

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 2, Number 38 (2017), 8 – 13

T. A. Imanbekova, A. Umbetova, N. N. Ahmetsadykov, Zh. Batanova, Kh. Abeuov

Kazakh national agrarian university, Almaty, Kazakhstan,
LLC «Research and Production Enterprise "Antigen", Almaty region, Kazakhstan

**CHARACTERISTICS OF CULTURAL PROPERTIES OF FLK CELLS,
CHRONICALLY INFECTED WITH BOVINE LEUCOSIS**

Abstract. As a result of multiple studies on the cultivation of transplantable cell lines FLK set the optimum time of formation of monolayer and accumulation leukosis virus in suspension.

Keywords: bovine leucosis virus, cell culture, monolayer, titer, cytopathogenic action, degeneration, cytological drug.

УДК 619:616.576.89 (574)

Т. А. Иманбекова, А. Умбетова, Н. Н. Ахметсадықов, Ж. М. Батанова, Х. Б. Абеуов

Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан,
ТОО «Научно-производственное предприятие «Антиген», Алматинская область, Казахстан

**ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК FLK,
ХРОНИЧЕСКИ ИНФИЦИРОВАННЫЙ ВИРУСОМ ЛЕЙКОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Аннотация. В результате проведенных исследований по выращиванию перевиваемой линии клеток FLK установлены оптимальные сроки формирования монослоя и накопления вируса лейкоза в суспензии.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота, культура клеток, монослой, титр, цитопатогенное действие, дегенерация, цитологический препарат.

Введение. Лейкоз – хроническое инфекционное заболевание крупного рогатого скота (КРС) лимфопролиферативной природы. Болезнь диагностируют на всех континентах мира. Наиболее широко она распространена практически на всей территории постсоветского пространства с развитым животноводством, а также в странах Восточной и Западной Европы, Азии, Южной и Северной Америки.

Многие авторы показывают ежегодный рост как больных, так и инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) животных. Так, РФ в структуре инфекционной патологии лейкоз занимает лидирующее место и составляет более 60% от числа инфекционных заболеваний. В европейском континенте, где количество неблагополучных пунктов, от общемирового показателя составляет 84%, а количество больных животных достигает 99,6%. Американскими исследователями установлено, что ежегодные экономические потери, связанные с лейкозом КРС сельскому хозяйству США, обходятся в 91 миллион долларов [1].

Согласно официальной статистики в некоторых стадах РК инфицированность КРС вирусом лейкоза составляет от 10 до 50%, гематологические сдвиги, характерные для лейкоза, у 10% животных, а клинические признаки у 1-2% больных животных. В результате хозяйства, неблагополучные по данному заболеванию терпят существенный экономический ущерб, в первую очередь

по причине снижения годового надоя молока у серопозитивных коров на 10-14% и содержание жира на 0,09%, вынужденного забоя скота и выбраковки молодняка, а также из-за затрат на карантинные и противовейкозные мероприятия [2-9]. Впервые вирус лейкоза удалось обнаружить в краткосрочных культурах лимфоцитов крови инфицированных животных и адаптировать к размножению в перевиваемых 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) [10].

Методы и средства специфической профилактики лейкоза не разработаны, поэтому все программы по профилактике и ликвидации инфекции основаны на серологической диагностике ее и ликвидации или изолировании инфицированных животных. В состав иммунологических диагностических тест-систем входит антиген ВЛ КРС. Наибольшее распространение для накопления антигена, изучения структуры и биосинтеза компонентов BLV получила перевиваемая клеточная линия FLK-BLV, полученная в США M.J. VanderMaaten et J.M. Miller. Эта линия клеток отличается стабильностью и высоким уровнем продукции как вирионов, так и растворимого наружного гликопротеида gp51 и широко используется во всем мире для накопления вирусной биомассы с целью приготовления препаратов для серологической диагностики [11].

В нашей стране для постановки реакций диагностические наборы закупаются из зарубежных стран и используются чаще всего для исследования, ограниченного количества животных. Завозимые из-за рубежа диагностические наборы очень дорогие по стоимости и не всегда доступны для ветеринарной лаборатории РК, что не позволяет своевременно и качественно проводить диагностические исследования. Поэтому особую актуальность приобретают задачи конструирования отечественных диагностических наборов для серологической диагностики лейкоза, разработанные на основе клеточных культур, постоянно продуцирующих ВЛКРС.

