

REFERENCES

1. Mandyhra, M.S. (2000). Epizootologichnyi monitoringh, profilaktyka ta systemy likvidatsii leikozu velykoi rohatoi khudoby v Ukraini [Epizootiological monitoring, prevention and systems for the elimination of leukosis in cattle in Ukraine]. *Extended abstract of Doctor's thesis*. Kharkiv [in Ukrainian].
2. Khrantsov, V.V., Parshyna, O.N., Yvanov, O.P., & Taslytskyi, S.Ya. (2006). Chastota registratsii infektsii VLVRH v selhozpredpriyatiyah raznyih form sobstvennosti i hozyaystvenno-poleznyie priznaki u zhyvotnyih s raznoy stepenyu komprometatsii k leykozu [The frequency of registration of infection VLVRH in agricultural enterprises of different forms of ownership and economic-useful signs in animals with different degrees of compromise to leukemia]. Proceedings from Epizootology and prevention of infectious diseases of cattle '06: *Mizhnarodna naukovo-praktichna konferentsiya – The International Scientific and Practical Conference* (p. 82). Kyiv [in Ukrainian].
3. Yarchuk, B.M., Tyrsin, R.V., & Dovhal, O.V. (2006). Suchasni aspekty ozdorovlennia gospodarstv, neblahopoluchnykh shchodo leikozu velykoi rohatoi khudoby [Modern aspects of improvement of farms, dysfunctional with regard to leukemia of cattle]. Proceedings from Epizootology and prevention of infectious diseases of cattle: *Mizhnarodna naukovo-praktichna konferentsiya – The International Scientific and Practical Conference* (pp. 89-90). Kyiv [in Ukrainian].
4. Ehorov, A.M., Osypov, A.P., Dzantyevev, B.B., & Havrylova, E.M. (1991). *Teoryia y praktyka ymmunofementnoho analiza [Theory and practice of ELISA]*. Moskva [in Russian].
5. Nakane, P.K., & Kawaoi, A.J. (1974). Peroxidase-labelled antibody: a new method of conjugation. *Histochem Cytochem*, 22, 1084-1091.

УДК 636.09:602:57.083.33:616.98

ХОМЕНКО В.Г., e-mail: yaroslavh@ukr.net,
ХОМЕНКО Я.В., e-mail: yaroslavh@ukr.net
Інститут ветеринарної медицини НААН

ОТРИМАННЯ КОН'ЮГАТУ НА ОСНОВІ ЗОЛЮ ЗОЛОТА ТА РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА G ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЬОЗУ ТВАРИН

У статті викладено результати виготовлення кон'югату на основі золю золота та рекомбінантного білка G Streptococcus spp., який застосовується в дот-імуноаналізі під час діагностики бруцельозу тварин. Для отримання кон'югату спочатку отримували золь золота, який на наступному етапі поєднували з білком G. Властивості кон'югату визначали під час постановки дот-імуноаналізу зі заздалегідь відомими позитивними та негативними на бруцельоз тварин сироватками крові.

Ключові слова: бруцельоз, білок G, колоїдне золото, дот-імуноаналіз.

Вступ. Незважаючи на стабільне епізоотичне благополуччя в Україні щодо бруцельозу загроза виникнення інфекції існує, зокрема через контрабандне завезення тварин, продуктів забою, сировини, молочних продуктів із країн, в яких дана проблема актуальна, а також у разі зараження свійських тварин від диких чи тварин-бактеріоносіїв [1].

Використання технології дот-імуноаналізу для розв'язання проблем захворюваності на бруцельоз відкриває широкі можливості для науковців та фахівців-практиків з метою поліпшення епізоотологічної ситуації. Порівняно з відомими класичними методами діагностики бруцельозу тварин дот-імуноаналіз вигідно вирізняється високою чутливістю, простотою постановки реакції, оперативністю отримання результатів і їх інформативністю [2–3].

В мембранних тестах колоїдне золото широко застосовується у складі кон'югату для діагностики паразитарних [4], вірусних [5] та грибкових захворювань [6].

Мета дослідження. Виготовити кон'югат білка G та золю золота для діагностичної бруцельозної тест-системи на основі дот-імуноаналізу.

