

УДК 619:616.98.578.828.11Л

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Турсунов К., Райымбек Г., Шустов А.В., Бегалиева А., Инірбай Б., Сыдыкнаби Ы.,
Муканов К.К., Раманкулов Е.М., Мукантаев К.Н.

*Национальный центр биотехнологии
ш. Кургальжинское, 13/5, Астана, 010000, Казахстан
lii@biocenter.kz*

АБСТРАКТ

Лейкоз крупного рогатого скота занимает одно из важных мест в общей структуре инфекционной патологии сельскохозяйственных животных. Болезнь наносит значительный экономический ущерб сельскохозяйственным предприятиям, который складывается из потерь, связанных с гибелью и преждевременной выбраковкой высокопродуктивных коров, снижением продуктивности, снижением качества молока, затратами на проведение противолейкозных мероприятий. Все это ставит под угрозу сохранение племенных стад, а также проведение селекционных и племенных работ с целью совершенствования продуктивных качеств молочного скота.

В данной работе приведены результаты исследования по разработке иммунохроматографической тест-системы на основе рекомбинантного 51 гликопротеина для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота. В результате проведенных работ выявлено, что оптимальной концентрацией gp51 рекомбинантного антигена для нанесения на нитроцеллюлозную мембрану является 500 мкг/мл. Оптимальной концентрацией протеина G для приготвления конъюгата коллоидного золота является 8 мкг/мл. Объем конъюгата коллоидного золота на мембрану составил 7 мкл на 1 стрип.

При определении диагностических характеристик иммунохроматографической тест-системы было выявлено, что тест-система четко дифференцирует положительные контрольные сыворотки от сывороток здоровых животных, а также сыворотки больных бруцеллезом и ящуром животных. При определении чувствительности тест-системы специфические антитела в контрольных положительных сыворотках выявлялись в разведении 1:1600. Сравнительный анализ результатов иммунохроматографического, иммуноферментного анализа и реакции иммунодиффузии, полученных при исследовании 145 проб положительных сывороток, выявил 97%-ное совпадение результатов.

Ключевые слова: вирус, лейкоз, gp51, рекомбинантный антиген, иммунохроматографический анализ, реакция диффузионной преципитации.

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ANALYSIS FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS

Tursunov K., Raiymbek G., Shustov A.V., Begaliev A., Inirbay B., Sadiknabi I., Mukanov K.K.,
Ramanculov E.M., Mukantayev K.N.

*National center of biotechnology
13/5, Korgalzhyn rd., Astana, 010000, Kazakhstan
lii@biocenter.kz*

ABSTRACT

Bovine leukemia is an important infectious disease that affects farm animals. The viral etiology of the disease is well recognized. The disease causes significant economic damage to agricultural enterprises, including losses associated with the death and premature culling of high producing cows, reduced productivity, reduced milk quality, the cost of anti-leukemic measures. All these factors endanger the preservation of breeding herds, and threaten the management and breeding efforts to improve productive traits in dairy cattle.

In the present study, we determined that the optimal concentration of recombinant gp51 antigen to immobilize on a nitrocellulose membrane is 500 µg/ml. For the preparation of a colloidal gold conjugate, the optimal concentration of protein G is 8 µg/ml. The amount of colloidal gold conjugate for the membrane was 7 µl per 1 strip.

We found that the diagnostic characteristics of the immunochromatographic assay clearly differentiate the positive control sera of infected animals from sera of healthy animals, and also differentiates between serum samples with brucellosis and FMD. When determining the sensitivity of the test system, specific antibodies in the positive control sera were detected at a dilution of 1:1600.

Comparison of 145 positive serum samples in a lateral flow assay with immunoenzyme analysis and reaction immunodiffusion showed 97% agreement between the results.

Keywords: virus, leukemia, gp51, recombinant antigen, immunochromatographic analysis, reaction diffusion precipitation

ВВЕДЕНИЕ

Энзоотический лейкоз является инфекционным злокачественным заболеванием лимфатической системы крупного рогатого скота. Болезнь вызывается РНК-содержащим вирусом лейкоза типа С, принадлежащих к семейству *Retroviridae*, подсемейству *Oncoviridae*. Вызываемая вирусом инфекция коров характеризуется постоянным лимфоцитозом и образованием антител против структурных белков вируса. У зараженных животных происходит нарушение функционирования иммунной системы, приводящее к повышению восприимчивости животных к другим инфекционным болезням. Наиболее часто такое явление встречается у молочных коров [1, 2].

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота является актуальной проблемой животноводства многих стран, приводя к значительным экономическим потерям [3, 4, 5]. Экономические потери складываются из-за уменьшения экспортного потенциала, стоимости диагностических и профилактических мероприятий, уничтожения продуктивного и племенного поголовья животных.

