

Zuai A., Shalgimbaeva N.N., Kulataev B.T.

PRODUCTIVE FEATURES HISSAR SHEEP BRED IN THE FARMS "AZHAR"

Annotation

The results study productivity of the major manufacturers gissar sheep and hybrids derived from them compliant breed meat and greasy fat-tailed breeds adapted to the new conditions Almaty region.

Keywords: coarse wool, sheep, crosses, sheep producers, ewe, fat-tailed directions, live weight.

УДК 619:616.576.89 (574)

**Иманбекова Т.А., Ахметсадыков Н.Н.,
Ажмухан Н.О., Маукиш А.К.**

Казахский национальный аграрный университет, г. Алматы

ТОО «Научно-производственное предприятие «Антиген», Алматинская обл.

ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, г. Алматы

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ВИРУС ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Аннотация

В результате проведенных исследований по выращиванию перевиваемых линий установлены оптимальные сроки формирования монослоя и накопления вируса лейкоза в суспензиях клеток. При выращивании культур клеток ЛЭК ВИБВ-90 и FLK-BLV на ростовых питательных средах с 10 % содержанием сыворотки крови ягнят установлено, что 100 % плотный монослой формируется на 3-4 сутки культивирования с обеих культур при посевной концентрации 70-85 и 80-100 тыс.кл/мл соответственно с титром активности 1:2-1:8 и 1:4-1:16 в РИД. При этом биологическая активность перевиваемой клеточной линии FLK-BLV была 2 раза выше, чем ЛЭК ВИБВ-90.

Ключевые слова: лейкоз крс, РИД, антиген.

Введение

Этиологическим агентом лейкоза крупного рогатого скота является онкорнавирус. Выделение вируса *in vitro* предоставляет определенную трудность. Впервые удалось обнаружить в краткосрочных культурах лимфоцитов крови инфицированных животных и репродуцировать в перевиваемых хронически инфицированных культурах клеток тканей животных разных видов, таких как АИД-15 (фибробласты легкого эмбриона коровы), ПЭК (почки эмбриона коровы), Т 61-Lu (легкого эмбриона коровы), BLV-Simian (легкого макаки-резус), FLS (селезенка овцы), ТЭК МВА-766 (тимус эмбриона коровы) ткани нашли [1]. В вирусологических исследованиях часто применяют перевиваемые линии клеток FLK-BLV и ЛЭК ВИБВ-90, которых соответственно получили в 1974 году Vander Maaten и М.И. Гулюкин с соавт. в 1992 году путем сокультивирования эмбриональных клеток почки овцы и легкого коровы с лимфоцитами. Для этой цели наряду с другими исследованиями, широко применяются серологические методы (РИД и ИФА), обеспечивающие эффективное выявление болезни [2, 3]. В нашей стране для постановки этих реакций диагностические наборы закупаются из зарубежных стран и используются чаще всего для исследования ограниченного количества животных. Завозимые из-за рубежа диагностические наборы

очень дорогие, дорогостоящие, не всегда доступны для ветеринарной лаборатории РК, что не позволяет своевременно и качественно проводить диагностические исследования [4, 5]. Поэтому особую актуальность приобретают задачи конструирования отечественных диагностических наборов для серологической диагностики лейкоза, разработанные на основе клеточных культур, постоянно продуцирующих вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС).

Следовательно, задачей наших исследований являлся подбор культуральной системы, продуцирующей ВЛ КРС и позволяющей получить из нее диагностический антиген к возбудителю болезни [6].

Материалы и методы исследований

В работе использованы две линии перевиваемых культур клеток: FLK-BLV и ЛЭК ВИЭВ-90, хронически инфицированные вирусом лейкоза КРС. Культуры были получены из ВИЭВ им. Я. Р. Коваленко и лаборатории культур клеток ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН РФ [7].

