



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103283** (13) **C2**  
(51) МПК  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**A61K 31/716** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2012 13087</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>13.05.2011</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.09.2013</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/334,995</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>14.05.2010</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>25.01.2013, Бюл.№ 2</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.09.2013, Бюл.№ 18</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2011/036518, 13.05.2011</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Моран Кольм (IE/FR), Квятковскі Стефан (US), Яннікоуріс Александрос (FR/US), Тільєн Урсула Анне (US)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ОЛТЕК, ІНК., 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40345, United States of America (US)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: KWIATKOWSKI ET AL.: 'A Study of Saccharomyces cerevisiae Cell Wall Glucans.' J INST BREWING vol. 115, no. 2, 2009, pages 151 - 158. BRUSSAARD: 'Novel ingredients protect animals from mycotoxin.' FEED MIX vol. 16, no. 2, 2008, pages 22 - 25. OHNO ET AL.: 'Solubilization of yeast cell-wall beta-(1-&gt;3)-D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction.' CARBOHYDR RES vol. 316, no. 1-4, 31 March 1999, pages 161 - 172. ZEKOVIC ET AL.: 'Mild Pfizner--Moffat oxidation of the (1-&gt;3)-beta-D-glucan from Saccharomyces cerevisiae.' CHEMICAL PAPERS vol. 60, no. 3, 2006, pages 243 - 248.</p>
---	--

**(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ КОМПОНЕНТІВ КЛІТИННОЇ СТІНКИ ДРІЖДЖІВ**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу виявлення компонентів клітинної стінки дріжджів та набору для їх імунологічного виявлення.

UA 103283 C2



Дана заявка заявляє пріоритет відповідно до попередньої патентної заявки США № 61/334995 від 14 травня 2010 р., повний опис якої включено в цей документ за допомогою даного посилання.

#### ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

5 Даний винахід відноситься до кормових добавок для тварин і їх виявленню в кормах. Крім того, винахід відноситься до компонентів клітинної стінки дріжджів, способам їх виділення, композиціям і способам для їх імунологічного виявлення.

#### РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

10 В області кормів для тварин використовуються різноманітні добавки й допоміжні засоби для поліпшення продуктивності тваринництва. У деяких випадках в якості кормових добавок знаходять застосування компоненти клітинної стінки дріжджів. Одним із прикладів кормових добавок є МІКОСОРБ (виробництво ALLTECH, Inc.). МІКОСОРБ зв'язує домішки мікотоксинів у харчових продуктах і кормах, тим самим ізолюючи мікотоксини в незасвоюваному стані. Такі домішки мікотоксинів звичайно виникають за рахунок росту грибів як на полі, так і після збирання врожаю в зерні, зернових продуктах і кукурудзяному силосі, використовуваних як

15 компоненти вихідної сировини. Хоча сировина й готові компоненти корму, що перебувають у продажі, проходять необхідний моніторинг на мікотоксини, 100 % ефективної системи моніторингу не існує. В усьому світі, по оцінках приблизно 25 % всіх посівів уражені забрудненням мікотоксинами (Council for Agricultural Science and Technology (1989) "Mycotoxins: Economics and Health Risks", Task Force Report No. 116, Ames, IA), і тому випадки влучення забрудненого матеріалу в корми для худоби й свійських тварин практично неминучі. Наслідки споживання худобою кормів, забруднених мікотоксинами, включають знижений апетит, зниження темпів росту, зниження репродуктивної функції й виробництва молока, придушення імунної системи, порушення травлення, а у важких випадках - смерть. Таким чином, доведено,

20 що видалення мікотоксинів є корисною стратегією для зниження ризику отруєння природними токсинами, які негативно впливають на здоров'я людини й тварин.

Розробка надійних, специфічних аналітичних способів і наборів для якісного й кількісного виявлення кормових добавок ускладнюється наявністю безлічі сполук, що заважають, а також відносно низькою концентрацією кормових добавок, що використовують у готових кормах для

30 тварин.

#### СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід відноситься до кормових добавок для тварин і їх виявленню в кормах. Крім того, даний винахід відноситься до компонентів клітинної стінки дріжджів, способам їх виділення й композиціям і способам їх імунологічного виявлення. У деяких варіантах втілення

35 представлений спосіб виявлення компонентів клітинної стінки дріжджів і/або їх фрагментів у зразку (наприклад, зразках кормів, зразках харчових продуктів або їх екстрактів). Такий спосіб знаходить застосування, наприклад, у визначенні присутності харчових і кормових добавок, що містять компоненти клітинної стінки дріжджів (наприклад, дріжджового глюкану, дріжджового (1→4)-α-D-глюкану, дріжджового (1→6)-β-D- глюкану, дріжджового (1→4)-α/(1→6)-β-D-глюкану, кормової добавки МІКОСОРБ, кормової добавки ВІОМОСС, кормової добавки АСТІГЕН і т.п.) у

40 кормах (наприклад, кормі для худоби, кормі для домашніх тваринних або проміжних продуктах їх виробництва). У деяких варіантах втілення даний винахід відноситься до способів витягу компонентів клітинної стінки дріжджів (наприклад, дріжджового глюкану, дріжджового (1→4)-α-D-глюкану, дріжджового (1→6)-β-D-глюкану, дріжджового (1→4)-α/(1→6)-β-D-глюкану, кормової добавки МІКОСОРБ і т.п.) з кормів (наприклад, корму для худоби, корму для домашніх тваринних або проміжних продуктів їх виробництва). У деяких варіантах втілення даний винахід представляє антигени, які знаходять застосування для індукції антитіл до конкретних компонентів клітинної стінки дріжджів (наприклад, дріжджовому (1→4)-α-D-глюкану, дріжджовому (1→6)-β-D-глюкану, дріжджовому (1→4)-α/(1→6)-β-D-глюкану й/або їх кон'югатам).

50 У кращих варіантах втілення такі антигени кон'юговані з носієм, наприклад, білковим носієм (наприклад, бичачим сироватковим альбуміном (БСА)). У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує способи активації вуглеводів (наприклад, вуглеводів, що містять глюкопіранозні кільця, глюканів, дріжджового (1→4)-α/(1→6)-β-D-глюкану) по С6-ОН - положенню(ям). У деяких варіантах втілення така активація включає м'яке окислювання

55 (наприклад, за допомогою диметилсульфоксиду/ангідриду оцтової кислоти). У деяких варіантах втілення даний винахід представляє антитіла, здатні розпізнавати антигени клітинної стінки дріжджів (наприклад, моноклональні або поліклональні антитіла, здатні розпізнавати дріжджовий (1→4)-α-D- глюкан, дріжджовий (1→6)-β-D- глюкан, дріжджовий (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкан або їх кон'югати; моноклональні антитіла 513A161.1 або 513A431.1 проти антигену

60 (1→4)-α-D-глюкан/(1,6)-β-D-глюкан/БСА; поліклональні антитіла проти антигену

(1→4)-α-D-глюкан/(1→6)-β-D-глюкан/БСА; або їх очищені, розведені, кон'юговані й/або моноспецифічні форми). У деяких варіантах втілення даний винахід представляє набори, що включають реагенти для виявлення компонентів клітинної стінки дріжджів (наприклад, дріжджового глюкану, дріжджового (1→4)-α-D- глюкану, дріжджового (1→6)-β-D- глюкану, дріжджового (1→4)-α-/(1→6)-β-D- глюкану, кормової добавки МІКОСОРБ і т.п.) у зразках (наприклад, зразках кормів, зразках харчових продуктів або їх екстрактів).