Учитывая биологию размножения вируса, наиболее актуальными методами диагностики болезни являются серологические тесты. Обычно применяют несколько методов обнаружения специфических антител в сыворотке крови или молока. В сыворотке крови животных антитела против вируса лейкоза выявляются через 2 и 8 недель после инфицирования. В структуре гуморального ответа преобладают антитела против вирусных белков gp51 и p24 [6]. При этом антитела против gp51 антигена формировали более высокие титры в отличие от антител против p24 антигена.

Традиционным источником gp51 антигена является вирус, получаемый из линии клеток почек эмбриона овцы (FLK), хронически инфицированных вирусом. В последние десятилетия различные исследователи описали экспрессию гликопротеинов гена Env в гетерологичных системах, таких как кишечная палочка [7, 8, 9], *Saccharomyces cerevisiae* [10], а также в системе рекомбинантного вируса коровьей оспы [11, 12] и, в последнее время, в системе бакуловируса [13, 14].

Elizangela Maira dos Santos с соавторами (2012) использовала пептиды, полученные технологией фагового дисплея, в разработке методов иммуноанализа энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. Эти пептиды были расценены как антигенные миметики иммуногенных эпитопов белков вируса лейкоза крупного рогатого скота, обладающих потенциалом при разработке диагностических тест-систем [15]. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей полученных пептидов показал их гомологию с p24 антигеном, gp51 и gp30 гликопротеинами. Пептиды из клонов D10, G5 и A9 гомологичны с белком p24, который рассматривается как основной капсидный белок вируса лейкоза крупного рогатого скота, а пептид клона D4 имеет высокую степень гомологии с gp51 гликопротеином вирусной оболочки.

В настоящее время разработаны различные диагностические тесты, такие как полимеразная цепная реакция, реакция иммунодиффузии в агаровом геле, реакция вируснейтрализации и иммуноферментный анализ. Для серологической диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота наиболее широко применяется реакция иммунодиффузии и иммуноферментный анализ. Данные методы основаны на использовании вируса лейкоза или рекомбинантного gp51 антигена экспрессированного в клетках насекомых [16].

Сравнительный анализ четырех коммерческих ИФА тестов на основе gp51 антигена и реакции иммунодиффузии, проведенный Carole Simard et al. (2000), показал корреляционную связь между этими тестами [17]. Полученные автором данные демонстрируют незначительное снижение показателей чувствительности и специфичности реакции иммунодиффузии в отличие от иммуноферментных тестов. Однако по эффективности и автоматизированности иммуноферментные анализы значительно превосходили реакцию иммунодиффузии. Кроме того, в странах, где распространенность лейкоза крупного рогатого скота незначительна, иммуноферментный анализ вполне пригоден для анализа объединенных образцов сывороток. Данный подход значительно сокращает объем работы и стоимость тестирования.

В настоящее время для быстрой диагностики многих инфекционных и неинфекционных болезней начал широко применяться иммунохроматографический анализ. Привлекательность данного метода связана с коротким периодом проведения анализа, простотой и доступной процедурой постановки диагноза. При этом, по своим диагностическим характеристикам, иммунохроматографический анализ не уступает иммуноферментному анализу. Более того, подтверждающий диагноз в полевых условиях решает целый ряд проблем: транспортировка проб в лабораторию, быстрая постановка диагноза для принятия своевременных профилактических мероприятий. DaPeng Peng с соавторами (2007) показали, что разработанная ими иммунохроматографическая тест-система для обнаружения антител против нуклеокапсида вируса птичьего гриппа (ВГП) является уникальным инструментом диагностики особо опасных инфекционных болезней. При сравнении иммунохроматографического анализа с реакцией торможения гемагглютинации и реакцией иммунодиффузии, тест-система продемонстрировала значительное преимущество по специфичности и чувствительности [18].

В данной статье описаны диагностические характеристики иммунохроматографической тест-системы для

серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Тест-система основана на использовании рекомбинантного gp51 антигена экспрессированного в *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы сыворотки и стандартные вирусные антигены

Сыворотки крупного рогатого скота в количестве 310 проб любезно предоставлены РГКП «Республиканская ветеринарная лаборатория» МСХ РК. Предварительно сыворотки были исследованы в реакции иммунодиффузии. Контрольные положительные и отрицательные сыворотки, а также инактивированный вирус, полученный на культуре клеток FLK, предоставлены научно-производственным предприятием ТОО «Антиген» Республика Казахстан.

Получение конъюгата коллоидного золота

pH коллоидного золота доводили до 6,0 добавлением 0,2 М K_2CO_3 . Перед приготовлением конъюгата провели измерение концентрации протеина G для насыщения данного диаметра микрочастицы коллоидного золота. Для этого в лунки планшета к 100 мкл коллоидного золота (pH 6,0) добавили 10 мкл последовательных водных разведений протеина G. Через 10 минут в каждую пробирку добавили 10 мкл 10%-ного NaCl. При недостаточном насыщении коллоидного золота изменение цвета происходило от красного до синего. Изменение цвета оценивали спектрофотометрически (максимальное поглощение 580 нм).

