

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

НОВГОРОВОДА ОЛЕКСАНДРА ЮРІЇВНА

УДК 636.09:579-07

**ЕКСПРЕС-ІНДИКАЦІЯ *P. AERUGINOSA*
МЕТОДОМ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ**

16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія»

Автореферат на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України

Науковий керівник доктор ветеринарних наук, професор
Мазур Тетяна Василівна,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та біотехнології

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор
Галатюк Олександр Євстафійович,
Житомирський національний
агроєкологічний університет,
завідувач кафедри мікробіології,
фармакології та епізоотології

доктор ветеринарних наук,
старший науковий співробітник
Уховський Віталій Вікторович,
Інститут ветеринарної медицини НААН,
завідувач лабораторії лептоспірозу
з музеєм мікроорганізмів

Захист відбудеться «19» квітня 2018 року о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано « » березня 2018 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. *Pseudomonas aeruginosa* входить в групу антибіотикорезистентних бактерій-опортуністів об'єднаних терміном «ESKAPE» (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter specie*), що включають шість найнебезпечніших мікробів для населення розвинених країн світу (Rice L. B., 2008; Салманов А. Г., 2017). *P. aeruginosa* спричиняє захворювання у сільськогосподарських, промислових і диких тварин, птиці, риб і бджіл (Порт Е. В., 2006; Вержиховський О. М., 2007; Пруцаков С. В., 2010; Зон Г. А., 2013;). Спалахи псевдомонозу у птахівничих господарствах супроводжуються значним відходом перехворілої птиці, низькою виводимістю курчат через значну загибель ембріонів у період інкубації яєць (Терехов В. И., 2004; Васильєв А. К., 2008). Відзначається посилення ролі *P. aeruginosa* в етіології захворювань і важких інфекційних ускладнень у людей (Klockgether J., 2017; Moradali M. F., 2017). За даними звіту Всесвітньої організації охорони здоров'я 17 лютого 2017 року *P. aeruginosa* віднесено до видів бактерій, які становлять найбільшу загрозу для здоров'я людини (Всесвітня організація охорони здоров'я, 2017).

Тому раннє виявлення *P. aeruginosa* як окремого агента, так і представника мікробних асоціацій є актуальним. Особливої уваги потребує формування карбапенем-резистентних штамів *P. aeruginosa*, що диктує необхідність впровадження сучасної системи інфекційного контролю цього патогена (Європейський центр з профілактики та контролю захворюваності, 2015; Салманов А. Г., 2017).

Традиційні методи індикації збудників бактеріозів включають три етапи: мікробіологічний аналіз, серологічну і біологічну діагностику. Але такі комплексні підходи є надто рутинними, вартісними і вимагають використання стаціонарного обладнання і високопрофесійного персоналу. Сучасні методи виявлення мікроорганізмів, такі як імуноферментний аналіз та полімеразна ланцюгова реакція трудомісткі та високо затратні для проведення постійного моніторингу об'єктів довкілля (Стародуб М. Ф., 2016). Технології, засновані на явищі поверхневого плазмонного резонансу дозволяють створити дешеві та високочутливі тест-системи для експрес-індикації *P. aeruginosa*, які можна використовувати в лабораторіях і в польових умовах (Nabok A., 2016).

Для забезпечення епізоотичного та епідемічного благополуччя інфекційних хвороб тварин і людей, актуальним питанням сьогодення є розроблення імуносенсорної тест-системи для експрес-індикації *P. aeruginosa* у будь-яких субстратах та об'єктах навколишнього середовища, що зумовлює актуальність даної дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є складовою частиною ініціативної науково-дослідної роботи кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України «Особливості епізоотології асоційованих інфекцій свиней зумовлених *E. coli* та

Salmonella spp. за впливу *Pseudomonas aeruginosa*)» (номер державної реєстрації 0114U002522, 2014–2015 рр.); державної науково-дослідної теми Української лабораторії якості та безпеки продукції агропромислового комплексу Національного університету біоресурсів і природокористування України «Розробка імуносенсорної тест-системи для експрес-діагностики соціально-значущих бактеріальних інфекцій тварин в Україні» (номер державної реєстрації 0116U001586, 2016–2017 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – розробити метод експрес-індикації *P. aeruginosa* за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

Для досягнення зазначеної мети було поставлено наступні завдання:

– дослідити фактори ризиків у ветеринарній та гуманній медицині, пов’язані із персистенцією *P. aeruginosa* та вивчити основні біологічні властивості ізолятів *P. aeruginosa* в порівнянні з референс штамми;

– дослідити залежність між схильністю штамів *P. aeruginosa* до адгезії і антибіотикорезистентністю з метою встановлення потенційної патогенності псевдомонад;

– отримати видоспецифічні сироватки та імуноглобуліни на повноклітинний антиген *P. aeruginosa*;

– визначити оптимальні режими сенсibilізації робочої поверхні трансдюсера (сенсорного чіпу імуносенсора) для виявлення закономірності відхилення резонансного кута імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу;

– встановити робочі стартові характеристики трансдюсера за використання повноклітинного антигену *P. aeruginosa* (позитивний контроль), за використання зразку, який не містить клітинних компонентів *P. aeruginosa* (негативний контроль) та в дослідному зразку;

– перевірити ефективність створеного чіпу при індикації *P. aeruginosa* в дослідних (реальних) зразках.

Об’єкт дослідження – експрес-індикація *P. aeruginosa* методом поверхневого плазмонного резонансу.

Предмет дослідження – фактори ризиків, біологічні властивості ізолятів *P. aeruginosa*, сенсibilізація робочої поверхні трансдюсера, постановка імуноаналізу методом поверхневого плазмонного резонансу для експрес-індикації *P. aeruginosa*.

Методи дослідження: епізоотологічні (вивчення епізоотичної ситуації, визначення показників захворюваності, аналіз даних звітів); мікробіологічні (посів на м’ясо-пептонний бульйон, на диференціальні середовища, дослідження адгезивних властивостей та антибіотикорезистентності штамів мікроорганізмів); імунологічні (імунізація кролів, реакція аглютинації, реакція імуноферментного аналізу); біохімічні (визначення вмісту загального білка, глобулінів); біофізичні (сенсibilізація поверхні трансдюсера, постановка імуноаналізу на основі поверхневого плазмонного резонансу) та статистичні (математична обробка результатів дослідження).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено методику експрес-індикації *P. aeruginosa* методом поверхневого плазмонного резонансу. Наукова новизна отриманих результатів захищена патентом на корисну модель: «Спосіб експрес-визначення *Pseudomonas aeruginosa*».

Визначено оптимальні режими сенсibiлізації поверхні сенсорного чіпа поверхневого плазмонного резонансу для виявлення закономірності відхилення резонансного кута імуносенсора для індикації *P. aeruginosa*. З'ясовано універсальність застосування сенсорних чіпів для різних типів імуносенсорів (спектрометрів) на основі поверхневого плазмонного резонансу.

Виявлено прямопропорційну залежність між адгезивними та колонізуючими властивостями синьогнійної палички та чутливістю до антибіотиків із високим ступенем зв'язку кореляції ($r=0,75$).

Практичне значення одержаних результатів. Виготовлено специфічні сироватки та імуноглобуліни щодо соматичного антигену *P. aeruginosa*.

