

УДК 616.155.392:616.9:57.086.835:636.2

НОВЫЙ АНТИГЕН ДЛЯ НОВОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НА ЛЕЙКОЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2016 В.Н. Ласкавый, А.Е. Кузнецова, Е.И. Тихомирова

«Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт

Статья поступила в редакцию 19.11.2016

В работе представлено описание получения нового комплексного антигена из белков надосадочной жидкости линии клеток СПЭВ, контаминированной онкорнавирусами типа С и D, для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Описаны параметры постановки разработанной авторами реакции взаимодействия (агглютинации) эритроцитов цитратной крови животных с выделенным комплексным антигеном. Новый метод диагностики лейкоза позволяет эффективно, быстро и с минимальными затратами выявлять инфицированных животных.

Ключевые слова: лейкоз КРС, диагностическая реакция, антиген, культура клеток, эритроциты

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) по морфологическим признакам классифицирован как онкорнавирус типа С млекопитающих. Вирионы ВЛКРС содержат в своем составе 60% протеинов, 2,2% нуклеиновых кислот, 0,5% углеводов и 35% липидов. Электрофоретический анализ очищенных вирионов ВЛКРС показывает наличие в их составе 6 основных белков с молекулярной массой (М.м.) от 10 до 51 кД (p10, p12, p15, p24, gp30 и gp51) [1-4]. Индикация антител к рецепторным и структурным белкам (p24 и gp51) ВЛКРС широко востребована практикой. В тоже время эти протеины не имеют общих антигенных детерминант с мажорными внутренними белками других онкорнавирусов животных типа С и D. Известно также, что адгезия этих белковых антигенов с эритроцитами оказывается довольно нестабильной. Именно в этом заключается причина не использования классической РГА для диагностики лейкоза КРС [5-8].

Серологические методы диагностики лейкоза КРС (РИД, ИФА) не обеспечивают в отдельных случаях достоверной постановки диагноза, 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 [9-10]. 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 пептиды с М.м. ниже 24 кД, либо выше 51 кД. Не изучена их роль и значимость для диагностики лейкоза КРС. Возможно, что пептиды с М.м. выше 51 кД сорбируются на эритроцитах более стабильно и более интенсивно, и будут наиболее перспективными для диагностики лейкоза КРС в реакции взаимодействия (агглютинации) с эритроцитами крови больного животного.

Цель работы: получить новый комплексный антиген из белков надосадочной жидкости линии клеток СПЭВ, контаминированной онкорнавирусами типа С и D, и изучить возможность его использования для диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Материалы и методы. В работе использовали линию клеток СПЭВ, контаминированную онкорнавирусами типа С и D, не имеющими антигенного родства с вирусом лейкоза КРС. Посевная концентрация клеток (ПКК) составляла 80-100 тыс./мл, а в качестве ростовой питательной среды (РПС) использовали среду 199 с 10% сыворотки крови (СК) КРС с добавлением пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Культивирование осуществляли стационарным методом в пластиковых матрасах в течение 5-6 суток при температуре $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в анаэробных условиях. Содержимое культуральных сосудов однократно замораживали при температуре $(-20-30)^\circ\text{C}$ и оттаивали при 37°C , затем осветляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин. Из надосадка выделяли белковую фракцию в фосфатно-солевом буферном растворе. Концентрацию белка определяли методом Лоури на биохимическом анализаторе StatFax 3300. Для определения молекулярной массы полученного белка проводили жидкостную

Ласкавый Владислав Николаевич, доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник отдела бактериальных, вирусных и микологических инфекций. E-mail: sarvlad47@yandex.ru

Кузнецова Анна Евгеньевна, научный сотрудник отдела бактериальных, вирусных и микологических инфекций. E-mail: shirokova-7575@mail.ru

Тихомирова Елена Ивановна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела бактериальных, вирусных и микологических инфекций. E-mail: tichomirova_ei@mail.ru.

хроматографию высокого давления (ЖХВД), на жидкостном хроматографе «Стайер», с использованием спектрофотометрического детектора А214 (длина волны 214 нм).