К 0,2 мл раствора белка, содержащего необходимую концентрацию протеина G плюс 10% от необходимой концентрации, добавляли 10 мл коллоидного золота (pH 6,0). Инкубировали 10 мин. при комнатной температуре, затем добавляли 0,4 мл 1% ПЭГ до конечной концентрации 0,04%. Инкубировали еще 30 мин. при комнатной температуре, затем центрифугировали в течение 45 мин. при 60000 g. Супернатант удаляли, осадок растворяли в 1,5 мл ФСБ, содержащего 0,04% ПЭГ. Конъюгат хранили при 4°C. Перед использованием конъюгат разбавили в ФСБ, содержащем 0,02% ПЭГ до 1:10-1:20.

Изготовление иммунохроматографических тестов

Мембраны с нанесенными реагентами и мультимембранные композиты изготавливали по методике, описанной в работе [19]. Конъюгаты коллоидного золота с протеином G наносили на стекловолоконную мембрану с использованием диспенсера BioDot XYZ3050 в объеме 11 мкл на 1 см ширины стекловолоконной мембраны. В тест-системе для формирования аналитической и контрольной зоны использовали раствор рекомбинантного gp51 антигена вируса крупного рогатого скота и антител крупного рогатого скота в концентрации 500 мкг/мл. Все растворы антигена и антител наносили в объеме 2,0 мкл на 1 см ширины рабочей мембраны. Полученные стекловолоконные и рабочие мембраны сушили на воздухе при 20-22°C в течение не менее чем 20 часов.

Иммунохроматографический анализ

Сыворотки исследуемых животных в объеме 100 мкл разводили в 1 мл буфера для образцов. Далее 4 капли буфера для образцов с разведенными образцами наносили на стрип в области расположения конъюгата. Через 20 мин. учитывали результат. Если на стрипе проявлялись две полосы после высыхания, то исследуемая проба считалась положительной, если только одна нижняя полоса (контрольная линия) – проба считалась отрицательной. Полученные результаты свидетельствовали о правильности работы тест-системы. В случае отсутствия нижней полосы при различных вариантах реакция считалась недействительной.

Иммуноферментный анализ

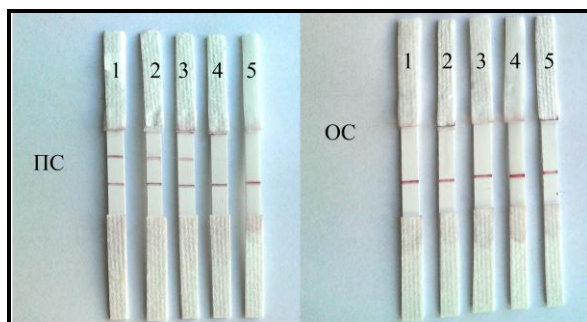
Для проведения непрямого варианта иммуноферментного анализа в лунки 96-луночных планшет вносили рекомбинантный антиген в оптимальной концентрации (0,01 мг/мл). Планшеты инкубировали в течение 12 часов при 4°C. После отмывки в планшете и блокирования свободных поверхностей лунок, в лунки вносили сыворотки в разведении 1:10 и повторяли процесс инкубирования. Затем планшеты отмывали повторно, и в лунки вносили антивидовой конъюгат (против антител крупного рогатого скота) в разведении 1:10000, выдерживали при 37°C в течение 1 час. Реакцию проявляли и учитывали с помощью спектрофотометра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация протеина G, для конъюгации с частицами коллоидного золота, определяли изотермой адсорбции при длине волны 580 нм. Максимальное насыщение коллоидных частиц протеином G наступало с 5 мкг в мл и не менялось при дальнейшем увеличении концентрации протеина. С учетом полученных результатов для

приготовления конъюгата коллоидного золота использовано 8 мкг/мл для протеина G. Объем конъюгата коллоидного золота, наносимого на мембрану, составил 7 мкл на 1 стрип. Конъюгат наносили на основу для конъюгата Pad PT-R5 (MDI, Индия).

При разработке иммунохроматографической тест-системы определяющую роль играла концентрация антигена, наносимого на нитроцеллюлозную мембрану. С этой целью, готовили стрипы с рекомбинантным gp51 антигеном в концентрации 500, 250, 125, 60, 30 и 15 мкг. Анализ проводили с использованием контрольных положительных и отрицательных сывороток (рисунок 1). Из рисунка 1 видно, что тестирующая линия на стрипах с контрольной положительной сывороткой проявлялись при концентрациях антигена 500, 250 и 125 мкг/мл. В более низких концентрациях тест-линия не проявлялась. На стрипах с контрольной отрицательной сывороткой тест-линии не проявились на всех концентрациях антигена. Полученные результаты показали, что оптимальной концентрацией антигена для нанесения на нитроцеллюлозную мембрану является 500 мкг/мл.



