

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

**ХОМЕНКО ЯРОСЛАВ ВАСИЛЬОВИЧ**

УДК 619:616.98-073

**НАУКОВО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ  
ДОТ-ІМУНОАНАЛІЗУ ЗА БРУЦЕЛЬОЗУ ТА ЛЕЙКОЗУ  
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

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

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник** доктор ветеринарних наук, професор  
**Скибіцький Володимир Гурійович**,  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України,  
професор кафедри мікробіології, вірусології  
та біотехнології

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук,  
старший науковий співробітник  
**Прискока Віктор Андрійович**,  
Державний науково-дослідний інститут  
з лабораторної діагностики  
та ветеринарно-санітарної експертизи,  
завідувач сектору прогнозування  
науково-дослідного відділу  
епізоотологічного моніторингу

кандидат ветеринарних наук, доцент  
**Радзиховський Микола Леонідович**,  
Житомирський національний  
агроєкологічний університет,  
доцент кафедри мікробіології, фармакології  
та епізоотології

Захист відбудеться «20» грудня 2017 року о 13<sup>00</sup> 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: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «    » листопада 2017 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Незважаючи на стабільне епізоотичне благополуччя щодо бруцельозу тварин, в Україні реєструють поодинокі випадки даного захворювання серед овець, підтверджені факти циркуляції збудника серед диких тварин. Загроза виникнення бруцельозу 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 (Бабкін А. Ф., Обуховська О. В., 2012).

В Україні серед вірусних захворювань сільськогосподарських тварин лейкозу великої рогатої худоби належить одне із провідних місць (Мандигра М. С., 2000). Постійно проводиться інтенсивна робота щодо контролю цієї інфекції, проте проблема поки що остаточно не вирішена. Одним із ефективних заходів боротьби з лейкозом великої рогатої худоби, є постійний серологічний моніторинг із застосуванням ефективних методів лабораторної діагностики (Храмцов В. В., 2006; Ярчук Б. М. 2006; Lanlan Bai etc., 2015).

Удосконалення і використання технології дот-імуноаналізу для розв'язання проблем захворюваності сільськогосподарських тварин на бруцельоз та лейкоз відкриває широкі можливості для науковців та фахівців-практиків, які причетні до охорони здоров'я та життя людини і тварин. Порівняно з відомими класичними методами діагностики зазначених хвороб тварин, дот-імуноаналіз вигідно вирізняється високою чутливістю, простотою постановки реакції, оперативністю отримання результатів і їх інформативністю (Wright P. F. etc., 1997). У ветеринарній медицині подібні діагностикуми майже не використовуються. Саме тому розроблення і впровадження у ветеринарну практику України експрес-діагностикумів на основі дот-імуноаналізу є актуальними.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано в плані реалізації завдань Державної науково-технічної програми (Галузева науково-технічна програма «Здоров'я тварин, якість та безпека тваринницької продукції»), вона є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України «Вивчення *Yersinia enterocolitica* в плані обґрунтування технології отримання якісної та безпечної тваринницької продукції» (номер державної реєстрації 0111U003699, 2011–2015 рр.).

**Мета та завдання дослідження.** Мета роботи полягала в експериментальному обґрунтуванні технології розроблення експрес-діагностикумів на основі дот-імуноаналізу за бруцельозу тварин та лейкозу великої рогатої худоби.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

- проаналізувати поширення бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби в Україні та світі;
- модифікувати методику отримання ліпополісахариду бруцельозного антигену;

- випробувати рекомбінантний видоспецифічний антиген лейкозу великої рогатої худоби;
- розробити методику отримання кон'югату з використанням колоїдного золота та вугілля;
- підібрати матеріали для отримання імуносорбентів (специфічних щодо збудника лейкозу великої рогатої худоби та *Brucella abortus*);
- підібрати біокомпоненти, розчини для експрес-тестів на основі дот-імуноаналізу та оптимізувати умови їх проведення;
- виготовити експериментальні зразки тест-систем на основі розробленої методології дот-імуноаналізу за бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби, визначити параметри їхньої чутливості та специфічності;
- розробити методику дот-імуноаналізу для диференціації антитіл, специфічних щодо *B. abortus* та збудника ієрсиніозу.

*Об'єкт дослідження* – дот-імуноаналіз за бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби.

*Предмет дослідження* – експериментальне обґрунтування технології отримання діагностикумів на основі дот-імуноаналізу за бруцельозу і лейкозу великої рогатої худоби.

**Методи дослідження:** молекулярно-біологічні (електрофорез у поліакріламідному гелі, полімеразна ланцюгова реакція); нанобіотехнологічні (відновлення золотохлорводневої кислоти до наночастинок золота та кон'югація їх із білком G *Streptococcus spp.*); імунологічні (дот-імуноаналіз, непрямий імуноферментний аналіз); мікробіологічні (мікроскопія, культивування мікроорганізмів); математичні (статистичні) (опрацювання експериментальних даних проведено із використанням відповідних рекомендацій та програмного комплексу Microsoft Excel).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше в Україні розроблено технологію одержання кон'югату рекомбінантного білка G *Streptococcus spp.* та колоїдного вугілля; вперше в Україні отримано кон'югат білка G *Streptococcus spp.* та колоїдного золота; удосконалено технологію отримання ліпополісахариду антигену збудника бруцельозу; обґрунтовано доцільність використання рекомбінантних антигенів p24 та gp51 в якості компонентів діагностикумів за лейкозу великої рогатої худоби; оптимізовано умови постановки дот-імуноаналізу за бруцельозу тварин та лейкозу великої рогатої худоби; розроблено оригінальну методику дот-імуноаналізу, яка дозволяє диференціювати бруцельоз від ієрсиніозу тварин (*патент України на корисну модель № 117672*).

**Практичне значення одержаних результатів.** Діагностичні тест-системи дот-імуноаналізу, сконструйовані на базі експериментально обґрунтованої технології отримання компонентів та методики постановки імунологічної реакції, можуть бути використані з метою зажиттєвої діагностики бруцельозу у різних видів тварин і лейкозу у великої рогатої худоби. Вони не потребують коштовного інструментального обладнання і можуть бути застосовані у польових умовах. Отримані результати можуть бути методологічною основою у

процесі розроблення діагностичних тест-систем із новим підходом до традиційної постановки дот-імуноаналізу у разі інших захворюваннях тварин.

Розроблено і впроваджено «Методичні рекомендації з диференціації антитіл, специфічних щодо збудників ієрсиніозу (*Yersinia enterocolitica*) та бруцельозу (*Br. abortus*)» (Хоменко Я. В., Козловська Г. В., 2017).

Результати досліджень, що наведені у дисертації, впроваджено у навчальну програму під час викладення дисципліни «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин» при підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальністю «Ветеринарна медицина» у Житомирському національному агроекологічному університеті.

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно організовано та проведено науково-практичні експерименти, здійснено пошук інформації за темою дисертації та детальний її аналіз. За методичною та консультативною допомогою наукового керівника доктора ветеринарних наук, професора В. Г. Скибіцького виконано, проаналізовано та узагальнено весь обсяг досліджень, сформульовано наукові висновки і пропозиції виробництву. У статтях, написаних у співавторстві, реалізовано результати експериментальних досліджень здобувача.