Задачей наших исследований являлась подбор оптимальной среды для культуральной системы, продуцирующей ВЛКРС, адаптированную к оптимальным лабораторным условиям культивирования, накопления вирусной биомассы и получение из нее концентрированного очищенного вирусного антигена, необходимый для проведения исследований на лейкоз серологическими методами.

Материалы и методы исследований. В работе использована перевиваемая линия культур клеток FLK-BLV, хронически инфицированные вирусом лейкоза КРС. Культура была получена из лаборатории культур клеток ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РФ. Для культивирования ее использовали среды Игла MEM, RPMI-1640, DMEM и 199 с добавлением 10% сыворотки крови разных видов животных, антибиотика 100 ед/мл, стрептомицина 100 мкг/мл. Пересев FLK-BLV проводили один раз в неделю с коэффициентом 1:3-1:4. Семисуточные культуры снимали с поверхности стекла с помощью смеси растворов Версена (0,025) и трипсина (0,25%) в соотношении 9:1, предварительно подогретых до комнатной температуры, из расчета 10 мл раствора на 250 мл матрас. Матрасы с раствором Версена ставили в термостат на 10-15 мин., затем встряхивали. Конгломераты клеток в суспензии разбивали пипетированием и отбирали 1 мл суспензии для подсчета клеток. Отделенные от стекла и суспендированные клетки подсчитывали в камере Горяева по общепринятой методике. Клетки культивировали 7 суток в термостате при температуре 37⁰С, ежедневно наблюдая за ростом под микроскопом с увеличением 7x10. На 7 сутки сливали культуральную жидкость для получения антигена и проводили следующий пассаж по выше описанной методике. Для определения активности из полученных антигенов готовили серийные разведения 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 и 1:32 и исследовали в РИД со стандартным коммерческим антигеном и анти-сывороткой производства России.

Результаты исследований и их обсуждение. В исследованиях использовали перевиваемую линию клеток почки эмбриона овцы (FLK), постоянно продуцирующую ВЛКРС. Для культивирования ее применяли питательную среду 199, Игла - MEM, ПСП и ПСС.

При культивировании клеток и накопления вируса в высоких титрах обычно используется fetalная сыворотка. В связи с высокой стоимостью ее нами для замены ее с сывороткой крови ягненка в сравнительном аспекте изучена ее ростовые свойства с сыворотками лошадей и КРС. Культуру FLK выращивали в ростовой питательной среде 199 с содержанием от 10% нормальной

сыворотки крови ягненка, 100 мкг/см³ линкомицина и 300 мг глутамина. Посевная концентрация клеток в суспензии при стационарном методе культивирования в матрасах составляла в пределах 150-300 тысяч клеток на 1 мл ростовой среды. Культуру инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 7-10 суток. Смену ростовой питательной среды на поддерживающую проводили после образования плотного монослоя через 24-48 часов. Сроки формирования монослоя FLK, титры накопления ВЛКРС приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты культивирования клеток FLK в различных видах сывороток и титры накопления вируса

№ п/п	Питательная среда	Сроки культивирования, сут.	Начало проявления ЦПД, сут.	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³
1	Среда 199 с использованием фетальной сыворотки	7-9	4	6,5
2	Среда 199 с использованием сыворотки ягнят	7-10	3-4	6,25
3	Среда 199 с использованием сыворотки лошадей	7-8	5-6	3,5
4	Среда 199 с использованием сыворотки КРС	7-10	–	–

Из данных таблицы 2 видно, что начало проявления цитопатического действия и биологическая активность с использованием сыворотки ягнят незначительно уступает питательной среде с использованием фетальной сыворотки. При использовании сыворотки лошадей наблюдается накопление вируса, но в низких титрах (3,5 lgТЦД₅₀/см³), что не выгодно и не целесообразно при наработке антигена в связи с большими потерями питательной среды и других компонентов. А при использовании сыворотки КРС наблюдается образование монослоя и развития клеток, но отсутствует проявление ЦПД, что связано с наличием в сыворотках КРС антител к вирусу лейкоза. После проведения серии исследований по выбору наиболее доступной по себестоимости и получению сыворотки нами в дальнейших исследованиях было использовано сыворотки крови ягнят.