Розроблено чіп імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу для експрес-індикації *P. aeruginosa*. Запропоновано алгоритм підготовки чіпу імуносенсора поверхневого плазмонного резонансу для експрес-індикації *P. aeruginosa* «Біосенсорний контроль бактеріального забруднення середовища» (затверджено вченою радою факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 4 від 23 листопада 2015 року.), що впроваджені в Державному науково-дослідному контрольному інституті ветеринарних препаратів та кормових добавок (м. Львів). Методику впроваджено у відділі ветеринарно-санітарної експертизи Львівської регіональної державної лабораторії ветеринарної медицини (м. Львів).

Результати досліджень, що викладені у дисертації, впроваджено у навчальний процес та наукову роботу на факультетах ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України, Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Одеського державного аграрного університету, Білоцерківського національного аграрного університету та кафедрі мікробіології Запорізького державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Відповідно до мети та завдань досліджень здобувачем самостійно проведено аналіз джерел наукової літератури з напрямку досліджень вітчизняних та зарубіжних авторів; розроблено схему досліджень; безпосередньо проведено експериментальні дослідження щодо модифікації поверхні трансдюсера та оптимізації методики постановки імуноаналізу для визначення *P. aeruginosa* на основі поверхневого плазмонного резонансу, а також епізоотологічні, мікробіологічні, імунологічні, серологічні та статистичні дослідження.

Під керівництвом наукового керівника сформульовано тему дисертаційної роботи, мету та завдання дослідження, сплановано експериментальні дослідження, проведено аналіз та узагальнення одержаних результатів, а також сформульовано висновки та пропозиції виробництву.

З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертації використано лише ті ідеї та положення, які є результатом особистої роботи здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на засіданнях науково-технічної ради Національного університету біоресурсів і природокористування України (2012–2017 рр.); XII Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів Національного університету біоресурсів і природокористування України «Проблеми ветеринарної медицини та якості безпеки продукції тваринництва» (м. Київ, 2013 р.); XII Міжнародній конференції молодих вчених «Наука и природа» (м. Вітебськ, Республіка Білорусь, 2013 р.); щорічній конференції товариства ветеринарної епідеміології та профілактичної медицини (м. Дублін, Республіка Ірландія, 2014 р.); XIV Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва», присвяченій 95-річчю факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України (м. Київ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Заразні хвороби тварин: сучасні методи діагностики, лікування та профілактики», присвяченій 25-й річниці створення кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету (м. Житомир, 2015 р.); XV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 2016 р.); науково-навчальному семінарі «Epi Days 2017 – Епідеміологія в практичному застосуванні» (м. Грайфсвальд, Федеративна Республіка Німеччина, 2017 р.); щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин», присвяченій 40-річчю заснування Інституту ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України (м. Київ, 2017 р.).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, з яких розділ монографії, стаття у науковому фаховому виданні України, 5 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, науково-практичні рекомендації, патент України на корисну модель, 4 тези наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота включає анотації, вступ, огляд літератури, опис напрямів дослідження, матеріали і методи виконання роботи, розділи результатів експериментальних досліджень, їх узагальнення та аналіз, пропозиції виробництву, список використаних джерел та додатки. Матеріал викладено на 175 сторінках друкованого тексту. Список використаних джерел налічує 252 найменувань, з яких 107 латиницею. Робота містить 35 рисунків і 16 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Роботу виконано упродовж 2012–2017 рр. на кафедрі епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Деякі фрагменти імунологічних, мікробіологічних досліджень було виконано в Українській лабораторії якості та безпеки продукції агропромислового комплексу Національного університету біоресурсів і природокористування України. Окремі біофізичні дослідження було проведено в лабораторії біосенсорики Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Дослідження включали 4 етапи.

Перший етап полягав у дослідженні ризиків, пов'язаних з персистенцією *P. aeruginosa*. Для отримання даних щодо моніторингу псевдомонузу в Україні користувались даними статистичних даних ветеринарних звітів, представлених на веб-сайті Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, захворювання свиней та великої рогатої худоби, звіти регіональних лабораторій та дані Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Для аналізу даних щодо епідемічної ситуації використовували звіти World Health Organization та Annual epidemiological report European Centre for Disease Prevention and Control, EARS-NET – Net database (Європейська система нагляду і контролю за антибіотикорезистентністю).

Другий етап включав вивчення біологічних властивостей ізолятів *P. aeruginosa* та дослідження залежності їх адгезивних властивостей від антибіотикорезистентності.

В роботі використано ізоляти *P. aeruginosa*, виділені із патологічного матеріалу, вилученого з трупів свиней (змиви з раневих поверхонь) номер – Ps. А Г1; Ps. А П2; Ps. А П3; Ps. А П4; із ґрунту біля тваринницьких приміщень – Ps. А Г1; Ps. А Г2; Ps. А Г3; Ps. А Г4; Ps. А Г5; зі сперми кнурів-плідників – SS1; SS2; SS3; зі змивів з піхви свиноматок – Ps. AVS1; Ps. AVS2; Ps. AVS3. Польові штами було виділено протягом 2012 року на території свинокомплексу «Калита» Броварського району Київської області. Штами одержані з філіалу музею мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України: ATCC 10145; NCIB 8295; ВКМ В-889; В-4; В-12, і еталонний штам ATCC № 9027, одержаний із Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ). В якості еталонних штамів на різних етапах досліджень було використано: *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* 144, отриманих від Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ).

Забір матеріалу, виділення культур, їх ідентифікацію, вивчення біологічних характеристик мікроорганізмів проводили за допомогою чинних

інструкцій та загальноновизнаних методик відповідно «Методичних рекомендацій виявлення та ідентифікація *P. aeruginosa* в об'єктах довкілля (харчових продуктах, воді, стічних рідинах) (1984).

З метою визначення адгезивних властивостей досліджуваних мікроорганізмів, використовували штами *P. aeruginosa*, отримані з різних об'єктів та три штами *P. aeruginosa* з музею мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України (м. Київ). Адгезивні властивості псевдомонад, виділених із різних джерел, вивчали за методикою В. І. Бріліс зі співавторами (1986).

Для визначення чутливості бактерій до антибактеріальних препаратів використовували методи дифузії в агар і серійних розведень в 0,7 % м'ясо-пептонному агарі (МУК 4.2.1890-04 Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів).

Контроль якості середовища та дисків з антибіотиками здійснювали з використанням еталонних штамів мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922 та *P. aeruginosa* ATCC 9027. Аналіз антибіотикорезистентності виділених мікроорганізмів проводили за допомогою комп'ютерної програми WHO-NET 5.1 (Copyright 1989-2001 World Health Organization. All rights reserved).

Третій етап роботи було присвячено підготовці складників та їх адаптації до застосування на обладнанні імуносенсору для експрес-індикації *P. aeruginosa* в біоматеріалі.

Для виготовлення соматичного О-антигену *P. aeruginosa* використовували еталонний штам *P. aeruginosa* ATCC 9027, попередньо перевіривши його на відсутність спонтанної аглютинації, за методикою П. К. Бойка (1982 р.), ним імунізували кролів за методикою С. А. Грінь (2008 р.) з метою отримання специфічного імуноглобуліну. З отриманих активних сироваток виділяли загальну глобулінову фракцію білків методом висолювання насиченим розчином сульфату амонію за методикою О. П. Бойко та ін. (2010 р.). Вміст білка в глобуліновій фракції визначали спектрометрично.

