

## АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОГО ВИРУСНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Кузнецова А.Е., Ласкавый В.Н.

*ФГБНУ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт, г. Саратов, sarnivi@mail.ru*

В работе представлены результаты сравнительной оценки использования в реакции иммунодиффузии и твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа традиционных, коммерческих антигенов и разработанного нами нового вирусного антигена для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Коммерческий набор компонентов реакции иммунодиффузии содержал антигены вируса лейкоза КРС р24 и gp-51. Новый вирусный антиген был выделен нами из культуральной жидкости клеточной линии СПЭВ, контаминированной онковирусами типа С и D. Белковая фракция содержала белки с молекулярной массой 75-82 кДа. Приведены данные использования нового вирусного антигена для определения инфицированности животных вирусом лейкоза в реакции агглютинации эритроцитов. Показана перспективность использования белкового компонента, выделенного из надосадочной жидкости клеточной линии СПЭВ, контаминированной онковирусами С и D, в качестве антигена для диагностических реакций.

Ключевые слова: лейкоз крупного рогатого скота, диагностика лейкоза КРС, антигены вируса лейкоза КРС, серологические реакции, реакция агглютинации эритроцитов крови.

## DIAGNOSTIC AGGLUTINATION REACTION DEVELOPMENT OF CITRATED BLOOD FOR BOVINE LEUKOSIS

Kuznetsova A.E., Laskavy V.N.

*FSBSI «Saratov Scientific and Research Veterinary Institute», Saratov, sarnivi@mail.ru*

The comparative evaluation results of using traditional commercial antigens and newly developed viral antigen from immunodiffusion reactions and solid phase competition enzyme immunoassay for bovine leucosis diagnosis are presented in this publication. The commercial component set of immunodiffusion reaction contained BOVINE leukemia virus antigen p24 and gp-51. Viral antigen from culture liquid cell line, contaminated with oncoviruses type C and D was isolated. The protein fraction contained proteins with a molecular weight of 75-82 kDa. We present the data on using new viral antigen to determine animal infection caused by bovine leukemia virus in erythrocytes agglutination reactions. The prospect of using the protein component, selected from the cell lines contaminated with oncoviruses C and D for diagnostic antigen reactions is discussed.

Keywords: bovine leucosis, diagnostics of bovine leucosis, antigens of bovine leucosis virus, serological reactions, agglutination reaction of blood cells.

В настоящее время недостаточная эффективность серологических методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота (КРС) для выявления латентных форм болезни и отсутствие апробированных практикой средств специфической профилактики этого заболевания определяют актуальность и необходимость поиска новых средств и методов диагностики. Недостаточно изучены и не востребованы практикой низкомолекулярные белки вируса лейкоза КРС и родственных онковирусов, роль и значимость которых для диагностики, изменения морфологической картины крови и образования опухолей, не определены [1, 2, 4].

При использовании таких серологических методов диагностики лейкоза КРС, как реакция иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментный анализ (ИФА), наиболее часто выявляются протеины р24 и gp51 вируса лейкоза КРС, которые не имеют общих антигенных детерминант с мажорными внутренними белками других онковирусов животных типа С и D

[3, 8, 9]. Индикация антител к рецепторным и структурным белкам (p24 и gp51) вируса лейкоза КРС в настоящее время широко востребована практикой, однако не лишена недостатков. Применяемые способы диагностики ЭЛКРС не позволяют выявлять клинически здоровых животных-вирусоносителей, поэтому параллельно используют молекулярно – генетические методы для индикации специфического антигена, в том числе провируса лейкоза КРС. Данный подход дает возможность в процессе диагностических исследований решить проблемы как ложноположительных, так и ложноотрицательных реакций. Несмотря на разработку и серийное производство достаточно эффективных серологических и молекулярно – генетических препаратов, способных выявить инфицированных животных даже на ранних стадиях инфекционного процесса, до настоящего времени не изучены и не востребованы практикой низкомолекулярные белки, роль и значимость которых для диагностики, изменения морфологической картины крови и образования опухолей не определены.

**Цель работы** – сравнительный анализ эффективности использования в диагностических реакциях на лейкоз КРС коммерческих антигенов и нового вирусного антигена, выделенного из культуральной жидкости при культивировании СПЭВ, контаминированной онковирусами типа С и D.

