

ЛІТЕРАТУРА

1. **Berger-Schoch A.E., Herrmann D.C., Schares G. et al.** Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland // *Vet. Parasitol.*– 2011.– №177 (3-4).– P. 290–297.
2. **Dubey J.P., Prowell M.** Ante-mortem diagnosis, diarrhea, oocyst shedding, treatment, isolation, and genetic typing of *Toxoplasma gondii* associated with clinical toxoplasmosis in a naturally infected cat // *J. Parasitol.*– 2013.– Vol. 99(1).– P. 158–160.
3. **Dubey J.P., Pas A., Rajendran C. et al.** Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar // *Vet. Parasitol.*– 2010.– №172(3-4).– P. 195–203.
4. **Glor S.B., Edelhofer R., Grimm F. et al.** Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against *T. gondii* in serum plasma and meat juice of experimentally and natural infected animals // *Parasites & Vectors.*– 2013.– № 6.– 11p.
5. **Nagel S.S., Williams J.H., Schoeman J.P.** Fatal disseminated toxoplasmosis in an immunocompetent cat // *J. S. Afr. Vet. Assoc.*– 2013.– Vol. 14;84(1).– P. 1–6.
6. **Reyes M.F., Guevara V.G., Roque DG. S. et al.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic short-haired cats (*Felis catus*) in a wildlife facility in Manila // *Philipp. J. Vet. Anim. Sci.*– 2013.– №39 (1).– P. 99–106.
7. **Spada E., Proverbio D., della Pepa A. et al.** Seroprevalence of feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray cat colonies in northern Italy and correlation with clinical and laboratory data // *J. Feline Med. Surg.*– 2012.– №14(6).– P. 369–377.
8. **Westling K., Jorup-Rönström C., Evengård B.** Toxoplasmosis not transmitted by cat bite, but high prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients bitten by their own cat // *Scand. J. Infect. Dis.*– 2010.– Vol. 42(9).– P. 687–690.

Я. ХОМЕНКО, аспірант
Національний університет біоресурсів і природокористування

Розробка маркерів (міток) для імуноаналізу розпочалася ще у 70-х роках минулого століття. Серед найбільш успішних та перспективних, які набули широкого застосування, можна відзначити колоїдне золото та колоїдне вугілля.

Відомості про використання колоїдного вугілля у формі «туш» в імунології з'явилися ще в 1970 році [1-3].

У 1993 році Ван Амеронген із співавторами описав використання колоїдних частинок вуглецю в якості нових міток для експрес-тестів в імунологічних дослідженнях. Вугільні частинки також застосовують в твердофазному імуноаналізі [4].

На відміну від колоїдного золота, у якому сполучення білка та колоїдного золота відбувається майже миттєво, адсорбція на колоїдному вугліці займає більше часу - від однієї до кількох годин.

До переваг колоїдного вугілля можна віднести його стабільність та високу контрастність кольору на мембрані.

При розробці діагностичної тест-системи на лейкоз ВРХ використовували відповідний видоспецифічний антиген, який містив два рекомбінантних білки - р 24 і гр 51. Встановлено, що в сироватці крові і в молоці з'являються переважно антитіла до р 24 і в дещо меншій кількості - до білка гр 51 [5].

Метою роботи було отримання кон'югату колоїдного вугілля з білком *G Streptococcus spp.*, як компонента діагностичної тест-системи на основі дот-імуноаналізу.

У роботі використані наступні речовини: вугілля Special black 4 (25 нм) (Specialschwarz); рекомбінантний видоспецифічний антиген лейкозу ВРХ, білок *G Streptococcus spp.*; хімічні реактиви вітчизняного та іноземного виробництва з кваліфікацією не нижче "ч.д.а"; листовий білий полістирол (НІРС) завтовшки 0,2 мм; скло-волокно (КіпВіо, Китай), нітроцелюдозна мембрана (Міліпоре, США); позитивні та негативні щодо лейкозу ВРХ референс-сироватки, отримані з МЕБ референс-центру (Великобританія).

Білок *G Streptococcus spp.* в концентрації 10 мг/мл попередньо діалізували проти 2,5 мМ Tris-HCl буфера зі значенням рН 8,0.

Для одержання кон'югату додавали 50 мг препарату вугілля Special black 4 (25 нм) до 5 мл дистильованої води, ретельно суспендували та гомогенізували за допомогою УЗДН-2Т (15МА, 6 раз по 20 сек з перервами, за температури 0°C).

Готовий препарат зберігали за температури +4°C без доступу світла.