Матеріали і методи дослідження. Виготовлення кон'югату білка G з колоїдним золотом. Отримання золю золота здійснювали методом Френса [7] в модифікації. Зв'язування золю з білком здійснювали за оптимізованою та адаптованою методикою Hermanson G.T. та співавторів [8].

Для відновлення золотохлорводневої кислоти (HAuCl_4) застосовували цитрат натрію. В скляний посуд з деіонізованою водою додавали 1% золотохлорводневу кислоту. Підігрівали до температури 90°C і вносили 1% цитрату натрію, доводили до кипіння та спостерігали зміну кольору від сіро-синього до рожево-помаранчевого (рис. 1). Саме в цей момент відбувається відновлення золотохлорводневої кислоти до наночастинок золота з середнім діаметром частинок 20 нм.

Отриманий золь застосовували для кон'югації з рекомбінантним білком G *Streptococcus spp.* Спочатку визначали мінімальну кількість білка, що стабілізує 1 см^3 колоїду. З цією метою брали 6 прозорих пластикових флаконів і в кожен вносили білок G в концентраціях 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 мкг. Потім в кожен з флаконів додавали 1 см^3 колоїдного золота, ретельно перемішували і залишали на 10 хв за кімнатної температури. Після цього в усі флакони вносили у дозі $0,1\text{ см}^3$ 10% NaCl. Контроль реакції проводили візуально. Необхідна кількість білка, яка стабілізує золь, буде в тому флаконі, де спостерігається зміна забарвлення від рожевого до фіолетового.

Після визначення необхідної кількості білку G *Streptococcus spp.* для стабілізації 1 см^3 золю, додавали 1 мг білку до загального об'єму колоїду та ставили на магнітну мішалку на 30 хв. Вносили 1% PEG 2000 до кінцевої концентрації 0,04% і залишили ще на 30 хв на мішалці. Центрифугували при 15000 g протягом 1 год. Надосад відбирали піпеткою, а осад розчиняли в 1x PBS з вмістом 1% PEG 20000. Якість отриманого кон'югату перевіряли в дот-імуноаналізі.

Дот-імуноаналіз. Імобілізацію бруцельозного антигену здійснювали на листовий білий полістирол (HIPS) завтовшки 0,2 мм. Антиген, розведений в 0,05 M розчині карбонатно-бікарбонатного буфера (pH 9,6), наносили за допомогою автоматичної піпетки на твердий носій (гребінець) окремими плямами об'ємом $0,003\text{ см}^3$. Перед нанесенням антиген попередньо титрували для визначення оптимального розведення.