Частину експериментальних і виробничих досліджень проведено разом із науковими співробітниками кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України (кандидатом біологічних наук Д. Л. Мартиненком, кандидатом ветеринарних наук, доцентом Г. В. Козловською, аспірантами Д. Ю. Рибальченком та Ю. В. Бреус), а також завідувачем відділу Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК НУБіП України доктором сільськогосподарських наук В. Г. Спиридоновим, які є співавторами опублікованих за матеріалами дисертації наукових праць.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертаційної роботи було апробовано та одержали позитивні відгуки на засіданнях кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології НУБіП України, науково-практичних конференціях і наукових семінарах (м. Київ, 2011–2014 рр.).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 7 наукових праць, з яких 4 статті у наукових фахових виданнях України, стаття у науковому виданні іншої держави, методичні рекомендації, патент України на корисну модель.

**Структура та обсяг та дисертації.** Дисертацію викладено на 136 сторінках комп'ютерного тексту, вона містить анотації, вступ, огляд літератури, загальну методику та основні методи досліджень, результати експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, пропозиції виробництву, список використаної літератури і додатки. Робота ілюстрована 12 таблицями та 22 рисунками. Список використаних джерел містить 133 найменування, у тому числі 103 латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Експериментальну частину роботи, апробацію та виробничу перевірку результатів досліджень проводили упродовж 2011–2017 рр. на базі проблемної лабораторії ветеринарної мікробіології, вірусології та імунобіотехнології, що функціонує при кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України. Окремі дослідження виконано у відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК НУБіП України та Інституті ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України (ІВМ НААН).

Під час проведення досліджень було використано сучасні методи діагностики бруцельозу тварин та лейкозу великої рогатої худоби; проведено серологічні та експериментальні дослідження. Технологічні етапи розроблення тест-систем на основі дот-імуноаналізу для діагностики бруцельозу тварин та лейкозу великої рогатої худоби проводили відповідно до міжнародних стандартів, використовуючи всі необхідні засоби індивідуального захисту в лабораторії *BSL-2*, атестованій на проведення діагностичних досліджень за ДСТУ *ISO/IEC 17025*.

Матеріалом для досліджень були: інактивована стандартизована культура бруцел із штаму *Brucella abortus 19*, що входить до складу комерційного препарату «Антиген бруцельозний єдиний для РА, РЗК, РТЗК»; рекомбінантний видоспецифічний антиген збудника лейкозу великої рогатої худоби, рекомбінантний білок *G Streptococcus spp.*, отримані від доктора сільсько-господарських наук В. Г. Спиридонова у рамках творчого договору; позитивні та негативні щодо бруцельозу тварин і лейкозу великої рогатої худоби референс-сироватки, отримані з МЕБ референс-центру (Великобританія); позитивний на лейкоз великої рогатої худоби референс-стандарт Е 05 (Німеччина); сироватки крові тварин із господарств ряду областей України (Київської, Вінницької, Житомирської); сироватки крові кролів, гіперімунізованих різними сироварами збудника ієрсиніозу (надані доцентом Г. В. Козловською); кон'югати імуноферментні на основі рекомбінантного білка *G Streptococcus spp.*, кон'югованого з пероксидазою хрону, та кон'югати цього ж білка із золем золота і вугіллям.

Під час розроблення дот-імуноаналізу на бруцельоз використовували високоочищений специфічний антиген, отриманий із клітин *Brucella abortus* за рекомендованою МЕБ технологією в модифікації. Було оптимізовано параметри центрифугування, температурний режим тощо, що дозволило збільшити, у порівнянні із класичною методикою, отримання бруцельозного антигену з високими показниками чутливості та специфічності.

Білковий склад антигену збудника лейкозу великої рогатої худоби визначали за допомогою електрофорезу в денатуруючих умовах за методом U. K. Laemmli (1970) (рис. 1).

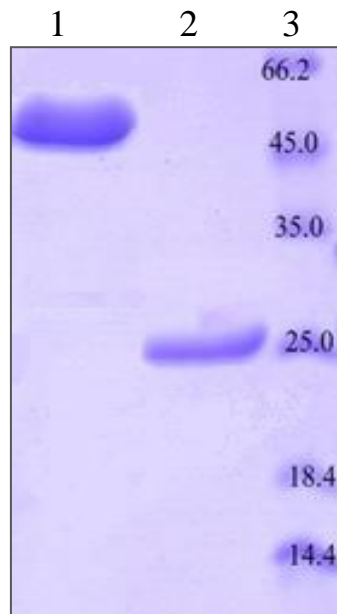


Рис. 1 Електрофореграма лейкозного антигену: 1 – глікопротеїн gp51; 2 мг/мл; 2 – протеїн p24, 1 мг/мл; 3 – маркер молекулярної маси білків, kDa.

Аналіз результатів проведення електрофорезу лейкозного антигену показав відповідність молекулярної маси білків заявленим параметрам. Спостерігали два протеїни з молекулярними масами 24 та 51 kDa, які були без сторонніх домішок.

Специфічність імуноферментного кон'югату на основі рекомбінантного стрептококового білка G та пероксидази хрому перевіряли в непрямому твердофазному імуноферментному аналізі.

Під час постановки імуноферментного аналізу для розведення сироваток крові використовували фосфатно-сольовий розчин, що містив 5 % сухого знежиреного молока та 0,05 % *Tween-20*. Промивали лунки полістиролового планшету за допомогою фосфатно-сольового буферу з концентрацією *Tween-20* – 0,05 %. Робоче розведення для сироваток крові, антигену та імуноферментного кон'югату під час проведення імуноферментного аналізу визначали за допомогою титрування. Із сироватками крові інкубували 60 хв у термостаті за 37 °С, з кон'югатом 30 хв за аналогічних температурних умов. Реакцію проявляли, використовуючи розчин хромогену тетраметилбензидину, який вносили по 100 мкл у кожен лунку та інкубували упродовж 30 хв за 18–25 °С у темному місці.

Якість кон'югатів білка G *Streptococcus spp.*, поєднаного з колоїдним золотом або колоїдним вугіллям, перевіряли в дот-імуноаналізі.

Під час постановки дот-імуноаналізу в якості імуносорбенту використовували листовий білий полістирол (HIPS) у вигляді гребінців із зубцями. На кожен зубець наносили відповідний антиген у попередньо підібраній титруванням концентрації.

Оптимальне розведення сироваток крові та імуноферментного кон'югату визначали титруванням.

Імуносорбент інкубували 20 хв за кімнатної температури із сироватками крові, розведеними 1/10 у буфері для зразків (фосфатно-сольовий буфер із додаванням 0,75 % желатини, 2,5 М сечовини і 0,01 % бензойної кислоти). Після закінчення інкубації імуносорбент двічі відмивали дистильованою водою та занурювали в робоче розведення кон'югату, інкубували 20 хв за кімнатної температури. Потім двічі відмивали його дистильованою водою. Оцінку аналізу проводили візуально за інтенсивністю забарвлення місць нанесення антигену, а також за допомогою розробленого програмного забезпечення «Епіскрин АВ».

Під час проведення дот-імуноаналізу з використанням кон'югату на основі білка G та пероксидази хрому додатково проводили інкубацію із хромогеном – преципітуючим тетраметилбензидином (ТМВ-Precip).

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

**Поширення бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби в Україні та світі.** Бруцельоз тварин надзвичайно розповсюджений у світі, особливо в країнах Середнього Сходу, Середземноморському регіоні, на півдні Сахари в Африці, в Китаї, Індії, Перу і Мексиці. Відмічають зростання нових випадків захворювання в країнах Центральної і Південно-Західної Азії.

В Україні бруцельоз практично ліквідовано. Реєструють лише поодинокі випадки захворювання серед овець. Підтверджені факти циркуляції збудника в Україні серед диких тварин.