Даний винахід не обмежується типом і природою зразка, що використовується для аналізу. У деяких кращих варіантах втілення зразок є або являє собою похідне від харчового або кормового продукту. Харчовий або кормовий продукт включає кожний(і) споживані (наприклад, тваринами) матеріал(и), що привносять енергію й/або живильні речовини в раціон. Приклади кормів включають повну кормову суміш (TMR), фураж(и), кормові гранули, концентрат(и), корм (и) суміш(и), зерно, барду, меласу, клітковину, грубі корми, траву(и), сіно, ядра горіхів, листя, борошно, розчинну (і) речовина(и) і добавку (і), але не обмежується ними. Корм й харчові продукти не обмежуються за фізичною формою. Корм й харчових продукти можуть бути перероблені в частки меншого розміру (наприклад, роздроблені, нарізані, розтерті, розмелені й т.п.); виготовлені в рідкому виді (наприклад, екстраговані, зварені, концентровані, перетворені в сироп або іншу грузлу форму), або перероблені в одиниці більшого розміру (наприклад, пресовані в брикети, ущільнені, стислі або виготовлені у вигляді складних форм, наприклад, гранул, блоків, квадратів, пластівців і т.п.).

Даний винахід не обмежується типом і природою способу екстракції, що використовується для одержання зразків для аналізу. У деяких варіантах втілення вихідний матеріал для аналізу (наприклад, харчовий або кормовий продукт; корму) піддають методиці екстракції, щоб одержати зразок для аналізу. Методи екстракції включають екстракцію кислотою, екстракцію лугом, екстракцію органічним розчинником, екстракцію буфером, екстракцію зілля, екстракцію детергентом, фізичну екстракцію (наприклад, кип'ятіння, екстрагування паром, низькотемпературну екстракцію, диспергування й т.п.) або їх комбінацію, але не обмежуються ними. У деяких варіантах втілення матеріал для аналізу (наприклад, харчовий або кормовий продукт; корми) екстрагують за допомогою комбінації органічного розчинника й розчину кислоти. У деяких варіантах втілення матеріал для аналізу (наприклад, харчовий або кормовий продукт; корми) екстрагують за допомогою розчину диметилсульфоксиду (ДМСО) і соляної кислоти (HCl).

Даний винахід не обмежується кількістю аналізованої речовини (наприклад, антигену, компонентів клітинної стінки дріжджів, дріжджового глюкану, дріжджового (1→4)-α-D- глюкану, дріжджового (1→6)-β-D- глюкану, дріжджового (1→4)-α-/(1→6)-β-D- глюкану, кормової добавки МІКОСОРБ і т.п.), присутнього у вихідному зразку. Кількість аналізованої речовини може бути менше 0,005 мг, 0,005-0,05 мг, 0,05-0,5 мг, 0,5-1 мг, 1-5 мг, 5-10 мг, 10-25 мг, 25 мг або більше. Даний винахід не обмежується кількістю аналізованої речовини (наприклад, антигену, компонентів клітинної стінки дріжджів, дріжджового глюкану, дріжджового (1→4)-α-D- глюкану, дріжджового (1→6)-β-D- глюкану, дріжджового (1→4)-α-/(1→6)-β-D- глюкану, кормової добавки МІКОСОРБ і т.п.), присутнього в тестованому вихідному матеріалі. Виявлена кількість аналізованої речовини може бути менш 0,05 кг на тонну, 0,05-0,5 кг на тонну, 0,5-1 кг на тонну, 1,0-2,0 кг на тонну, 2,0-3,0 кг на тонну, 3,0-4,0 кг на тонну, 4,0-5,0 кг на тонну, 5,0-6,0 кг на тонну, 6,0-10,0 кг на тонну, 10 кг на тонну або більше.

Даний винахід не обмежується робочою концентрацією антитіл, використовуваних для виявлення аналізованої речовини (наприклад, антигену, компонентів клітинної стінки дріжджів, дріжджового глюкану, дріжджового (1→4)-α-D- глюкану, дріжджового (1→6)-β-D- глюкану, дріжджового (1→4)-α-/(1→6)-β-D- глюкану, кормової добавки МІКОСОРБ і т.п.). Робоче розведення антитіл (наприклад, моноклональних або поліклональних антитіл, здатних розпізнавати дріжджовий (1→4)-α-D- глюкан, дріжджовий (1→6)-β-D- глюкан, дріжджовий (1→4)-α-/(1→6)-β-D- глюкан або їх кон'югати; моноклональних антитіл 513A161.1 або 513A431.1 проти антигену (1→4)-α-D-глюкан/(1→6)-β-D-глюкан/БСА; поліклональних антитіл проти антигену (1→4)-α-D-глюкан/(1→6)-β-D-глюкан/БСА; або їх очищених, розведених, кон'югированих й/або моноспецифіческих форм) може бути більше розведеним, чим 1:100000; від 1:50000 до 1:100000; від 1:20000 до 1:50000; від 1:10000 до 1: 20000; від 1:5000 до 1:10000; від 1:1000 до 1:5000; від 1:500 до 1:1000; від 1:100 до 1:500; від 1:50 до 1:100; від 1:10-1:50; від 1:1 до 1:10; від 2:1 до 1:1, або більше концентрованим, чим 2:1.

У деяких варіантах втілення даний винахід представляє імуногенну композицію, що включає компоненти клітинної стінки дріжджів. У деяких варіантах втілення компоненти клітинної стінки дріжджів включають дріжджовий глюкан. У деяких варіантах втілення глюкан включає дріжджовий (1→4)-α-D- глюкан, дріжджовий (1→6)-β-D- глюкан, дріжджовий (1→4)-α-/(1→6)-β-D- глюкан або їх кон'югати або похідні. У деяких варіантах втілення даний винахід представляє

дріжджовий (1→6)-β-D- глюкан, дріжджовий (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкан, кон'югований з носієм (наприклад, білком-носієм). Носії можуть сприяти імуногенності й/або стабільності в організмі тварини-хазяїна. Приклади носіїв включають бичачий сироватковий альбумін (BCA), гемоціанін лімфи равлика (KLH), овальбумін (OVA), бичачий тиреоглобулін (THY), і коровий антиген гепатиту В утік (DNHcAg) (Gathuru et al. (2005) Vaccine 23:4727-4733), але не обмежуються ними. Даний винахід не обмежується положенням зв'язку між антигеном і носієм. У деяких кращих варіантах втілення антиген (наприклад, вуглеводний антиген, глюкан, вуглевод, що містить глюкопіранозне(i) кільце(a), дріжджовий (1→4)-α-D- глюкан, дріжджовий (1→6)-β-D- глюкан, дріжджовий (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкан) кон'югований з носієм по одному або більше O-6 - положенню(ям) стосовно антигену. У деяких варіантах втілення антиген являє собою дріжджовий (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкан, кон'югований із BCA по C 6-положенню.