Четвертим етапом роботи було створення імуносенсорної тест-системи на основі поверхневого плазмонного резонансу для експрес-індикації *P. aeruginosa*. Для цього визначали оптимальні режими сенсibiлізації поверхні трансдюсера з метою виявлення закономірності відхилення резонансного кута імуносенсора з довжиною хвилі 632,8 нм. На робочій поверхні трансдюсера (чіпа) іммобілізували специфічні антитіла, що взаємодіяли з клітинними антигенами, і в результаті чого реєстрували зсув величини резонансного кута за методикою М. Ф. Стародуба (2005 р.). Для перевірки застосування сенсорного чіпу використовували спектрофотометр «Плазмон – б» – оптичний прилад на базі поверхневого плазмонного резонансу, розроблений на базі Інституту фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова НАН України. Спектроскопія поверхневого плазмонного резонансу проводилась в конфігурації Кретчмана з використанням He-Ne лазера з $\lambda=632,8$ нм як джерела світла, гоніометра Г-5М, скляної призми та фотодіоду (ФД 263). Для забезпечення оптичного контакту між призмою і металеву плівкою, нанесеною на скляну поверхню,

використовували імерсійну рідину (з коефіцієнтом заломлення $n=1,62$). Імобілізація на поверхні біологічного матеріалу та виникнення з ним специфічних взаємодій супроводжується зміною резонансного кута.

Проводили індикацію повноклітинного антигену *P. aeruginosa* в модельних розчинах (позитивний контроль), в зразку, який не містить клітинних компонентів *P. aeruginosa* (негативний контроль) і в дослідному (реальному) зразку. Для експрес-індикації *P. aeruginosa* було проаналізовано зразки, відібрані з ґрунту біля тваринницьких приміщень, зі сперми кнурів-плідників та із патологічного матеріалу. Ефективність експрес-індикації *P. aeruginosa* методом поверхневого плазмонного резонансу визначали шляхом порівняння із класичними методами бактеріальних досліджень (методи імуоферментного аналізу та бактеріального посіву).

Отримані результати досліджень оброблялись із використанням варіаційно-статистичного методу аналізу за допомогою персонального комп'ютера, прикладних програм з електронними таблицями Microsoft Excel та комп'ютерної програми для обробки лабораторних даних OriginLab, вірогідність розходжень визначали за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження факторів ризиків у тваринництві та гуманній медицині, пов'язані із наявністю персистенції *P. aeruginosa*. За даними EARS-NET – Net database (Європейська система нагляду і контролю за антибіотико-резистентністю) в країнах Північної Європи відслідковується чітка тенденція до зниження рівня розповсюдження полірезистентної синьогнійної інфекції, в той же час, як рівень екстенсивності хвороб, спричинених карбапенем-резистентною *P. aeruginosa* в країнах Південної та Східної Європи, Південної Азії та Російської Федерації зросло до 50 % і вище.

Згідно аналізу статистичних даних ветеринарних звітів, представлених на веб-сайті Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів та звітів регіональних лабораторій, псевдомоноз сільськогосподарських тварин досить поширений у Запорізькій, Донецькій, Одеській, Луганській та Черкаській областях. Епізоотичний процес за псевдомонозу свиней характеризується спорадичними спалахами та ензоотією з повільним перебігом, чітко вираженою сезонністю. Найвища ураженість тварин *P. aeruginosa* в Україні відзначається в осінньо-зимовий період, переважно з жовтня до лютого.

Особливості біологічних властивостей *P. aeruginosa*, виділених в різних біотопах. За оцінки росту бактерій на середовищі з N-цетилпіридинію хлориду відзначено, що 73,4 % культур через 24 години дають характерний ріст з утворенням водорозчинного пігменту піоціаніну. Цитохромоксидазний тест в 100 % випадків був позитивним; 100 % позитивних результатів отримано також в аргінідегідролазному тесті і 100 % негативних результатів у лізин і орнітиндекарбоксилазному тестах. Оскільки бактерії роду *Pseudomonas* мають велику спорідненість з аеромонадами, для їх виділення використовували

методику окисно-ферментативного тесту (ОФ-тест). Виявилось, що через 48 годин всі штами окислювали глюкозу з утворенням глюконової кислоти, що дозволяє відокремити бактерії роду *Pseudomonas* від бактерій роду *Aeromonas*.

Видову диференціацію *P. aeruginosa* здійснювали за оцінкою їх росту на ацетамідному агарі з урахуванням стану його гідролізу. При чому у 100 % штамів відзначено явище гідролізу, що характерно тільки для видів бактерій роду *Pseudomonas*. Характерною та показовою ознакою бактерій виду *P. aeruginosa* є продукція пігменту піоціоніну, що в даному експерименті було визначено шляхом посіву на м'ясо-пептонний бульон через 18 годин у 80 % штамів, а через 24 години – у всіх 100 %. Крім того, 90 % штамів під час росту виділяли своєрідний характерний запах (жасмину), що зумовлено здатністю синьогнійної палички синтезувати триметиламін. Металевий блиск (феномен спонтанного райдужного лізису) під час росту на м'ясо-пептонний агар, притаманний *P. aeruginosa*, проявляли 60 % колоній *P. aeruginosa*, що підтверджує їх типовість.

Аналізуючи отримані дані, можна стверджувати, що такі ознаки є характерними для бактерій роду *Pseudomonas*, виду *Aeruginosa*.

Взаємозв'язок між антибіотикорезистентністю та схильністю до адгезії у штамів *P. aeruginosa*, виділених від свиней. Середній показник адгезії, що становить середню кількість мікроорганізмів, які асоційовані з одним еритроцитом (від 0 до 1,0 бактерії – неадгезивні, від 1,01 до 2,0 – низькоадгезивні, від 2,01 до 4,0 – середньоадгезивні, більше 4,01 – високоадгезивні) досліджуваних ізолятів *P. aeruginosa*, виділених із різних біотопів, відповідав середньому рівню адгезивної активності, що свідчить про їх високий вірулентний потенціал.

Найвищий показник адгезії бактеріальних клітин до еритроцитів був характерним для представників *P. aeruginosa*, виділених із раневих поверхонь середній показник адгезії ($4,9 \pm 2,1$), серед музейних штамів таких не виявлено. Середньою адгезивною активністю володіли ізоляти, виділені зі сперми кнурів-плідників ($2,7 \pm 1,5$), змивів із піхви свиноматок ($2,5 \pm 1,8$) і ґрунту біля тваринницьких приміщень ($2,2 \pm 1,5$). Серед низькоадгезивних штамів перевагу становили музейні штами ($1,3 \pm 1,5$), які з тварин або ґрунту не було виявлено. Вираженими антибіотикорезистентними властивостями володіли штами з високим ступенем адгезивності. Мінімальну адгезивну здатність виявляли музейні штами, найбільш чутливі до протимікробних препаратів.

Виявлено прямий кореляційний зв'язок між середнім показником адгезії та резистентністю виділених ізолятів *P. aeruginosa* до антибіотиків $r=0,75$ ($p \leq 0,001$).

Отже, зміни ступеня адгезивності корелюють із резистентністю до антибактеріальних препаратів, що може сприяти широкому розповсюдженню антибіотикорезистентних та високоадгезивних штамів *P. aeruginosa*.

Отриманий зв'язок між адгезією та антибіотикорезистентністю дає змогу кваліфікувати штами *P. aeruginosa* як потенційно патогенні на основі їх здатності до адгезії.