В работе было использовано 120 голов КРС, в том числе 100 голов для отработки способа диагностики лейкоза, 20 голов (из них 10 интактных и 10 инфицированных вирусом лейкоза) – для сравнительной оценки эффективности разработанного способа диагностики с общепринятыми методами (РИД, ИФА, ПЦР). Забор крови КРС проводили по общепринятой методике в объеме 5 мл от одного животного в пробирки со стабилизатором – лимоннокислым натрием. Из цитратной крови готовили 0,25–0,5% взвесь эритроцитов на физиологическом растворе для постановки диагностических реакций. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по общепринятым методикам (Лакин, 1973). Расчёт результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0 (for Windows), результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. Механизмы персистенции и накопления онковирусов в перевиваемых линиях клеток изучены недостаточно. Известно, что активные формы кислорода эффективно уничтожают вирусы и онкоклетки. В ходе исследования установлено, что при соотношении питательной среды и воздушной фазы 1:10 (аэробные условия) на седьмые сутки культивирования отмечаются явления дегенерации монослоя и закисления питательной среды. При соотношении жидкой и газовой фаз 5:2, монослой тест-культуры был компактным и многослойным, питательная среда оставалась нейтральной, в ядрах ТК отмечали увеличение количества ядрышек, что указывает на активизацию метаболических процессов.

Для отработки технологии выделения антигена исходную культуру клеток СПЭВ, загрязненную онкорнавирусами типа С и D, засеивали на ростовую питательную среду в пластиковые матрасы и культивировали при 37°C в течение 3–4 суток до формирования монослоя. Затем ростовую среду сливали и добавляли раствор Версена с трипсином для максимального снятия клеток монослоя посредством встряхивания. Через 3–5 минут раствор сливали и добавляли снова ростовую питательную среду, при этом доводили количество клеток в 1 мл среды до 100–120 тысяч. Далее клетки СПЭВ, загрязненные онкорнавирусами типа С и D, культивировали в пробирках Флоренского при 37°C в течение 3–4 суток до формирования монослоя в анаэробных условиях, при соотношении жидкой и газовой фаз 5:2. После этого ростовую среду меняли на поддерживающую среду и снова помещали пробирки в термостат при 37°C. Через 16–18 часов отбирали

пробирки, в которых произошло разрушение монослоя, однократно замораживали их и оттаивали. В результате получали взвесь из оттаявших разрушенных клеток СПЭВ, загрязненных онкорнавирусами типа С и D.

Для исключения артефактов по неспецифическому разрушению монослоя клеток и накопления большего объема взвеси для получения диагностического средства, полученную суспензию из оттаявших разрушенных клеток СПЭВ вносили в следующую партию пробирок с монослоем и поддерживающей средой, выращенных в аналогично условиях, из расчета 20% суспензии и 80% поддерживающей среды с монослоем. Процедуру повторяли несколько раз до появления 90% количества разрушенных клеток в одной партии пробирок.

Чистота антигена на этапе предварительной подготовки является чрезвычайно важным фактором, поскольку возможные примеси могут конкурировать за адгезивные участки эритроцитов, особенно в течение первых 2-х часов. Поэтому для очистки взвесь клеток с разрушенным монослоем замораживали и оттаивали 2–3 раза, центрифугировали в течение 30 минут со скоростью 3000 об/мин., отбирали надосадочную жидкость и выделяли из нее белковую фракцию. Для этого надосадочную жидкость осаждали солевым раствором сульфата аммония в количестве 60% от насыщения, центрифугировали при 4500 об/мин, в течение 20 мин, удаляли надосадок, а осадок вновь растворяли в минимальном объеме 0,01М фосфатно-солевого буферного раствора при pH 7,4. Для концентрации белка раствор диализовали при помощи диализной мембраны с диаметром пор 3500 Да в 0,01 М растворе фосфатно-солевого буфера при pH 7,4 в течение 24 часов. После чего определяли концентрацию белка методом Лоури. Во всех повторностях исследований концентрация белка была в пределах от 4,9 мг/мл до 5,2 мг/мл. Эту выделенную белковую фракцию использовали в дальнейших исследованиях качестве нового антигена.

Исследование белкового состава КЖ ТК клеток СПЭВ, загрязненной онкорнавирусами типа С и D методом ЖХВД, является одним из общепринятых методов для оценки структурных компонентов исследуемого материала и их количества. Указанный метод дает дополнительную информацию о присутствии в исследуемом материале балластных и специфических белков, и поэтому является качественным критерием оценки чистоты исследуемых препаратов. Метод является высоко-воспроизводимым и удобным для работы с небольшим количеством антигена.