Лейкоз великої рогатої худоби реєструється в багатьох країнах світу, особливо в країнах з високорозвиненим молочним тваринництвом (Аргентина, Бразилія, Канада, Чилі, Колумбія, Ізраїль, Японія, Південна Корея, Нікарагуа, Російська Федерація, Україна, США та ін.). В Україні станом на початок 2017 року виявлено 1664 тварин хворих на лейкоз великої рогатої худоби у Харківській і Житомирській областях.

**Отримання компонентів для дот-імуноаналізу за лейкозу та бруцельозу.** Під час розроблення дот-імуноаналізу на бруцельоз використовували високоочищений специфічний антиген – ліпополісахарид, отриманий із клітин *B. abortus*.

Під час розроблення діагностичної тест-системи на лейкоз великої рогатої худоби використовували суміш рекомбінантних видоспецифічних антигенів вірусу лейкозу. Вона містила два рекомбінантних білки – p24 і gp51 (співвідношення 1:1).

Діагностичні характеристики антигенів збудника лейкозу великої рогатої худоби та бруцельозу тварин визначали в непрямому твердофазному імуноферментному аналізі.

У разі застосування в імуноферментному аналізі бруцельозного ліпополісахариду відмічали незначну неспецифічну взаємодію останнього з антитілами до *Yersinia enterocolitica* 0:9. Це не вплинуло на визначення кінцевого результату і сироватки крові тварин, хворих на ієрсиніоз, були віднесені до негативних на бруцельоз.



Очищений бруцельозний антиген взаємодіяв із позитивними на бруцельоз сироватками та не мав неспецифічних взаємодій із сироватками крові здорових тварин.

Застосування специфічних протеїнів p24 і gp51 збудника вірусу лейкозу (співвідношення 1:1) у непрямому варіанті імуноферментного аналізу забезпечило високу чутливість та специфічність (до 100 %) даного методу, які у разі дослідженні 950 проб сироваток крові великої рогатої худоби були на рівні з полімеразною ланцюговою реакцією.

Для отримання імуноферментного кон'югату на основі рекомбінантного стрептококового білка G та пероксидази хрому застосовували періодатний метод Р. К. Nakane and А. Kawaoi (1974) у нашій модифікації.

За виготовлення кон'югату білка G, поєднаного з колоїдним золотом, необхідно було спочатку отримати золь золота. Це здійснювали за допомогою методу Френса (1973) в модифікації. Процес відновлення золотохлорводневої кислоти цитратом натрію повторювали 6 разів. Після чого проводили спектрометрію отриманих зразків. Результати показали, що досліджувані зразки мають незначне коливання концентрації  $0,96 \pm 2$  % оптичних одиниць (рис. 2).

Зв'язували колоїдне золото з білком G за класичною методикою G. T. Hermanson зі співавторами (1996).

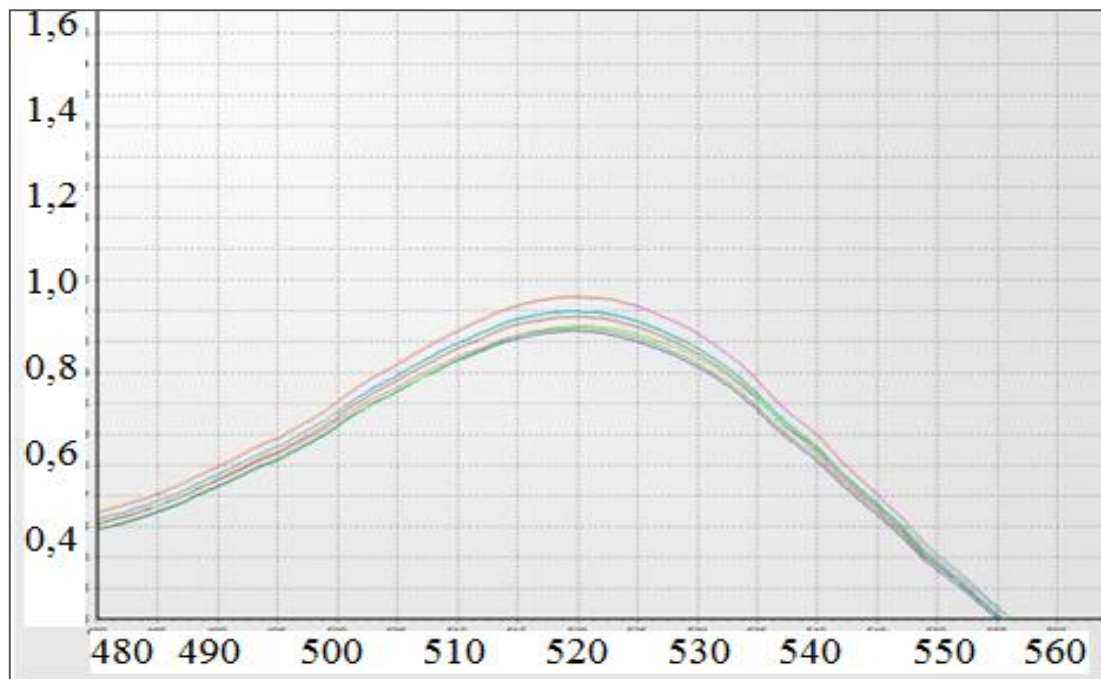


Рис. 2 Спектрограма зразків золь, отриманих шляхом відновлення  $\text{H[AuCl}_4$  цитратом натрію

Кон'югат білка G, міченого колоїдним вугіллям, отримували за власною методикою. Білок G поєднується з колоїдним вугіллям внаслідок фізичної адсорбції та міцно утримується. Стабілізували отриманий кон'югат 10 % сахарозою.

Комерційні тест-системи на основі дот-імуноаналізу, як правило, комплектуються вторинними антитілами, поміченими ензимною міткою та

тетраметилбензидином преципітуючим. У процесі удосконалення дот-імуноаналізу було замінено ензимний кон'югат вторинних антитіл кон'югатами білка G *Streptococcus spp.*, які можуть зв'язувати Fc-фрагменти імуноглобулінів тварин багатьох видів (табл. 1). За афінністю кон'югати білка G не поступаються вторинним видоспецифічним антитілам; використання білка G, отриманого в бактеріальних системах експресії, з економічної точки зору є більш доцільним у порівнянні з методологією отримання моноклональних або поліклональних антитіл.

Таблиця 1

**Реактивність кон'югатів на основі білка G з Ig G різних видів тварин**

Антитіла	PrG-золото	PrG-вугілля	PrG-пероксидаза хрому
Великої рогатої худоби	+++	+++	+++
Свині	+++	+++	+++
Коня	++	++	++
Кроля	+++	+++	+++
Людини	+++	+++	+++
Курки	–	–	–
Миші	+++	+++	+++

Примітки: +++ – добре зв'язування з імуноглобулінами; ++ – незначне зв'язування з імуноглобулінами; – – відсутнє зв'язування з імуноглобулінами.

У процесі оптимізації дот-імуноаналізу, з метою зменшення тривалості постановки реакції та економічно ефективного виробництва тест-системи ензимна мітка кон'югату була замінена на колоїдне золото і колоїдне вугілля. Ми виготовили та випробували два різновиди кон'югатів – рекомбінантний білок G, поєднаний із колоїдним золотом, та білок G, поєднаний із колоїдним вугіллем. Використання даних кон'югатів показало, що воно є специфічними, зв'язувались лише з гомологічними антитілами, та були індиферентними відносно компонентів імуносорбенту. До переваг отриманих кон'югатів можна також віднести можливість їх використання за діагностики сироваток крові різних видів тварин: вони з однаковою афінністю (+++) зв'язуються з Ig G сироваток крові великої рогатої худоби, свині, кроля, миші, людини.