Антитіла по даному винаході не обмежуються видом-хазяїном, у якому їх індукують. Вид-хазяїн може бути пацюком, мишею, морською свинкою, хом'яком, кроликом, козою, вівцею, куркою, ослом, конем, жуйними, псовими, котячими, свинями, мавпами, людиною або будь-яким іншим видом. Антитіла по даному винаході не обмежуються режимом імунізації, способом виготовлення антигену або способом доставки антигену, які використовуються для індукції антитіл. Антиген може бути представлений у присутності або під час відсутності імуностимуляторів (наприклад, ад'ювантів), буферів, солей, розчинників, сполук, що підвищують розчинність або т.п. речовин. Вид-хазяїн можна імунізувати антигеном однократно; двічі; тричі; чотири рази; п'ять разів; 5-10 разів; 10-20 разів; або більше 20 разів. Антитіла по даному винаході не обмежуються клональністю (наприклад, можуть бути моноклональними, поліклональними). Антитіла можна використовувати в неопрацьованому або очищеному виді. Антитіла можуть бути поліспецифічними або моноспецифічними. У кращих варіантах втілення антитіла здатні специфічно розпізнавати антиген, використаний для їх індукції. У деяких кращих варіантах втілення антитіла по даному винаході здатні специфічно розпізнавати (1→4)-α-D-глюкан/(1→6)-β-D-глюкан, екстрагований із клітинних стінок дріжджів (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*). У деяких кращих варіантах втілення антитіла по даному винаході включають поліклональні антитіла. У деяких варіантах втілення даний винахід представляє моноклональні або поліклональні антитіла, здатні розпізнавати дріжджовий (1→4)-α-D- глюкан, дріжджовий (1→6)-β-D- глюкан, дріжджовий (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкан або їх фрагменти, варіанти або кон'югати. У деяких варіантах втілення композиції антитіл по даному винаході зв'язуються з (1→4)-α-D- глюканом клітинної стінки дріжджів, але не з (1→4)-α-D глюкан-утримуючими фрагментами, що є присутнім у речовинах, що не є (1→4)-α-D глюкан-утримуючими полімерами клітинної стінки дріжджів (наприклад, (1→4)-α-D- глюканом клітинної стінки дріжджів, (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюканом клітинної стінки дріжджів або їх фрагментів, варіантами або кон'югатами). У деяких варіантах втілення композиції антитіл по даному винаході зв'язуються з (1→6)-β-D-глюканом клітинної стінки дріжджів, але не з (1→6)-β-D-глюкан-утримуючими фрагментами, що є присутнім у речовинах, що не є (1→6)-β-D-глюкан-утримуючими полімерами клітинної стінки дріжджів (наприклад, (1→6)-β-D- глюканом клітинної стінки дріжджів, (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюканом клітинної стінки дріжджів або їх фрагментів, варіантами або кон'югатами). У деяких варіантах втілення композиції антитіл по даному винаході зв'язуються з (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюканом клітинної стінки дріжджів, але не з (1→4)-α/(1→6)-β-D глюкан-утримуючими фрагментами, що є присутні у речовинах, що не є клітинною стінкою дріжджів (наприклад, (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюканом клітинної стінки дріжджів або його фрагментів, варіантами або кон'югатами).

Деякі способи виявлення антигену по даному винаході включають способи імунологічного аналізу. У деяких кращих варіантах втілення способи імунологічного аналізу включають твердофазний ІФА. У деяких варіантах втілення ІФА виконують із використанням зразків, отриманих з вихідного матеріалу для аналізу (наприклад, харчових або кормових продуктів; кормів; їх екстракту) і первинного антитіла (наприклад, антитіла, здатного розпізнавати компоненти клітинної стінки дріжджів; антитіла, здатного розпізнавати дріжджовий глюкан; антитіла, здатного розпізнавати дріжджовий (1→4)-α-D- глюкан, дріжджовий (1→6)-β-D- глюкан і/або дріжджовий (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкан). У деяких варіантах втілення антитіло прямо пов'язане з речовиною, здатним генерувати сигнал, що виявляється (наприклад, хромогенною речовиною, флуорогеном, радіоактивним ізотопом і т.д.). У деяких варіантах втілення антитіло прямим або непрямим чином пов'язане з іншим агентом, здатним генерувати сигнал, що виявляється (наприклад, хромогенною речовиною, флуорогеном, радіоактивною міткою, ізотопом і т.д.).

У деяких варіантах втілення даний винахід представляє набори для виявлення аналізованої речовини (наприклад, антигену, компонентів клітинної стінки дріжджів, дріжджового глюкану,

дріжджового (1→4)- $\alpha$ -D- глюкану, дріжджового (1→6)- $\beta$ -D- глюкану й/або дріжджового (1→4)- $\alpha$ -/(1→6)- $\beta$ -D- глюкану) у зразку (наприклад, харчового або кормового продукту, кормів, їх екстракту). Компоненти набору можуть включати реагенти, буфери для екстракції, розчинники, детергенти, що блокують агенти, пробірки, антитіла, стандарти, інструкції й будь-які комбінації перерахованого вище, але не обмежуються ними.

У деяких варіантах втілення даний винахід представляє засоби забезпечення, у яких перебуває інформація про концентрацію аналізованої речовини (наприклад, антигену, компонентів клітинної стінки дріжджів, дріжджового глюкану, дріжджового (1→4)- $\alpha$ -D- глюкану, дріжджового (1→6)- $\beta$ -D- глюкану й/або дріжджового (1→4)- $\alpha$ -/(1→6)- $\beta$ -D- глюкану) у вихідному аналізованому матеріалі (наприклад, харчовому або кормовому продукті, кормах, їх екстракті). У деяких варіантах втілення аналіз виконує кінцевий користувач (наприклад, фермер, власник худоби, робітник тваринницької ферми, тваринник, власник свійської тварини, фахівець, що обслуговує свійську тварину, заводчик свійських тварин, ветеринарний лікар, виробник кормового або харчового продукту, дистриб'ютор кормового або харчового продукту, нормативна посадова особа). У деяких варіантах втілення кінцевий користувач (наприклад, фермер, власник худоби, робітник тваринницької ферми, тваринник, власник свійської тварини, фахівець, що обслуговує свійську тварину, заводчик свійських тварин, ветеринарний лікар, виробник кормового або харчового продукту, дистриб'ютор кормового або харчового продукту, нормативна посадова особа) надає зразок або вихідний матеріал третій стороні й третя сторона виконує аналіз. У деяких варіантах втілення третя сторона передає інформацію, що відноситься до результатів аналізу, кінцевому користувачеві (наприклад, фермерові, власникові худоби, робітникам тваринницької ферми, тваринникові, власникові свійської тварини, фахівцеві, що обслуговує свійських тварин, заводчиків свійських тварин, ветеринарному лікареві, виробникові кормового або харчового продукту, дистриб'юторові кормового або харчового продукту, нормативній посадовій особі). У деяких варіантах втілення третя сторона передає інформацію про результати аналізу четвертій стороні.

Додаткові варіанти втілення будуть очевидні для фахівців у даній області, на підставі інформації, що міститься тут.

#### ОПИС КРЕСЛЕНЬ

На Фігурі 1 показана схема одержання глюканових фракцій P1, P2, P3 і S1, S2 і S3 (див., наприклад, Приклад 1).

На Фігурі 2 показана відповідь вихідних антисироваток кролика й чотирьох варіантів надосадової рідини афінно очищеної антисироватки. Афінно очищені антисироватки одержували за рахунок поділу  $\beta$ -(1,6) глюкан-специфічних (Gab 1-Gab4) антитіл у мікропланшетах, покритих БСА (див., наприклад, Приклад 3).

На Фігурі 3 показана калібрована крива, побудована при використанні очищених поліклональних антитіл кролика проти (1→4)- $\alpha$ -/(1→6)- $\beta$ -D- глюкан- БСА, отриманих за допомогою способів, описаних тут (див., наприклад, Приклади 2 і 3).

На Фігурі 4 показана усереднена стандартна крива 5 аналізів, виконаних при використанні 6 рівнів включення МІКОСОРБу в кормовому матеріалі для молочної худоби. Вторинна вісь Y указує на точність відтворюваності стандартних кривих протягом однієї доби (% CV<sub>intra</sub>) і в різні дати (% CV<sub>inter</sub>).

