

5. Павлов М. Е. Контроль за состоянием здоровья и меры его нормализации / М. Е. Павлов // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – Горки, 1998. – С. 304–307.

6. Демидюк С. К. Ранняя диагностика і симптоматика хвороб, пов'язаних з порушенням обміну речовин у високопродуктивних корів / С. К. Демидюк, А. М. Стадник // Зб. наук. праць Харків. держ. зоовет. акад. – Харків, 2008. – Вип. 16 (41). – Ч. 2, т. 3. – С. 244–249.

7. Слівінська Л. Г. Уміст у крові кісткових маркерів метаболізму за остеодистрофії корів / Л. Г. Слівінська, В. Л. Федорович // Наук. вісник вет. медицини: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2011. – Вип. 8 (87). – С. 151–155.

8. Ковзов В. В. Диагностика нарушений обмена веществ у высокопродуктивных коров / В. В. Ковзов // Учёные записки УО Витебской ордена «Знак Почёта» госуд. акад. вет. медицины. – Витебск, 2007. – Вип. 1, т. 43. – С. 109–111.

9. Стадник А. М. Современные направления доклинической молекулярной диагностики остеодистрофии / А. М. Стадник, В. Л. Федорович // Учёные записки УО Витебской ордена «Знак Почёта» госуд. акад. вет. медицины. – Витебск, 2007. – Т. 43, вып. 1. – С. 228–230.

10. Диагностическая информативность некоторых показателей крови коров при остеодистрофии / Л. Г. Сливинская, В. Л. Федорович, С. К. Демидюк и др. // Учёные записки УО Витебской ордена «Знак Почёта» госуд. акад. вет. медицины. – Витебск, 2014. – Т. 50, вып. 2, ч. 1. – С. 224–227.

11. Федорович В. Л. Стан кісткового метаболізму за остеодистрофії корів / В. Л. Федорович, Л. Г. Слівінська // Наук. вісник Луган. нац. аграр. ун-ту. – Луганськ, 2011. – № 31. – С. 223–226.

Стаття надійшла до редакції 3.03.2015

УДК 619:614.31:615.9:631.57

Спиридонов В. Г., д.с.-г.н., заступник директора УЛЯБП АПК,

Мельничук С. Д., д.б.н., член-кор. НААН України,

Рибальченко Д. Ю., наук. співр. УЛЯБП АПК

Іщенко В. Д., к.вет.н., доцент, **Ткаченко В. В.**, к.вет.н., асистент[©]

E-mail: tkachdok@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ

ЧУТЛИВІСТЬ РОЗРОБЛЕНОЇ ІФА ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АФЛАТОКСИНУ В₁ ПОРІВНЯНО З ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Розроблено тест-систему для виявлення афлатоксину В₁ методом ІФА. Відпрацьована методика синтезу імуноферментного кон'югату афлатоксин-ЛФ і підібрано стабілізуючі розчини для його зберігання та створення імуноферментної тест-системи. Підібрано стабілізуючий розчин для зберігання кон'югату та розчин на основі трісового буфера, який найкраще справлявся з подоланням неспецифічних взаємодій антитіл з матеріалом планшету і зменшував кількість хибних результатів при постановці аналізу.

Для встановлення чутливості розробленої ІФА тест-системи готували серію розведень стандарту афлатоксину В₁ в молоці з концентраціями 0, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 ррб. Зразки тестували методом ІФА та за допомогою ВЕРХ. Визначено, що чутливість виявлення афлатоксину В₁ в розробленій тест-системі ІФА (ELISA) складає 4-40 ррб, а у ВЕРХ – 1-320 ррб. Доведено, що хроматографічні методи (тонкошарова хроматографія та ВЕРХ) менш специфічні порівняно з імуноферментним аналізом. Отримавши основні компоненти тест-системи і оптимізувавши умови проведення аналізу показали,

[©] Спиридонов В. Г., Мельничук С. Д., Рибальченко Д. Ю., Іщенко В. Д., Ткаченко В. В., 2015

що розроблена тест-система легко відтворювана, має високу чутливість та специфічність.