Определение молекулярной массы анализируемого образца препарата КЖ розового цвета, проводили на жидкостном хроматографе «Стайер»; для разделения использовали колонку

BioSep-SEC-S 2000 5 мкм 145A, 300x7,8 мм. В качестве элюента применяли 0,01M фосфатно-солевой буфер, скорость потока составляла 1 мл в минуту. В качестве стандартов использовали бычий сывороточный альбумин с молекулярной массой 64-70 кДа, лактоферрин с молекулярной массой 75-80 кДа и папаин с молекулярной массой 20 кДа. Результаты исследования белкового состава культуральной жидкости представлены в табл. 1. Установлено, что основные белки (пики 1 и 2) имели молекулярную массу от 75 до 82 кДа и составляли 93% от всей массы входящих в надосадочную жидкость белков (табл. 1).

Таким образом, нами была разработана

технология выделения нового антигена для диагностики лейкоза КРС и усовершенствованы методы контроля его качества. При выделении и стандартизации антигена нами были определены оптимальные условия культивирования клеток СПЭВ и накопления целевого продукта – антигена из белковых компонентов культуры клеток СПЭВ, контаминированной онкорнавирусами типа С и D, при строгом соблюдении оптимальных условий анаэробного культивирования, которые положительно сказываются на пролиферативной активности и сохранности монослоя клеток.

Таблица 1. Белковый состав культуральной жидкости клеток СПЭВ, контаминированной онкорнавирусами типа С и D методом жидкостной хроматографии высокого давления

Время, мин	Высота, mAU	Площадь, mAU*сек	Отношение каждого пика к общей площади пиков, А, %	Молекулярная масса пиков
11,36	58,44	5029,95	93,18	75-82 кДа
16,04	- 0,03	- 0,02	0,00	15-20 кДа
21,44	4,38	367,99	6,82	10 кДа и менее

Общепринятыми критериями оценки качества диагностических тест-систем (ТС) являются высокая чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов контроля тестируемых показателей. Нами были проанализированы имеющиеся в литературе данные о средствах для диагностики лейкоза КРС и способах диагностики заболевания с использованием этих средств. С учетом основных недостатков имеющихся методов, а также факта принадлежности вируса лейкоза к онковирусам типа С, оценивали возможность и перспективность использования нового антигена, полученного при культивировании линии клеток СПЭВ, контаминированной онкорнавирусами типа С и D, для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции гемагглютинации.

При разработке способа диагностики учитывали тот факт, что не были известны способы диагностики лейкоза КРС, основанные на агглютинирующей способности взаимодействия двух компонентов: водорастворимого белкового компонента из клеточной линии СПЭВ, контаминированной онкорнавирусами С и D, (а не эритроцитарного диагностикума, как это общепринято в постановке реакции агглютинации) и определенной концентрации взвеси эритроцитов цитратной крови инфицированного ВЛКРС животного. При разработке варианта реакции гемагглютинации (РГА) для диагностики лейкоза КРС оценивали в сравнительном аспекте характер и

специфичность реакции взаимодействия неотмытых (НЭ) и 3-кратно отмытых эритроцитов (ОЭ), полученных от интактных и инфицированных животных с комплексным антигеном, выделенным из культуральной жидкости (КЖ) тест-культуры (ТК) клеток СПЭВ, контаминированных онкорнавирусами типа С и D.

Технология изготовления и методы контроля качества рабочих суспензий эритроцитов были нами усовершенствованы. При разработке ТС для диагностики лейкоза КРС были отобраны гомологичные эритроциты, которые наиболее активно и прочно агглютинируются вирусом ВЛКРС. Технология получения суспензии эритроцитов осуществлялась в соответствии с общепринятыми методами. В тоже время строгое соблюдение условий забора крови, получения плазмы, трехкратно отмытых (ОЭ) и неотмытых (НЭ) эритроцитов и соблюдение режимов центрифугирования и хранения обеспечили в итоге стандартность производства рабочих суспензий эритроцитов с заданной концентрацией.