Для культивирования использовали среды Игла MEM, Игла DMEM и 199 с добавлением 10% сыворотки мелкого рогатого скота, антибиотика 100 ед/мл (ципролет 0,2 мкг/мл). Пересев FLK-BLV проводили один раз в неделю с коэффициентом 1:3-1:4, а ЛЭК ВИЭВ-90 – 1:4-1:5. Семисуточные культуры снимали с поверхности стекла с помощью смеси растворов Версена (0,02%) и трипсина (0,25%) в соотношении 9:1, предварительно подогретых до комнатной температуры. Отделенные от стекла и суспензированные клетки подсчитывали в камере Горяева по общепринятой методике. Клетки культивировали в течение семи суток в термостате при температуре 37 °С, ежедневно наблюдая за ростом под микроскопом с увеличением 7х10. На седьмые сутки сливали культуральную жидкость для получения антигена и проводили следующий пассаж по вышеописанной методике. Оценку активности клеточных культур FLK-BLV и ЛЭК ВИЭВ-90 продуцирующих ВЛ КРС проводили в реакции иммунодиффузии (РИД) в геле агара.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты образования сплошного монослоя при культивировании перевиваемых линий клеток ЛЭК ВИЭВ-90 и FLK-BLV в матрасах представлены в таблице 1. Таблица 1 – Результаты культивирования перевиваемых линий клеток в разных питательных средах

Культура клеток	Жизнеспособность клеток	Адгезивность, (час)		Культурально-морфологические свойства клеток	Сравнительный микроскопический контроль клеток
		Среда 199 с 10% сыворотки крови овцы	Среда Игла Мем10% сыворотки крови телят		
FLK-BLV	90 %	Прикрепление клеток и их расплывание на поверхности стекла через 2-3 часов после посева.	Прикрепление клеток и их расплывание на поверхность и стекла через 8-10 часов после посева.	Границы клеток плотно примыкают друг к другу, ядро клеток округлой формы, цитоплазма чистые.	Монослой на 70-80 % на 3 сутки при посевной концентрации 80-100 тыс. кл./см ³

ЛЭК- ВИЭВ 90	70 %	Прикрепления клеток и их рас- пластывание на поверхности стекла через 4-5 часов после вы- сева.	Прикрепле- ние клеток и образование монослоя наблюдаетс я, но рост не наблюдаетс я	Ядро имеет крупносетчатую структуру, цито- плазма с мелкой вакуолизацией.	Монослой на 50-70 % на 3 сутки при по-севой концен- трации 70-85 тыс. кл./см ³
--------------------	------	---	---	---	---

Как видно из таблицы 1, жизнеспособность при размораживании перевиваемой линии клеток FLK-BLV, хронически инфицированной вирусом лейкоза, после хранения в жидком азоте, составляла 90%. На первом пассаже монослой был сформирован на четвертые сутки культивирования. Первый пересев был проведен с коэффициентом пересева 1:2, второй – с коэффициентом 1:3. Через 3-4 пассажа культура клеток стабильно пересевалась с индексом пролиферации 2,8-3,9. Рост культуры FLK-BLV начинался с прикрепления клеток и их распластывания на всей поверхности стекла матраса. Через 5-6 часов после высева площадь адгезии клеток составляли 15-25 % в виде отдельных островков и отдельных клеток. На вторые сутки культивирования клетки привывали 40-50 %, площади матраса 70-80 %. С течением срока культивирования в монослое культуры все более преобладали вытянутые клетки. Границы клеток были хорошо выражены и формировали сплошной монослой. В равномерном монослое ядра клеток были округлой, реже овальной формы с четко ограниченной оболочкой ядра. На четвертые сутки культивирования культура представляла собой очень плотный клеточный монослой. Далее на 5-6 сутки культивирования в монослое выявлялись плотные клетки с трудно различимым ядром, что свидетельствовало о начале дегенерации клеток. К 8-9 суткам культивирования на поверхности клеток начинались дегенеративные изменения в монослое, проявляющиеся отслоение от стенки стекла матраса части клеточного пласта, который наблюдался обычно с периферии.