Ключові слова: афлатоксин В₁, тест-система, імуноферментний аналіз, тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, чутливість, специфічність.

УДК 619:614.31:615.9:631.57

Спиридонов В. Г., д.с.-х.н., заступитель директора УЛКБП АПК,
Мельничук С. Д., д.б.н., член-кор. НААН України,
Рыбальченко Д. Ю., науч. сотр. УЛКБП АПК,
Ищенко В. Д., к. вет. н., доцент, **Ткаченко В. В.**, к. вет. н., асистент
Національний університет біоресурсов и природопользования України, Киев

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЗРАБОТАННОЙ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФЛАТОКСИНА В₁ ПО СРАВНЕНИЮ С ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Разработана тест-система для определения афлатоксина В₁ методом ИФА. Отработанная методика синтеза иммуноферментного конъюгата афлатоксин-ЩФ и подобраны стабилизирующие растворы для его хранения для создания иммуноферментной тест-системы. Подобран стабилизирующий раствор для хранения конъюгата и раствор на основе трисового буфера, который лучше справлялся с преодолением неспецифических взаимодействий антител с материалом планшета и уменьшал количество ложных результатов при постановке анализа.

Для определения чувствительности разработанной ИФА тест-системы готовили серию разведений стандарта афлатоксина В₁ в молоке с концентрациями 0, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 ррб. Образцы тестировали методом ИФА и с помощью ВЭЖХ. Определено, что чувствительность обнаружения афлатоксина В₁ в разработанной тест-системе ИФА (ELISA) составляет 4-40 ррб, а в ВЭЖХ – 1-320 ррб. Доказано, что хроматографические методы (тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ) менее специфичны по сравнению с иммуноферментным анализом. Получив основные компоненты тест-системы и оптимизировав условия проведения анализа показано, что разработанная тест-система легко воспроизводима, имеет высокую чувствительность и специфичность.

Ключевые слова: афлатоксин В₁, тест-система, иммуноферментный анализ, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, чувствительность, специфичность.

UDC 619:614.31:615.9:631.57

Spyrydonov V. G., Dr. agricultural Sciences,
Melnychuk S. D., Dr. biol. Sciences,
Rybal'chenko D. Y., researcher,
Ischenko V. D., PhD. vet. Science, Associate Professor,
Tkachenko V. V., PhD. vet. Science (E-mail: tkachdok@ukr.net)
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev

THE SENSITIVITY OF DEVELOPED ELISA TEST SYSTEM FOR AFLATOXIN В₁ DETECTION COMPARED TO CHROMATOGRAPHIC METHODS

The test system was developed for the detection of aflatoxin В₁ by ELISA. The methodology for synthesis of immune-enzyme aflatoxin-alkaline phosphatase conjugates was completed and selected stabilizing solutions for the storage and creating ELISA test system. The stabilizing solution was selected for storing conjugate and trises buffer solution that better cope with overcoming nonspecific interactions of antibodies with the

material of plate and reduces amount of false positives in the formulation of analysis. For determining the sensitivity of developed ELISA test systems was prepared the dilutions series of aflatoxin B₁ standards in milk at the concentrations 0, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 ppb. The samples were analyzed by ELISA and HPLC. Determined that the sensitivity of detection of aflatoxin B₁ at the developed of ELISA test system is 4-40 ppb, and HPLC - 1-320 ppb. Was proved that the chromatographic techniques (thin layer chromatography and HPLC) compared with the ELISA less specific. After receiving the basic components of the test system and optimized of the analysis conditions were showed that the developed test system can be easily reproducible and has a high sensitivity and specificity.