На Фігурі 5 показана усереднена стандартна крива 5 аналізів, виконаних при використанні 6 рівнів включення МІКОСОРБу в кормовому матеріалі для курей. Вторинна вісь Y указує на точність відтворюваності стандартних кривих протягом однієї доби (% CV<sub>intra</sub>) і в різні дати (% CV<sub>inter</sub>).

На Фігурі 6 показана усереднена стандартна крива 5 аналізів, виконаних при використанні 6 рівнів включення МІКОСОРБу в кормовому матеріалі для свиней. Вторинна вісь Y указує на точність відтворюваності стандартних кривих протягом однієї доби (% CV<sub>intra</sub>) і в різні дати (% CV<sub>inter</sub>).

На Фігурі 7 показані розходження показань середньої оптичної щільності ( $\Delta OD_{450}$ ) продукту, що заважає, відняті із сигналу на продукт МІКОСОРБ, отримані при аналізі корму для курей і розподілі зразків на декількох титраційних мікропланшетах (Приклад 7). Продукти, що заважають, вносили в кількості 50, 100, 200 % (мас/мас) на додаток до продукту МІКОСОРБ 100 %, 1,0 кг/т).

На Фігурі 8 показані розходження показань середньої оптичної щільності ( $\Delta OD_{450}$ ) продукту, що заважає, відняті із сигналу на продукт МІКОСОРБ, отримані при аналізі корму для курей і розподілі зразків на одному титраційному мікропланшеті (Приклад 7). Продукти, що заважають, вносили в кількості 50, 100, 200 % (мас/мас) на додаток до продукту МІКОСОРБ 100 %, 1,0 кг/т).

На Фігурі 9 показані результати твердофазного ІФА, що вказують на перехресну реакційну

здатність моноклонального антитіла 513A161.1 у концентрації 1:100 (угорі) або 1:200 (унизу).

На Фігурі 10 показані результати твердофазного ІФА, що вказують на перехресну реакційну здатність моноклонального антитіла 513A161.1 у концентрації 1:500 (угорі) або 1:1000 (унизу).

На Фігурі 11 показані результати твердофазного ІФА, що вказують на перехресну реакційну здатність моноклонального антитіла 513A161.1 у концентрації 1:1500 (угорі) або 1:2000 (унизу).

На Фігурі 12 показані результати твердофазного ІФА, що вказують на перехресну реакційну здатність моноклонального антитіла 513A431.1 у концентрації 1:100 (угорі) або 1:200 (унизу).

На Фігурі 13 показані результати твердофазного ІФА, що вказують на перехресну реакційну здатність моноклонального антитіла 513A431.1 у концентрації 1:500 (угорі) або 1:1000 (унизу).

На Фігурі 14 показані результати твердофазного ІФА, що вказують на перехресну реакційну здатність моноклонального антитіла 513A431.1 у концентрації 1:1500 (угорі) або 1:2000 (унизу).

На Фігурі 15 показані середні показання й стандартні відхилення коефіцієнта поглинання при твердофазному ІФА трьох стандартів екстрактів клітинної стінки дріжджів, нанесених на планшет у нерозбавленому виді або при розведенні 1:1 в PBS або PBS+3 % знежиреного сухого молока (Приклад 6).

На Фігурі 16 показаний графік стандартних кривих екстракту корму для часу покриття мікропланшета й температури інкубування при твердофазному ІФА, описаних у Прикладі 6.

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Для кращого розуміння цього винаходу нижче наведені визначення ряду термінів і фраз:

У даному описі терміни "пептид", "поліпептид" і "білок" відносяться до первинної послідовності амінокислот, з'єднаних ковалентними "пептидними зв'язками". У загальному випадку пептид містить невелику кількість амінокислот, звичайно 2-50 амінокислот, і є більше коротким, чим білок. Термін "поліпептид" включає пептиди й білки. У деяких варіантах втілення пептид, поліпептид або білок є синтетичними, у той час як в інших варіантах втілення пептид, поліпептид або білок мають рекомбінантне або природне походження. Синтетичний пептид являє собою пептид, отриманий штучним шляхом *in vitro* (тобто не продукований *in vivo*).

Термін "глікопротеїн(и)" або "глікопептид(и)" відноситься до білка або пептиду, що містить один або більше залишків вуглеводів, ковалентно приєднаних до ланцюга поліпептиду. Термін "селенопротеїн(и)" або "селенопептид(и)" відноситься до білка або пептиду, що містить один або більше атомів селену. Як правило, атоми селену включені в білки в складі амінокислот, що містять селен, включаючи селеноцистеїн і селенометіонін.

Термін "селеноглікопротеїн (и)", "селеноглікопептид (и)" або "SGP" відноситься до глікопротеїну або глікопептиду, що включає один або більше атомів селену. Як правило, "селеноглікопротеїни" містять одну або більше амінокислоту, що містить селен. "Селеноглікопротеїни" можуть включати ряд вуглеводів у будь-якій кількості різних форм.

Терміни "зразок" і "проба" використовують у їх найбільш широкому змісті; вони включають зразки й проби, отримані з будь-якого джерела. У даному описі термін "зразок" використовують стосовно біологічних зразків, що отримані у тварин (включаючи людину); він включає рідини, тверді речовини, тканини й гази. У деяких варіантах втілення даного винаходу зразки включають зразки, що містять матеріал рослинного походження (силос, зерно, оброблений корм для худоби, кормові продукти на проміжних стадіях виготовлення). У той же час, ці приклади не слід розглядати як приклади, що обмежують типи зразків, що знаходять застосування в рамках цього винаходу. Як використовується тут, термін "дріжджі" і "дріжджові клітини" відноситься до еукаріотичних мікроорганізмів, що відносяться до царства Fungi, що володіє клітинною стінкою, клітинною мембраною й внутрішньоклітинними компонентами. Дріжджі не утворюють відособленої таксономічної або філогенетичної групи. У цей час відомо приблизно 1500 видів; підраховано, що описано тільки 1 % всіх видів дріжджів. Термін "дріжджі" найчастіше сприймається як синонім для *S. cerevisiae*, однак філогенетична розмаїтість дріжджів підтверджується їх присутністю як у відділі Ascomycota, так і у відділі Basidiomycota. Термін "дріжджі" охоплює пивні дріжджі, спиртові дріжджі й пекарські дріжджі. Дріжджі, що брунькуються ("істинні дріжджі") відносяться до порядку Saccharomycetales. Більшість видів дріжджів розмножуються безстатевим шляхом за допомогою брунькування, хоча деякі з них розмножуються шляхом розподілу навпіл. Дріжджі є одноклітинними, хоча деякі види стали багатоклітинними шляхом утворення ланцюжка з'єднаних клітин, що брунькуються, відомих як псевдогіфи, або хибні гіфи. Розмір дріжджів може варіюватися в широких межах залежно від виду, звичайно становлячи 3-4 мкм у діаметрі, хоча деякі дріжджі можуть досягати розміру понад 40 мкм. Як використовується тут, термін "клітинна стінка дріжджів", також називаний "YCW", відноситься до клітинної стінки організму дріжджів, що оточує плазматичну мембрану й внутрішньоклітинні компоненти дріжджів. Клітинна стінка дріжджів включає як зовнішній шар (головним чином складається з маннана), так і внутрішній шар (головним чином складається із

глюкану й хітину) клітинної стінки дріжджів. Функція клітинної стінки - забезпечення структури й захист вмісту дріжджової клітини (центра її метаболічної активності). У клітинній стінці дріжджів розташовуються сигнальні шляхи й шляхи розпізнавання. Склад клітинної стінки дріжджів варіює від штаму до штаму й залежить від умов росту дріжджів.