Отримання видоспецифічної сироватки та імуноглобуліну на повноклітинний антиген *P. aeruginosa*. Специфічний імуноглобулін отримували із гіперімунної сироватки, виготовленої на основі повноклітинного антигену *P. aeruginosa*. Імуноглобулін готували поетапно, перевіряючи активність сироватки у реакції аглютинації на склі.

Динаміка формування специфічних антитіл у кролів на введення антигену *P. aeruginosa* активізувалася на 45 добу імунізації і досягала середніх титрів 4–5 \log_2 . Максимальний рівень синтезу антитіл відзначено на 75 добу, що дорівнював 7 \log_2 (рис. 1).

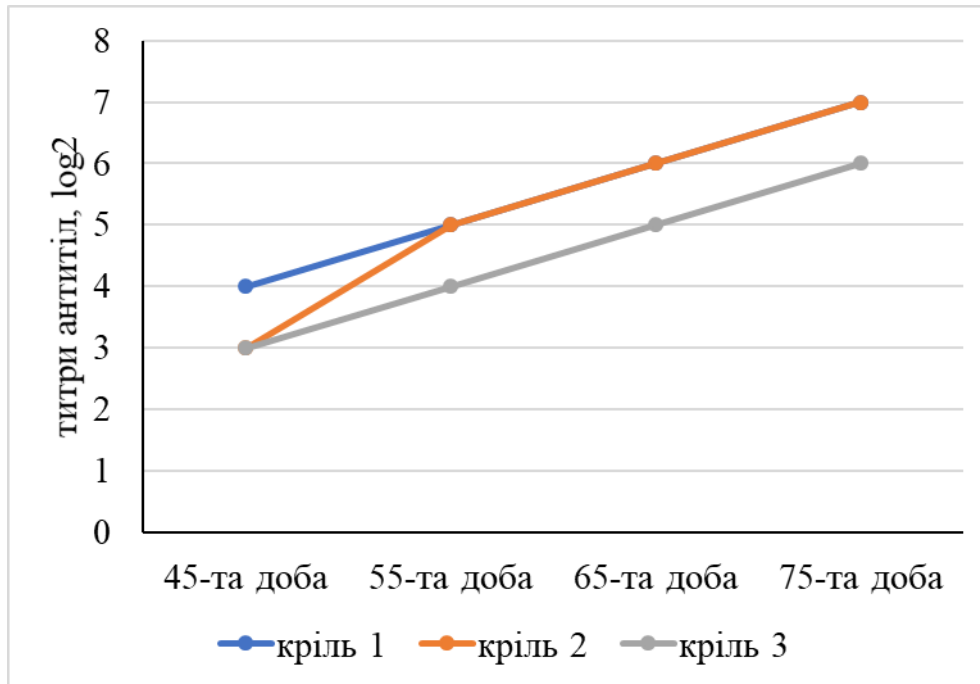


Рис. 1. Динаміка титрів антитіл у кролів під час гіперімунізації їх антигеном *P. aeruginosa*

Визначення оптимальних режимів сенсibilізації робочої поверхні трансдюсера (чіпа) імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу. В ході досліджень, визначено, що селективна поверхня трансдюсера імуносенсора працює із концентрацією імуноглобуліну Ig G 1 мг/мл, робочий титр 1:1280 в поліклональних антитілах проти *P. aeruginosa*.

Нанесення на золоту поверхню трансдюсера різних покриттів дозволяє збільшити чутливість імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу на 15–20 %.

В процесі досліджень, виявлено, що універсальною модифікацією робочої поверхні трансдюсера імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу є використання поліаліаміну гідрохлориду і сенсibilізація антитіл за допомогою білку A *Staphylococcus aureus*.

Встановлено, що чутливість відгуку знаходилась в межах 10^1 – 10^3 кл./см³. Імобілізація антитіл супроводжувалась зміною резонансного кута в межах 850–1900 кутових секунд (рис. 2).

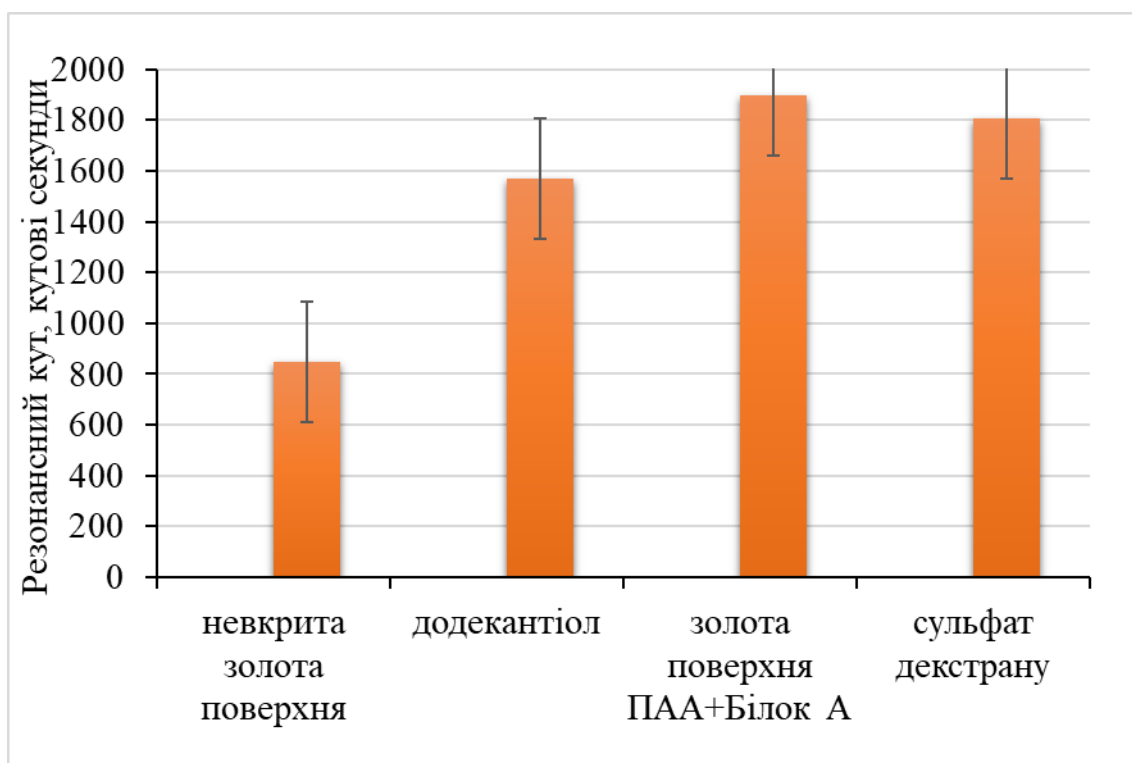


Рис. 2. Відгук імуносенсора на внесення розчину антигену до *P. aeruginosa* в концентрації 10 кл./см³ при використанні різних варіантів чутливої поверхні: 1 – невокрита золота; 2 – додекантіол; 3 – золото, вкрите шаром поліаліамін гідрохлорид + білок А; 4 – сульфат декстрану.

Дослідження продемонстрували, що в 9 з 10 тестових досліджень *P. aeruginosa* було виявлено в концентрації 10¹–10⁶ кл./см³, а для отримання вірогідних результатів варто використовувати модифікацію поверхні імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу за допомогою поліаліаміну гідрохлориду (20 нг/мл) і орієнтації антитіл за допомогою білку А *S. aureus* (Sigma-Aldrich).

