

Використання діагностичного імунохроматографічного експрес-тесту “Епіскрін АВ Лейкоз” для моніторингу лейкозу великої рогатої худоби.

*Ю.В. Бреус, здобувач, Д.Л. Мартиненко, докторант
С.Д. Мельничук, доктор біологічних наук, В.Г. Спиридонов, доктор
сільськогосподарських наук, Д.Ю. Рибальченко,
Я.В.Хоменко, аспіранти.*

Встановлено, що розроблений діагностичний імунохроматографічний експрес-тест “Епіскрін АВ Лейкоз” за показниками специфічності та чутливості не поступається працюючій нині тест-системі “ІФА лейкоз – Ав”. Проведено порівняльне вивчення результатів дослідження панелі цільної крові та молока в двох діагностичних системах.

Ключові слова: імуноферментний аналіз, імунохроматографічний аналіз, вірус лейкозу, рекомбінантні білки, антитіла.

Лейкоз великої рогатої худоби — інфекційна, хронічна хвороба пухлинної природи, яка характеризується злякисним розмноженням клітин кровотворних органів з порушенням їх дозрівання, що зумовлює дифузну інфільтрацію різних органів і тканин та утворення в них злякисних пухлин. Особливістю цього захворювання є його тривалий перебіг без клінічного прояву [3].

Це захворювання зареєстроване на всіх континентах у десятках країн світу і призводить до значних економічних збитків, оскільки у хворих тварин різко знижується продуктивність і в подальшому до їх загибелі.

Збудником лейкозу великої рогатої худоби є онкогенний РНК - вірус родини ретровірусів, який має близьку генетичну й антигенну спорідненість з вірусом Т-клітинного лейкозу людини типів 1 і 2 та Т-клітинного лейкозу мавп [2].

Основним методом прижиттєвої діагностики лейкозу є реакція імунодифузії (далі - РІД) та імуноферментний аналіз (далі - ІФА). Крім того, ІФА застосовують для дослідження збірних проб молока від груп корів у благополучних стадах [6].

Науковий керівник - доктор ветеринарних наук, професор В.Г.Скибіцький.

Для дослідження особливо цінних тварин та для арбітражних висновків застосовується полімеразно-ланцюгова реакція [1].

Метою роботи була розробка діагностичного експрес-тесту для виявлення в плазмі, сироватці крові та молоці специфічних щодо вірусу лейкозу антитіл.

Матеріали та методи дослідження. Робота виконана на базі УЛЯБП АПК протягом травня 2012р. Досліджено зразки крові (стабілізована ЕДТА) та молока відібрані від 14 голів великої рогатої худоби 4-5 річного віку, що належали господарству «Зоря» Козятинського району, Вінницької області.

Для конструювання імунохроматографічного аналізу (далі - ІХА) експрес-тесту використали скловолокно, адсорбуючу мембрану, адгезивну карту фірми Kinbio Tech. Co.,Ltd (Китай) та нітроцелюлозну мембрану Millipore 135 (США). Для тестової лінії застосовували рекомбінантний антиген вірусу лейкозу р24 в концентрації 1 мг/мл, як контрольна лінія були імуноглобуліни класу G великої рогатої худоби в концентрація 1 мг/мл. Лінії наносили спеціальним приладом у кількості 1мкл/см між тестовою та контрольною лінією на відстані 0,5см. Як детектуючу речовину використали кон'югат колоїдного золота з білком G та рекомбінантним антигеном р 24 [4]. Конюгат у кількості 5мкл/см наносили на скловолоконну мембрану за допомогою аерографа. Після конструювання картку нарізали за допомогою спеціального приладу на тест-смужки розміром 0,4см. Зразки крові та молока розводили буфером (1x PBS, що містить 2% BSA та 2% твіну) у співвідношенні 1:1, тест-смужку занурювали в досліджуванний зразок і вже за 10 хв одержували візуальні результати, які зчитували за допомогою програмного забезпечення «Скан – агент».

Паралельно досліджували зразки крові та молока в комерційному діагностичному наборі “ІФА лейкоз – Ab”,(виробник «Укрзооветпромстач») згідно з інструкціями виробника.

Результати досліджень. Із 14 досліджених за допомогою ІФА зразків крові 12, а молока від цих самих тварин 9 виявились позитивними (таблиця).

**Результати виявлення специфічних щодо лейкозу антитіл у крові та
молоці корів за допомогою тест системи “ІФА лейкоз – Ab”**

Інвентарний номер корови	Зразок	ОГ (450нм відносно 620 нм)	Результат
6848	Кров	0.079	Негативний
	Молоко	0.016	Негативний
2902	Кров	0.259	Позитивний
	Молоко	0.054	Негативний
1910	Кров	3.260	Позитивний
	Молоко	2.973	Позитивний
1967	Кров	3.180	Позитивний
	Молоко	3.191	Позитивний
1709	Кров	1.590	Позитивний
	Молоко	0.235	Позитивний
3610	Кров	0.610	Позитивний
	Молоко	0.030	Негативний
2136	Кров	1.819	Позитивний
	Молоко	0.150	Негативний
1838	Кров	3.109	Позитивний
	Молоко	3.170	Позитивний
1774	Кров	3.227	Позитивний
	Молоко	1.398	Позитивний
2145	Кров	0.100	Негативний
	Молоко	0.038	Негативний
1748	Кров	3.244	Позитивний
	Молоко	1.219	Позитивний
7969	Кров	3.167	Позитивний
	Молоко	0.606	Позитивний
1692	Кров	3.235	Позитивний
	Молоко	3.139	Позитивний
2848	Кров	3.175	Позитивний
	Молоко	1.511	Позитивний