5 Як використовується тут, термін "екстракт клітинної стінки дріжджів" відноситься до клітинної стінки дріжджів, зруйнованої або "лізованої" (наприклад, під час стадії розриву й лізису) і відділеної від розчинних внутрішньоклітинних компонентів дріжджової клітини.

Як використовується тут, термін мас/мас (маса/маса) відноситься до кількості даної речовини в композиції по масі. Наприклад, корм для тварин, що містить 0,02 % мас/мас добавки до кормового раціону по винаходу, означає, що маса добавки до кормового раціону становить 0,02 % від загальної маси корму для тварин (наприклад, 200 грамів композиції добавки до кормового раціону по винаходу в 907200 грамах корму для тварин).

10 Як використовується тут, термін "очищений" або "очистити" відноситься до видалення компонентів зі зразка. Наприклад, клітинну стінку дріжджів або екстракти клітинної стінки дріжджів очищують шляхом видалення компонентів, що не відносяться до клітинної стінки дріжджів (наприклад, плазматичної мембрани й/або внутрішньоклітинних компонентів дріжджів); її також очищують шляхом видалення домішок або агентів, що не є клітинною стінкою дріжджів. Видалення компонентів, що не відносяться до клітинної стінки дріжджів і/або домішок, що не є клітинною стінкою дріжджів, приводить до збільшення процентного вмісту клітинної стінки дріжджів або її компонентів у зразку. На молекулярному рівні термін "очищений" відноситься до молекул (наприклад, вуглеводів, глікопротеїнів), які вилучені з їх природного оточення, виділені або розділені. Таким чином, "виділений вуглевод" може являти собою очищений вуглевод. "Практично очищені" молекули є, щонайменше, на 60 % вільними, переважно, щонайменше, на 75 % вільними й більш переважно, щонайменше, на 90 % вільними від інших компонентів, з якими вони асоційовані в природних умовах. Як використовується тут, термін "очищений" або "очистити" також відноситься до видалення забруднюючих домішок зі зразка. Видалення забруднюючих білків приводить до підвищення процентного вмісту дослідника, що цікавить, поліпептиду в зразку. Крім того, рекомбінантні поліпептиди (наприклад, глікопротеїни) експресують в або очищують із клітин-хазяїв рослин, бактерій, дріжджів або ссавців і очищують поліпептиди шляхом видалення білків клітини-хазяїна; таким чином, процентний вміст рекомбінантних поліпептидів у зразку підвищується. Як використовується тут, термін "тварина" відноситься до представників царства Animalia. Він включає худобу, сільськогосподарських тварин, свійських тварин, кімнатних тварин або тварин, що утримують в домашніх умовах, морських і прісноводних тваринних і диких тварин, але не обмежується ними.

35 Як використовується тут, термін "худоба", також називаний "видами сільськогосподарських тварин", а також "домашньою худобою", а також "тваринами, що розводять на комерційній основі", відноситься до свійських тварин, що навмисно вирощують в умовах сільського господарства або аквакультури для виробництва їжі або волокна, або для використання їх праці або спілкування.

40 Як використовується тут, терміни "харчова добавка", "добавка до раціону", "композиція добавки до раціону" і т.п. відносяться до харчового продукту, складеному як харчова добавка або живильна добавка для використання в складі раціону, наприклад, як доповнення до кормів для тварин. Типові композиції добавок до раціону описані тут.

45 Як використовується тут, термін "набір" використовується стосовно комбінації реагентів і інших матеріалів. Мається на увазі, що набір може включати реагенти, наприклад, розчини для екстракції, антитіла, і реагенти для виявлення. Не мається на увазі, що термін "набір" обмежується певною комбінацією реагентів і/або інших матеріалів. У даному описі термін "токсичний" відноситься до будь-якої шкідливої або дії, що ушкоджує, виробленої на суб'єкта, клітину або тканину в порівнянні з тією же клітиною або тканиною до введення токсиканта. Як використовується тут, термін "сублімаційне сушіння", термін "ліофілізація" і термін "криогенне зневоднювання" відносяться до видалення розчинника з матеріалу в замороженому стані шляхом сублімації. Це досягається шляхом заморожування матеріалу, що висушується, нижче його евтектичної крапки, а потім вплив схованої теплоти сублімації. Точний контроль вступник теплоти дозволяє виконувати сушіння в замороженому стані без розплавлювання продукту. При практичному застосуванні цей спосіб прискорюють і точно контролюють при умовах зниженого тиску.

55 Як використовується тут, термін "сухий сипучий порошок" відноситься до сипучого сухого порошку, наприклад, порошку, який можна висипати з контейнера, сумки, судини й т.д. без перешкод з боку більших грудок.

60 Як використовується тут, термін "диспергування" відноситься до зниження розміру часток за



рахунок удару, обрізки або тертя.

Як використовується тут, термін "відмивання" відноситься до видалення або очищення (наприклад, з використанням будь-якого виду розчиненої речовини (наприклад, дистильованої води, буфера або розчинника) або їх суміші) домішок або розчинних небажаних компонентів препарату (наприклад, екстракт клітинної стінки дріжджів можна відмити з метою видалення компонентів, що не відносяться до клітинної стінки дріжджів, зі зразка; лунку титраційного мікропланшета можна відмити з метою видалення компонентів, що не зв'язалися або, що зв'язалися неспецифічно, ).

Термін "антитіло" або "імуноглобулін" відноситься до білка, що зв'язують специфічний антиген. Імуноглобуліни включають поліклональні, моноклональні, химерні й гуманізовані антитіла, Fab-фрагменти, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти, і імуноглобуліни наступних класів: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE і імуноглобуліни (slg), що секретують, але не обмежуються ними. Імуноглобуліни звичайно складаються із двох ідентичних важких ланцюгів і двох легких ланцюгів. У той же час терміни "антитіло" і "імуноглобулін" також включають одноланцюгові антитіла й двохланцюгові антитіла. Антитіла можна одержати за допомогою будь-якої відомої методології (див., наприклад, Current Protocols in Immunology (1998) John Wiley and Sons, Inc., N.Y.).

Термін "антиген" відноситься до вуглеводу, білку, глікопротеїну, ліпопротеїну, ліпиду або іншої речовини, які реагують із антитілами, специфічними стосовно фрагмента молекули.

Як використовується тут, термін "аналізована речовина" відноситься до атома, молекули, групи атомів і/або молекул, речовини або хімічного компоненту. Аналізовану речовину саму по собі виміряти неможливо, але можна визначити аспекти або властивості (фізичні, хімічні, біологічні й т.д.) аналізованої речовини з використанням аналітичної процедури, наприклад, ВЕЖХ або ЯМР. Наприклад, не можна виміряти "стілець" (аналізована речовина-компонентів) сам по собі, але можна виміряти висоту, ширину й т.д. стільця. Аналогічно, не можна виміряти мікотоксин, але можна виміряти сигнал мікотоксина (наприклад, хромогенний сигнал, флуоресцентний сигнал), пов'язаний з його концентрацією.

Терміни "утворювати імунопреципітат", "очистити імуноафінним способом" і "очистити з використанням афінних способів" і їх граматичні варіанти, наприклад, утворені від них дієслова й прикметники, відносяться до використання антитіла для відділення його антигену або його фрагмента від суміші інших молекул.