Дальнейшими исследованиями были отработаны оптимальные параметры по продолжительности культивирования перевиваемой линии клеток FLKс использованием питательных сред Игла-МЕМ, ПСП, ПСС, содержащие 10% сыворотки ягненка, результаты их представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты определения ростовых свойств питательных сред при выращивании клеток FLK

№ п/п	Питательная среда	Сроки формирования монослоя, сут.	Начало проявления ЦПД, сут.	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³
1	Среда 199	1-2	4	6,25
2	Среда Игла-МЕМ	2-3	3-4	4,75
3	Среда ПСП	2-4	5-6	3,5
4	Среда ПСС	3-4	6	3,75

Данные таблицы 2 показывают, что использование всех питательных сред дают рост клеток и накопление вируса, но наблюдаются разные сроки формирования плотного монослоя и начала проявления ЦПД. Накопление вируса в более высоких титрах наблюдается только в среде 199. Из всех использованных питательных сред выбор был остановлен на среде 199.

После проведения серии исследований по определению наиболее доступной по себестоимости сыворотки и питательной среды наши дальнейшие исследования были направлены на отработку оптимальных параметров и продолжительности культивирования клеток FLK. Для чего ранее полученные суспензии клеток разбавляли в ростовой среде 199 и добавляли 10% сыворотки ягненка. Суспензию клеток разливали в 50, 100 и 1500 мл матрасы в объеме по 10, 20 и 180 мл соответственно и инкубировали в термостате с температурой 36,6-37°C в течение 4-10 дней со сменой среды через каждые 1 или 2 суток. Если за этот промежуток времени монослой не сформируется, то проводили повторную смену ростовой среды с 10% сывороткой на 4-5 сутки после засева клеток. Коэффициент пересева составлял 1:2-1:3. Посевная концентрация клеток 150-300 тысяч на 1 мл ростовой среды. Наблюдения за культурами проводили до момента образования

монослоя. При таком способе культивирования образование сплошного монослоя клеток происходило на 3 сутки. При просмотре матрасов под микроскопом на другой день наблюдали образование островков в результате размножения, прикрепившихся к стенке клеток FLK (рисунок 1).

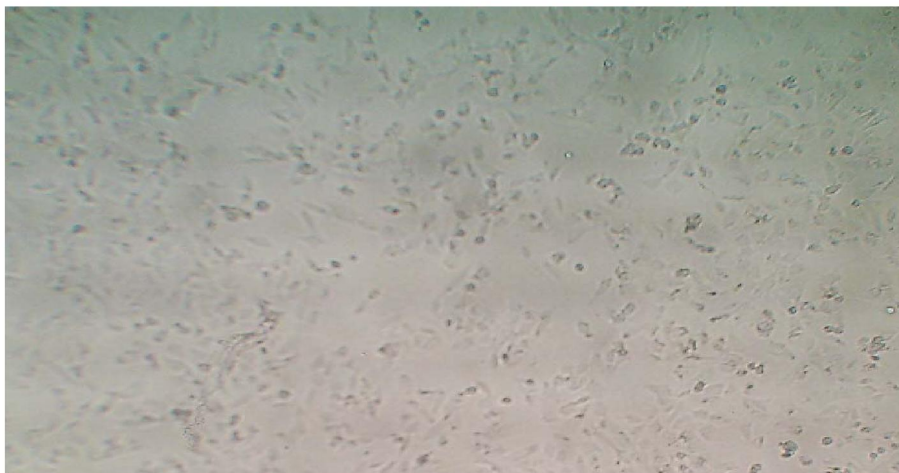


Рисунок 1 – Культура клеток FLK через 24 часа культивирования

В процессе культивирования размеры островков постепенно увеличивались, далее они сливались, образуя сплошной слой. Культура в основном состояла из фибробластоподобных клеток. Содержало центрально расположенное ядро овальной формы, в котором различали 4-6 ядрышек и имели нежно-зернистую структуру. Рост клеток начинался с прикрепления и расплывания через 4-6 часов после засева из единичных или собранных в группу клеток с большими разнообразиями в форме. С течением срока культивирования в культуре все более преобладало вытянутые клетки (фибробластоподобные) и отмечались образования монослойных пластов (рисунок 2).