Отримані дані дозволили застосовувати кон'югати на основі рекомбінантного білка G *Streptococcus spp.* із золем золота та вугілля для конструювання діагностичних тест-систем на бруцельоз тварин та лейкоз великої рогатої худоби. Це дозволяє виявляти протибруцельозні та протилейкозні антитіла в сироватках крові тварин різних видів, використовуючи лише один тип кон'югату.

Оптимізація умов постановки тест-системи показала, що іммобілізацію антигенів доцільно проводити шляхом фізичної адсорбції під час висихання нанесених краплин сорбційної суміші. Це значно спрощує технологію і тривалість виготовлення імуносорбентів. Найбільш інтенсивне зв'язування

відбувалось на білому листовому полістиролі (HIPS) у разі сорбції бруцельозного та лейкозного антигенів за умови використання карбонатно-бікарбонатного буфера рН 9,6 (табл. 2).

Таблиця 2

**Оцінка умов іммобілізації бруцельозного антигену на імуносорбенті**

Матеріал імуносорбента	Листовий білий полістирол (HIPS)		Синтетичний папір «Polyolith»GC-3		Листовий полівінілхлорид (ПВХ)	
	Висушування	Волога камера	Висушування	Волога камера	Висушування	Волога камера
КББ 0,05М, рН 9,6	++++	++++	++	+++	+	++
Боратний буфер 0,01М, рН 8,7	+++	+++	+++	+++	+	++

Результати, отримані за використання 0,01М боратного буфера з рН 8,7, виявились незадовільними. На всіх трьох носіях імуносорбентів контрастність специфічних сигналів була нижчою, ніж у разі іммобілізації антигену за використання 0,05М карбонатно-бікарбонатного буфера (рН 9,6). Ознак неспецифічності під час дослідження негативних сироваток крові не виявили.

Порівнюючи полістирол, синтетичний папір і полівінілхлорид, результати істотно відрізнялись (рис. 3). На полівінілхлориді спостерігали «забруднення» гребінця, внаслідок взаємодії кон'югату з компонентами самого імуносорбента. Синтетичний папір також мав подібні недоліки. На білому листовому полістиролі (HIPS) постійно отримували чіткі результати постановки дот-імуноаналізу, ознак неспецифічної взаємодії з ним компонентів імуноаналізу не виявили.



Рис. 3 Результати постановки дот-імуноаналізу за використання імуносорбентів, виготовлених з різних матеріалів

Методом титрування було встановлено, що оптимальним розведенням білкового лейкозного антигену для сорбції на листовий полістирол є

концентрація 5 мкг/мл, а для ліпополісахариду бруцельозного антигену – розведення 1:200.

Імобілізацію антигену проводили на карбонатно-бікарбонатному буфері за допомогою автоматичного мікродозатора окремими плямами діаметром близько 3 мм на кожен зубець гребінця та сушили за кімнатної температури +18 ... +25 °С).

Оптимальне розведення сироваток крові тварин як для бруцельозної, так і для лейкозної діагностичних тест-систем у разі використання обох варіантів кон'югатів становить 1:10. Дане розведення забезпечує виявлення антитіл у слабопозитивних референс-сироватках за відсутності фону у разі використання негативних сироваток.

У результаті серії досліджень було встановлено, що оптимальним для розведення зразків сироваток крові є фосфатно-сольовий буфер із вмістом 0,75 % желатини, 2,5 М сечовини і 0,01 % бензойної кислоти (рН 7,2–7,4). У разі використання останнього результати постановки дот-імуноаналізу були коректними, повністю зникали ознаки неспецифічної взаємодії імунокомпонентів (фонове забарвлення негативних референс-сироваток) (рис. 4).

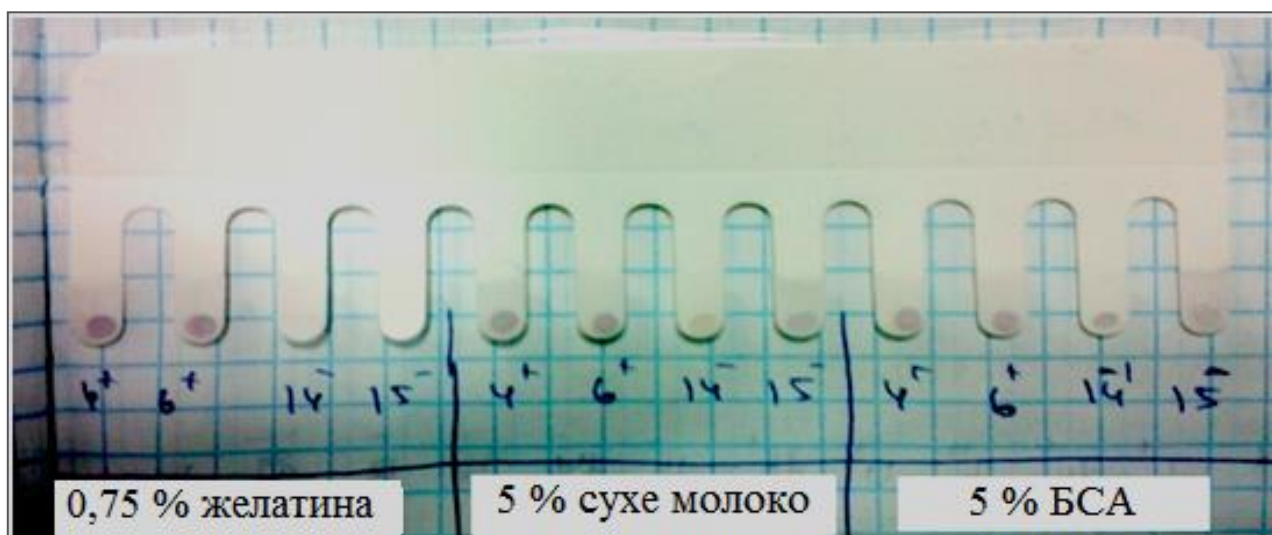


Рис. 4 Результати постановки дот-імуноаналізу на лейкоз за використання різних розчинів для розведення сироваток крові (кон'югат-колоїдне золото з білком G)

Вирішальним етапом роботи було визначення чутливості, специфічності та відтворюваності удосконалених тест-систем. Було проведено випробування модифікованих тест-систем на внутрішньовиробничих панелях сироваток крові, до складу яких входили позитивні та негативні референс-сироватки МЕБ (Великобританія) та сироватки крові вільних від інфекційних захворювань тварин із господарств різних областей України. Провівши необхідні розрахунки було встановлено, що чутливість та специфічність тест-систем на основі дот-імуноаналізу для діагностики бруцельозу та лейкозу складає 100 %.

З метою визначення відтворюваності вираховували коефіцієнт варіації (CV) під час дослідження слабопозитивних референс-сироваток крові на бруцельоз

тварин та лейкоз великої рогатої худоби у 10 повторях, відповідно у бруцельозній та лейкозній системах за використання обох видів кон'югатів. Числові значення під час постановки дот-імуноаналізу одержували за допомогою програмного забезпечення «Епіскрин АВ» (рис. 5).