Результати діагностичного дослідження цих самих зразків крові і молока великої рогатої худоби для виявлення антитіл на лейкоз за допомогою ІХА тесту не відрізнялись від результатів в ІФА, що свідчить про високу чутливість та специфічність розробленого ІХА експрес-тесту «Епіскрін АВ Лейкоз»

Вигляд використаних експрес-тестів показаний на рисунку.



Діагностика лейкозу великої рогатої худоби за допомогою експрес-тесту
«Епіскрін АВ Лейкоз»

За позитивного результату «+» на тест-смужці з'явилися дві лінії рожево-червоного кольору, за негативного «-» на тест-смужці є лише одна (контрольна) лінія рожево-червоного кольору.

Висновки

1. Розроблено імунохроматографічний експрес-тест «Епіскрін АВ Лейкоз» чутливий та специфічний.
2. При дослідженні зразків крові та молока на лейкоз великої рогатої худобин в тест системі «ІФА лейкоз – Ab» та «Епіскрін АВ Лейкоз» результати не відрізнялись.
3. Експрес-тест «Епіскрін АВ Лейкоз» дуже зручний та простий у використанні - постановку реакції може здійснювати навіть не фахівець.
4. Перевагою запропонованого тесту є те, що він дозволяє проводити діагностику безпосередньо в господарстві в присутності тварини, що суттєво спрощує процедуру епізоотичного контролю та прискорює одержання результатів. Завдяки цьому в господарстві можна швидко

вилучати хворих тварин із стада і провести запобіжні заходи, щодо поширення хвороби.

Список літератури

1. Диагностика провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота с использованием диагностического набора «Лейко-ПЦР» / [Н.Б. Новак, Л.М. Ищенко, Р.В. Облап, та ін..] // Тезисы докладов V международной конференции "Биоресурсы и вирусы", (Киев, 10-13 сентября 2007 г.) / Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко. — К.: Фитосоциоцентр, 2007. — С. 142.
2. Зелінський М. Проблеми лейкозу та шляхи їх вирішення / М. Зелінський, В. Ковалюшко // Ветеринарна медицина України. – 2000. – № 5. – С. 12 – 13.
3. Лейкоз сельскохозяйственных животных / [В. А. Бусол, Н. Н. Доронин, Н. С. Мандыгра и др.] – К.: Урожай, 1988. – 264 с.
4. Hermanson G.T. Preparation of Colloidal-Gold Labeled Proteins / G.T. Hermanson // – Bioconjugate 593 - 604, (1996), cited by other.
5. Huang C. One – step immunochromatographic devise and method of use. / C. Huang, E. Fan. // 1998. U.S. Pat 5,712,172
6. Wu M.C. Milk and fat production in dairy cattle by advanced subclinical bovine leukemia virus infection / M.C. Wu., R.D. Shanks., H.A. Lewin. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1989. – 86. – P. 993 – 996.
7. Paek. S.H. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. / S.H. Paek., S.H. Lee., J.H.Cho., and Y.S. Kim / 2000. Methods 22, 53 - 60.

Использование диагностического иммунохроматографического экспресс-теста "Епискрин АВ Лейкоз" для мониторинга лейкоза крупного рогатого скота

**Ю.В. Бреус, Д.Л. Мартыненко, Д.Ю. Рыбальченко,
С.Д. Мельничук, В.Г. Спиридонов, Я.В.Хоменко**

Приведены данные по использованию диагностического набора "Епискрин АВ Лейкоз" для выявления в плазме, сыворотке крови, молоке антител против вируса лейкоза. Полученные данные свидетельствуют, что разработанный диагностический иммунохроматографический экспресс-тест "Епискрин АВ Лейкоз" по показателям специфичности и чувствительности не уступает "ИФА лейкоз - Аб". Проведено сравнение результатов исследования панели крови и молока в двух диагностических системах.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ, вирус лейкоза, рекомбинантные белки, антитела.

**The using of diagnostic immunochromatographic rapid test
"Episkrin AB Leukemia" to monitor leukosis**

**Y. Breus, D. Martynenko, D. Rybalchenko,
S. Melnychuk, V. Spiridonov, Y..Homenko**

The data on the use of diagnostic kits "Episkrin AB Leukemia" for detection antibodies in plasma, serum and milk against leukemia virus. These data suggest that the developed diagnostic test Rapid Express "Episkrin AB Leukemia" in terms of specificity and sensitivity is not inferior to "IFA leukemia - AB". Results were compared from the study panel of blood and milk in two diagnostic systems.

Key words: ELISA, rapid test, leukemia virus, recombinant proteins, antibodies.