Науковий керівник - докт. вет. наук **В.Г. Скибіцький**

Виявлення лейкозу ВРХ з використанням кон'югату колоїдного вугілля з білком G (*Streptococcus spp.*)

Анотація. Викладено результати дослідження отримання колоїдного вугілля, кон'югація його з білком G (*Streptococcus spp.*) та охарактеризовано властивості кон'югату.

Ключові слова: колоїдне вугілля, білок G, дот-імуноаналіз, лейкоз ВРХ.

Получение конъюгата коллоидного угля с белком G (*Streptococcus spp.*) для следующего использования в дот-иммуноанализе при диагностике лейкоза КРС. ЯРОСЛАВ В. ХОМЕНКО.

Аннотація. Изложены результаты исследования получения коллоидного угля, конъюгация его с белком G (*Streptococcus spp.*) и охарактеризовано свойства конъюгата.

Ключевые слова: коллоидный уголь, белок G, дот-иммуноанализ, лейкоз КРС.

The opteining of conjugate of colloidal coal with protein G (*Streptococcus spp.*) for future use in dot-immunoassay for diagnostics enzootic bovine leukosis. IAROSLAV V. KHOMENKO.

A. The results of the study to obtain a colloidal coal, conjugation with it protein G (*Streptococcus spp.*) and to characterize the properties of the conjugate.

Key words: colloidal coal, protein G, dot-immunoassay, enzootic bovine leukosis.

До суспензії вугілля у воді, яка була попередньо розведена у 5 разів 2,5 мМ Tris-HCl буфером зі значенням рН 8,0, додавали розчин білка G з розрахунку 1-1,5 мг/см³.

Інкубували суспензію при постійному помішуванні протягом 4 годин і залишили на ніч за температури +4°C.

Потім центрифугували суспензію 18000 г протягом 30 хвилин. Надосад видаляли, а осад ретельно ресуспендували в розчині, який містив 5 мМ NaCl, 1% BSA, 0,02% NaN₃ зі значенням рН 8,0 в об'ємі 1/2 від вихідного. Стабілізували одержаний кон'югат 10% сахарози. Якість кон'югату в робочому розведенні перевіряли в дот-імуноаналізі та тесті на основі імунохроматографічного аналізу (ІХА).

При постановці дот-імуноаналізу та ІХА використовували референс-сироватки великої рогатої худоби, які містили специфічні щодо збудника лейкозу антитіла та вільні від них (Великобританія).

Імобілізацію лейкозного антигену в робочому розведенні здійснювали на листовий білий полістирол (HIPS), у вигляді гребінців, які сушили на повітрі. Надалі імуносорбент інкубували 20 хв. за кімнатної

температури із сироватками крові розведеними 1/10 буфером для зразків (фосфатно-сольовий буфер із додаванням 0,75 % желатину, 2,5 М сечовини і 0,01% бензойної кислоти). Після закінчення інкубації імуносорбент двічі відмивали дистильованою водою та занурювали в робоче розведення кон'югату "вугілля-білок G", інкубували 20 хв. за кімнатної температури. Потім двічі відмивали його дистильованою водою. Оцінку аналізу проводили візуально за інтенсивністю забарвлення місць нанесення антигена (рис. 1).

При постановці ІХА кон'югат "вугілля-білок G" сорбували на скло-волокно (KinBio, Китай) і сушили на повітрі. На нітроцелюлозну мембрану (Milipore, США) наносили рекомбінантний видоспецифічний антиген лейкозу ВРХ. Одержані біокомпоненти з'єднували в тест-смужку. Для проведення дослідження в пробірку вносили 0,3 см³ буфера для зразків та додавали 0,03 см³ сироватки крові ВРХ. Надалі занурювали тест-смужку вже з нанесеним кон'югатом та антигеном у пробірку з розведеною сироваткою крові ВРХ. Протягом 10-15 хвилин ми відмічали кольорову реакцію (рис. 2).

Результати досліджень.

За вказаною вище методикою був одержаний

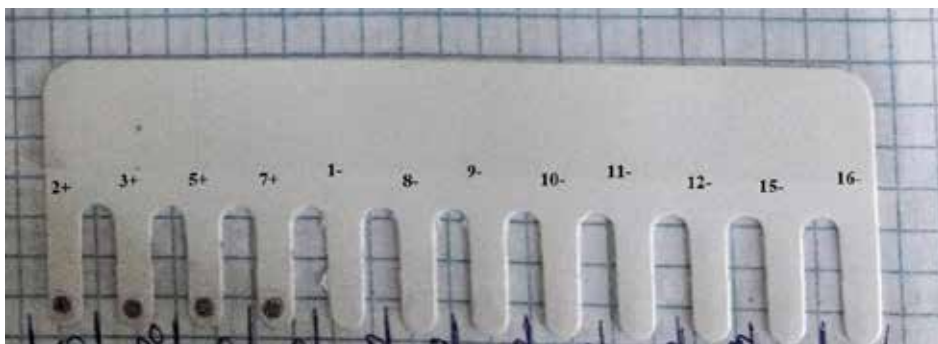


Рис.1. Результати застосування кон'югату "вугілля-білок G" при постановці дот-імуноаналізу на референс-сироватках:

2, 3, 5, 7 – контрольні позитивні сироватки ВРХ;
1, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16 – контрольні негативні сироватки ВРХ.