Чутливість відгуку знаходилась в межах 10¹–10³ кл./см³, тоді, як чутливість інших методик попередньої обробки трансдюсера становить від 10² кл./см³. Чутливість імуносенсора з використанням моношару антитіл, сформованого на невокритій поверхні золота становила від 1000 кл./см³.

Визначено, що сенсibiлізація Ig G *P. aeruginosa* на поверхні чіпу імуносенсору на основі поверхневого плазмонного резонансу за допомогою додекантіолу або поліелектроліту поліаліаміну гідрохлориду є стабільною в часі та не руйнується під час промивання вимірювальної комірки забуференим фізіологічним розчином.

Модифіковані таким методом чіпи зберігали майже стовідсоткову активність упродовж 3 місяців, тоді як антитіла, нанесені на поверхню трансдюсера шляхом фізичної сорбції втрачали активність вже через 2–3 тижні.

Визначення робочих характеристик чіпу імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу за використання повноклітинного антигену *P. aeruginosa*. Для активації сенсорного чіпу у вимірювальну комірку

імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу вводили 0,9 % фізіологічний розчин (рН 7,4) зі швидкістю потоку 5 мл/хв та реєстрували зсув рефракторного кута. Межу детекції імуносенсора співставляли зі зміною сигналу на одну резонансну одиницю (resonance units – RU), що відповідає поверхневій щільності білка, зв'язаного з чіпом.

В подальшому послідовно наносили реагенти, за алгоритмом, що схематично наведено на рисунку 3.

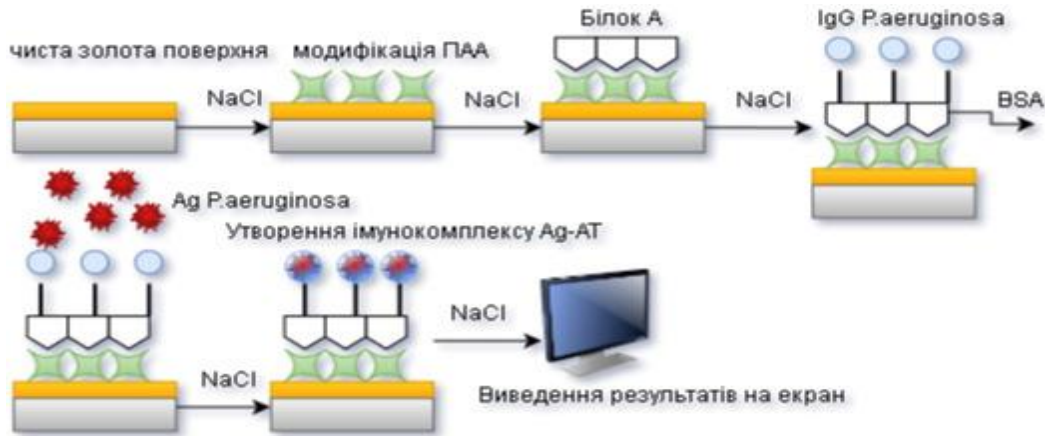


Рис. 3. Схема розроблення алгоритму імуноаналізу індикації *P. aeruginosa* методом поверхневого плазмонного резонансу

Конструювали чіп імуносенсора поверхневого плазмонного резонансу за допомогою формування селективного шару поверхні сенсорного чіпу для індикації повноклітинного антигену *P. aeruginosa* в модельних розчинах (позитивний контроль) (рис. 4).

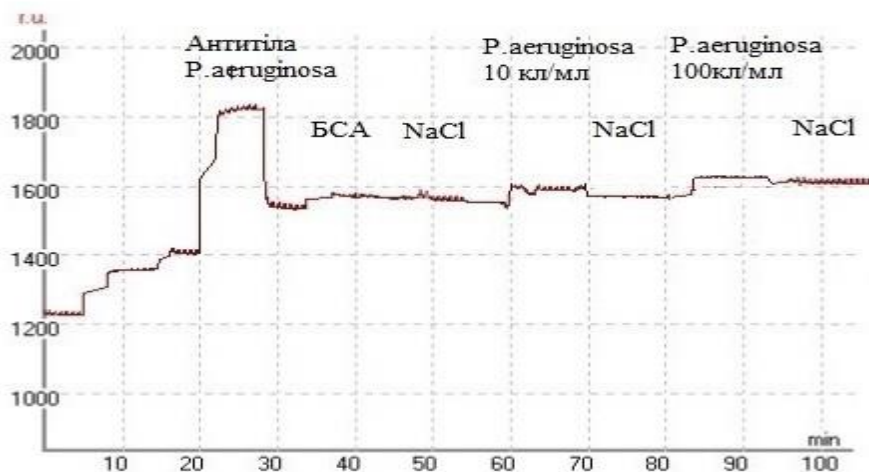


Рис. 4. Графік відгуку імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу при визначенні *P. aeruginosa* в модельних розчинах

Проводили дослідження щодо індикації *P. aeruginosa* за використання зразку, який не містить клітинних компонентів *P. aeruginosa* (негативний контроль) та в дослідних (реальних) зразках (рис. 5).

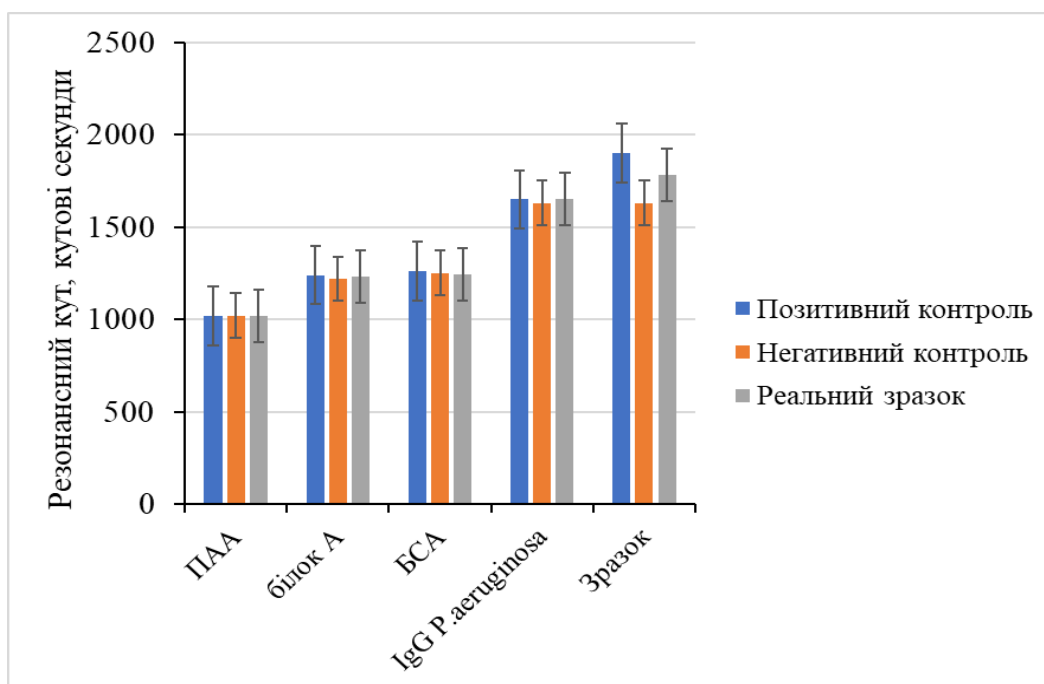


Рис. 5. Графік відгуків резонансного кута імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу за умов індикації *P. aeruginosa*

В результаті проведення ряду експериментів наведено можливість індикації *P. aeruginosa* з межею виявлення 10^1 – 10^3 кл./см³ і робочим діапазоном від 10^1 до 10^7 кл./см³. Показник нульового рівня відгуку імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (1000 RU) зафіксовано при концентрації 10 кл./см³.