ПС – положительная сыворотка; ОС – отрицательная сыворотка; 1 – концентрация антигена 500 мкг/мл; 2 – 250 мкг/мл; 3 – 125 мкг/мл; 4 – 60 мкг/мл; 5 – 30 мкг/мл

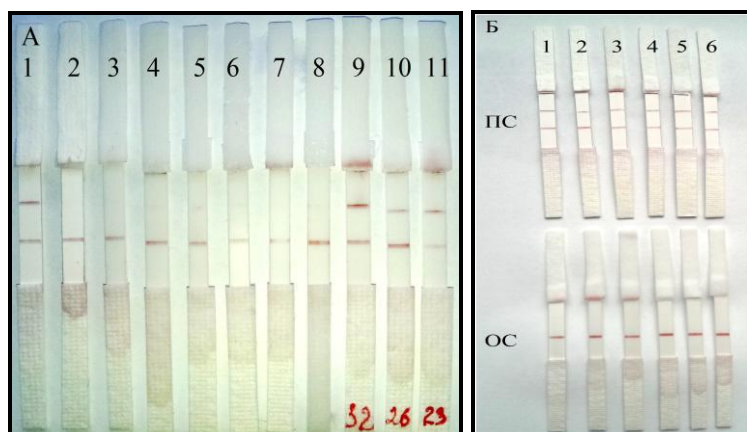
Рис. 1. Иммунохроматографический анализ с различными концентрациями антигена на стрипах

ПС – positive serum; ОС – negative serum; 1 – antigen concentration 500 µg/ml; 2 – 250 µg/ml; 3 – 125 µg/ml; 4 – 60 µg/ml; 5 – 30 µg/ml

Fig. 1. Immunochromatographic assay with different concentration antigens on the strips

Специфичность иммунохроматографического анализа определяли с помощью контрольной положительной сыворотки, сыворотки людей, больных бруцеллезом, сыворотки крупного рогатого скота, больного бруцеллезом и ящуром, и сывороток крупного рогатого скота, больного лейкозом. В качестве контрольной отрицательной сыворотки использовали сыворотки от здоровых животных. На стрипах с контрольными положительными сыворотками и сыворотками от больных животных проявились как тестирующая, так и контрольная линия (рисунок 2а). С сыворотками от здоровых, а также больных бруцеллезом и ящуром животных на стрипах проявились только контрольные линии, что свидетельствует о специфичности разработанной тест-системы.

Для определения чувствительности тест-системы контрольные положительные и отрицательные сыворотки крупного рогатого скота разводились двукратно до 1:1600. На контрольных положительных сыворотках проявление тестирующей и контрольной линий наблюдалось в разведении 1:1600. Повторение эксперимента на различных положительных сыворотках показал аналогичный результат. На контрольных отрицательных сыворотках тестирующая линия не проявлялась на всех разведениях (рисунок 2б).



а – специфичность тест-системы; 1 – положительная контрольная сыворотка; 2 – отрицательная контрольная сыворотка; 3, 4 – сыворотка человека, больного бруцеллезом; 5, 6 – сыворотка крупного рогатого скота, больного бруцеллезом; 7, 8 – сыворотка крупного рогатого скота, больного ящуром; 9-11 – сыворотка крупного рогатого скота, больного лейкозом; б – чувствительность тест-системы; 1 – разведение сыворотки 1:100; 2 – 1:200; 3 – 1:400; 4 – 1:800; 5 – 1:1000; 6 – 1:1600

Рис. 2. Специфичность и чувствительность иммунохроматографической тест-системы на основе рекомбинантного gp51 антигена

а – Specificity test-system; 1 – positive control serum; 2 – negative control serum; 3, 4 – serum of human diseases brucellosis; 5, 6 – serum of cattle diseases brucellosis; 7, 8 – serum of cattle diseases FMD; 9-11 – serum of cattle diseases leukemia; б – sensitivity test-system; 1 – serum dilution 1:100; 2 – 1:200; 3 – 1:400; 4 – 1:800; 5 – 1:1000; 6 – 1:1600

Fig. 2. Specificity and sensitivity of immunochromatographic test-system based on the recombinant gp51 antigen

Для анализа диагностических характеристик тест-системы использовали 310 сывороток крупного рогатого скота. Разработанная иммунохроматографическая тест-система сравнивалась с иммуноферментным анализом и реакцией иммунодиффузии, результаты которого представлены в таблице 1. По положительным и отрицательным результатам между иммуноферментным анализом и реакцией иммунодиффузии отмечается высокая степень совпадения. По 20 положительным и 16 отрицательным сывороткам иммуноферментный анализ, в отличие от РИД, показал сомнительные результаты. Показатели оптической плотности этих сывороток находились в пороговой области и не были отнесены ни к тем, ни к другим отрицательным сывороткам.