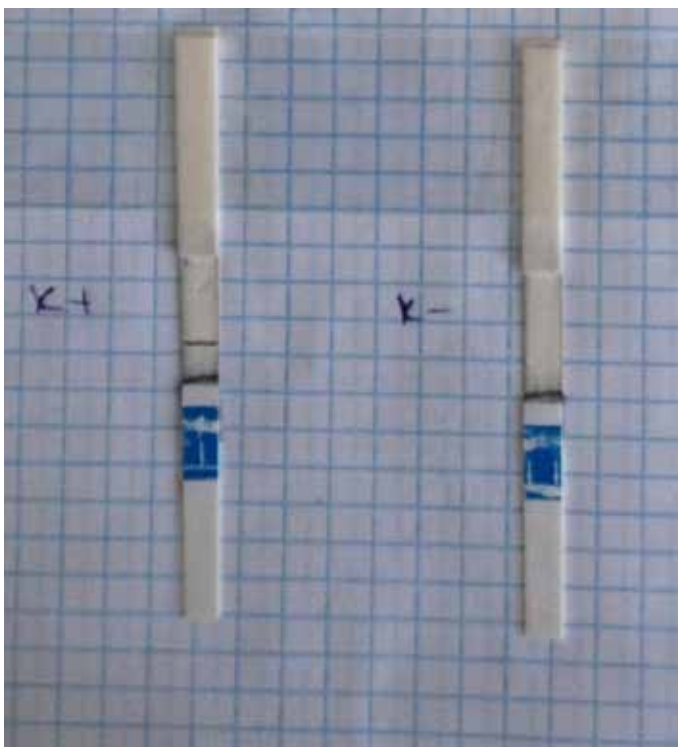


Рис. 2. Результати застосування кон'югату "вугілля-білок G" при постановці дот-імуноаналізу на референс-сироватках :

"K+" – контрольна позитивна сироватка ВРХ;
"K -" – контрольна негативна сироватка ВРХ.

кон'югат – рекомбінантний білок G *Streptococcus spp.* мічений колоїдним вугіллям. Якість кон'югату визначали за допомогою позитивних та негативних референс-сироваток з МЕБ референс-центру (Великобританія).

Аналізуючи одержані результати було визначено, що кон'югат специфічний – зв'язується лише з гомологічними антитілами та індіферентний щодо компонентів імуносорбенту. При постановці, як дот-імуноаналізу, так і ІХА, відмічали візуально чіткий сигнал у місці нанесення антигена з позитивною сироваткою і повну його відсутність при постановці з негативною сироваткою, в якій були відсутні специфічні щодо лейкозу ВРХ антитіла.

Висновки

Одержано зразки кон'югату колоїдного вугілля з білком G (*Streptococcus spp.*) для наступного використання в дот-імуноаналізі при діагностиці лейкозу ВРХ. Він відзначається високою специфічністю, зменшує тривалість постановки дот-імуноаналізу та має нижчу собівартість, ніж пероксидазний кон'югат вторинних антитіл.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Geck P.** India-Ink immuno-reaction for the rapid detection of pnteric Pathogens // *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* – 1971. – V. 18. – P. 191–196.
2. **Waller T.** The India-ink immunoreaction: a method for the rapid diagnosis of ncehalitoozoonosis // *Lab. Anim.* – 1977. – V. 11. – P. 93–97.
3. **Berguist N.R., Waller T.** A novel simple immunoassay for rapid detection of human IgG antibodies to *Toxoplasma gondii* // *J. Immunol. Meth.* – 1983. – V. 61. – P. 339–344.
4. **Загоскіна Т.Ю., Полтавченко А.Г., Докорина А.А. и др.** Обнаружение противобруцеллезных антител в сыворотках крови экспериментальных животных в иммуноанализе с дот антигенной фракцией бруцелл, маркированной частицами активированного угля // *Сибирь-Восток.* – 2002. – №8. – С. 7–9.
5. **Lienau A., Stober M., Kehrli M.E. et al.** Bovine Leukozyten-Adhasions-Defixienz: Klinisches Bild und Differential-Diagnostik // *Dtsch. Tierarztl. Wscht.* – 1994. – V.101. – P. 381–420.