За умов індикації *P. aeruginosa* в зразку, що не містив клітинних компонентів, відповіді приладу не спостерігалось, оскільки імунокомплекс на поверхні трансдюсеру не формувався. Це свідчить про відсутність впливу неспецифічних взаємодій на результат аналізу.

Перевірка ефективності створеного чіпу при індикації *P. aeruginosa* в реальних зразках. Для визначення ефективності чіпу імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу для аналізу реальних зразків було проаналізовано зразки ґрунту біля тваринницьких приміщень, сперми кнурів-плідників та патологічного матеріалу при запальних процесах. Аналіз зразків проводили за допомогою імуносенсорної тест-системи на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу, методу бактеріального посіву та імуноферментного аналізу.

За отриманими результатами аналітичних сигналів мінімальна концентрація для *P. aeruginosa*, яку визначали за допомогою імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу, складала $(3,9 \pm 0,3) \times 10^1$ КУО/мл, що переважає чутливість імуноферментного аналізу.

Результати експрес-індикації *P. aeruginosa* у дослідних зразках методом поверхневого плазмонного резонансу задовільно співвідносяться з результатами визначення тих же показників методом імуноферментного аналізу та бактеріального посіву на м'ясо-пептонний бульйон.

ВИСНОВКИ

На підставі експериментальних досліджень було розроблено метод експрес-індикації *P. aeruginosa* на основі поверхневого плазмонного резонансу. Доведена його висока чутливість і специфічність, що є суттєвим внеском в уніфікацію методології експрес-індикації патогенних мікроорганізмів.

1. Досліджені фактори ризиків у тваринництві та гуманній медицині, пов'язані із наявністю персистенції *P. aeruginosa*. Епізоотична та епідемічна ситуація щодо *P. aeruginosa* у світі напружена у зв'язку із швидким поширенням антибіотикостійких (карбапенем-резистентних) штамів *P. aeruginosa*. Рівень екстенсивності інфекцій, зумовлених карбапенем-резистентними *P. aeruginosa* у країнах Південної та Східної Європи, Південної Азії та Російської Федерації перетнув 50 % бар'єр.

2. Показано, що біологічні властивості досліджених польових штамів псевдомонад, виділених із різних біотопів, та музейних штамів характеризувались утворенням водорозчинного пігменту піоціаніну у 74 % випадків (44 % ізолятів із раневих поверхонь, 24 % зі сперми кнурів-плідників і 10 % з піхвових змивів свиноматок). 20 % польових штамів, виділених із ґрунту, проявляли атипові властивості і не утворювали піоціанін. Інші 4 % штамів, які не утворювали піоціанін – музейні штами, які ймовірно втратили свої вірулентні властивості внаслідок дисоціації.

3. Виявлено, що максимальною адгезивною активністю характеризувались польові штами *P. aeruginosa*, виділені з біотопів патологічного органічного походження – середній показник адгезії ($4,9 \pm 2,1$). Середньою адгезивною активністю володіли ізоляти, виділені з природних біотопів фізіологічного органічного походження, яка коливалась в межах $2,5 \pm 1,8 - 2,7 \pm 1,5$ та неорганічного походження ($2,2 \pm 1,5$). В групу низькоадгезивних входили музейні штами ($1,3 \pm 1,5$).

4. Виражена антибіотикорезистентність притаманна штамам із високим ступенем адгезивності, на відміну від музейних штамів, найбільш чутливих до протимікробних препаратів. З урахуванням цих даних виявлено прямий кореляційний зв'язок між середнім показником адгезії та резистентністю виділених ізолятів *P. aeruginosa* до антибіотиків із коефіцієнтом кореляції $r=0,75$ ($p \leq 0,001$). Отриманий зв'язок між адгезією та антибіотикорезистентністю дає змогу кваліфікувати штами *P. aeruginosa* як потенційно патогенні на основі їх схильності до адгезії.

5. Отримано діагностичну антисироватку та імуноглобулін, які були використані під час конструювання трансдюсера (чіпу) імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу для експрес-індикації *P. aeruginosa*. Робочий титр імуноглобуліну складав 1:1280.

6. Встановлено що універсальною модифікацією робочої поверхні трансдюсера імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу є використання поліаліаміну гідрохлориду і сенсibiliзація антитіл за допомогою білку А *Staphylococcus aureus*, що сприяє формуванню на поверхні чіпу багаточислової (тривимірної) розгалуженої структури з антитіл за допомогою

поліелектролітів, таким чином підвищуючи адсорбційну здатність трансдюсера. Імобілізація антитіл супроводжувалась зміною резонансного кута в межах 850–1900 кутових секунд.

7. Досліджено, що чутливість відгуку знаходилась в межах 10^1 – 10^3 кл./см³, в той час, як чутливість інших методик попередньої обробки трансдюсера становить від 10^2 кл./см³. Чутливість імуносенсора з використанням моношару антитіл, сформованого на невикритій поверхні золота становила від 1000 кл./см³.

8. Калібрування елементів системи та приладу «Плазмон – б» продемонструвало, що відгук (мінімальне фіксоване значення кута рефракції) становить від 1000 RU, робочий титр сироватки дозволяє виявити мінімальну порогову кількість – 10 – 10^3 кл./см³.

9. Результати перевірки ефективності розробленого чіпа для індикації *P. aeruginosa* в дослідних (реальних) зразках дозволили встановити високу специфічність імуноаналізу методом поверхневого плазмонного резонансу. При порівнянні даних, отриманих при дослідженні реальних зразків класичним бактеріологічним методом та методом імуносенсорного аналізу, вірогідної різниці виявлено не було. Результати індикації *P. aeruginosa* методом поверхневого плазмонного резонансу підтверджують коректність використання експрес-методу і необхідність його запровадження у практичних умовах.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Розроблено метод експрес-індикації *P. aeruginosa* методом поверхневого плазмонного резонансу, розроблено спосіб експрес-визначення *Pseudomonas aeruginosa* (патент України на корисну модель «Спосіб експрес-визначення *Pseudomonas aeruginosa*»).

2. Запропоновано метод підготовки поверхні трансдюсера (чіпа) імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу для ефективної сенсibiliзації бактерійними антитілами (методичні рекомендації «Біосенсорний контроль бактеріального забруднення середовища». Розглянуто та затверджено вченою радою факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України від 23 листопада 2015 року, протокол № 4).

3. Результати досліджень рекомендовано використовувати в освітньому процесі вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації за спеціальністю «Ветеринарна медицина» під час вивчення дисциплін «Ветеринарна мікробіологія та імунологія», «Загальна і спеціальна профілактика», «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Ветеринарна санітарія та гігієна», «Гігієна і санітарія харчових виробництв», «Загальна ветеринарна та фітосанітарна превенція».