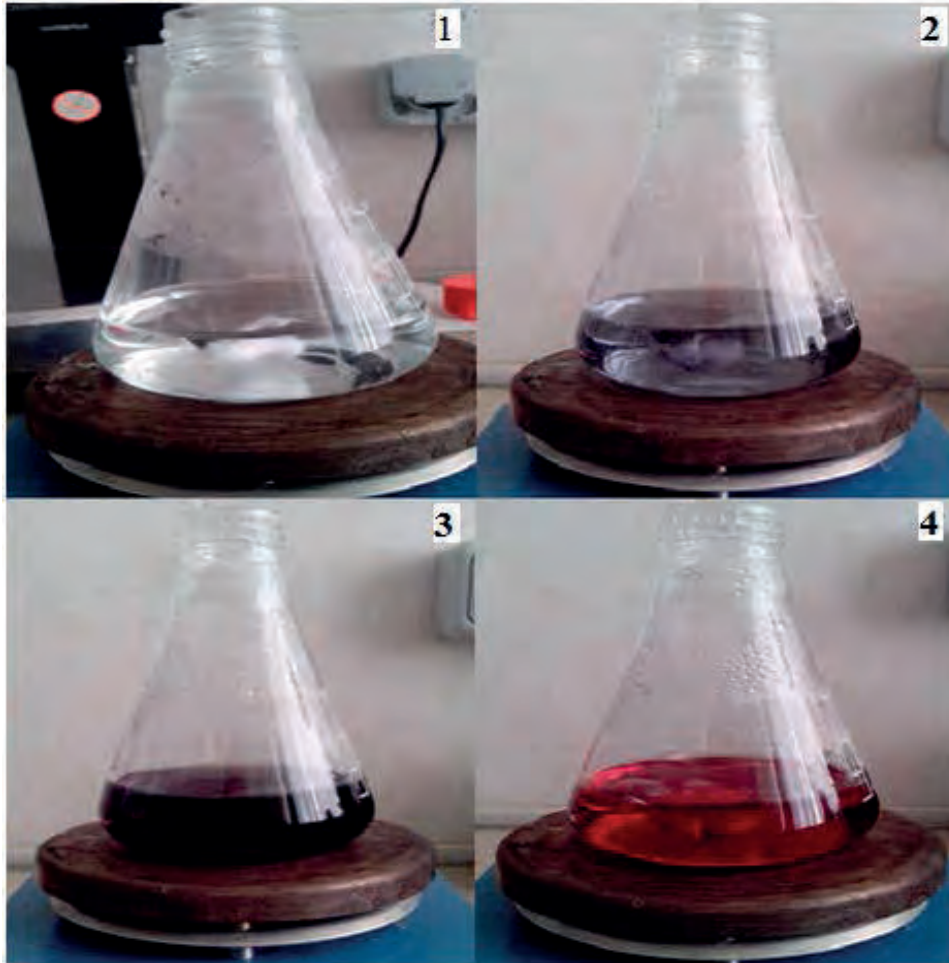


Рис. 1. Динаміка зміни кольору під час відновлення HAuCl_4 цитратом натрію.

Як ванночки для інкубації з сироватками крові та кон'югатом, а також для промивання зубців гребінця використовували стандартні бактеріологічні мікротитрувальні планшети на 96 лунок.

У лунки ряду А ванночки для інкубації вносили зразки сироваток крові в буфері для зразків (фосфатно-сольовий буфер із додаванням 0,75% желатини, 2,5 М сечовини і 0,01% бензойної кислоти) в кількості 0,2 см³. У лунки ряду С вносили у дозі 0,2 см³ робочого розчину кон'югату білка G, кон'югованого з золем золота. Розведення сироваток крові було 1:10. У лунки рядів В, D вносили – 0,25 см³ дистильованої води.

Для проведення аналізу гребінець по черзі вставляли в ряд А–D. Інкубували 20 хв зі зразками сироваток крові та кон'югатом за температури 18–25°C, після чого кожен раз промивали в лунках з дистильованою водою.

Оцінку аналізу проводили візуально за інтенсивністю забарвлення місць нанесення антигену, а також за допомогою розробленого за нашою участю програмного забезпечення «Епіскрин АВ».

Результати досліджень та їх обговорення. Виготовлений кон'югат перевіряли в дот-імуноаналізі, використовуючи внутрішньовиробничу панель сироваток крові, до складу якої входили позитивні та негативні на бруцельоз

референс-сироватки МЕБ (Великобританія) та сироватки крові вільних від інфекційних захворювань тварин із господарств Київської, Вінницької, Житомирської областей України. Загальна кількість сироваток крові тварин, які були взяті на дослідження становила 45 зразків. Результати випробування кон'югату наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати випробувань кон'югату на внутрішньовиробничій панелі сироваток крові

Сироватки	Кількість, шт	Візуальний позитивний результат, шт	Абсолютний результат в «Епіскрин АВ»
Сильнопозитивні референс-сироватки на бруцельоз	10	10	45–83
Слабопозитивні референс-сироватки на бруцельоз	5	5	39–44
Негативні референс-сироватки на бруцельоз	10	0	9–21
Сироватки здорових тварин з тваринницьких господарств	20	0	7–20

Окрім візуальної оцінки, результати постановки ДІА були перевірені за допомогою програмного забезпечення «Епіскрин АВ». Отримані числові значення повністю співпадали із візуальною оцінкою. Показники позитивних референс-сироваток отримані за допомогою сканеру і опрацьовані в комп'ютерній програмі «Епіскрин АВ» мали наступні числові значення (табл. 1). Абсолютний результат в «Епіскрин АВ» для негативних референс-сироваток крові був в діапазоні значень 9–21.

