазма имела слегка зернистую структуру.

Адаптация клеточных линий ТЭК-МВА-76 к средам с сыворотками крови эмбрионов овец и новорожденных ягнят в целом проходила также активно, как к средам с сыворотками крови эмбрионов коров.

Показатели сроков формирования монослоя и индексов клеточной пролиферации в этих культурах почти не отличались от показателей контрольных культур клеток, выращенных с использованием сывороток крови эмбрионов коров. Прикрепление и распластывание клеток в опытных культурах ТЭК-МВА-76 и РЦК отмечалось уже через 4-6 часов после посева. Обе клеточные культуры в монослое имели свойственные им морфологические признаки.

Нативные культуры обеих линий клеток характеризовались высоким уровнем жизнеспособности и адгезии клеток в течение всего срока наблюдения. Цитоплазма клеток была светлой и хорошо преломляла свет. В обеих клеточных культурах, выращенных на средах с сыворотками крови эмбрионов овец и новорожденных ягнят, ростовые и морфологические свойства клеток оставались неизменными и почти не отличались от контрольных культур клеток, выращенных с использованием сывороток крови эмбрионов коров.

Использование в качестве сывороточного компонента питательной среды сыворотки крови крупного рогатого скота показало явные различия ростообеспечивающих свойств разных серий сывороток. Так, для культур обеих линий клеток с увеличением количества пассажей характерно было ослабление потенции роста. Обе клеточные культуры, выращенные на средах с использованием этих видов сывороток, по срокам формирования монослоя и индексам клеточной пролиферации достоверно уступали культурам, выращенным с сывороткой крови эмбрионов коров ($P<0,05$).

Клеточная культура ТЭК-МВА-76, выращенная на средах с сыворотками крови крупного рогатого скота, клеточный монослой формировала лишь на первых пассажах в среднем за I47 часов культивирования.

В клетках с некоторыми сериями сывороток формирование монослоя вообще не отмечалось.

Средний индекс пролиферации в этих культурах также уступал культурам, выращенным на средах, содержащих сыворотки крови эмбрионов коров, примерно в 2 раза (табл.2). С увеличением количества пасса-

Таблица 2

Средние показатели репродукции ВЛКРС и продукции вирусных антигенов в перевиваемых культурах клеток ТЭК-ЦВА-76 и PLK , выращенных на средах с разными сыворотками крови животных

№ пп	Наименование сывороток крови	№ серий сывороток	культуры клеток ТЭК-ЦВА-76 Титры антигенов (РИП) Гп	$П_{24}$	К-во с синцитиев в I преп.	культуры клеток PLK Титры антигенов (РИП) Гп	$П_{24}$	Кол-во синцитиев в I препар. (ТСО)
I.	Суягных овцематок	М I-6	20,8±I,83	30,6±I,64	5-20	34,0±I,8	39,0±0,92	I5-25
2.	Эмбрионов овец	М I-6	I8,2±0,94	28,2±I,75	5-20	28,0±I,34	34,0±0,7I	I5-25
3.	Новорожденных ягнят	М I-6	I7,8±0,90	24,4±0,73	4-20	28,2±2,62	33,2±0,67	I4-22
4.	Крупного рогатого скота	М I-6	4,0±0,I6	7,3±0,62	-	6,7±0,97	8,6±2,I9	2-5
5.	Эмбрионов коров	М I-4	I6,6±0,68	23,4±I,54	4-20	27,4±0,97	3I,4±0,8I	I0-23

(-) выявить синцитии не удавалось.

жей резко снижался выход клеток, рост их становился очаговым, отмечались конгломераты зернистых и сморщенных клеток.

Культура клеток РЬК , выращенная на средах с сыворотками крови крупного рогатого скота, клеточный монослой формировала лишь до 9 пассажа в среднем за 133 часа культивирования. Средний индекс пролиферации при этом составлял 3,05±0,16, что примерно в 2 раза ниже чем в культуре, выращенной с сывороткой крови эмбрионов коров.