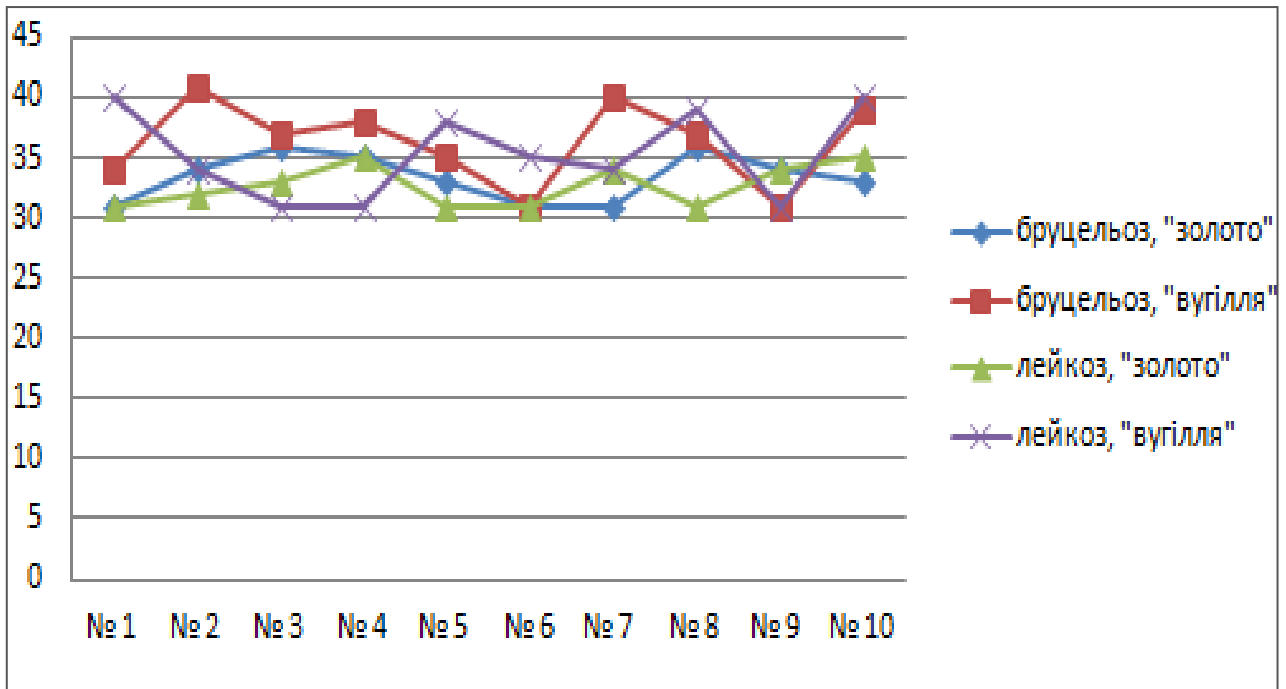


Рис. 5 Варіації результатів постановки дот-імуноаналізу при бруцельозі та лейкозі (програмне забезпечення «Епіскрин АВ»)

Було отримано наступні результати за перевірки тест-систем:

- для діагностики бруцельозу, кон'югат білок G-колоїдне золото CV=5,1 %;
- для діагностики бруцельозу, кон'югат білок G-колоїдне вугілля CV=8,8 %;
- для діагностики лейкозу великої рогатої худоби, кон'югат білок G-колоїдне золото CV=5,4 %;
- для діагностики лейкозу великої рогатої худоби, кон'югат білок G-колоїдне вугілля CV=7,9 %.

Аналізуючи отримані результати, встановлено, що відтворюваність розроблених діагностиків відповідає вимогам, які накладено для тест-систем даного типу (CV<10 %).

**Порівняння удосконаленого дот-імуноаналізу та роз-бенгал проби за дослідження тварин на бруцельоз.** У порівняльних експериментах застосовували 10 високопозитивних сироваток на бруцельоз, 5 – слабопозитивних та 10 – негативних.

Під час постановки роз-бенгал проби було відзначено високу специфічність препарату антигену, однак чутливість була низькою. У лунках із високопозитивними сироватками відмічено виражену аглютинацію, але серед слабопозитивних сироваток одна спрацювала як негативна, а одна дала

сумнівний результат. Жодна з негативних референс-сироваток не прореагувала (табл. 3).

Таблиця 3

### Результати постановки роз-бенгал проби

Сильнопозитивні на бруцельоз референс-сироватки крові (МЕБ)										
№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	поз.	поз.	поз.	поз.	поз.	поз.	поз.	поз.	поз.	поз.
Слабопозитивні на бруцельоз референс-сироватки крові (МЕБ)										
№	11	12	13	14	15					
	поз.	сумн.	поз.	поз.	нег.					
Негативні на бруцельоз референс-сироватки крові (МЕБ)										
№	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
	нег.	нег.	нег.	нег.	нег.	нег.	нег.	нег.	нег.	нег.

Під час постановки дот-імуноаналізу чутливість та специфічність удосконаленої тест-системи за використання обох видів кон'югатів задовольняли необхідні вимоги. Як високо- так і слабопозитивні на бруцельоз референс-сироватки крові визначались в обох випадках як позитивні (рис. 6). Під час постановки дот-імуноаналізу з негативними референс-сироватками неспецифічних результатів не було виявлено.



Рис. 6 Результати постановки дот-імуноаналізу з слабопозитивними референс-сироватками (Міжнародне епізоотичне бюро)

Використання в дот-імуноаналізі кон'югату білку G із колоїдним золотом або колоїдним вугіллям суттєво підвищило чутливість та специфічність даного методу діагностики.

**Порівняння удосконаленого дот-імуноаналізу з реакцією імунодифузії та полімеразною ланцюговою реакцією під час дослідження на лейкоз великої рогатої худоби. З метою апробації розробленого методу дот-**

імуноаналізу експрес-діагностики лейкозу великої рогатої худоби було проведено дослідження сироваток крові великої рогатої худоби з господарств Київської, Вінницької та Житомирської областей України кількістю 950 проб. Сироватки крові також було перевірено методом полімеразної ланцюгової реакції та за допомогою реакції імунодифузії.

У результаті аналізу проведених досліджень було встановлено, що серед 950 проб сироваток крові 145 прореагували як позитивні, що становить 15,2 %, а негативними виявились 805 – 84,7 %. Візуальні результати було підтверджено також й інструментально. Позитивні показники отримані за допомогою сканеру і опрацьовані в комп'ютерній програмі «Епіскрин АВ» мали наступні числові значення (табл. 4). Абсолютний результат в «Епіскрин АВ» для сироваток крові, які прореагували як негативні був в діапазоні значень 9–30.

Таблиця 4

**Результати зразків сироваток крові  
позитивних на лейкоз великої рогатої худоби**

Абсолютний результат в «Епіскрин АВ»	Кількість проб сироваток крові
31–41	50
42–72	62
73–91	33

На наступному етапі усі зразки сироваток крові було перевірено за допомогою реакції імунодифузії. На відміну від дот-імуноаналізу, як позитивні прореагували лише 141 проба (14,8 %), а 809 (85,1 %) – було віднесено до негативних. Зразки сироваток крові, які специфічно прореагували в реакції імунодифузії, так само були позитивними і в дот-імуноаналізі. Аналіз результатів засвідчив недостатню чутливість методу реакції імунодифузії для діагностики лейкозу великої худоби, але специфічність була високою.

Як арбітражний метод застосовували полімеразну ланцюгову реакцію. Результатами проведених досліджень було доведено, що всі сироватки крові великої рогатої худоби, які були позитивними в дот-імуноаналізі, так само були позитивними і у ПЛР-аналізі. Відзначали також повну відповідність і за негативними результатами.