Було відмічено, що навіть слабопозитивні референс-сироватки крові, які мали абсолютний результат в межах 39–44 та низький рівень візуального сигналу, все одно були чіткими та легко діагностувалися на гребінці імуносорбенту.

Висновки та перспективи подальших досліджень. За результатами проведених досліджень було експериментально обґрунтовано методику отримання кон'югату білка G *Streptococcus spp.* з колоїдним золотом, як компоненту тест-набору на основі ДІА для діагностики бруцельозу тварин.

Отриманий кон'югат можна використовувати при діагностиці сироваток крові різних видів тварин: він однаково добре зв'язується з імуноглобулінами IgG сироваток крові великої рогатої худоби, свині, лисиці, кроля, собаки, людини.

На наступному етапі, маючи робоче розведення кон'югату, потрібно встановити специфічність та чутливість тест-системи, а також визначити відтворюваність.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабкін А.Ф. Бруцельоз: сучасні аспекти епізоотології / А.Ф. Бабкін, О.В. Обуховська // Ветеринарна медицина. К. – 2012. Вип. 96. – С. 204–205.

2. Field use of the Dot-ELISA test for human visceral leishmaniasis in Honduras / B.C. Walton, M.G. Pappas, M. Jr. Sierra [et al.] // Bull. P.A.H.O. – 1986. – V. 20. – P. 147–155.
3. Engvall E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G / E. Engvall, P. Perlmann // Immunochemistry. – 1971. – V. 8. – P. 871–874.
4. Petchclai B. Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis / B. Petchclai, S. Hiranras, U. Potha // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1991. – V. 45. – P. 672.
5. Chu F. Study on using colloidal gold immuno-dot assay to detect special antibody of hemorrhagic fever renal syndrome / F. Chu, Q. Ji, R.-M. Yan. // Chin. J. Integr. Trad. Western Med. – 2001. – V. 21. – P. 504.
6. Reboli A.C. Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay for Candida antigen detection. / A.C. Reboli // J. Clin. Microbiol. – 1993. – V. 31. – P. 518–523.
7. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // Nat. Phys. Sci. – 1973. – V. 241. – P. 20–22.
8. Hermanson G.T. Preparation of Colloidal-Gold Labeled Proteins / G.T. Hermanson // Bioconjugate. – 1996. – P. 593–604.

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТА НА ОСНОВЕ ЗОЛЯ ЗОЛОТА И РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА G ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЁЗА ЖИВОТНЫХ / Хоменко В.Г., Хоменко Я.В.

В статье изложены результаты изготовления конъюгата на основе золь золота и рекомбинантного белка G Streptococcus spp., который применяется в дот-иммуноанализе при диагностике бруцеллеза животных. Для получения конъюгата сначала получали золь золота, который на следующем этапе соединяли с белком G. Свойства конъюгата определяли при постановке дот-иммуноанализа с заранее известными положительными и отрицательными на бруцеллез животных сыворотками крови.

Ключевые слова: бруцеллез, белок G, коллоидное золото, дот-иммуноанализ.

PREPARATION OF CONJUGATE BASED ON COLLOIDAL GOLD AND RECOMBINANT G PROTEIN FOR DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS OF ANIMALS / Khomenko V.G., Khomenko Y.V.

Introduction. *There is a threat of brucellosis in Ukraine due to the smuggling of animals, slaughter products, raw materials, dairy products from countries where this problem is relevant, and in the case of disease transmission from wild or animal-bacterial carriers.*

In comparison to classical methods of brucellosis diagnosis in animals, dot immunoassay (DIA) is simple, fast, highly sensitive and informative method.

In membrane tests, colloidal gold is widely used for the preparation of conjugates in diagnostic kits for parasitic, viral and fungal diseases.