Термін "імунологічний аналіз" і його граматичні варіанти відносяться до використання антитіла для визначення присутності антигену або його фрагмента в суміші інших молекул.

Термін "фарбування" відноситься до будь-якої кількості способів, відомим у даній області й використовуваним для кращої візуалізації, розрізнення або ідентифікації певного(их) компонента(ів) і/або властивостей(а) матеріалу (наприклад, зразка, зразка корму, екстракту зразка корму, клітини, клітин).

Термін "імунофлюоресценція" відноситься до методики фарбування, що використовують для ідентифікації, маркування, мічення, візуалізації або прояву за рахунок процедур, відомих у даній області, де ліганд (як правило, антитіло) пов'язаний з рецептором (звичайно антигеном), і такий ліганд, у випадку антитіла, кон'югований із флуоресцентною молекулою, або даний ліганд потім зв'язується антитілом, специфічним стосовно даного ліганду, а зазначене антитіло кон'юговане із флуоресцентною молекулою, де зазначену флуоресцентну молекулу можна візуалізувати за допомогою відповідного інструмента (наприклад, флуоресцентного мікроскопа).

Термін "антигенна детермінанта" відноситься до фрагмента антигену (наприклад, епітопу), що вступає в контакт із конкретним антитілом. Якщо для імунізації тварини-хазяїна використовують фрагмент білка, різні області білка можуть індукувати продукцію антитіл, що специфічно зв'язуються з даною областю або тривимірною структурою білка; ці області й/або структури називають антигенними детермінантами. Антигенні детермінанти можуть конкурувати з інтактним антигеном ("імуногеном", використовуваним для стимуляції імунної відповіді) за зв'язування з антитілом.

Як використовується тут, термін "імуноаналіз" відноситься до якісного або кількісного тесту, що призначений для виявлення антигену в зразку. При імуноаналізі звичайно використовують антитіла, що розпізнають антиген. Антитіло, що розпізнає антиген, може бути прямим або непрямим чином пов'язане з візуалізуючим компонентом, наприклад, хромогенним або флуорогенним маркером або ферментом. Приклади імуноаналізу включають твердофазний імуноферментний аналіз ("твердофазний ІФА"), імунохроматографічні тести в бічному потоці, вестерн-блоттінг, аналіз на основі мікрочастинок (наприклад, аналіз Luminex®), імуноаналіз із магнітним носієм, дот-блот, імуноферментний аналіз (ІФА), радіоімуноаналіз (RIA), імунохемілюмінесцентний аналіз (CLIA), що підраховує імуноаналіз (CIA) і т.п., але не обмежуються ними. Імуноаналіз може бути конкурентним або неконкурентним.

Як використовується тут, термін "твердофазний імуноферментний аналіз" або "твердофазний ІФА", що іноді називають "сендвич-аналізом", відноситься до певного типу імуноаналізу. Як правило, невідому кількість антигену абсорбують або імобілізують на твердій поверхні й обробляють антитілом, здатним розпізнавати його. Кількість зв'язаного антитіла, як правило, визначають шляхом прямого або непрямого зв'язування із флуорогенним або хромогенним ферментом. Види твердофазного ІФА включають прямий твердофазний ІФА, непрямий твердофазний ІФА, сендвич-твердофазний ІФА, конкурентний твердофазний ІФА й звернений твердофазний ІФА, але не обмежуються ними. У даному описі термін "твердофазний ІФА" відноситься до твердофазному імуноферментному аналізу (або ІФА). Численні способи й варіанти застосування твердофазного ІФА відомі в даній області техніки й описані в багатьох літературних джерелах (див., наприклад, Crowther, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)," in *Molecular Biomethods Handbook*, Rapley et al. (eds.), pp. 595-617, Humana Press, Inc., Totowa, N.J. (1998); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Ch. 11, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994)). Крім того, існують численні доступні для придбання тест-системи на основі твердофазного ІФА. Як використовується тут, терміни "харчовий продукт", "продукти харчування", "корми", "кормовий продукт" і т.п. відносяться до кожного(их) споживаному(их) (наприклад, твариною) матеріалу(ам), що привносить енергію й/або живильні речовини в раціон. Приклади включають повну кормову суміш (TMR), фураж(и), кормові гранули, концентрат(и), кормову(і) суміш(и), зерно, барду, меласу, клітковину, грубі корми, траву(и), сіно, ядра горіхів, листя, борошно, розчинну(і) речовину(и) і добавку(и), але не обмежуються ними. Продукти харчування не обмежуються по їх фізичній формі. Харчові продукти можуть бути перероблені в частки меншого розміру (наприклад, роздроблені, нарізані, розтерті, розмелені й т.п.); виготовлені в рідкому виді (наприклад, екстраговані, зварені, концентровані, перетворені в сироп або іншу грузлу форму), або перероблені в одиниці більшого розміру (наприклад, пресовані в брикети, ущільнені, стислі або виготовлені у вигляді складних форм, наприклад, гранул, блоків, квадратів, пластівців і т.п.).

Як використовується тут при використанні як іменник, "добавка" або "кормова добавка" відноситься до речовини або предмета, що додається або включається іншим способом в іншу речовину або предмет. Крім того, як використовується тут, при використанні як іменник, слова "добавка" або "кормова добавка" можуть бути взаємозамінними при згадуванні "добавок" або "кормових добавок", які змішують із кормом для тварин перед годівлею тварини.

Як використовується тут, термін "глюкан" відноситься до будь-якого вуглеводного полімеру, що містить глюкозу. У деяких варіантах втілення глюкани являють собою полімери D-глюкози без обмеження по ступені полімеризації, ковалентного або нековалентного зв'язку з іншими полімерами або точним складом вуглеводу. Одиниці D-глюкози по всій довжині глюканового полімеру можуть брати участь в  $\alpha$ -зв'язках,  $\beta$ -зв'язках, або як в  $\alpha$ -, так і в  $\beta$ -зв'язках.

Як використовується тут, термін "вуглевод" використовується стосовно органічної сполуки с загальною формулою  $C_m(H_2O)_n$ . Вуглевод складається тільки з атомів вуглецю, водню і кисню, причому співвідношення атомів водню й кисню становить 2:1.

Як використовується тут, термін "сигнал" використовують у цілому стосовно будь-якого процесу, що піддається виявленню й, що вказує на виникнення реакції, наприклад, зв'язування антитіла з антигеном. Припускають, що сигнали у вигляді радіоактивності, флуориметричних або колориметричних продуктів/реагентів знайдуть застосування в рамках цього винаходу. У різних варіантах реалізації відповідно до цього винаходу виконують якісну оцінку сигналу, у той час як в альтернативних варіантах реалізації сигнал оцінюють кількісно.

У даному описі термін "твердий носій" використовують стосовно будь-якого твердого або закріпленого матеріалу, до якого приєднують такі реагенти, як антитіла, антигени й інші сполуки, що тестують. Наприклад, у методиці твердофазного ІФА твердим носієм є лунки титраційних мікропланшетів. Інші приклади твердих носіїв включають предметні стекла для мікроскопії, покривні стекла, гранули, частки, колби для культивування клітин, а також багато інших підходящих об'єктів.

Терміни "специфічне зв'язування" і "специфічно зв'язується" при використанні стосовно взаємодії між антитілом і антигеном описують взаємодію, що залежить від присутності певної структури (наприклад, антигенної детермінанти або епітопа) у складі антигену. Інакше кажучи, антитіло розпізнає й зв'язується з білковою структурою, унікальною для антигену, але не здійснює зв'язування з усіма білками в цілому (тобто неспецифічне зв'язування).