Жизнеспособность до пассажирования культуры клеток ЛЭК-ВИЭВ-90 составляла 70%. На первом пассаже после восстановления, монослой был сформирован на 4 сутки культивирования. Через 3-4 пассажа культура клеток стабильно пересевалась с индексом пролиферации 4,2-4,8. Рост культуры начинался с прикрепления клеток и их распластывания через 4-5 часов после высева в виде отдельных островков. На вторые сутки культивирования клетки покрывали 40-60 % площади поверхности матраса. При этом клетки имели округлую или многоугольную форму. В течение первых 1-2 суток культивирования клетки росли в виде отдельных, равномерно распределенных островков по всей площади матраса, имевших очертания неправильной формы. На 3 сутки культивирования при посевой концентрации 70-85 тыс. кл/см³ монослой сформировался на 50-70 %. К концу третьих, началу четвертых суток культивирования клетки сливались, образуя ровный плотный монослой, к концу четвертых суток монослой сформирован полным. Далее к 120-часам культивирования в монослое отмечали отдельные плотные клетки, свидетельствующие о начале дегенеративных изменений в монослое.

Оценку продукции антигена ВЛ КРС клеточными культурами FLK BLV и ЛЭК ВИЭВ-90 проводили в РИД. Выделение антигена из культуральной жидкости проводили методом преципитации полиэтиленгликолем (м.м. 6000). Культуры выращивали до 7 суток, брали по 100 см³ культуральной среды каждой культуры, осветляли центрифугированием при 5000 об/мин., в течение 15 минут. К осветлённой надосадочной жидкости добавляли 10 г сухого ПЭГ-6000, перемешивали до полного растворения полиэтиленгликоля на магнитной мешалке и добавляли сухой NaCl в количестве 5,8 г. После растворения соли, материал помещали в холодильник при 4°C на ночь для формирования осадка. Преципитат осаждали центрифугированием при 5000 об/мин. в течение 20 минут и ресуспендировали в

37,2 см³ за буферном фосфатном физраствором. В итоге от 100 см³ вируссодержащей суспензий клеток каждой линии FLK BLV и ЛЭК ВИЭВ-90 получали по 2 см³ исходного антигена ВЛ КРС. Для сравнительного определения количество антигена титрованием в РИД. Для постановки РИД использовали реагенты стандартного диагностического набора для серологической диагностики лейкоза производства Курской биофабрики. Для определения титра активности из полученного антигена готовили последовательные двукратные разведения и равные объемы каждого разведения вносили в лунки, расположенные по периферии, кроме двух вертикальных диаметрально противоположных лунок, куда вносили контрольный антиген, заведомо образующий стандартную полосу преципитации с контрольной сывороткой. Последнюю вносили в центральную лунку. В качестве тест-системы использовали гликопротеидный антиген ВЛ КРС и сыворотку содержащую антитела. Учет РИД проводили через 48 часов инкубации в чашках Петри во влажной камере термостата при температуре 25°C. Сфокусированный луч света направляли на дно чашки под углом 30-45°C и оценивали результаты иммунодиффузии.

Полученные концентрированные антигены вируса лейкоза исследовали на активность и специфичность в реакции иммунодиффузии. Активность вируспродуцирующей культуры клеток FLK-BLV в РИД составила в пределах в соотношении от 1:4 до 1:16, а ЛЭК ВИЭВ-90 – 1:4-1:8 с характерными четкими специфическими линиями преципитации. За период наблюдений выход антигена gp51 для культуры FLK-BLV был выше в 2 раза, по сравнению с культурой ЛЭК ВИЭВ-90.

Выводы

В результате проведенных исследований по выращиванию перевиваемых линий установлены оптимальные сроки формирования монослоя и накопления вируса лейкоза в суспензиях клеток. При выращивании культур клеток ЛЭК ВИЭВ-90 и FLK-BLV на ростовых питательных средах с 10 % содержанием сыворотки крови ягнят установлено, что 100 % плотный монослой формируется на 3-4 сутки культивирования в обоих культурах при посевной концентрации 70-85 и 80-100 тыс.кл/см³ соответственно с титром активности 1:2-1:8 и 1:4-1:16 в РИД. При этом биологическая активность перевиваемой клеточной линии FLK-BLV была 2 раза выше, чем ЛЭК ВИЭВ-90. Поэтому клеточная линия FLK-BLV рекомендуется для производства антигенов вируса лейкоза КРС в промышленном масштабе.