Таблица 1 – Сравнительный анализ результатов между ИХА-gp51, ИФА-gp51 тест-систем и РИД при исследовании 310 сывороток крупного рогатого скота

Table 1 – The comparative analysis of results between GICA-gp51, ELISA-gp51 and AGID in the study of 310 serum samples of cattle

		ИХА-gp51			ИФА-gp51			
		позитив	негатив	итого	позитив	негатив	сомнительные	итого
РИД	Позитив	141	4	145	122	3	20	145
	Негатив	-	165	165	2	147	16	165
	Итого	141	169	310	124	150	36	310

При исследовании 145 проб положительных сывороток иммунохроматографический анализ выявил 141 положительную и 4 отрицательных сывороток. Среди отрицательных сывороток результаты иммунохроматографического анализа полностью совпадали с результатами реакции иммунодиффузии. Из таблицы 1 видно, что 4 положительные пробы иммунохроматографическим анализом определены как ложноположительные. Повторное определение статуса ложноположительных проб в иммунохроматографическом анализе и сомнительных в иммуноферментном анализе показал те же самые результаты. Также необходимо отметить, что интенсивность цвета тестирующей линии некоторых сывороток была низкой. При сопоставлении результатов ИХА и ИФА было выявлено, что сыворотки, показавшие в ИХА слабую интенсивность цвета линии, в ИФА дали сомнительный результат. 16 проб сывороток, показавшие сомнительные результаты в иммуноферментном анализе, в иммунохроматографическом анализе показали отрицательный результат. На стрипах от этих сывороток тестовые линии не проявились, тогда как контрольные линии показали четкую линию.

В настоящее время для серологической диагностики инфекционных болезней разработаны различные иммунохроматографические тест-системы. Отличительной особенностью этих тест-систем является экспрессность, высокая специфичность и чувствительность в сравнении с традиционными методами, такими как реакция иммунодиффузии [18].

Общезвестно, что идеальными кандидатами для применения в таких диагностических тестах являются рекомбинантные антигены, продуцируемые в *E. coli*. Данная технология получения рекомбинантных антигенов имеет ряд преимуществ по сравнению с классическими методами. Преимущество заключается в гомогенности, высокой концентрации содержания белка и низкой себестоимости. Однако для некоторых видов антигенов, таких как гликопротеины, экспрессированные в *E. coli*, диагностическая эффективность в иммунохимических методах остается не ясной.

Гликопротеин gp51 и протеин р24 вируса лейкоза крупного рогатого скота являются основными целями для иммунного ответа, в связи с чем широко используются в различных диагностических системах. Из этих двух антигенов гликопротеин gp51 обладает высокой степенью антигенности и наибольшим диагностическим потенциалом для выявления антител к вирусу лейкоза [16].

Ранее нами получен рекомбинантный gp51 гликопротеин вируса лейкоза крупного рогатого скота, экспрессированный в кишечной палочке. Вестерн-блот и иммуноферментный анализ с использованием контрольных сывороток против вируса лейкоза крупного рогатого скота показали диагностическую пригодность антигена. Вероятным объяснением активности полученного рекомбинантного протеина с сыворотками от больных лейкозом животных является наличие на гликопротеине gp51 негликозилированных антигенных эпитопов.

Полученные результаты согласуются с результатами Van J. (1992), исследовавшего антигенные эпитопы gp51 антигена, экспрессированного в кишечной палочке [7]. По данным авторов, гликопротеин gp51 является высоко гликозилированным антигеном и несет три конформационных эпитопа, локализованные в N-концевой части. Они представляют собой основные детерминанты, определяющие биологическую активность вируса. Антитела, направленные против этих эпитопов, ведут себя как защитные антитела в экспериментах по вакцинации животных. Помимо указанных эпитопов, гликопротеин содержит ряд негликозилированных эпитопов в C-концевой части протеина.

На основе полученного рекомбинантного gp51 антигена вируса лейкоза, экспрессированного в кишечной палочке, была разработана иммунохроматографическая тест-система для определения специфичных антител в сыворотке больных животных. Исследование положительных и отрицательных сывороток, а также сывороток животных, больных гетерогенными инфекциями, показало достаточно высокую специфичность и чувствительность тест-системы. Эти показатели соответствовали показателям иммуноферментного анализа и реакции иммунодиффузии.