**Розробка методики дот-імуноаналізу для диференціації антитіл, специфічних щодо збудників бруцельозу (*Brucella abortus*) та ієрсиніозу (*Yersinia enterocolitica*) (серовар 0:9).** *B. abortus* містить спільну з *Yersinia enterocolitica* серовару 0:9 антигенну імунодомінанту у складі ліпополісахариду клітинної стінки і низку загальних білкових детермінант зовнішньої мембрани, що обумовлює перехресні серологічні реакції. Для отримання імуносорбентів було застосовано схему одночасної сорбції на полістироловому гребінці як бруцельозного, так і ієрсиніозного (серовар 0:3) ліпополісахаридних антигенів. У якості кон'югату використовували рекомбінантний білок G *Streptococcus spp.* у комбінації з колоїдним золотом.

Під час дослідження позитивних на бруцельоз сироваток крові відмічали позитивну реакцію в місці нанесення бруцельозного антигену та відсутність її в місці нанесення ієрсиніозного антигену. Під час постановки реакції із сироваткою крові кроля, який був імунізований *Yersinia enterocolitica* (серовар 0:9), відмічали чіткий сигнал як із бруцельозним, так і з ієрсиніозним антигеном. Під час постановки дот-імуноаналізу із сироватками крові кролів, імунізованих іншими сероварами ієрсиній, спостерігали чіткий сигнал лише в місці нанесення антигену *Yersinia enterocolitica* серовару 0:3 (рис. 5). Під час постановки дот-імуноаналізу з негативними на бруцельоз референс-сироватками та сироватками крові, що не містили протиієрсиніозні антитіла, псевдопозитивних результатів не виявляли з обома антигенами (рис. 5).

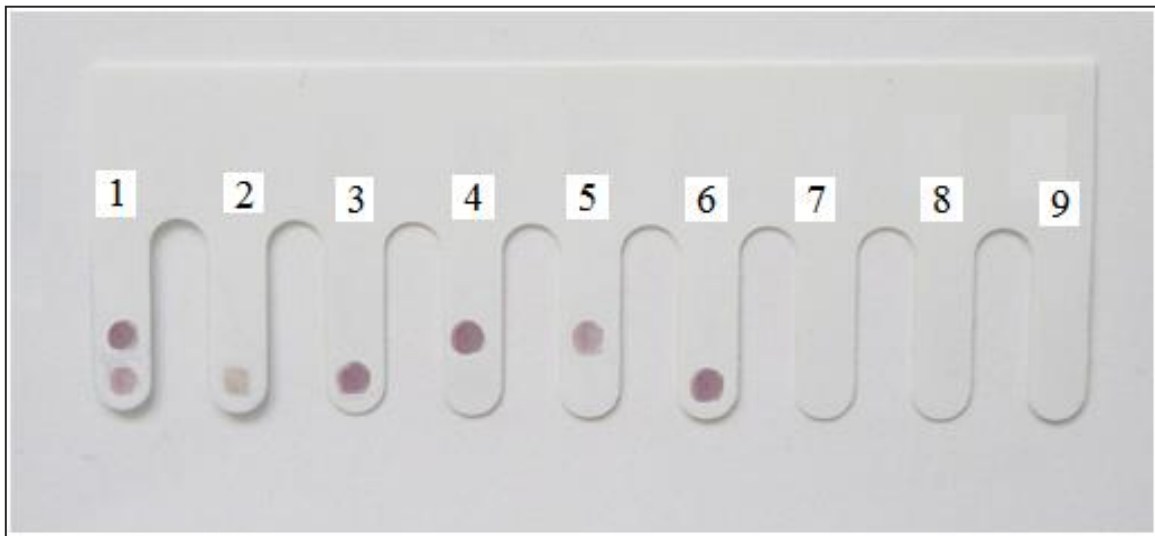


Рис. 5 Результати постановки дот-імуноаналізу для диференційної діагностики ієрсиніозу і бруцельозу: 1 – сироватка крові з антитілами до *Yersinia enterocolitica* серовару 0:9; 2 – сироватка крові з антитілами до *Yersinia enterocolitica* серовару 0:6; 3 – сироватка крові з антитілами до *Yersinia enterocolitica* серовару 0:3; 4 – сироватка крові з антитілами до *B. abortus*; 5 – сироватка крові з антитілами до *B. abortus*; 6 – сироватка крові з антитілами до *Yersinia enterocolitica* серовару 0:8; 7 – сироватка крові, вільна від протибруцельозних антитіл; 8 – сироватка крові, вільна від протибруцельозних антитіл; 9 – сироватка крові, вільна від проієрсиніозних антитіл.

Валідацію розроблюваних діагностикумів на основі дот-імуноаналізу за бруцельозу тварин та лейкозу великої рогатої худоби проводили в акредитованих лабораторіях із використанням панелей сироваток крові великої рогатої худоби у кількості 950 проб, позитивних та негативних щодо бруцельозу тварин і лейкозу великої рогатої худоби референс-сироваток, отриманих з МЕБ референс-центру (Великобританія), позитивного на лейкоз великої рогатої худоби референс-стандарту E 05 (Німеччина). Порівняльні випробування тест-системи на бруцельоз проводили з роз-бенгал пробою, оскільки останню вважають однією з референтних реакцій для діагностики бруцельозу тварин. Тест-систему на лейкоз порівнювали із реакцією імунодифузії та полімеразною



ланцюговою реакцією, оскільки вони рекомендовані інструкцією з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу в Україні.

Підсумовуючи результати дисертаційних досліджень, слід підкреслити, що обґрунтована технологія отримання діагностикумів на основі дот-імуноаналізу відкриває реальні перспективи щодо удосконалення лабораторної діагностики інфекційних захворювань тварин, зокрема бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби. Запропоновані тест-системи дозволять без складного лабораторного обладнання, навіть у польових умовах, проводити діагностику лейкозу великої рогатої худоби і бруцельозу. Їх використання, поряд з існуючими, широко апробованими методами, зокрема полімеразною ланцюговою реакцією, імуноферментним аналізом, в залежності від конкретних обставин, сприятиме більш ефективному проведенню профілактичних та оздоровчих заходів у разі названих інфекцій.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично та експериментально обґрунтовано технологію отримання компонентів та оптимізовано умови постановки дот-імуноаналізу за бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби; розроблено експрес-методику диференціювання *B. abortus* та *Yersinia Enterocolitica*; доведено, що специфічність, чутливість та відтворюваність результатів постановки імуноаналізу за використання розроблених компонентів і оптимізованих умов відповідають вимогам Міжнародного епізоотичного бюро.

1. Бруцельоз – розповсюджена зооантропонозна інфекція, яка становить важливу медико-ветеринарну проблему, загрожує здоров'ю та життю людини і тварин. В Україні реєструють поодинокі випадки даного захворювання серед овець, підтверджені факти циркуляції збудника серед диких тварин.

Лейкоз великої рогатої худоби залишається актуальною проблемою для ветеринарної медицини багатьох країн світу, включаючи і Україну. В 2017 році на території нашої держави було виявлено 1664 хворих тварин.

2. Модифіковано методику отримання ліпополісахариду з клітин *Brucella abortus*, яка підвищує в 2,4 рази (у порівнянні із раніше запропонованими методиками) отримання цільового продукту – видоспецифічного бруцельозного антигену з високим рівнем чутливості та специфічності (до 100 % в імуноферментному аналізі і дот-імуноаналізі).

3. Експериментально обґрунтовано доцільність сумісного використання рекомбінантних лейкозних антигенів – p24 і gp51 (у співвідношенні 1:1), що забезпечує високу чутливість та специфічність (до 100 %) експрес-тестів на основі дот-імуноаналізу за лейкозу великої рогатої худоби.