Key words: *aflatoxin B₁, test systems, ELISA, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, sensitivity, specificity.*

Важливе значення для забезпечення випуску якісної продукції та попередження переходу до організму людини та тварин шкідливих речовин у кількостях, що перевищують гігієнічні норми, є контроль за вмістом контамінантів хімічного та біологічного походження. За оцінками зарубіжних аналітиків, понад 40 % світового зерна забруднено мікотоксинами. Сьогодні доведено, що безпечних рівнів мікотоксинів немає, навіть найменші їх кількості в кормах володіють негативним ефектом і здатні поступово накопичуватися в організмі. Окрім того, у більшості випадків мікотоксини в кормах присутні не окремо, а в комбінації. Виявлення навіть одного мікотоксину на межі максимально допустимого рівня (МДР) – досить вагома підстава вважати про присутність інших мікотоксинів. Комбінації мікотоксинів викликають змішані симптоми мікотоксикозів у тварин, що значно ускладнює діагностику захворювань. Постійне вживання декількох мікотоксинів у кількостях, що у 2–3 рази нижчі за МДР, створює більш негативний ефект, ніж нетривале вживання одного мікотоксину у високій дозі. Головним завданням фахівців в роботі з контамінованими комбікормами і зерновими компонентами є своєчасне виявлення мікотоксинів, встановлення їх концентрації [1, 2, 4, 5].

Нині для діагностики інфекційних захворювань та виявлення хімічних сполук вживаним є метод імуноферментного аналізу (ІФА), що був запропонований на початку 70-х років. До кінця ХХ століття цей метод пройшов шлях від новітньої наукової розробки до рутинного методу в клінічній діагностиці. До його переваг можна віднести високу чутливість, специфічність, відтворюваність, уніфікованість і придатність для масових обстежень. Можливість інструментальної оцінки результатів усуває чинник суб'єктивності [6]. До цього часу в Україні не вироблялись набори для визначення мікотоксинів та компоненти для їх виготовлення (мікотоксини, гаптени для імунізації та антитіла).

Метою роботи є розробка простих та доступних методів експрес-виявлення афлатоксину, встановлення рівнів детекції та надання рекомендацій щодо використання розроблених тест-систем.

Методи та матеріали. Роботи проведені у відділі молекулярно-генетичних досліджень УЛЯБП АПК. Методи досліджень включають синтез кон'югатів на основі гаптенів, приготування стабілізуючих та блокуючих розчинів та інших компонентів імуноферментних тест-систем, адсорбції антитіл на тверду фазу, виділення екстракції токсинів з різноманітних субстратів, проведення статистичного аналізу. В досліджах використовували зразки різного походження, які містили афлатоксин В₁.

Виявлення афлатоксину В₁ за допомогою тонкошарової хроматографії. Платівку для тонкошарової хроматографії («Merck», art.5567) розмічають тонкими

олівцевими лініями. На горизонтальній лінії, проведеній на відстані 1,5 см від нижнього краю пластинки, наносять за допомогою мікрошприца на відстані в 2 см один від одного по 0,002, 0,005 і 0,01 см³ робочого розчину стандарту афлатоксину В₁ (2, 5 і 10 нг відповідно). На відстані 1 см між плямами стандарту наносять 0,01 і 0,02 см³ досліджуваного розчину. Платівку поміщають в камеру для тонкошарової хроматографії з сумішшю ефір-метанол-вода (94:4,5:1,5) і витримують пластинку до досягнення фронтом розчинника лінії, проведені в 1 см від верхнього краю пластинки. Платівку витягують з камери, сушать на повітрі 5 хв і розглядають в довгохвильовому УФ-світлі. Виявлення на платівці плям, відповідних за хроматографічною рухливістю і кольором флуоресценції плямі стандарту афлатоксину, свідчить про можливу наявність афлатоксину [3].

Виявлення афлатоксину В₁ за допомогою ВЕРХ. Для калібрування приладу по флуориметричному детектору в інжектор за допомогою мікрошприца вводять 0,001; 0,002; 0,003; 0,005 см³ робочого розчину стандарту афлатоксину В₁ (відповідає 1,0; 2,0; 3,0; та 5,0 нг афлатоксину В₁). Для кожної кількості афлатоксину визначають висоту піку та розраховують калібрувальний коефіцієнт для афлатоксину В₁.