В клеточных культурах РЬК при пассировании наблюдались как патологические, так и нормальные клеточные организации. С увеличением количества пассажей число клеток с атипичными структурными изменениями росло и носило необратимый характер, что в итоге не могло не отразиться на ростовой активности и жизнеспособности клеток.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что обе клеточные культуры, выращенные на средах с сыворотками крови суягных овцематок, по показателям сроков формирования монослоя и индексам клеточной пролиферации проявляли более высокий уровень адаптации и ростовой активности клеток, чем клеточные культуры, выращенные на средах с другими видами сывороток.

Средние статистические данные по репродукции ВЛКРС и продукции его антигенов в перевиваемых культурах клеток ТЭК-ЛВА-76 и РЬК выращенных на средах с разными сыворотками крови животных приведены в таблице 2, из которой видно, что культуры обеих клеточных линий продуцируют как гликопротеиновый, так и полисахаридный антигены ВЛКРС, где титры этих антигенов зависят от вида используемого сывороточного компонента питательной среды.

Лучшая продукция ВЛКРС и его антигенов в клеточных культурах ТЭК-ЛВА-76 и РЬК отмечалась в средах с сыворотками крови суягных овцематок, в которых уровень активности вирусных антигенов в результате пассирования опытных культур существенно возрастал и был достоверно выше контрольных ($P<0,05$). Репродукция вируса в процессе пассирования также увеличивалась. При этом количество специфических клеток в каждом препарате обеих культур было соответственно 5-20 и 15-25.

В клеточных культурах ТЭК-ЛВА-76 и РЬК , выращенных на средах с сыворотками крови эмбрионов овец, высокий уровень репродукции

БЛКРС и продукции вирусных антигенов отмечался на протяжении всего срока наблюдений. Причем в опытных культурах клеток ТЭК-МВА-76 и FIK показатели продукции как полипептидного, так и гликопротеинового антигенов БЛКРС были несколько выше, чем в культурах, выращенных с сыворотками крови эмбрионов коров.

Показатели продукции БЛКРС в опытных и контрольных культурах ТЭК-МВА-76 и FIK были одинаково высокими (до 20 и более синцитиев в I препарате). Однако, репродукция вируса в клеточной культуре FIK была достоверно выше, чем в культуре ТЭК-МВА-76 ($P<0,05$).

Аналогичные результаты были получены в культурах обеих клеточных линий, выращенных на средах с сыворотками крови новорожденных ягнят. С этими видами сывороток обе клеточные культуры проявляли такую же высокую антигенпродуцирующую способность как и с сыворотками крови эмбрионов коров. Однако, в клеточной культуре FIK продукция БЛКРС и его антигенов была несколько выше, чем в контрольной культуре, выращенной на среде с сывороткой эмбрионов коров, и эта тенденция сохранялась на уровне всех пассажей. В ТСО число синцитиальных клеток в каждом препарате насчитывалось от I4 до 22 (табл. 2).

Репродукция БЛКРС и продукция вирусных антигенов в опытной культуре клеток ТЭК-МВА-76, выращенной на средах с сыворотками крови новорожденных ягнят, на протяжении всех пассажей была такой же высокой, как и в контрольной культуре, выращенной на средах с сыворотками крови эмбрионов коров. При этом, число синцитиальных клеток колебалось в пределах от 4 до 20 в одном препарате.

В культурах обеих клеток при использовании сывороток крови крупного рогатого скота наблюдалась слабая продукция антигенов БЛКРС. Причем в процессе пассирования в этих культурах утрачивалась способность продуцировать как БЛКРС, так и его антигены. В культуре клеток FIK продукция гликопротеинового антигена БЛКРС отмечалась на уровне 6 пассажей, полипептидного - несколько дольше. Репродукция вируса в культуре при пассировании снижалась. В препаратах I0 пассажа выявить синцитии не удалось. В клеточной культуре ТЭК-МВА-76 на среде с сыворотками крови крупного рогатого скота, показатель активности гликопрстеинового и полипептидного антигенов БЛКРС отмечался до 3 и 4 пассажа соответственно. Репродукции вируса при этом также не обнаруживалось (Табл.2).

Результаты производственных испытаний антигенов БЛКРС, полученных при культивировании перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и

FIK на средах с различными видами сывороток крови животных, приведены в таблице 3.