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Розділ монографії

1. Starodub M., Ogorodniichuk J., **Novgorodova O.** Efficiency of Instrumental Analytical Approaches at the Control of Bacterial Infections in Water, Foods and Feed. Biosensors for Security and Bioterrorism Applications. Advanced Sciences and Technologies for Security Applications. Edited by Dimitrios P. Nikolelis. Springer, 2016. P. 199–231. *(Здобувачем проведено аналіз літературних даних, експериментальні дослідження та взято участь у підготовці матеріалів до друку).*

Стаття у науковому фаховому виданні України

2. Новгородова О. Ю. Залежність антибіотикорезистентності від адгезії у *Pseudomonas aeruginosa* виділених від свиней. Вісник Житомирського національного агроекономічного університету. 2015. № 1 (49). Т. 3. С. 121–125.

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

3. **Новгородова О. Ю.**, Стародуб М. Ф Розробка імунобіосенсорної тест-системи для експрес-діагностики *Pseudomonas aeruginosa*. Біологія тварин. 2016. №. 3. Т. 18. С. 66–70. *(Здобувач провела дослідження з розроблення імунобіосенсорної тест-системи для експрес-діагностики *Pseudomonas aeruginosa*, узагальнила отримані результати та підготувала статтю до друку).*

4 **Новгородова О. Ю.**, Стародуб М. Ф., Ушкалов В. О. Експрес-визначення патогенних бактерій на основі імунобіосенсорної тест-системи. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2016. Вип. 1 (127). С. 82–87. *(Здобувач провела дослідження з експрес-визначення патогенних бактерій на основі імунобіосенсорної тест-системи, аналіз одержаних даних та підготувала матеріали до друку).*

5. **Novgorodova O.**, Starodub M., Ushkalov V. Immunosensors for the express detection of antibiotic resistant bacterial pathogens. Journal for Veterinary Medicine, biotechnology and Biosafety. 2016. Vol. 2. Issue. 3. P. 23–29. *(Здобувачем проведено аналіз літературних даних, лабораторні дослідження та підготовлено матеріали до друку).*

6. **Новгородова О. Ю.**, Стародуб М. Ф., Ушкалов В. О. Підготовка компонентів селективної поверхні трансдюсера імунного біосенсора для індикації *Pseudomonas aeruginosa*. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького. 2017. Т. 19. № 77. С. 190–193. *(Здобувач проводила імунізацію кролів, відбирала імунову сироватку та підготувала компоненти селективної поверхні трансдюсера імунного біосенсора для індикації *Pseudomonas aeruginosa*, провела аналіз одержаних даних та підготувала матеріали до друку).*

7. **Новгородова О. Ю.**, Ушкалов В. О., Мазур Т. В. Особливості епідемічної та епізоотичної ситуації щодо *Pseudomonas aeruginosa*:

[електронний ресурс]. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2017. № 3 (67). Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/issue/view/348> (Здобувач проаналізувала дані стосовно епідемічної та епізоотичної ситуації щодо *Pseudomonas aeruginosa* та підготувала матеріали до друку).

Науково-методичні рекомендації

8. **Новгородова О. Ю.**, Огороднійчук Ю. О., Стародуб М. Ф. Біосенсорний контроль бактеріального забруднення середовища: [науково-методичні рекомендації]. К, 2016. 17 с. (Затверджено вченою радою факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 4 від 23 листопада 2015 року. Здобувач брала участь у виготовленні специфічної сироватки та імуноглобуліну, підборі оптимальних характеристик сенсibiliзації поверхні трансдюсера, проведенні експериментальних досліджень з визначення бактерії *Pseudomonas aeruginosa*, узагальненні результатів, підготовці і написанні рекомендацій).

Патент України на корисну модель

9. **Новгородова О. Ю.**, Стародуб М. Ф., Ушкалов В. О. Патент України на корисну модель 106886, МПК: G01N 33/553, A61K 39/104, C07K 16/08. Спосіб експрес-визначення *Pseudomonas aeruginosa*; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів та природокористування України. № и 201511146; заявлено 13.11.2015; опубліковано 10.05.2016; Бюл. № 9. (Здобувач проводила розроблення принципу корисної моделі, патентний пошук, виконала експериментальну частину щодо експрес-визначення *Pseudomonas aeruginosa* та підготувала матеріали до патентування).

Тези наукових доповідей:

10. **Новгородова О. Ю.**, Мазур Т. В. Виготовлення гіперімунних сироваток проти *Pseudomonas aeruginosa*. Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва: XIV Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу та аспірантів, присвячена 95-річчю факультету ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва, м. Київ, 21–22 травня 2015 року: тези доповіді. 2015. С. 101. (Здобувач отримала гіперімунні сироватки проти *Pseudomonas aeruginosa*, провела статистичну обробку одержаних результатів, їх інтерпретацію та підготувала матеріали до друку).

11. Новгородова А. Ю. Экологические аспекты бактерий рода *Pseudomonas* на территории Украины. Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков: V Международная научно-практическая конференция, г. Новосибирск, 21 марта 2014 года: тезисы доклада. Новосибирск, 2014. С. 248–252. (Здобувачем проведено наукові дослідження та їх аналіз, підготовлено матеріали до друку).

12. **Новгородова О. Ю.**, Стародуб М. Ф., Ушкалов В. О., Мазур Т. В. Експрес-індикація *Pseudomonas aeruginosa* тварин. Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини: XV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, м. Львів, 8–9 грудня 2016 року: тези доповіді. Львів, 2016. С. 170. (Здобувач провела дослідження з експрес-індикації *Pseudomonas aeruginosa* тварин, аналіз одержаних результатів, їх інтерпретацію та підготувала матеріали до друку).

13. **Новгородова О. Ю.**, Стародуб М. Ф., Ушкалов В. О. Імобілізація антитіл *P. aeruginosa* на поверхні імунного біосенсора. Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: щорічна науково-практична конференція молодих вчених, м. Київ, 22 червня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 62. (Здобувач провела імобілізацію антитіл *P. aeruginosa* на поверхні імунного біосенсора, аналіз одержаних результатів, та підготувала матеріали до друку).

АНОТАЦІЯ

Новгородова О. Ю. Експрес-індикація *P. aeruginosa* методом поверхневого плазмонного резонансу. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2018.

Дисертацію присвячено розробленню методики експрес-індикації *P. aeruginosa* методом поверхневого плазмонного резонансу, вивченню факторів ризиків у тваринництві та гуманній медицині, пов'язаних із персистенцією *P. aeruginosa*, вивченню біологічних властивостей ізолятів, дослідженню зв'язку адгезивних властивостей штамів *P. aeruginosa* з антибіотикорезистентністю.

Отримано діагностичну антисироватку та імуноглобулін, які було використано під час конструювання трансдюсера (чіпу) імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу для експрес-індикації *P. aeruginosa*.

В результаті проведення досліджень сенсibiliзації трансдюсера імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу, виявлено, що за умов обробки поверхні чіпу поліаліламін гідрохлоридом чутливість відгуку імуносенсора знаходилась в межах 10^1 – 10^3 кл./см³, тоді як чутливість інших методик попередньої обробки трансдюсера становить від 10^2 кл./см³. Чутливість імуносенсора з використанням моношару антитіл, сформованого на невикритій поверхні золота становила від 1000 кл./см³.

Калібрування елементів системи та приладу «Плазмон – 6» продемонструвало, що відгук (мінімальне фіксоване значення кута рефракції) становить від 1000 RU, робочий титр сироватки дозволяє виявити мінімальну порогову кількість – 10^1 – 10^3 кл./см³.