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Клітинна стінка дріжджів (YCW) містить складну структуру, що включає два основних полісахаридних компоненти:  $(1\rightarrow2)(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-D-маннан}$  і  $(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-глюкан}$ . Дані

полісахариди пов'язані з білками YCW через O- і N- глікозидні зв'язки, як обговорювалося в  
 недавно опублікованому огляді (Lesage et al. (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:317-343,  
 повністю включеному в даний документ за допомогою посилання). У промисловому масштабі  
 YCW, як правило, відокремлюють або екстрагують із лізованих організмів дріжджів шляхом  
 5 центрифугування й відмивання, як повідомлялося D.A. Howes і K.E. Newman (див., наприклад,  
 патент США № 6045834, повністю включений у даний документ за допомогою посилання). На  
 даному етапі YCW нерозчинна у воді. Наступна ферментативна й хімічна обробка первинної  
 YCW змінює структуру полісахаридів і білків, тим самим роблячи ці компоненти YCW,  
 щонайменше, частково розчинними у воді й у диметилсульфоксиді "ДМСО". Склад розчинних і  
 10 нерозчинних частин продукту залежить від умов здійснення способу.

Імуноаналіз включає чутливі аналітичні методики, які знаходять застосування при аналізі  
 таких складних, неоднорідних сумішей. У деяких варіантах втілення способу по даному винаході  
 антитіла тварини, імунізованого дріжджовим (1→6)-β-D- глюканом, що містить антиген, що  
 з'єднує всі основні структурні компоненти клітинної стінки (див. Kollár et al. (1997) J. Biol. Chem.  
 15 272:17762-17775, повністю включену в даний документ за допомогою посилання), розпізнають  
 даний полісахарид, забезпечуючи надійний і чутливий імуноаналіз. У деяких варіантах втілення  
 цього винаходу кількісний імуноаналіз (твердофазний ІФА) дозволяє аналізувати отриману з  
 YCW живильну добавку МІКОСОРБ (ALLTECH, Inc.) у зразках корму для тварин. Аналіз  
 (1→6)-β-D- глюкану YCW дуже специфічний при кількісному визначенні YCW, оскільки  
 20 (1→6)-β-D- глюкан укр. рідко зустрічається серед вуглеводів рослин. Таким чином, антитіла  
 проти цього полісахариду YCW не взаємодіють у значній мірі з рослинними полісахаридами, що  
 присутні в кормі для тварин, що забезпечує низький фон аналізу.

Крім того, деякі варіанти втілення цього винаходу також представляють способи: 1)  
 відділення розчинного (1→4)-α-(1→6)-β-D- глюкану від клітинної стінки дріжджів (див. статті  
 25 Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:1031 і Arvindkar et al. (2002) Yeast 19:131-139, кожна  
 з яких включена в даний документ за допомогою посилання у своїй повноті), наприклад, як  
 антиген для одержання антитіл, що розпізнають дріжджовий (1→4)-α-(1→6)-β-D- глюкан;  
 окислювання гідроксильних груп даного полісахариду по С-6-положенню глюкопіранозних  
 кілець реагентом Пфіцнера-Моффатта (див. статтю Pfizner et al. (1963) J. Am. Chem. Soc.  
 30 85:3027, повністю включену в даний документ за допомогою посилання) для перетворення їх в  
 альдегідну групу (див. статтю Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248, повністю включену  
 в даний документ за допомогою посилання); і використання даної окисленої форми  
 (1→4)-α-(1→6)-β-D- глюкану в реакції відновлювального амінування (див. статтю Abdel-Magid et  
 al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862, повністю включену в даний документ за допомогою  
 35 посилання) залишками лізину в складі бичачого сироваткового альбуміну (БСА) для одержання  
 кон'югата полісахарид-білок. У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує способи  
 поділу й очищення (наприклад, за допомогою іонообмінників, ДЕАЕ-целюлози й Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -  
 буферів з різною іонною силою) кон'югата (1→4)-α-(1→6)-β-D- глюкан- БСА, що використовують  
 у якості розчинного імуногена для імунізації тварини (наприклад, кролика) (див. Howard et al.  
 40 (2001) Basic Methods in Antibody Production and Characterization, CRC Press, pp. 11-18 і 31-50). У  
 деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує способи виготовлення покритої БСА  
 афінної смоли (див. Matejtschuk (1997) Affinity Separations: a Practical Approach, Oxford University  
 Press) і її використання для абсорбції БСА-специфічних антитіл із сироватки кролика, що  
 містить як БСА-специфічні, так і (1→4)-α-(1→6)-β-D-глюкан-специфічні антитіла. У деяких  
 45 варіантах втілення цього винаходу способи кон'югування полісахаридів з білками знаходять  
 застосування у виробництві вакцин для людини й тварин, оскільки такі способи зберігають  
 вихідну структуру полісахариду й не модифікують його кінець, що відновлює, на противагу  
 типовим способам кон'югування (див. патент США № 6596861, повністю включений у даний  
 документ за допомогою посилання).

50 Глюкани клітинної стінки *Saccharomyces cerevisiae*

Глюкани переважають серед полісахаридів клітинної стінки *Saccharomyces cerevisiae* (див.  
 Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:151-158). Описано полі (1→3)-β-D- глюкану в  
 підтримці форми й твердості клітинної стінки дріжджів (див. статті Klis et al. (2006) Yeast 23:185-  
 202; Lesage et al. (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:317-343, кожна з яких повністю включена в  
 55 даний документ за допомогою посилання) і (1→6)-β-D- глюкану в якості полісахариду, що  
 з'єднує один з одним всі полісахариди клітинної стінки (див. статті Aïmanîada et al. (2009) J. Biol.  
 Chem. 284:13401-13412; Kollár et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:17762-17777; Klis et al. (2002) FEMS  
 Microbiology Rev. 26:239-256, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою  
 посилання). Присутність розчинного й нерозчинного глікогеноподібного (1→4)-α-D- глюкану в  
 60 стінках вирощених в аеробних умовах *S. cerevisiae* часто

згадується в ранній літературі про дріжджі (див. статті Gunja-Smith et al. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 56:588-592; Grba et al. (1975) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2:29-37, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання), і ідентифіковані дві форми глікогенсинтетази (див. статті Gunja-Smith et al. (1977) *J. Bacteriol.* 130:818-825; Rothman-Denes et al. (1970) *PNAS* 66:967-974, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання). Глікоген являє собою резервний енергетичний вуглевод, що накопичується *S. cerevisiae*, що може бути мобілізований під час періодів голодування дріжджів. Він являє собою полімер  $\alpha$ -D- глюкози з молекулярною масою  $\sim 10^8$  і розгалуженою структурою з 10-14 залишків  $\alpha$ -D- глюкози, з'єднаних 1 $\rightarrow$ 4-зв'язками (див. статті Aklujkar et al. (2008) *J. Instit. Brew.* 114:205-208; Boulton et al. (2001) *The Biochemistry of Fermentation*. In: *Brewing Yeast and Fermentation*, Blackwell Science, Iowa, pp. 89-92, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання).