Сравнительное изучение диагностической ценности опытных и контрольных антигенов ВЛКРС проводили в РИД на взрослом поголовье крупного рогатого скота (1813 гол.) в хозяйствах с различной степенью выраженности эпизоотической ситуации по лейкозу. Результаты этих исследований выявили 214 голов животных, инфицированных ВЛКРС. Степень инфицированности животных ВЛКРС при этом колебалась от 1,9 до 46,8% к количеству обследованного поголовья.

Опытные антигены, полученные из перевиваемых линий клеток ТЭК-МВА-76 и FIK , выращенных на средах с сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, в РИД с серопозитивной сывороткой давали четкие линии преципитации подобно стандартным антигенам ВЛКРС, производства Курской биофабрики. Тогда, как опытные антигены, полученные при культивировании клеток ТЭК-МВА-76 на средах с сыворотками крови крупного рогатого скота, в отличие от стандартных антигенов ВЛКРС, вообще не реагировали в РИД с серопозитивными сыворотками крови животных. В то же время опытные серии антигенов ВЛКРС, приготовленные из клеточных культур FIK , выращенных на средах с сыворотками крови крупного рогатого скота, в РИД с серопозитивными сыворотками проявляли весьма слабую диагностическую активность.

Антигены ВЛКРС, приготовленные из клеточных культур ТЭК-МВА-76 и FIK , выращенных на средах с сыворотками крови эмбрионов коров, проявляли с серопозитивными сыворотками крови животных, подобно стандартным антигенам ВЛКРС, высокую диагностическую активность (табл.3), отмечающуюся в РИД четкими линиями преципитации со всеми положительными сыворотками крови животных.

Таким образом, анализируя результаты производственных испытаний антигенов ВЛКРС, можно заключить, что опытные антигены ВЛКРС, приготовленные из культуральной жидкости, содержащей сыворотки крови каракульских суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, по качеству не уступают стандартным антигенам ВЛКРС, производимых Курской биофабрикой. Следовательно, антигены ВЛКРС, полученные при выращивании перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FIK на средах с сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, могут быть использованы для замены

Таблица 6.

Результаты производственных испытаний антигенов ВЭРС в РНГА

Наименование хозяйств	К-во жив-х (голов)	Стандартный контрольный антиген (Ка)			Опытный антиген (Оа)		
		№ серии Ка	Выявл. голов	%	№ серии Ка	Выявл. голов	%
			ТОК-КВА-76				
1. К-з им.Свердлова	144	12	31	21,5	4(1)	31	21,5
2. С-з "50-летия СССР	60	5	22	36,6	8(2)	22	36,6
3. С-з "50 -летия СССР	141	28	8	6,0	7(3)	8	6,0
4. С-з "Тайпа-Арал"	109	17	2	1,9	2(4)	-	-
5. К-з "Ленинград"	429	9	42	9,7	11(5)	42	9,7
			ГИК				
6. К-з им.Куйбышева	306	12	39	11,9	5(1)	39	11,9
7. С-з 50-летия СССР	60	9	28	46,8	6(2)	28	46,6
8. К-з "Ленинград"	310	25	34	10,9	9)3)	34	10,9
9. К-з им.Свердлова	37	5	4	10,0	3(4)	1	2,7
10. С-з "Нарпай"	197	17	4	2,3	10(5)	4	2,3

Серии антигенов, полученные с сыворотками крови : (1) - суягных овцематок; (2) - эмбрионов овец; (3) - новорожденных ягнят; (4) - крупного рогатого скота; (5) - эмбрионов коров.

дорогостоящих стандартных антигенов-диагностикумов ВЛКРС.

Сравнение себестоимости антигенных препаратов, приготовленных из культуральной жидкости перевиваемых клеточных линий ТЭК-ЦВА-76 и FIK ,выращенных на средах с сыворотками крови каракульских суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, показало, что только за счет замены эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота, необходимой при изготовлении антигенов ВЛКРС, на сыворотку крови суягных овцематок экономическая эффективность в расчете на 100 тыс.доз диагностикума составит 8,2 тыс.рублей. Это позволит примерно в 11 раз снизить себестоимость производства лейкозных диагностикумов.

Учитывая, что по новой технологии производства антигенов-диагностикумов ВЛКРС имеется значительная экономия как питательных сред, так и снижения затрат труда, данный способ культивирования получает значительные преимущества, по сравнению с ранее применяемыми. Следовательно, в производстве антигенов ВЛКРС дорогостоящую сыворотку крови эмбрионов коров можно заменить на более дешевую и эффективную сыворотку крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят.