Постановку реакции осуществляли на специальных планшетах с лунками. Ряды лунок заполняли 0,25-0,5% взвесями эритроцитов цитратной крови. Одни из рядов лунок с разными концентрациями взвесей эритроцитов цитратной крови заполняли физ.раствором в каждой лунке (контроль), а в другие ряды с теми же разными концентрациями взвесей добавляли полученный новый комплексный антиген в том же

количестве, как и физ.раствор. При этом, соотношение антигена к взвеси (а также физ.раствора к взвеси) было 1: 4-6. Выдерживали планшеты при температуре 4-8°C в течение 12-15 часов, после чего производили учет реакции. За положительный результат реакции принимали наличие осадка в виде зонтика с неровными краями по всей поверхности лунки. За отрицательный результат реакции принимали наличие осадка в виде пуговки или точки на дне лунки. Специфичность РГА оценивали по результатам адгезии нового комплексного антигена на рецепторах эритроцитов мукополипротеидной природы и выпадению осадка на дно лунок пластиковой панели в виде зонтика с неровными краями.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что наиболее выраженная РГА была при использовании рабочей суспензии неотмытых эритроцитов в 0,5% концентрации, полученных от инфицированного КРС, и выдерживании смеси в течение 12–15 часов при температуре 4-8°C. В тоже время в аналогичных условиях результаты взаимодействия эритроцитов рабочих (0,12 и 0,25%) суспензий отмытых и неотмытых клеток с новым комплексным были отрицательными или слабо выраженными. Необходимо отметить, что проведение РГА с использованием антигена из «Диагностического набора» (СТО 00482900-0019-2006) не дает положительных результатов ни с ОЭ, ни с НЭ плазмы, полученных от инфицированных животных, что свидетельствует об антигенных различиях и специфичности нового комплексного антигена и антигена, производимого «Курской биофабрикой». Таким образом, полученные результаты РГА с неотмытыми и отрицательная реакция с отмытыми эритроцитами рабочих суспензий свидетельствуют о наличии на рецепторах клеточных элементов плазмы крови специфических белков, положительно реагирующих только с новым комплексным антигеном.

На следующем этапе работы оценивали результативность диагностики лейкоза КРС в зависимости от температурного режима проведения РГА. Показано, что положительный результат на инфицированность животного лейкозом КРС в РГА был получен только в одном случае – при использовании не отмытых эритроцитов (в концентрации 0,5%), изготовленных из крови инфицированной телки, и нового комплексного антигена, через 12-15ч выдерживания смеси при температуре 4-8°C. В остальных случаях результаты диагностики лейкоза КРС в реакции РГА были отрицательными или слабо выраженными. Достоверность результатов в РГА была подтверждена положительными результатами контроля СК исследуемого животного в РИД (+) и антигена лейкоза КРС в ПЦР (+).

Концентрация взвеси эритроцитов цитратной крови (0,25-0,5%), соотношение вводимого средства к цитратной крови (1:4-6), а также температурный режим (4-8°C), при котором выдерживали смесь в течение 12-15 часов, были подобраны экспериментальным путем. Так, при концентрации ниже 0,25% и количестве средства для диагностики менее одной части реакция с цитратной кровью практически отсутствовала, а при концентрации выше 0,5% и количестве средства более одной части реакции были не выражены, трудно учитывались. Температурный режим, при котором происходило взаимодействие антигена с взвесями эритроцитов цитратной крови, подбирался также экспериментально. Было апробировано 3 режима: при комнатной температуре (22°C), при 37°C и 4-8°C. При комнатной температуре и при 37°C реакции были плохо выражены, трудно учитывались.

Дополнительно были проведены эксперименты, аналогично описанным, с отмытыми эритроцитами, приготовленными общепринятым методом из цитратной крови животных. Было исследовано также 50 проб. Положительных результатов при использовании отмытых эритроцитов получено не было. Все результаты были отрицательными и не совпадали с общеизвестными методами. Таким образом, доказана возможность и специфичность предложенной РГА для диагностики лейкоза КРС у индивидуального животного при строго регламентированных показателях качества исходных ингредиентов - НЭ плазмы в 0,5% концентрации, нового комплексного антигена (полученного из надосадочной жидкости ТК клеток СПЭВ, контаминированных онкорнавирусами типа С и D) и оптимальных условий проведения реакции при температуре 4 - 8°C в течение 12 – 15 часов.