4. Розроблено методику отримання ефективного та стабільного (зберігає свої властивості понад 7 років) кон'югату рекомбінантного білка G *Streptococcus spp.* із колоїдним вугіллям; оптимізовано методику кон'югації рекомбінантного білка G *Streptococcus spp.* із колоїдним золотом для використання в дот-імуноаналізі. Доведено, що кон'югати на основі колоїдного

вугілля та колоїдного золота взаємодіють з імуноглобулінами тварин різних видів (велика рогата худоба, дрібна рогата худоба, свині, коні, кролі, миші).

5. Розроблено методику отримання імуносорбенту для дот-імуноаналізу на основі листового полістиролу (HIPS), який є оптимальним для іммобілізації як бруцельозного, так і лейкозного антигенів за дотримання оптимізованих умов (нанесення краплин об'ємом 3 мкл антигенів, суспендованих у буфері 0,05 М карбонатно-бікарбонатного буфера (рН 9,6); встановлено оптимальні концентрації антигенів, що використовуються для отримання імуносорбентів: для лейкозного – 5 мкг/мл, для бруцельозного ЛПС-антигену – розведення 1:200).

6. Визначено оптимальний розчин для розведення досліджуваних сироваток крові при постановці дот-імуноаналізу за лейкозу великої рогатої худоби та бруцельозу. Для розведення досліджуваних зразків кращим є фосфатно-сольовий буфер зі значенням рН 7,2–7,4, який містить 0,75 % желатин, 2,5 М сечовини і 0,01 % бензойної кислоти.

7. Встановлено, що специфічність та чутливість тест-систем дот-імуноаналізу за бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби, сконструйованих на основі розроблених компонентів, реалізованих в оптимізованих умовах, повністю відповідає вимогам Міжнародного епізоотичного бюро, відтворюваність – діючим сучасним щодо тест-систем даного типу вимогам (CV<10 %).

8. Розроблено експрес методику дот-імуноаналізу для диференціювання антитіл, специфічних щодо *Yersinia enterocolitica* (серовар 0:9) та *B. abortus*. Згідно запропонованого рішення застосовується одночасно два антигени (*B. abortus* та *Yersinia enterocolitica* серовару 0:3) для сорбції на полістироловому гребінці з наступною постановкою дот-імуноаналізу та використання в якості кон'югату білка G *Streptococcus spp.* поєднаного з колоїдним золотом.

## ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Впровадження у практику ветеринарної медицини діагностиків на основі дот-імуноаналізу за бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби поліпшить існуючі системи контролю за названими інфекціями. Діагностикуми на базі дот-імуноаналізу не вимагають коштовного обладнання та можуть бути використані не лише у спеціалізованих діагностичних лабораторіях, а й поза їх межами.

2. Науково-експериментальне обґрунтування технології отримання кон'югатів на основі рекомбінантного білка G *Streptococcus spp.* відкриває перспективи для більш раціонального (у порівнянні із застосуванням компонентів, моноспецифічних щодо імуноглобулінів крові різних видів тварин) використання їх у практиці гуманної і ветеринарної медицини, біології біотехнології та ін.; заміна імуноферментної мітки на вугільну суттєво спрощує використання діагностиків, здешевлює їх виробництво.

3. Для диференціальної діагностики бруцельозу та ієрсиніозу (*Yersinia enterocolitica* серовару 0:9) у польових умовах пропонуємо досліджувати

сироватки крові тварин методом дот-імуноаналізу за одночасного застосування двох антигенів (*B. abortus* та *Yersinia enterocolitica* серовару 0:3) для сорбції та використання в якості кон'югату білка G *Streptococcus spp.* поєднаного з колоїдним золотом (*патент України на корисну модель № 117672*).

4. Результати досліджень рекомендовано використовувати в освітньому процесі вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина» під час вивчення навчальних дисциплін «Біотехнологія у ветеринарній медицині», «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин».

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Мартиненко Д. Л., **Хоменко Я. В.**, Рибальченко Д. Ю., Бреус Ю. В., Король Д. М., Небещук Л. В. Отримання імуносорбента для діагностичного набору на бруцельоз. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2012. Ч. 2. С. 192–195. (*Здобувач брав участь у проведенні досліджень, аналізі їх результатів і написанні статті*).

2. Бреус Ю. В., Мартиненко Д. Л., Мельничук С. Д., Спиридонов В. Г., Рибальченко Д. Ю., **Хоменко Я. В.** Використання діагностичного імунохроматографічного експрес-тесту «Епіскрин АВ Лейкоз» для моніторингу лейкозу великої рогатої худоби. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2012. № 4 (33). (*Здобувач брав участь у дослідженнях, узагальнив отримані дані, підготував статтю до друку*).

3. Хоменко Я. В. Виявлення лейкозу ВРХ з використанням кон'югату колоїдного вугілля з білком G (*Streptococcus spp.*). Тваринництво України. 2015. № 1–2. С. 32–33.

4. Хоменко Я. В. Спосіб детекції антитіл специфічних щодо *Yersinia Enterocolitica* (серовар 0:9) та *Brucella abortus*. Ветеринарна біотехнологія. 2016. № 29. С. 266–270. (*Здобувач брав участь у проведенні досліджень, аналізі їх результатів і написанні статті*).

### Стаття у науковому виданні іншої держави

5. Бреус Ю. В., Небещук О. Д., **Хоменко Я. В.**, Мартыненко Д. Л., Рыбальченко Д. Ю. Разработка и конструирование экспресс-теста для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. 2013. № 4 (79). С. 15–21. (*Здобувач провів дослідження та підготував матеріали для статті*).

### Методичні рекомендації

6. **Хоменко Я. В.**, Козловська Г. В. Методичні рекомендації з диференціації антитіл, специфічних щодо збудників ієрсиніозу (*Yersinia enterocolitica*) та бруцельозу (*Br. abortus*): [методичні рекомендації]. К., 2017. 10 с. (*Розглянуто та схвалено Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 9 від 22.03.2017 р.*

Здобувач провів дослідження та підготував матеріали для написання методичних рекомендацій).

### Патент на корисну модель

7. **Хоменко Я. В.**, Козловська Г. В., Скибіцький В. Г. Патент 117672 Україна. G 01 N 33/50 (2006.01) Спосіб диференціювання антитіл, специфічних щодо *Yersinia enterocolitica* (серовару 0:9) та *Br. abortus*; власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № u201611114; заявлено 04.11.2016; опубліковано 10.07.2017. Бюл. № 13. (Здобувач брав безпосередню участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).

### АНОТАЦІЯ

**Хоменко Я. В. Науково-експериментальне обґрунтування технології дот-імуноаналізу за бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби.** – 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, 2017.

Розроблено методологію отримання компонентів для діагностики шляхом постановки дот-імуноаналізу за бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби: удосконалено методику отримання ліпополісахариду антигену *B. abortus*; обґрунтовано доцільність використання рекомбінантного антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби, що містить протеїни з молекулярними масами 24 та 51 kDa та визначено оптимальні їх концентрації в дот-імуноаналізі; оптимізовано методику (Hermanson G. T., 1996) кон'югації рекомбінантного білка *G Streptococcus spp.* із колоїдним золотом; розроблено технологію отримання кон'югату рекомбінантного білка *G Streptococcus spp.* із колоїдним вугіллям; обґрунтовано доцільність використання листового білого полістиролу (HIPS) і розроблено оригінальну методику крапельної сорбції на ньому бруцельозного та лейкозного антигенів.