The goal of the work. *Preparation of conjugate of G protein with colloidal gold for the test kit based on the dot immunoassay designed for diagnosis of brucellosis.*

Materials and methods. *The gold sol was prepared before the conjugation of protein G with colloidal gold. This was done using the Frances method in modification. Conjugation of colloidal gold with protein G of Streptococcus spp. by the optimized and adapted protocol of Hermanson G. T. et al. The quality of the prepared conjugate was assessed using dot immunoassay.*

Results of research and discussion. *The conjugate was tested by the dot immunoassay using the panel of blood sera, which included positive and negative reference sera for brucellosis, OIE (UK) and blood sera from healthy animals.*

Conjugate of protein G with colloidal gold reacted with both strongly and low positive for brucellosis reference sera. It did not react with negative reference sera of healthy animals. In

addition to the visual assessment, the results were verified by the software "Episkrin AB". The resulting numerical values completely coincided with the visual estimate.

Conclusions and perspectives of further investigations. According to the results of research, the method for preparation of the conjugate of G protein of *Streptococcus* spp. with colloidal gold was experimentally validated. It was used as a component of test kit based on DIA for the diagnosis of brucellosis in animals.

The next step is determination of specificity, sensitivity and reproducibility of diagnostic test kit.

Keywords: brucellosis, protein G, colloidal gold, dot immunoassay.

REFERENCES

1. Babkin A.F., & Obukhovskaya O.V. (2012). Brucelyoz: suchasni aspekty epizootologii [Brusellosis: modern epizootology issues]. *Veterinarna medicina – Veterinarna medicina*, 96, 204-205 [in Ukrainian].
2. Walton, B.C., Pappas, M.G., Sierra, M.Jr. et al. (1986). Field use of the Dot-ELISA test for human visceral leishmaniasis in Honduras. *Bull. P.A.H.O.V.*, 20, 147-155.
3. Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.
4. Petchclai, B., Hiranras, S., & Potha, U. (1991). Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45, 672.
5. Chu, F., Ji, Q., & Yan, R.-M. (2001). Study on using colloidal gold immuno-dot assay to detect special antibody of hemorrhagic fever renal syndrome. *Chin. J. Integr. Trad. Western Med.*, 21, 504.
6. Reboli, A.C. (1993). Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay for Candida antigen detection. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 518-523.
7. Frens, G. (1973). Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.*, 241, 20-22.
8. Hermanson, G.T. (1996). Preparation of Colloidal-Gold Labeled Proteins. *Bioconjugate*. 593-604.

УДК 619:614.31+614.95+615.918:636.22/.28.085.34:582.28(477.52/.54)

ЯРОШЕНКО М.О., канд. вет. наук, e-mail: margarita.yaroshenko.69@ukr.net,

КУЦАН О.Т., д-р вет. наук, проф., чл.-кор. НААН, e-mail: okutsan @ukr.net,

ОРОБЧЕНКО О.Л., д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail:toxi-lab@ukr.net

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

МОНІТОРИНГ КОРМІВ ДЛЯ ВРХ МОЛОЧНОГО НАПРЯМУ ПРОДУКТИВНОСТІ НА НАЯВНІСТЬ ПЛІСЕНЕВИХ МІКРОМІЦЕТІВ У ГОСПОДАРСТВАХ ПІВНІЧНО-СХІДНОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ

Упродовж 2014–2017 рр., за визначення ступеня контамінації мікроміцетами кормів для ВРХ, перевищення МДР було встановлено у 70,8% проб. Плісєневі контамінанти роду *Aspergillus Mich.* склали 42,0%, *Penicillium Linc.* – 22,0%, родини *Mucoraceae* – 13,0% та *Fusarium Linc.* – 8,0%, інші роди склали 15,0%. Токсинуотворюючі мікроміцети були представлені видами *Asp. flavus*, *Asp. sydowi*, *Asp. candidus*, *Asp. oryzae*, *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Asp. amstelodami*, *Asp. ochraceus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium moniliforme var. lactis*, *Fusarium oxysporum*, *Pen. lanosum*, *Pen. stoloniferum*, *Pen. commune*, *Pen. casei*, *Pen. citrinum*, *Pen. rugulosum*.

Ключові слова: біотичні контамінанти кормів, токсинуотворюючі плісєневі сапрофіти, корми для ВРХ, молочний напрям продуктивності.