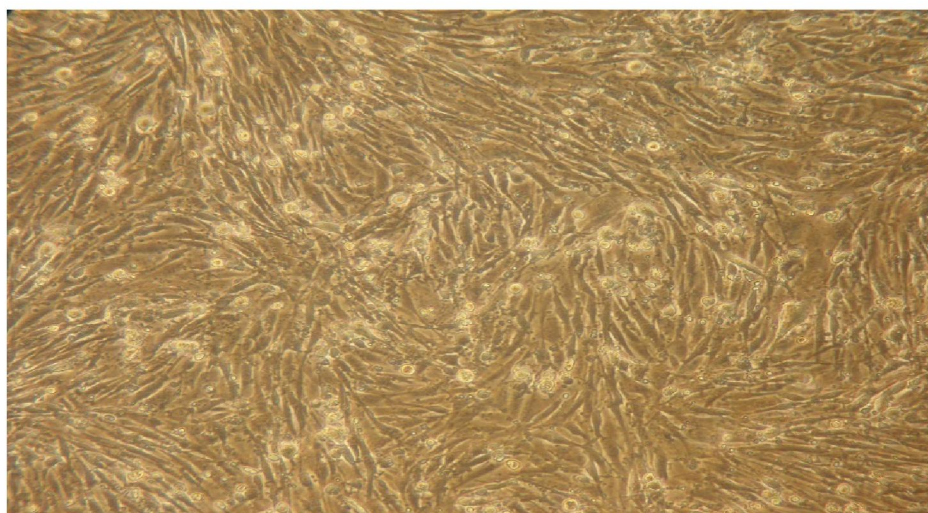


Рисунок 2 – 2-3-х суточная монослойная культура клеток FLK

К 7-8 суткам культивирования культура представляла собой очень плотный клеточный пласт, имеющий в проходящем свете типичный рисунок «зимнего окна» (рисунок 2).

К указанному сроку культивирования на поверхности клеток начинался дегенеративные изменения, проявляющаяся в отслоении от стенки стела посуды части клеточного пласта (рисунок 3). Дегенеративные изменения начинались обычно на периферии поверхности роста к 8-9 суткам культивирования. Без смены среды окончательная дегенерация и отслоения культуры происходила к 20-25 суткам.