При порівнянні даних, отриманих при дослідженні дослідних зразків біоматеріалів класичним бактеріологічним методом посіву та методом імуносенсорного аналізу, вірогідної різниці виявлено не було.

Вперше розроблено імуносенсорну тест-систему на основі поверхневого плазмонного резонансу для експрес-індикації *P. aeruginosa*, з можливістю здійснювати реєстрацію наявності бактерій в біоматеріалі в межах 10 мікробних клітин в 1 см³.

Ключові слова: *P. aeruginosa*, поверхневий плазмонний резонанс, імуносенсор, антибіотикорезистентність, адгезивні властивості, мікроорганізми.

АНОТАЦІЯ

Новгородова А. Ю. Экспрес-индикация *P. aeruginosa* методом поверхностного плазмонного резонанса. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена разработке методики экспрес-индикации *P. aeruginosa* методом поверхностного плазмонного резонанса, исследованию факторов рисков, связанных с персистенцией *P. aeruginosa*, изучению связи адгезивных свойств штаммов *P. aeruginosa* с антибиотикорезистентностью.

Установлено, что особенностью эпизоотологии псевдомонады свиней в Украине есть спорадичность и энзоотическое течение, сезонность (высшая инфицированность животных *P. aeruginosa* в Украине отмечается в осенне-зимний период, преимущественно с октября по февраль) и ассоциированный характер инфекции в сочетании с бактериями *E. coli* – в 16 % случаев, *P. vulgaris* – 17 %, *Enterobacter ssp* – 29 %, *S. aureus* – 13 % и *Salmonella ssp* – 13 %. Самый высокий уровень проявления эпизоотического процесса отмечен в свиноводстве в юго-восточном регионе Украины, а именно в Запорожской, Донецкой, Одесской, Луганской и Черкасской областях.

Показано, что биологические свойства исследованных полевых штаммов псевдомонад, выделенных из различных биотопов, и музейных штаммов характеризовались образованием водорастворимого пигмента пиоцианина в 74 % случаев (44 % изолятов с раневой поверхности, 24 % из спермы хряков-производителей и 10 % с влагилищных смывов свиноматок). 20 % полевые штаммы, выделенные из почвы, проявляли атипичные свойства и не образовывали пиоцианин. Остальные 4 % штаммы, которые не образовывали пиоцианин – музейные штаммы, вероятно потеряли свои вирулентные свойства вследствие диссоциации.

Выявлено, что максимальной адгезивной активностью характеризовались полевые штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из биотопов патологического органического происхождения – средний показатель адгезии (4,9±2,1).

Средней адгезивной активностью обладали изоляты, выделенные из природных биотопов обитания физиологического органического происхождения, колебалась в пределах $2,5 \pm 1,8$ – $2,7 \pm 1,5$, и неорганического происхождения ($2,2 \pm 1,5$). В группу низкоадгезивных входили музейные штаммы ($1,3 \pm 1,5$).

Выраженная антибиотикорезистентность присуща штаммам с высокой степенью адгезивности в отличие от музейных штаммов, наиболее чувствительных к противомикробным препаратам. С учетом этих данных выявлена прямая корреляционная связь между адгезией и резистентностью выделенных изолятов *P. aeruginosa* к антибиотикам с коэффициентом корреляции $r=0,75$ ($p \leq 0,001$).

Получено с использованием псевдомонозного O-антигена диагностические антисыворотки, а позже иммуноглобулины, которые были использованы при конструировании индикаторной тест-системы для выявления штаммов *P. aeruginosa* на основе поверхностного плазмонного резонанса. Титр иммуноглобулина – 1:1280.

Определены оптимальные варианты модификации поверхности трансдюсера (сенсорного чипа) для повышения чувствительности и стабильности отклика иммуносенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса. Создание полиэлектролитных дополнительных слоев на поверхности биосенсора способствовало получению более стабильных результатов, чем в случае проведения анализа на немодифицированной поверхности.

Проанализирована эффективность иммобилизации антител к *P. aeruginosa* и на поверхности трансдюсера, покрытой различными химическими агентами (додекантиолом, полиэлектролитами и производными декстрана) для создания функционально стабильных унифицированных чувствительных элементов оптического иммуносенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса.

Оптимизирована методика постановки иммуноанализа на базе поверхностного плазмонного резонанса для экспресс-индикации *P. aeruginosa*. Проведен анализ *P. aeruginosa* в модельных растворах и реальных образцах. В суспензиях минимальная концентрация обнаружения *P. aeruginosa* ($3,9 \pm 0,3$) $\times 10^1$ КУО/мл ($p \leq 0,05$), что превышает чувствительность иммуноферментного анализа.

При исследовании установлено, что данные, полученные классическим микробиологическим методом путем посева и с помощью иммуносенсорного анализа, высокой достоверной разницы не содержали. Результаты определения концентрации *P. aeruginosa* в реальных образцах подтверждают корректность использования экспресс-метода и необходимости его введения в практических условиях.

Имуносенсорная тест-система на основе поверхностного плазмонного резонанса для экспресс-диагностики возбудителя псевдомоноза способна осуществлять регистрацию присутствия бактерий *P. aeruginosa* в биоматериале в пределах 10 микробных клеток в 1 см³.

Ключевые слова: *P. aeruginosa*, поверхностный плазмонный резонанс, иммуносенсор, антибиотикорезистентность, адгезивные свойства, микроорганизмы.

ANNOTATION

Novgorodova O. Ju. Express-indication of *P. aeruginosa* by surface plasmon resonance. – The Manuscript.

The thesis is for degree of candidate of veterinary sciences degree for speciality 16.00.03 «Veterinary microbiology, epizootology, infectious diseases and immunology». National University of Life and environmental sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis is based on the development of express-indication of *P. aeruginosa* by surface plasmon resonance. The main aspects of the researches were devoted to study of the risk factors in livestock and humane medicine related to the persistence of *P. aeruginosa*. The results of morphological, cultural, fermentative and biological properties of tested *P. aeruginosa* isolates were presented.

Regarding the thesis, the connection of the adhesive properties of *P. aeruginosa* with antibiotic resistance has been investigated.

Diagnostic antiserum and immunoglobulin have been obtained, which were used during the design of a transducer (chip) of an immunosensor based on a surface plasmon resonance for rapid detection of *P. aeruginosa*.

As a result of studies of transducer's surface under the conditions of surface treatment of the chip polyalylamine hydrochloride, the sensitivity of the response of the was within 10^1 – 10^3 cells/cm³. Sensitivity of surface plasmon resonance immunosensor using a monolayer of antibodies formed on an uncovered surface of gold was from 1000 cells/cm³.

The calibration of the elements of the system and the "Plasmon-6" device demonstrated that the response (the minimum fixed refractive angle value) is from 1000 RU, the working serum titer can detect a of 10 – 10^3 cells/cm³.

There was no probable difference, comparing the data obtained during the study of experimental samples of biomaterials by the classical bacteriological method of sowing and by the method of immunosensory analysis.

As a results of the researches, surface plasmon resonance immune biosensor test system for the express diagnostics of bacteria *P. aeruginosa* is developed. Statistical significance of the analysis grows sharply with the increasing of concentrations. Linearity of the immunosensor is between 10^1 – 10^6 cells/sm³.

Key worlds: *P. aeruginosa*, surface plasmon resonance, imunosensor, antibiotic resistance, adhesion properties, microorganisms.