Умови хроматографування: об'єм досліджуваного розчину (20 мкл та 100 мкл для заповнення можливого мертвого об'єму); колонка розмірами 15x4,6 мм з оберненою фазою С18; збудження флуоресценції – 362 нм, детекція – 440 нм; рухома фаза – ацетонітрил-метанол-вода у співвідношеннях 2:2:6 з додаванням 0,12 г/л броміду калію та 0,2 г/л азотної кислоти; швидкість потоку – 1 мл/хв.; температура термостату колонки – 40°C. При використанні електрохімічного дериватизатору межа визначення становить 0,9 мкг/кг.

Результати досліджень. У відділі молекулярно-генетичних досліджень УЛЯБП АПК було розроблено тест-систему для виявлення афлатоксину В₁ методом ІФА. Відпрацьована методика синтезу імуноферментного кон'югату афлатоксин-лужна фосфатаза і підібрано стабілізуючі розчини для його зберігання. Відпрацьовано підбір стабілізуючого розчину для зберігання кон'югату для створення імуноферментної тест-системи. Підібрано розчин, який приготований на основі трисового буфера, що найкраще справлявся з подоланням неспецифічних взаємодій антитіл з матеріалом планшету і зменшував кількість хибних результатів при постановці імуноферментного аналізу.

Передовсім було встановлено специфічність розробленої тест-системи. В дослідках використовували зразки різного походження, які містили афлатоксини В₁ та М₁, що було підтверджено методом ВЕРХ. Для пост-колоночної дериватизації при проведенні ВЕРХ вибрали пірідініум бромід пербромід (РВРВ). На хроматографі показана різниця в чутливості двох методів дериватизації – пірідініумом бромід пербромідом та йодом (рис. 1).

Результати досліджень щодо встановлення специфічності виявлення афлатоксину В₁ із використанням розробленої тест-системи представлено в табл. 1.

Для встановлення чутливості розробленої ІФА тест-системи готували серію розведень стандарту афлатоксину В₁ в молоці з наступними концентраціями: 0, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 ррв. Зразки тестували методом ІФА та за допомогою ВЕРХ.

Необхідно наголосити, що за досить високої чутливості (табл. 3) хроматографічні методи (тонкошарова хроматографія та ВЕРХ) менш специфічні порівняно з ІФА. Тонкошарова хроматографія практично не розрізняє афлатоксин

B₁ від B₂, необхідне спектральне підтвердження хімічної будови аналіту; для ВЕРХ необхідна наявність флуоресцентного детектору та діодної матриці.

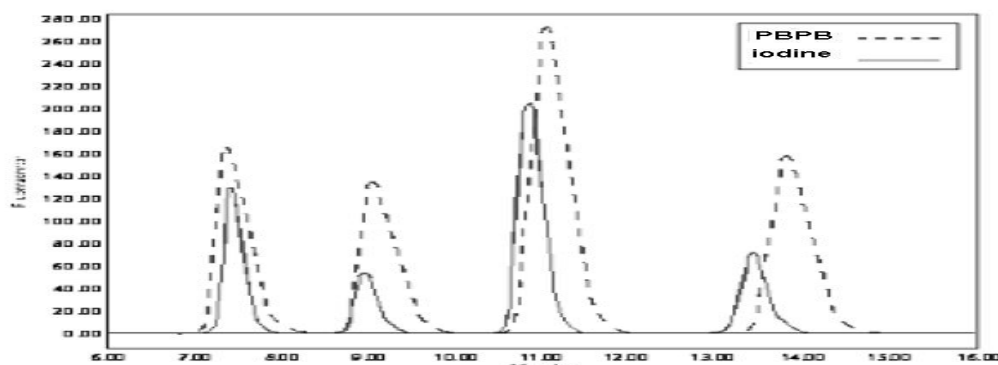


Рис. 1. Пост-колоночні методи дериватизації - пірідініумом бромід пербромідом

Таблиця 1

Результати специфічності виявлення афлатоксину B₁ в ІФА (ELISA)