Далее была произведена сравнительная оценка эффективности разработанного способа диагностики лейкоза крупного рогатого скота и тестов РИД, ИФА и ПЦР при диагностике лейкоза КРС. Исследования проводили в одном из неблагополучных хозяйств на коровах 3-х летнего возраста. В эксперименты были отобраны 10 коров, инфицированных вирусом лейкоза КРС, которые одновременно реагировали положительно в РИД, ИФА и ПЦР, и 10 голов животных, не реагирующих одновременно ни в одной из указанных реакций. Все исследования были выполнены в двукратной повторности с целью подтверждения совпадения результатов исследования и выявления возможных ошибок. Полученные результаты представлены в табл. 2. Показано, что разработанный метод диагностики лейкоза позволяет эффективно выявлять инфицированных животных, и совпадает с результатами всех общепринятых методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота, что доказывает его специфичность.

Таблица 2. Сравнительная оценка эффективности разработанного способа диагностики лейкоза крупного рогатого скота и тестов РИД, ИФА и ПЦР

Группы исследуемых животных	Наименование реакции и характер реакции			
	РИД	ИФА	ПЦР	заявляемый способ
группа 1 (10 голов)	+	+	+	+
группа 2 (10 голов)	-	-	-	-

Выводы: нами был получен новый комплексный антиген из белковых компонентов культуры клеток СПЭВ, контаминированной онкорнавирусами типа С и D, для диагностики лейкоза КРС. Учитывая известную роль онкогенных вирусов в патологии человека и животных, представленные нами данные об оптимальных условиях культивирования и накопления белкового компонента в линии клеток СПЭВ, рекомендуются для стандартизации производства активных диагностических антигенов, значимость и состав которых окончательно не определены, но они могут быть востребованы для разработки иммунобиологических препаратов.

Впервые разработан метод определения инфицированности животных вирусом лейкоза КРС по агглютинирующей способности эритроцитов цитратной крови животных с выделенным комплексным антигеном из белковых компонентов культуры клеток СПЭВ, контаминированной онкорнавирусами типа С и D. Данный метод позволяет быстро и с минимальными затратами проводить диагностику лейкоза КРС при сохранении эффективности диагностических исследований. Приоритет и новизна научных разработок защищены патентом РФ № 2560684 «Средство для диагностики лейкоза крупного рогатого скота и способ его применения». Подана заявка на выдачу евразийского патента на изобретение №201500615 от 07.07.2015 г. «Средство для диагностики лейкоза крупного рогатого скота и способ его применения».