Высокая степень корреляции результатов при сравнительном анализе была получена при разработке иммунохроматографических тест-систем и к другим инфекционным болезням, таким как бруцеллез, туберкулез и т.д. [20, 21]. Например, иммунохроматографический анализ для диагностики гепатита В на основе антигенов HBsAg и HBeAg продемонстрировал результаты, сопоставимые с результатами иммуноферментного анализа. Чувствительность и специфичность тест-системы составила 95 и 100% соответственно. При этом результаты были одинаковы при исследовании замороженной сыворотки, свежей сыворотки и цельной крови. В отличие от иммуноферментного анализа, тест-система, хоть и отличалась по чувствительности, однако из-за простоты, гибкости, экспрессности и эффективности идеально подходила для скрининга в популяционных эпидемиологических исследованиях [22].

Разработанная тест-система позволяла в короткий промежуток времени провести качественный анализ на антитела, специфичные к вирусу лейкоза крупного рогатого скота. В отличие от традиционных методов диагностики лейкоза и иммуноферментного анализа разработанная тест-система не требовала специального оборудования.

ВЫВОДЫ

1 Оптимальной концентрацией gp51 рекомбинантного антигена для нанесения на нитроцеллюлозную мембрану является 500 мкг/мл. Для приготовления конъюгата коллоидного золота оптимальной концентрацией протеина G является 8 мкг/мл. Объем конъюгата коллоидного золота на мембрану составил 7 мкл на 1 стрип.

2 Иммунохроматографическая тест-система дифференцирует положительные контрольные сыворотки от сывороток здоровых, а также больных бруцеллезом и ящуром животных. При определении чувствительности тест-системы специфические антитела в контрольных положительных сыворотках выявлялись в разведении 1:1600.

3 Сравнительный анализ 145 проб положительных сывороток в иммунохроматографическом анализе, иммуноферментном анализе и реакции иммунодиффузии выявил 97%-ное совпадение результатов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта «Разработка технологии производства иммунохроматографической тест-системы для диагностики лейкоза крупного рогатого скота» бюджетной научно-технической программы О.0659 «Промышленные биотехнологии» на 2014-2016 гг., финансируемой Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meas S., Ruas J., Farias N.A., Usui T. et al. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle // *The Japanese journal of veterinary research*. – 2002. – Vol. 50. – P. 9-16.
2. Kobayashi S., Tsutsui T., Yamamoto T., Hayama Y. et al. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan // *Veterinary Research*. – 2010. – Vol. 6. – P. 1-9.
3. Coulston J., Naif H., Brandon R., Kumar S. et al. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates // *Journal of General Virology*. – 1990. – Vol. 71. – P. 1737-1746.

4. BurrIDGE M.J., Puhr D.M., Hennemann J.M. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida // *Journal American Veterinary Medicine Associate*. – 1981. – Vol. 179. – P. 704-707.
5. Zhao X., Buehring G. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape // *Virology*. – 2007. – Vol. 366. – P. 150-165.
6. Troiano L.D.C., Thomaz-Socco V., Agottani J.V.B., Brodzinski J. et al. Production, Characterization, and Use of Monoclonal Antibodies Against gp51 Protein to Diagnose Bovine Leukemia Virus Infection // *BioResearch Open Access*. – 2013. – Vol. 2, №1. – P. 55-60.
7. Ban J., Czene S., Altaner C., Callebaut I. et al. Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein expressed in *Escherichia coli* by means of antipeptide antibodies // *Journal of General Virology*. – 1992. – Vol. 73. – P. 2457-2461.
8. Siakkou H., Ulrich R., Uelze A., Mohring R., Rosenthal S. Immunological characterization of BLV proteins synthesized in *Escherichia coli* // *Acta Virologica*. – 1990. – Vol. 34. – P. 256-262.
9. Ulrich R., Siakkou H., Platzer C., Bossmann H. et al. Synthesis of bovine leukemia virus antigen in *Escherichia coli* // *Arch Exp Veterinarmed*. – 1990. – Vol. 44. – P. 909-916.
10. Legrain M., Portetelle D., Dumont J., Burny A., Hilger F. Biochemical and immunological characterization of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene*. – 1989. – Vol. 79. – P. 227-237.
11. Kumar S., Andrew M.E., Boyle D.B., Brandon R.B. et al. Expression of bovine leukemia virus envelope gene by recombinant vaccinia virus // *Virus Research*. – 1990. – Vol. 17. – P. 131-142.
12. Portetelle D., Limbach K., Burny A., Mammerickx M. et al. Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection // *Vaccine*. – 1991. – Vol. 9. – P. 194-200.
13. Kabeya H., Ohashi K., Ohishi K., Sugimoto C. et al. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep // *Vaccine*. – 1996. – Vol. 14. – P. 1118-1122.
14. Russo S., Montermini L., Berkovitz-Siman-Tov R., Ponti W., Poli G. Expression of bovine leukemia virus Env glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus // *FEBS Lett*. – 1998. – Vol. 436. – P. 11-16.
15. dos Santos E.M., Cardoso R., Filho L.R.G., Heinemann M.B. et al. Selection of ligand peptides with the ability to detect antibodies in enzootic bovine leukosis // *African Journal of Biotechnology*. – 2012. – Vol. 11. – P. 7302-7312.
16. De Giuseppe A., Feliziani F., Rutili D., De Mia G.M. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme linked immuno sorbent assay // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 2004. – Vol. 11. – P. 147-151.
17. Simard C., Richardson S., Dixon P., Belanger C., Maxwell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency // *The Canadian Journal of Veterinary Research*. – 2000. – Vol. 64. – P. 101-106.
18. Peng D.P., Hu S.S., Hua Y., Xiao Y.C. et al. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2007. – Vol. 117. – P. 17-25.
19. Byzova N. A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. Rapid pretreatment free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk // *Talanta*. – 2010. – Vol. 81, №3. – P. 843-848.
20. El-Eragi A.M., Salih M.H., Alawad M.F.E.M., Mohammed K.B. Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of bovine brucellosis in Gezira State, Sudan // *Veterinary World*. – 2014. – Vol. 7.
21. Mi Young Park, Young Jin Kim, Sang Hyun Hwang, Hyoung Hoi Kim et al. Evaluation of an immunochromatographic assay kit for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2009. – Vol. 47. – P. 481-484.
22. Lau D.T., Ma H., Lemon S.M., Doo E. et al. A rapid immunochromatographic assay for hepatitis B virus screening // *Journal of Viral Hepatitis*. – 2003. – Vol. 10. – P. 331-334.