№ з/п	Зразки, що містять афлатоксин B ₁ ppb.	Результати дослідження в ІФА (ELISA)	Зразки що містять афлатоксин M ₁ ppb.	Результати дослідження в ІФА (ELISA)	Зразки, що не містять афлатоксин B ₁	Результати дослідження в ІФА (ELISA)
1	Люцерна 0,58	Виявлено	Соевий шрот 1,24	Не виявлено	Люцерна	Не виявлено
2	Солома 0,61	Виявлено	Кукурудза 2,14	Не виявлено	Солома	Не виявлено
3	Ріпак 8,05	Виявлено	Пшениця 5,54	Не виявлено	Ріпак	Не виявлено
4	Силос 73,22	Виявлено	Соя 7,87	Не виявлено	Кукурудза	Не виявлено
5	Кукурудза 9,81	Виявлено	Кукурудза 65,14	Не виявлено	Кукурудза	Не виявлено
6	Соевий шрот 0,82	Виявлено	Кукурудза 30,12	Не виявлено	Пшениця	Не виявлено
7	Люцерна 0,96	Виявлено	Кукурудза 14,62	Не виявлено	Соя	Не виявлено
8	Солома 0,67	Виявлено	Люцерна 7,42	Не виявлено	Силос	Не виявлено
9	Ріпак 8,05	Виявлено	Люцерна 9,17	Не виявлено	Соевий шрот	Не виявлено
10	Пшениця 73,22	Виявлено	-	-	Люцерна	Не виявлено

Для визначення відтворюваності вносили у 20 повторях один і той самий зразок та вираховували середнє значення (mea) та стандартне відхилення (SD), за допомогою Microsoft Office Excel, яке підставляли у формулу, та вираховували відтворюваність:

$$C.V. = SD/mea * 100 \% = 0,0237/0,353 * 100 = 6,7 \%$$

Таким чином, відтворюваність розробленого ІФА для виявлення афлатоксину складає 6,7 %, що відповідає стандартам прийнятих для тест-систем даного типу.

Отже, імуноферментна тест-система є легко відтворюваною, має високу чутливість та специфічність, що дозволяє отримати вірогідні результати аналізу.

Таблиця 2

Чутливість виявлення афлатоксину В₁ в ІФА (ELISA) порівняно з високоефективною рідинною хроматографією

№ п/п	Розведення стандарту афлатоксину В ₁ в зразку молока, ррб.	Результаті дослідження в ІФА (ELISA)	Результати дослідження методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC)
1	0	Не виявлено	Не виявлено
2	1	Виявлено	Виявлено
3	5	Виявлено	Виявлено
4	10	Виявлено	Виявлено
5	20	Виявлено	Виявлено
6	40	Виявлено	Виявлено
7	80	Не виявлено	Виявлено
8	160	Не виявлено	Виявлено
9	320	Не виявлено	Виявлено
10	640	Не виявлено	Не виявлено

Таблиця 3

Чутливість методів визначення афлатоксину В₁

Тонкошарова хроматографія (ТШХ)	Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)	Імуноферментний аналіз (ІФА)
3-20 мкг/кг	0,9 - 320 мкг/кг	4-40 мкг/кг

Висновки

1. Визначено, що чутливість виявлення афлатоксину В₁ в розробленій тест-системі ІФА (ELISA) складає 4–40 ррб, а чутливість виявлення у ВЕРХ становить 1–320 ррб.

2. Доведено, що хроматографічні методи (тонкошарова хроматографія та ВЕРХ) менш специфічні порівняно з імуноферментним аналізом.

3. Отримавши основні компоненти тест-системи та оптимізувавши умови проведення, показано, що розроблена імуноферментна тест-система є легко відтворюваною, має високу чутливість та специфічність, що дозволяє отримати вірогідні результати аналізу.