В Ы В О Д Ы

1. Установлено, что перевиваемые клеточные линии ТЭК-ЦВА-76 и FIK , выращенные на средах с сыворотками крови суягных овцематок каракульской породы, их эмбрионов и новорожденных ягнят, по показателям сроков формирования монослоя, индексам клеточной пролиферации, по репродукции ВЛКРС и продукции вирусных антигенов существенно превосходят перевиваемые культуры клеток, выращенные на средах с сыворотками крови эмбрионов коров.

Сыворотки крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят не содержат специфических антител к ВЛКРС и его антигенам.

2. Перевиваемые клеточные линии ТЭК-ЦВА-76 и FIK , хронически инфицированные вирусом лейкоза крупного рогатого скота, выращенные на средах с сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, продуцируют как гликопротеиновый, так и полипептидный антигены ВЛКРС.

БИБЛИОТЕКА
Сам. СХИ
гор. Самарканд
Д-133922

3. Репродукция ВЛКРС и продукция вирусных антигенов в клеточных культурах ТЭК-МВА-76 и FLK , выращенных на средах с коммерческими сыворотками крови крупного рогатого скота, существенно уступает клеточным культурам этих линий, выращенных на средах с сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, а также с сыворотками крови эмбрионов коров.

4. Перевиваемая культура клеток FLK лучше адаптируется к средам с сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, чем клеточная культура ТЭК-МВА-76.

5. Репродукция ВЛКРС и продукция его антигенов в клеточных культурах FLK , выращенных на средах с сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, существенно превосходит клеточную культуру ТЭК-МВА-76, выращенную на средах с теми же видами сывороток.

6. Гликопротеиновый и полипептидный антигены ВЛКРС, полученные при культивировании перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK выращенные на средах с сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, проявляли высокую активность в РИД при серологической диагностике лейкоза крупного рогатого скота.

7. В производстве антигена ВЛКРС, при культивировании перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK , дорогостоящую сыворотку крови эмбрионов коров можно заменить сравнительно дешевыми сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят.

8. Установлена прямая коррелятивная связь между репродукцией ВЛКРС в клеточных культурах ТЭК-МВА-76 и FLK , выращенных на средах с сыворотками крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят, и продукцией вирусных антигенов в РИД и тесте синцитиеобразования.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты изложенные в диссертационной работе, могут быть использованы специалистами ветеринарных учреждений и диагностических лабораторий при культивировании хронически инфицированных ВЛКРС перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK с целью

изучения различных свойств вируса.

2. Материалы диссертации использованы при разработке и составлении "Методических рекомендаций по использованию сывороток крови суягных овцематок для получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота" (одобрены на заседании секции "Лейкозы, сравнительная и экспериментальная онкология животных" ВАСХНИЛ от 6 июня I989 г.)

3. Для культивирования перевиваемых клеточных линий ТЭК-МВА-76 и FLK при крупномасштабном производстве лейкозных антигенов рекомендуется использовать сыворотки крови суягных овцематок, их эмбрионов и новорожденных ягнят вместо дорогостоящей коммерческой сыворотки эмбрионов коров.

4. Материалы диссертационной работы могут быть использованы в учебном процессе при подготовке слушателей по курсу ветеринарной вирусологии, а также при написании учебных пособий, методических рекомендаций и монографий.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Салимов Х.С., Мамаджанов Ю.И., Бутаев М.К. Серологическая оценка антигенов ВЛКРС, приготовленных из перевиваемых клеточных линий, выращенных на средах с добавлением различных сывороток крови//Докл.ВАСХНИЛ.-М.,I989.-№ II.С.28-29.

2. Шишков В.Н.,Салимов Х.С.,Мамаджанов Ю.И., Крикун В.А., Рожнова Н.В. Методические рекомендации по использованию сывороток крови суягных овцематок для получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота. М.,I989. С.I-7.

Размножено и печатн[illegible]
Заказ № 2 с 9
Тираж [illegible]
[illegible] Самаркандского сельскохозяйственного
[illegible]
г. Самарканд, ул. К.Маркса [illegible].