REFERENCES

1. Meas S., Ruas J., Farias N.A., Usui T. et al. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. *The Japanese journal of veterinary research*, 2002, vol. 50, pp. 9-16. PMID: 12201018.
2. Kobayashi S., Tsutsui T., Yamamoto T., Hayama Y., Kameyama K., Konishi M., Murakami K.. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *Veterinary Research*, 2010, vol. 6, pp. 1-9. PMID:20055982.
3. Coulston J., Naif H., Brandon R., Kumar S. et al. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *Journal of General Virology*, 1990, vol. 71, pp. 1737-1746. PMID: 2167927.
4. BurrIDGE M.J., Puhr D.M., Hennemann J.M. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. *Journal*

American Veterinary Medicine Associate, 1981, vol. 179, pp. 704-707. PMID:6281220.

5. Zhao X., Buehring G. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology*, 2007, vol. 366, pp. 150-165. PMID:17498765.

6. Troiano L.D.C., Thomaz-Socco V., Agottani J.V.B., Brodzinski J. et al. Production, Characterization, and Use of Monoclonal Antibodies Against gp51 Protein to Diagnose Bovine Leukemia Virus Infection. *BioResearch Open Access*, 2013, vol. 2, no. 1, pp. 55- 60. doi: 10.1089/biores.2012.0295.

7. Ban J., Czene S., Altaner C., Callebaut I. et al. Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein expressed in *Escherichia coli* by means of anti-peptide antibodies. *Journal of General Virology*, 1992, vol. 73, pp. 2457-2461. PMID: 1383413.

8. Siakkou H., Ulrich R., Uelze A., Mohring R., Rosenthal S. Immunological characterization of BLV proteins synthesized in *Escherichia coli*. *Acta Virologica*, 1990, vol. 34, pp. 256-262. PMID:1703391.

9. Ulrich R., Siakkou H., Platzer C., Bossmann H. et al. Synthesis of bovine leukemia virus antigen in *Escherichia coli*. *Arch Exp Veterinarmed*, 1990, vol. 44, pp. 909-916. PMID: 1966363.

10. Legrain M., Portetelle D., Dumont J., Burny A., Hilger F. Biochemical and immunological characterization of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1989, vol. 79, pp. 227-237. PMID: 2551774.

11. Kumar S., Andrew M.E., Boyle D.B., Brandon R.B. et al. Expression of bovine leukemia virus envelope gene by recombinant vaccinia virus. *Virus Research*, 1990, vol. 17, pp. 131-142.

12. Portetelle D., Limbach K., Burny A., Mammerickx M. et al. Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection. *Vaccine*, 1991, vol. 9, pp. 194-200. PMID: 1645899.

13. Kabeya H., Ohashi K., Ohishi K., Sugimoto C., Amanuma H., Onuma M. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine*, 1996, vol. 14, pp. 1118-1122. PMID: 8911007.

14. Russo S., Montermini L., Berkovitz-Siman-Tov R., Ponti W., Poli G. Expression of bovine leukemia virus Env glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus. *FEBS Lett*, 1998, vol. 436, pp. 11-16. PMID: 9771885.

15. dos Santos E.M., Cardoso R., Filho L.R. G., Heinemann M.B. et al. Selection of ligand peptides with the ability to detect antibodies in enzootic bovine leucosis. *African Journal of Biotechnology*, 2012, vol. 11, pp. 7302-7312. doi: 10.5897/AJB11.348.