Перспективи подальших досліджень. Розробка тест-систем для визначення в ІФА інших мікотоксинів, забруднювачів навколишнього середовища, кормів і сільськогосподарської продукції.

Література

1. Evaluation of certain mycotoxins in food : fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO technical report series ; 908). – Geneva, 2002. – 62 p.

2. Know Mycotoxins – Global Mycotoxin Information Resource [електронний ресурс]. – Режим доступу : URL : <http://www.knowmycotoxins.com/ru/vpig.htm>

3. ДСТУ EN 12955 – 2001. Метод високоефективної рідинної хроматографії за допомогою постколонкової дериватизації та очищення на імунній колонці.

4. ДСТУ ISO 22000:2007 Системи керування безпекою харчових продуктів – Вимоги до будь-яких організацій харчового ланцюга.

5. Кравченко Л. В. Биобезопасность. Микотоксины – природные контаминанты пищи / Л. В. Кравченко, В. А. Тутельян // Вопросы питания. – 2005. – № 3. – С. 3–13.

6. Теория и практика иммуноферментного анализа / [А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, М. Е. Гаврилова]. – М. : Высш. шк., 1991. – 288.

Стаття надійшла до редакції 23.03.2015

УДК 619:611(092)

Стегней М. М., к.вет.н., доцент ©

E-mail: anatomiamm@ukr.net

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
м. Київ, Україна*

ВНЕСОК ПРОФЕСОРА Г. О. ГИММЕЛЬРЕЙХА У СВІТОВУ МОРФОЛОГІЧНУ НАУКУ

Зроблено аналіз наукової діяльності видатного українського морфолога, відомої особистості в світі у галузі порівняльної та еволюційної морфології тварин, доктора біологічних наук, професора Г. О. Гиммельрейха. Ім'я Германа Олександровича Гиммельрейха відоме широкому колу вчених не лише в галузі ветеринарної медицини, гуманної медицини, біології, зоології України, але і фахівцям Азії, Африки, Латинської Америки, Європи.

Наукові дослідження Г. О. Гиммельрейха ґрунтувалися на вивченні м'язів глоткових стінок ссавців. Дослідженнями показано, що в будові м'язів глотки у різних групах ссавців існують значні відмінності. У результаті широкого і ретельного морфо-функціонального дослідження глотки він створив нове уявлення про шляхи філогенетичного розвитку всієї передньої ділянки апарату травлення. Bazуючись на власних даних, він запропонував відмінні від існуючого тлумачення межі глотки ссавців, її відділів, будову та функцію її м'язового апарату.

Здобуті у результаті досліджень матеріали викладені у 80 наукових працях і опубліковані не лише у вітчизняних збірниках, але і у визнаних міжнародних журналах.

Ключові слова: ветеринарна морфологія, кафедра анатомії, ветеринарний інститут, історія ветеринарної медицини, м'язи глотки, головна кишка, ссавці.

УДК 619: 611 (092)

Стегней М. М., к.вет.н., доцент

Національний університет біоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

ВКЛАД ПРОФЕСОРА Г. А. ГИММЕЛЬРЕЙХА В МИРОВУЮ МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ НАУКУ

Сделан анализ научной деятельности выдающегося украинского морфолога, известной личности в мире в области сравнительной и эволюционной морфологии животных, доктора биологических наук, профессора Г. А. Гиммельрейха. Имя Германа Александровича Гиммельрейха известно широкому кругу ученых не только в области ветеринарной медицины, гуманной медицины, биологии, зоологии Украины, но и специалистам Азии, Африки, Латинской Америки, Европы.

Научные исследования Г. А. Гиммельрейха основывались на изучении мышц глоточных стенок млекопитающих. Исследованиями показано, что в строении мышц глотки в разных группах млекопитающих существуют значительные различия. В результате широкого и тщательного морфо-функционального исследования глотки он создал новое представление о путях филогенетического