**Материалы и методы.** В работе для изготовления вирусного антигена использовали *перевиваемую линию клеток (ПЛК)* – СПЭВ из коллекции ВНИИВВиМ, контаминированную онковирусами С и D, не имеющими антигенного родства с вирусом лейкоза КРС. Характеристика ПЛК представлена в таблице 1.

Посевная концентрация клеток составляла 80-100 тыс/мл, а в качестве ростовой питательной среды использовали среду 199 с 10% сыворотки крови КРС с добавлением пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Культивирование онковирусов С и D осуществляли стационарным методом в пластиковых матрасах в течение 5-6 суток при температуре  $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в анаэробных условиях.

Таблица 1

Характеристика сублинии клеток СПЭВ

| Показатели                            | Наименование культуры   |  |
|---------------------------------------|---|--|
|                                       | СПЭВ (ВНИИВВиМ)   |  |
| Источник получения                    | Московский НИИ вирусных препаратов  |  |
| Среда культивирования                 | 199-с 10% СК КРС с добавлением пенициллина 100ед/мл стрептомицина 100мкг/мл |  |
| Посевная концентрация клеток (тыс/мл) | 100±10-стационарным методом   |  |
| Сроки образования монослоя (сут.)     | 3-6   |  |
| Коэффициент рассева                   | 1:3 – 1:4   |  |
| Диспергент                            | 0,02% раствор Версена   |  |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Контаминация микоплазмами | –   |
| Морфология клеток         | Прозрачные, мелкозернистые, эпителиоподобные клетки полигональной формы |

Из надосадочной культуральной жидкости выделяли белковую фракцию, содержащую белки с молекулярной массой 75-82 кДа, которую использовали в качестве вирусного антигена. Контроль активности вируса лейкоза (ВЛ) КРС проводили постановкой реакции иммунодиффузии (РИД) и методом твердофазного конкурентного ИФА (ТК-ИФА).

Для постановки РИД в качестве исходного материала использовали культурную жидкость (КЖ) на 6 сутки культивирования вируса. Образцы КЖ для РИД концентрировали в 30 раз диализом через полупроницаемую мембрану против 50%-ного раствора ПЭГ-600. Активность концентрированных антигенов оценивали в РИД, в варианте определения титра вируса. В работе использовали также коммерческий набор компонентов РИД производства Курской биофабрики, включающий антигены ВЛ КРС (р24 и gr-51) и положительную сыворотку крови (СК), содержащую преципитирующие антитела к антигенам р24 и gr-51. Активность антигенов оценивали по последнему разведению стандартного компонента набора или полученного нами вирусного антигена, при котором происходило образование видимого преципитата с положительной СК и выражали в обратной величине разведения вируса или в  $\log^2$ . ТК-ИФА проводили с использованием тест-систем ТК-ИФА Курской биофабрики.

Новый вирусный антиген был использован также для постановки диагностической реакции на лейкоз КРС – определение инфицированности животных по способности их эритроцитов к агглютинации с вирусным антигеном. Предложенный способ диагностики ЭЛКРС включает в себя: отбор крови у; приготовление; Постановку реакции агглютинации эритроцитов (РАЭ) – 0,25-0,5% взвеси эритроцитов исследуемых КРС – с авторским вирусным антигеном проводили в серологических плашках в соотношении 5:1; инкубировали при температуре 4-8°C в течение 12-15 часов; учет результатов проводили по характеру взаимодействия взвеси эритроцитов с антигеном. Положительной реакцией считали наличие осадка в виде зонтика с неровными краями по всей поверхности лунки; отрицательной – при наличии осадка в виде пуговки или точки на дне лунки.

**Результаты и их обсуждение.** Общепринятыми критериями оценки качества диагностических тест-систем являются высокая чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов контроля тестируемых показателей. С учетом этих критериев в наших исследованиях при разработке РА для диагностики лейкоза КРС оценивались в сравнительном аспекте характер и специфичность реакции взаимодействия цитратной крови, полученной от контрольных (здоровых) и инфицированных вирусом лейкоза животных, с

антигеном, выделенным из культуральной жидкости СПЭВ, хронически инфицированной онковирусами типа С и Д.