Литература

1. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. - М.: ВНИТИБП, 1998. - 928 с.
2. Смирнов Ю.П. Влияние лейкоза на молочную продуктивность коров.//Молочные и мясные скотоводство.-1999.-№4.-С.25-28.
3. Гулюкин М.И., Замараева Н.В., Седов В.А. и др. Основные тенденции в организации и проведении противолейкозных мероприятий // Труды ВИЭВ. – М. – 1999. – Т. 72. – С. 16 – 22 24
4. Бахтаунов Ю.Х. Лейкоз крупного рогатого скота и меры борьбы с ним // Вестник с.- х. науки Казахстана.-2011- № 12.- С 25-55.
5. Бахтаунов Ю.Х. Динамика распространения лейкоза крупного рогатого скота в Казахстане// Сб. науч.тр.КазНИВИ- 2011. – Т.57.-С.98-100.
6. Бессарабов Б.Ф., Сидорчук А.А., Воронин Е.С. и др. Инфекционные болезни животных/ М.: Колос.- 2007. – 671 с.
7. Гулюкин М.И., Дьяконов Л.П., Какпаков В.Т., Гальнбек Г.Т. Каталог клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных Москва -2011- С 26.

**Иманбекова Т.А., Ахметсадықов Н.Н.,
Ажмухан Н.О., Маукіш А.К.**

СИЫР ЛЕЙКОЗЫ ВИРУСЫН БӨЛІП ШЫҒАРАТЫН ТОРША ӨСІНДІЛЕРІНІҢ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

Аңдатпа

Дамылсыз өсетін торша жүйелерін өсіру барысында, жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде, торша сұйықтығында лейкоз вирусының жиналуының жоғарғы тиімділігі анықталды. ЛЭК ВИЭВ-90 және FLK BLV дамылсыз өсетін торша өсінділерін, 10% қозы қан сарысуымен дайындалған қоректік ортада 3-4 тәулікте, торша тығыз бірқабатты 100% өсінді түзді. Салыстыруға алынған екі торшада, өсінді концентрациясына сәйкес 70-85 мың және 80-100 мың торша/мл, сондай-ақ ИДР-да титр белсенділігі 1:2-1:8 және 1:4-1:16 көрсетті.

Кілт сөздер: сиыр лейкозы, РИД, антиген.

**Imanbekova T.A., Akhmetsadykov N.N.,
Azhmuhan N.O., Maukish A.K.**

CULTURAL PROPERTIES OF CELLS PRODUCING BOVINE LEUCOSIS VIRUS

Abstract

As a result of research on the cultivation of transplantable lines was set the optimal timing of formation of the monolayer and the accumulation of leucosis virus in suspensions of cells. When growing cultures of cells of LEK VIEW-90 and FLK-BLV of growth on nutrient media with 10% content of blood serum of the lambs established that 100% of a dense monolayer is formed within 3-4 days of cultivation in both cultures at a seeding concentration and 70-85 80-100 thousand cells/ml, respectively with a title activity 1:2-1:8 and 1:4-1:16 in REID. The biological activity of transplantable cell line FLK-BLV was 2 times higher than LEK VIEW-90.

Keywords: bovin leucosis, RIA, antigen.

УДК 636.32/38.082

Искаков К., Шаугимбаева Н.Н., Каташева А., Кулатаев Б.Т.

Казахский национальный аграрный университет

ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ ОВЕЦ ЛИНЕЙНЫХ БАРАНОВ И МАТОК КАЗАХСКОЙ ТОНКОРУННОЙ ПОРОДЫ РАЗВОДИМЫХ В ПХ «Р-КУРТЫ»

Аннотация

В южной зоне разведения тонкорунных овец с жарким климатом в целях интенсификации тонкорунного овцеводства, повышения воспроизводительных качеств овец, а также увеличения производства молодой баранины, рекомендуется использование