Оптимізовано умови постановки дот-імуноаналізу, зокрема визначено, що використання з метою розбавлення досліджуваних сироваток крові фосфатно-сольового буфера (pH 7,2–7,4), який містить 0,75 % желатини, 2,5 М сечовини і 0,01 % бензойної кислоти повністю усуває можливість неспецифічної взаємодії компонентів дот-імуноаналізу.

Розроблено експрес-методику диференціювання *Br. abortus* та *Yersinia Enterocolitica* на базі дот-імуноаналізу.

Доведено, що специфічність, чутливість та відтворюваність результатів дот-імуноаналізу за використання розроблених компонентів та оптимізованих умов постановки дот-імуноаналізу в процесі діагностики бруцельозу та лейкозу великої рогатої худоби відповідають вимогам Міжнародного епізоотичного

бюро: специфічність і чутливість становлять 100 %, відтворюваність – задовольняє сучасні вимоги щодо тест-систем даного типу ( $CV < 10\%$ ).

**Ключові слова:** бруцельоз, лейкоз великої рогатої худоби, діагностика, дот-імуноаналіз, колоїдне золото, колоїдне вугілля.

## АННОТАЦІЯ

**Хоменко Я. В. Научно-экспериментальное обоснование технологии дот-иммуноанализа при бруцеллёзе и лейкозе крупного рогатого скота. – 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, 2017.

В диссертационной работе проанализировано распространение бруцеллеза и лейкоза крупного рогатого скота. Отмечено, что бруцеллез повсеместно распространен, особенно в странах Среднего Востока, Средиземноморском регионе, на юге Сахары в Африке, Китае, Индии, Перу и Мексике. В Украине регистрируют лишь единичные случаи заболевания овец, также подтвержденные факты циркуляции возбудителя среди диких животных. Лейкоз крупного рогатого скота встречается во многих странах мира, особенно с высокоразвитым молочным животноводством. В Украине, в 2017 году было выявлено 1663 больных на лейкоз крупного рогатого скота животных в Харьковской и Житомирской областях.

Разработана методология получения компонентов для диагностики путем постановки дот-иммуноанализа при бруцеллёзе и лейкозе крупного рогатого скота: усовершенствована методика получения липополисахарида антигена *B. abortus*, которая увеличивает в 2,4 раза (по сравнению с ранее предложенными методиками) выход целевого продукта – видоспецифического бруцеллёзного антигена с высоким уровнем чувствительности и специфичности (до 100 % в иммуноферментном анализе и дот-иммуноанализе); обоснована целесообразность использования рекомбинантного антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота, который содержит протеины p24 і gp51 в соотношении 1:1, которое обеспечивает высокую чувствительность и специфичность (до 100 %) экспресс-тестов на основе дот-иммуноанализа при постановке на лейкоз; оптимизирована методика (Hermanson G. T., 1996) конъюгации рекомбинантного белка *G Streptococcus spp.* с коллоидным золотом, которая позволяет получить высокоэффективный и стабильный конъюгат (сохраняет свои качества более 7 лет); разработана технология получения конъюгата рекомбинантного белка *G Streptococcus spp.* и коллоидного угля путём физической адсорбции, с его последующей стабилизацией 10 % сахарозой; обоснована целесообразность использования листового белого полистирола (HIPS) и разработана оригинальная методика капельной сорбции (объемом по 3 мкл) на нём бруцеллёзного и лейкозного антигенов, которые суспендированы в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6). Определены оптимальные

концентрации антигенов при сорбции: 5 мкг/мл для лейкозного антигена, для бруцеллёзного ЛПС-антигена – разведение 1:200.

Оптимизированы условия постановки дот-иммуноанализа, в частности определено, что использование с целью разведения исследуемых сывороток крови фосфатно-солевого буфера (рН 7,2–7,4), который содержит 0,75 % желатины, 2,5 М мочевины и 0,01 % бензойной кислоты полностью устраняет возможность неспецифических взаимодействий компонентов дот-иммуноанализа. Оптимальное разведение сывороток крови животных как для бруцеллёзной, так и для лейкозной диагностических тест-систем при использовании обоих вариантов конъюгатов составляет 1:10.

Разработана экспресс-методика, которая позволяет дифференцировать *Br. abortus* и *Yersinia enterocolitica* (серовар 0:9) на базе дот-иммуноанализа. Согласно предложенного решения используется одновременно два антигена (*B. abortus* и *Yersinia enterocolitica* серовара 0:3) для сорбции на полистироловом гребешке с последующей постановкой дот-иммуноанализа. В качестве конъюгата применяется белок G *Streptococcus spp.* в комплексе с коллоидным золотом.

Доказано, что специфичность, чувствительность и воспроизводимость результатов дот-иммуноанализа при использовании разработанных компонентов та оптимизированных условий постановки дот-иммуноанализа в процессе диагностики бруцеллеза и лейкоза крупного рогатого скота отвечают требованиям Международного эпизоотического бюро: специфичность и чувствительность составляет 100 %, воспроизводимость – удовлетворяет современные требования к тест-системам данного типа (CV<10 %).

**Ключевые слова:** бруцеллез, лейкоз крупного рогатого скота, диагностика, дот-иммуноанализ, коллоидное золото, коллоидный уголь.

## ANNOTATION

**Homenko I. V. Scientific and experimental confirmation of dot-immunoassay technology for brucellosis and leucosis of.** – The Manuscript.

Dissertation for the degree of candidate of veterinary sciences, speciality 16.00.03 «Veterinary Microbiology, Epizootiology, Infectious Diseases and Immunology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

Critical components for dot blot immunoassay for diagnosis of brucellosis and bovine leukemia were chosen, technology of production of chemical and biological components was developed: method for purification of *B. abortus* LPS was improved; an expediency of using of the fusion recombinant protein, which includes both 24 kDa and 51 kDa proteins of bovine leucosis virus, was justified; optimal concentration of antigens in the dot blot immunoassay were determined; the protocol of G. T. Hermanson (1996) was optimized to bind colloidal gold nanoparticles to recombinant protein G *Streptococcus spp.*; the technology of conjugation of protein G *Streptococcus spp.* with carbon nanoparticles was developed; an expediency of using

of High Impact Polystyrene (HIPS) was justified; original method of drip sorption for immobilization of *B. abortus* and bovine leucosis virus antigens was developed.

The protocol for dot blot immunoassay was optimized. In particular, it was determined that the use of phosphate-salt buffer (pH 7.2–7.4) containing 0.75 % gelatin, 2.5 M urea and 0.01 % benzoic acid as a serum diluent completely eliminates the nonspecific binding of dot blot immunoassay components.

Dot blot immunoassay based express protocol for discrimination of *Br. abortus* and *Yersinia Enterocolitica* was established.

Sensitivity and specificity of developed test kits for diagnosis of brucellosis and bovine leucosis is 100 %, which is in conformity with World Organisation for Animal Health requirements. Coefficient of reproducibility for test kits is below 10 % (CV<10 %), which is right for such test kit.

It has been proved that the specificity, sensitivity and reproducibility of developed dot blot immunoassay for diagnosis of brucellosis and bovine leukemia are in conformity with World Organisation for Animal Health requirements: specificity and sensitivity are 100 %, reproducibility satisfies modern requirements for such type of test kits (CV<10 %).

**Key words:** brucellosis, bovine leucosis, yerseniosis, diagnosis, dot blot analysis, colloidal gold nanoparticles, colloidal carbon nanoparticles.