Сравнительная оценка эффективности диагностики лейкоза КРС постановкой РАЭ с выделенным вирусным антигеном и стандартных тестов РИД, ИФА и ПЦР с кровью животных из неблагополучного хозяйства показала положительный результат во всех реакциях при обследовании 10 коров 3-х летнего возраста, инфицированных вирусом лейкоза КРС. При обследовании 10 голов клинически здоровых животных отрицательный результат был также во всех реакциях (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительная оценка результатов диагностики лейкоза КРС с использованием стандартных тестов РИД, ИФА и ПЦР и РАЭ с новым вирусным антигеном

| Исследуемая кровь КРС (группы жив-х) | Наименование реакции и характер реакции |     |     |                |
|--------------------------------------|---|-----|-----|----------------|
|                                      | РИД                                     | ИФА | ПЦР | РА с антигеном |
| Группа 1 – инфицированные (10 голов) | +                                       | +   | +   | +              |
| Группа 2 – здоровые (10 голов)       | -                                       | -   | -   | -              |

Данные исследований показали, что использование авторского вирусного антигена позволяет эффективно выявлять инфицированных животных при полном совпадении с результатами всех общепринятых методов. Учитывая известную роль онкогенных вирусов в патологии человека и животных, представленные нами данные рекомендуются для стандартизации производства активных диагностических антигенов, значимость и состав которых окончательно не определены, но они могут быть востребованы для разработки иммунобиологических препаратов (ИБП).

**Заключение.** Впервые предложен для диагностики лейкоза КРС антиген, выделенный из культуральной жидкости, полученной при культивировании СПЭВ, контаминированной онковирусами типа С и Д. Впервые разработан метод определения инфицированности животных вирусом лейкоза КРС постановкой реакции агглютинации эритроцитов цитратной крови исследуемых животных с белковым компонентом, выделенным из надосадочной жидкости клеточной линии СПЭВ, контаминированной онкорновирусами С и Д, в качестве антигена по агглютинирующей способности эритроцитов цитратной крови с выделенным антигеном ВЛ КРС.

Приоритет и новизна научных разработок защищены патентом РФ № 2452955 «Способ оценки устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу» и заявкой на патент №2014 141 177

от 13.10.2014 «Средство для диагностики лейкоза крупного рогатого скота и способ его применения».

### Список литературы

1. Апалькин В.А., Гулюкин М.И., Петров Н.И. Лейкоз КРС. – СПб.: Петролайзер, 2005. 105 с.
2. Бессарабов Б.Ф., Вашутин А.А., Воронин Е.С. и др. Инфекционные болезни животных / Под ред. А.А. Сидорчук. М.: КолосС, 2007. 671с.
3. Джапаралиев Н.Т. Молекулярно-биологические методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота: Дисс. канд. вет. наук. – Владимир. 2002. 146 с.
4. Дуглас Р. Лоуи. Трансформация и онкогенез: Ретровирусы. В кн.: Вирусология / Под ред. Б. Филдса, Д. Найна. – М.: Мир, 1989. Т.1. С. 433-475.
5. Заявка 2014 141 177, РФ, МКИ G01N33/49, A61D99/00 Ласкавый В.Н., Кузнецова А.Е., Козлов С.А./ Средство для диагностики лейкоза крупного рогатого скота и способ его применения. Приоритет от 13.10.2014.
6. Ласкавый В.Н., Малинин М.Л., Кузнецова А.Е., Шibaева М.А., Караблин П.М. Способ оценки устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу. Патент РФ на изобретение № 2452955, дата подачи 03.06.2011, опуб. 10.06.2012, бюл. №16.
7. Малинин М.Л., Кузнецова А.Е., Шibaева М.А. и др. Зависимость восприимчивости крупного рогатого скота к лейкозу от биохимических показателей крови //Фундаментальные исследования. 2013. №10. Вып.8. С. 132-136.
8. Прохватилова Л.Б., Колосов С.Н., Ломакин А.И. и др. Применение ПЦР для раннего обнаружения провируса лейкоза крупного рогатого скота у экспериментально инфицированных животных. // Ветеринария. 2001. №8. С. 17-21.
9. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Под ред. Д.К. Львова. – М.: ООО Издательство «Медицинское информационное агентство», 2013. С. 870-871.
10. Miller J.M., Olson C. Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. // J. Nat. Cancer. Inst. 1972. Vol. 49, №5. P.1459-1462.

### Рецензенты:

Карпунина Л.В., д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», г. Саратов;

Тихомирова Е.И., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой экологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», г. Саратов.