Работа выполнена в рамках «Плана фундаментальных и приоритетных прикладных исследований Россельхозакадемии по научному обеспечению развития АПК Российской Федерации на 2011 – 2015 годы» при выполнении этапа НИР: «Разработать новые и усовершенствовать существующие средства и методы борьбы с массовыми инфекционными болезнями молодняка животных на основе изучения их этиологической структуры, факторов патогенности возбудителей, закономерностей формирования иммунитета». Результаты исследований были использованы при выполнении НИР «Мониторинг эпизоотической ситуации по заболеванию лейкозом крупного рогатого скота и разработка научно-обоснованной эффективной системы профилактических и оздоровительных мероприятий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Абакин, С.С. Современный взгляд на особенности прижизненной диагностики и иммуногенез у телят в системе мать-потомство при лейкозе крупного рогатого скота / С.С. Абакин, С.В. Криворучко, Д.Г. Пономаренко, Е.А. Борщев // Ветеринарная патология. 2010. № 1. С. 6-9.
2. Агольцов, В.А. Сравнительная диагностическая оценка серологического и молекулярно-генетического методов лабораторных исследований на лейкоз крупного рогатого скота / В.А. Агольцов, Е.С. Красникова, А.А. Щербаков и др. // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2012. № 4(90). С. 56-59.
3. Апалькин, В.А. Лейкоз крупного рогатого скота / В.А. Апалькин, М.И. Гулюкин, Н.И. Петров. – СПб: Петролазер, 2005. 106 с.
4. Бессарабов, Б.Ф. Лейкоз крупного рогатого скота / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вахутин, Е.С. Воронин // В кн. Инфекционные болезни животных. – М.: КолосС, 2007. С. 311-317.
5. Галеев, Р.Ф. Лейкоз крупного рогатого скота / Р.Ф. Галеев, Р.Ф. Хусаинов. – Уфа: Изд-во «Новый стиль», 2009. 220 с.
6. Гулюкин, М.И. Аналитический обзор эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в российской Федерации (1996-2010) / М.И. Гулюкин, Г.А. Симонян и др. – М.: ВИЭВ, 2011. 46 с.
7. Донник, И.М. Определение динамики распространённости лейкоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации // Аграрный вестник Урала. 2013. №1(107). С. 25-27.
8. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Т. 2. – Минск: Беларусь, 2000. 463 с.
9. Красникова, Е.С. Биологическая безопасность продукции животных, инфицированных вирусами энзоотического лейкоза и иммунодефицита КРС / Е.С. Красникова, О.С. Ларионова // Вестник ветеринарии. 2014. № 69 (2/2014). С. 85-87.
10. Лакин, Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
11. Ласкавый, В.Н. Способ оценки устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу / В.Н. Ласкавый, М.Л. Калинин, А.Е. Кузнецова и др. – Патент РФ на изобретение № 2452955, опуб. 10.06.2012, бюл. №16.
12. Левашев, А.Т. Лейкоз крупного рогатого скота: Рекомендации / А.С. Левашев, В.В. Смирнова, А.В. Киселёв // Россельхозакадемия. Сиб.отд. НПЦ «Сибонковец». – Новосибирск, 1991. 15 с.
13. Калинин, М.Л. Зависимость восприимчивости крупного рогатого скота к лейкозу от биохимических показателей крови / М.Л. Калинин, А.Е. Кузнецова, М.А. Шибеева и др. // Фундаментальные исследования. 2013. Вып. 8, №10. С. 132-136.
14. Незавитин, А.Г. Наследственная обусловленность устойчивости к инфекции ВЛКРС, лейкозу и влияние некоторых экологических факторов на интерьерные показатели крупного рогатого скота: автореф. дис... д.б.н. – Новосибирск, 1995. 43 с.
15. Семенов, М.П. Оценка биохимических, гематологических и иммунологических показателей у инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота больных лейкозом и интактных

- коров/ М.П. Семененко, Н.Ю. Басова, Е.В. Кузьмина // Ветеринария Кубани. 2011. № 2. С.22-23.
16. Смирнов, Ю.П. Способ оценки резистентности для прогнозирования развития лейкоза крупного рогатого скота: пат. 2285260 Рос. Федерация: МПК G01N33/49 / Ю.П. Смирнов, И.Л. Суворова; патентообладатель Государственное научное учреждение Научно-исследовательский ветеринарный институт Нечерноземной зоны РФ Российской академии сельскохозяйственных наук. – №2005110728; заявл.12.04.2005; опуб. 10.10.2006.

NEW ANTI-GENE FOR NEW DIAGNOSTIC REACTION TO THE BOVINE LEUKOSIS

© 2016 V.N. Laskaviy, A.E. Kuznetsova, E.I. Tikhomirova

Saratov Scientific Research Veterinary Institute

This work describes the obtaining of a new complex anti-gen from proteins of supernatant liquid of line PK cells, contaminated by oncornaviruses tipe C and D, for the diagnosis of bovine leukosis. It is described parameters of setting developed by the authors coupling reaction (agglutination) citrate red blood cells of animals with isolated complex anti-gen. New method of leukemia diagnosis allows efficiently, quickly and cost-effectively identify infected animals.

Key words: *bovine leukosis, diagnostic reaction, anti-gen, cell line, erythrocytes*

Vladislav Laskaviy, Doctor of Veterinary, Main Research Fellow at the Laboratory of Bacterial, Viral and Mycology Infections. E-mail: sarvlad47@vk.ru
 Anna Kuznetsova, Research Fellow Research Fellow at the Laboratory of Bacterial, Viral and Mycology Infections. E-mail: shirokova-7575@mail.ru
 Elena Tikhomirova, Doctor of Biology, Professor, Leading Research Fellow Research Fellow at the Laboratory of Bacterial, Viral and Mycology Infections. E-mail: tikhomirova_ei@mail.ru.