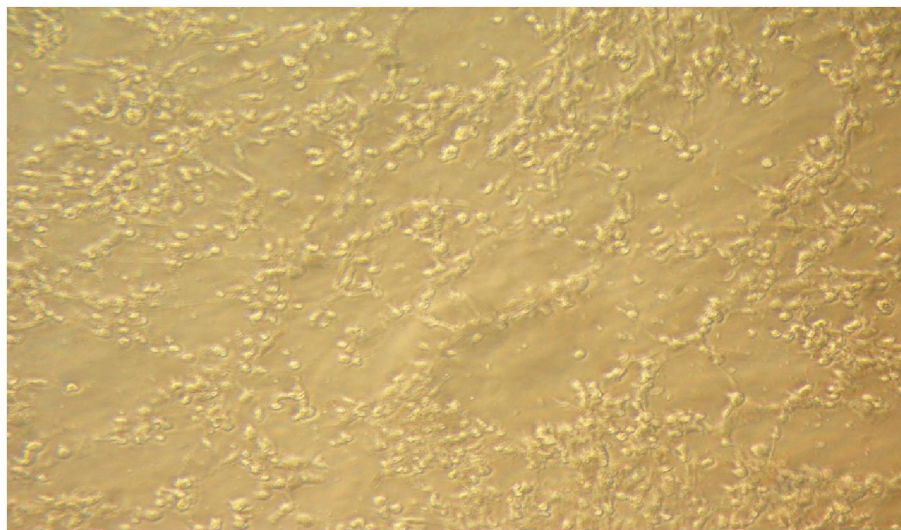


Рисунок 3 – Дегенерация монослоя клеток FLK через 7 суток культивирования

Заключение. При выращивании клеток FLK на среде 199 с заменой традиционно применяемой эмбриональной сыворотки коров на 10% сыворотки ягнят на 3-4 сутки отмечались стабильный рост и формирования плотного монослоя. Большинство клеток содержали центрально расположенное ядро овальной формы, в котором различали от 1 до 4 ядрышек. На цитологических препаратах культура клеток представляла клетками фибробластоподобного типа и небольшое количество клеток имело эпителиоподобную форму. На 6-7 сутки происходило полное разрушение клеточного пласта под цитопатогенным действием вируса. Биологическая активность в суспензии FLK клеток составляла более 6,0lg.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Yang D., Shanks R.D., Stewart J.A., Lewin N.A. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle persistent lymphocytosis // *Agricultural science*. – 1993. – Vol. 90. – P. 6538-6531.
- [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] Бусол В.А., Лиманская О.Ю., Лиманский А.П., Цымбал В.И. Тест-система для выявления ВЛКРС полимеразной цепной реакцией // *Ветеринария*. – М., 1999. – № 6. – С. 30.
- [5] Бессарабов Б.Ф., Сидорчук А.А., Воронин Е.С. и др. *Инфекционные болезни животных*. – М.: Колос, 2007. – 671 с.
- [6] Rodriguez S.M., Florins F., Gillet N., Brogniez F. et al. Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for NTLV // *Viruses*. – 2011. – Vol. 3. – P. 1210-1248.
- [7] Рузина М.Н. Анализ полиморфизма гена BOLA-DRB3 в связи с генотипической устойчивостью КРС к лейкозу и вирусоносительством. – М., 2012. – 142 с.
- [8] Дружаева Н.А. эпизоотологический мониторинг и микробиологическая безопасность продовольственной базы Северной зоны Нижнего Поволжья: Диссертация. – Саратов, 2014. – 177 с.
- [9] Гарматарова Т.В. Интерьерные показатели племенного скота в период адаптации в Западной Сибири и в связи с инфицированностью BLV: Автореф. дис. – Новосибирск, 2015. – 123 с.
- [10] Стюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. *Вирусные болезни животных*. – М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
- [11] Рачкус Ю.А. и др. Авт. свид. 4811056/13 опубл.23.12.1991, Бюл. 47.

REFERENCES

- [1] Yang D., Shanks R.D., Stewart J.A., Lewin N.A. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle persistent lymphocytosis // *Agricultural science*. 1993. Vol. 90. P. 6538-6531.
- [2] Smimov. Y.P. Effect of leukosis on dairy cows productivity // *Dairy and beef cattle*. 1999. N 4. P. 25-28.
- [3] Gulyukina M.I., Zamaraeva N.V., Sedov, V.A et al. The maintrends in the organization and conduct of activities for the prevention of leucosis // *Works VIEV*. M., 1999. Vol. 72. P. 16-22 24.
- [4] Busol V.A., Limanskaya O.Y., Limanskiy A.P., Tsymbal V.I. Test system for detection of polymerase chain reaction of bovine leucosis virus // *Veterinary Medicine*. M., 1999. N 6. P. 30.

- [5] Basarabians B.F., Sydorчук A.A., Voronin E.S., etc. Infectious diseases of animals. M.: Kolos, 2007. 671 p.
- [6] Rodriguez S.M., Florins F., Gillet N., Brogniez F. et al. Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for NTLV // Viruses. 2011. Vol. 3. P. 1210-1248.
- [7] Ruzina M.N. Analysis of gene polymorphism BOLA-DRB3 due to genotypic resistance to cattle and leucosis virus infection. M., 2012. 142 p.
- [8] Druzhaeva N.A. Ehpizootologic monitoring and microbiological safety of the food base of the North zone of the Lower Povolozhya: Dissert. Saratov, 2014. 177 p.
- [9] Garmatarova T.V. Interior indicators of breeding cattle in the period of adaptation in Western Siberia and due to infection with BLV: Author. dis. Novosibirsk, 2015. 123. p.
- [10] Syurin V.N., Samuylenko A.Y., Solovyov B.V., Fomina N.V. Viral diseases of animals. M.: VNITIBP, 1998. 928 p.
- [11] Rachkus Y.A., etc. Inventor's Certificate. 4811056/13 publ. 23.12.1991, Bul. 47.

Т. А. Иманбекова, А. Умбетова, Н. Н. Ахметсәдықов, Ж. М. Батанова, Х. Б. Абеуов

Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан,
«Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорны» ЖШС, Алматы облысы, Қазақстан

МҮЙІЗДІ ІРІ ҚАРАНЫҢ СОЗЫЛМАЛЫ ЛЕЙКОЗЫ ВИРУСЫМЕН ЖҰҚТЫРЫЛҒАН FLK ТОРШАЛАРЫНЫҢ ӨСІНДІК ҚАСИЕТТЕРІ

Аннотация. Мақалада жүргізілген зерттеу нәтижесінде FLK дамылсыз өсетін торша өсіндісінің, торша қабатының қалыптасуы және суспензиясында лейкоз вирусының жиналуының тиімді уақыты анықтау деректері берілген.

Түйін сөздер: мүйізді ірі қаралейкозының вирусы, жасуша өсіндері, моноқабат, титр, цитопатогендік әсер, дегенарация, цитологиялық препарат.