16. De Giuseppe A., Feliziani F., Rutili D., De Mia G.M. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme linked immuno sorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, vol. 11, pp. 147-151. PMID:14715562.

17. Simard C., Richardson S., Dixon P., Belanger C., Maxwell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 2000, vol. 64, pp. 101-106. PMID:10805248.

18. Peng D.P., Hu S.S., Hua Y., Xiao Y.C. et al. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, vol. 117, pp. 17-25. doi:10.1016/j.vetimm.2007.01.022.

19. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. Rapid pretreatment free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk. *Talanta*, 2010, vol. 81, no. 3, pp. 843-848. doi: 10.1016/j.talanta.2010.01.025.

20. El-Eragi A.M., Salih M.H., Alawad M.F.E.M., Mohammed K.B. Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of bovine brucellosis in Gezira State, Sudan. *Veterinary World*, 2014, vol. 7. Available at: www.veterinaryworld.org/Vol.7/June-2014/6.pdf. doi: 10.14202/vetworld.2014.395-397.

21. Mi Young Park, Young Jin Kim, Sang Hyun Hwang, Hyoung Hoi Kim. et al. Chang. Evaluation of an immunochromatographic assay kit for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, vol. 47, pp. 481-484. doi: 10.1128/JCM.01253-08.

22. Lau D.T., Ma H., Lemon S.M., Doo E. et al. A rapid immunochromatographic assay for hepatitis B virus screening. *Journal of Viral Hepatitis*, 2003, vol. 10, pp. 331-334. PMID: 12823602.

ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ ЛЕЙКОЗ ВИРУСЫНА ҚАРСЫ АНТИДЕНЕЛЕРДІ АНЫҚТАУ ҮШІН ИММУНОХРОМАТОГРАФИЯЛЫҚ АНАЛИЗ

Турсунов Қ., Райымбек Г., Шустов А.В., Бегалиева А., Інірбай Б., Сыдықнаби Ы.,
Муканов Қ.Қ., Раманкулов Е.М., Мукантаев Қ.Н.

Ұлттық биотехнология орталығы

Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

lil@biocenter.kz

ТҮЙІН

Ірі қара малдың лейкозы ауыл шаруашылығы жануарларының жұқпалы патологиясының жалпы құрылымында маңызды орындардың бірін алады. Ауру ауыл шаруашылығы кәсіпорындарына айтарлықтай экономикалық залал әкеледі, ол өнімділігі жоғары сиырлардың өліміне және уақытынан бұрын жарамсыз болып танылуына, өнімділіктің, сүт сапасының төмендеуіне, лейкозға қарсы іс-шаралар жүргізуге жұмсалатын шығындарға, сондай-ақ бұзаулардың иммунитет тапшылығымен тууына байланысты шығасылардан құралады. Осының бәрі асыл тұқымды табындардың сақталуына, сондай-ақ сүтті ірі қара малдың өнімділік сапасын жетілдіру мақсатында сұрыптау және тұқымды асылдандыру жұмыстарын жүргізуге қауіп тудырады.

Осы жұмыста ірі қара мал лейкозының серологиялық диагностикасы үшін рекомбинантты 51 гликопротеин негізінде иммунохроматографиялық тест-жүйесін әзірлеу жөніндегі зерттеудің нәтижелері келтірілген. Жұмыстың нәтижесінде нитроцеллюлозды мембранаға түсіру үшін рекомбинантты gr51 антигеннің тиімді концентрация 500 мкг/мл болып табылатындығы анықталды. Коллоидтық алтын конъюгатын дайындау үшін G ақуызының тиімді концентрациясы 8 мкг/мл болып табылады. Коллоидтық алтын конъюгатының мембранадағы көлемі 7 мкл 1 стрипке 7 мкл құрады.

Имунохроматографиялық тест-жүйенің диагностикалық сипаттамаларын анықтау кезінде оң бақылау нәтижесі сау малдың сарысуларын, сондай-ақ бруцеллезбен және аусылмен ауыратын малдың сарысуларын тест-жүйенің нақты саралайтындығын көрсетті. Тест-жүйенің сезімталдығын анықтау кезінде арнайы антиденелер оң бақылау сарысуларында 1:1600 ерітіндіде анықталды.

Оң сарысулардың 145 сынамаларын зерттеу кезінде алынған иммунохроматографиялық, иммуноферменттік анализдің және иммунодиффузиялық преципитация реакциясының нәтижелерін салыстырмалы талдау нәтижелердің 98%-ы сәйкес келетіндігін анықталды.

Негізгі сөздер: вирус, лейкоз, gr51, рекомбинантты антиген, иммунохроматографиялық талдау, диффузиялық преципитация реакциясы.