Зміст (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D- глюкану в клітині дріжджів може змінюватися від менш чим 1 % (див. Lille et al. (1980) *J. Bacteriol.* 143:1384-1394) до 29 % (див. статтю Sedmak et al., U.S. Pat. App. No. 2006/0263415, повністю включену в даний документ за допомогою посилання) сухої ваги, залежно від харчового статусу клітин, способу виділення, умов навколишнього середовища й часу збору клітин (див. Lille et al. (1980) *J. Bacteriol.* 143:1384-1394). Промислово одержувані клітини пивних дріжджів (див. Sedmak et al., патентну заявку США № 2006/0263415, повністю включену в даний документ за допомогою посилання) містили глюкани в концентрації 28,9 % сухої ваги (с.в.), включаючи 12,4 % с.в. (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-глюкану. При обробці цих клітин лужною протеазою нерозчинні у воді компоненти клітинної стінки містили 54,5 % с.у. глюканів і більше половини ваги (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D- глюкану (29,2 % с.в.).

В 2002 р. Arvindkar and Patil (див. статтю Arvindkar et al. (2002) *Yeast* 19:131-139, повністю включену в даний документ за допомогою посилання) запропонували пояснення наявності в клітинній стінці дріжджів нерозчинної фракції, що обумовлена іншими авторами як глікоген дріжджів, що "важко відмивається" (див. статтю Fleet et al. (1976) *J. Gen. Microbiol.* 94:180-192, повністю включену в даний документ за допомогою посилання), ґрунтуючись на отримані ними результатах про те, що (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-глюкан ковалентно пов'язаний з (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-глюканом. Однак це суперечило статті, опублікованої в 1997 р. Колларом і співавторами (див. статтю Kollár et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:17762-17775, повністю включену в даний документ за допомогою посилання) і з роботою, опублікованої Aimaniada і співавторами (див. статтю Aimaniada et al. (2009) *J. Biol. Chem.* 184:13401-13412, повністю включену в даний документ за допомогою посилання) про роль і структуру (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-глюкану в клітинній стінці дріжджів. Примітно, що результати Арвіндекара й Патила зажадали перевірки структури, оскільки автори працювали із хвилинними фракціями ферментативного гідролізу клітинної стінки дріжджів і не використовували ЯМР для кількісної або структурної оцінки виділених ними продуктів. В експериментах, виконаних у ході розробки варіантів втілення винаходу, були розроблені великомасштабні способи поділу для виділення змішаного полісахариду (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-глюкан/(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D- глюкан із клітинної стінки *S. cerevisiae*, і встановлена структура даного продукту за допомогою ЯМР-спектроскопії.

Продукти харчування й корму для тварин

Корми для тварин являють собою будь-які харчові продукти, які спеціально використовуються для годівлі свійських тварин (наприклад, великої рогатої худоби, кіз, овець, коней, птахів, буйволів, альпак, лам, ослів, мулів, кроликів, курей, гусаків, індичок і свиней). Корми для тварин часто включають сіно, солом, силос, пресовані й гранульовані корми, масла й змішані раціони, а також пророслі зерна й насіння бобових. Світова промисловість тваринних кормів споживала 635 мільйонів тонн кормів в 2006 році при щорічних темпах росту приблизно 2 %. Використання сільськогосподарських земель для вирощування кормів замість продуктів харчування для людини може бути спірним; деякі види кормів, наприклад, кукурудза (маїс), також можуть служити їжею для людей, у той час як інші, наприклад, трава - не можуть. Крім джерела енергії для тварин, корми для тварин також забезпечують живильні речовини (наприклад, селен), що використовує організм. Корми для тварин часто змішують із добавками й/або кормовими добавками (наприклад, МІКОСОРБ) до згодовування тварині.

Способи імуноаналізу

Даний винахід забезпечує способи виявлення речовин у зразках, що включають імунологічний аналіз або імуноаналіз. Імуноаналіз (імунологічний аналіз, способи імунологічного виявлення) припускає використання антитіла для виявлення (візуалізації, якісній ідентифікації, кількісного виявлення) речовини (наприклад, антигену), з яким зв'язується антитіло. Антиген, розпізнаваний антитілом, може являти собою макромолекулу або її фрагмент (наприклад, полімер, вуглевод, глікопротеїн, білок, їх групу або мономер). Наприклад, деякі способи по

даному винаході знаходять застосування при виявленні глюканів клітинної стінки дріжджів (наприклад, (1→4)- $\alpha$ -D- глюкану, (1→6)- $\beta$ -D- глюкану й/або (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D- глюкану).

Численні варіанти імуноаналізу знаходять застосування при якісному або кількісному виявленні речовин (наприклад, речовин, що перебувають у низькій концентрації, речовин, що є присутні у складі складних сумішей, вуглеводів, дріжджового (1→4)- $\alpha$ -D- глюкану, дріжджового (1→6)- $\beta$ -D-глюкану, дріжджового (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D- глюкану). Типи імуноаналізу включають твердофазний імуоферментний аналіз (твердофазний ІФА), імуохроматографічні тести в бічному потоці, вестерн-блоттинг, аналіз на основі мікрочастинок (наприклад, аналіз Lumiplex®), імуоаналіз із магнітним носієм, дот-блот, імуоферментний аналіз (ІФА), радіоімуоаналіз (PIA), імуохемілюмінесцентний аналіз (CLIA), що підраховує імуоаналіз (CIA) і т.п., але не обмежуються ними (див., наприклад, Wild et al. (2005) "The Immunoassay Handbook, 3<sup>rd</sup> Ed.", Elsevier Ltd., Oxford, UK). Імуоаналіз може бути конкурентним або неконкурентним.

Твердофазний імуоферментний аналіз (твердофазний ІФА)

Твердофазний імуоферментний аналіз, "твердофазний ІФА" використовується як діагностичний інструмент у медицині й патології рослин, а також контролі якості в різних галузях промисловості. В одному із прикладів типовий твердофазний ІФА включає молекулу-зонд, що спочатку іммобілізують на мікропланшеті з полістиролу або іншої поверхні. Потім вносять і інкубують агент, що блокує, наприклад, БСА. Біологічний або інший зразок, що містить специфічні молекули-мішені (найчастіше білки) у невідомій концентрації приводять у контакт із іммобілізованою молекулою-зондом. При її наявності, молекула-мішень захоплюється зондом пропорційно концентрації молекули-мішені. Потім поверхню звичайно промивають розчином м'якого детергенту для видалення молекул, які не зв'язалися специфічним чином. Потім вносять додаткову молекулу, наприклад, друге антитіло, формуючи "сендвіч"-комплекс із захоплюючим зондом, молекулою-мішенню й міченим зондом-детектором. Другу молекулу часто називають детектуючим зондом або детектуючим антитілом і звичайно ковалентно зв'язують із ферментом, гаптенем або іншою молекулою-міткою.

Після кінцевого етапу відмивання планшет обробляють кон'югатом, що зв'язується з міченим детектуючим антитілом і утримуючим субстратом ферменту, флуоресцентно мічений реагент для виявлення або різних інших репортерів. Репортер генерує виявляється сигнал, що, пропорційний кількості антигену-мішені в зразку. Як правило, твердофазний ІФА реєструється з використанням колориметричного або флуоресцентного зчитувача мікропланшетів і забезпечує один вимір аналізованої речовини-мішені на лунку. Інші варіанти твердофазного ІФА включають непрямий, конкурентний або звернений твердофазний ІФА, але не обмежуються ними (див., наприклад, Crowther et al. (2008) "The ELISA Guidebook, 2<sup>nd</sup> Ed.", Humana Press).

У багатьох випадках твердофазний ІФА проводять у мікропланшетах, виготовлених відповідно до стандартного формату, що дає можливість обробки за допомогою автоматизованих інструментів. Ці стандарти встановлені Суспільством біомолекулярних наук (Society of Biomolecular Sciences, SBS) і відомі як SBS-стандарти. Згідно SBS-Стандартам, "площа основи" багатолункового планшета приблизно дорівнює 85 мм x 125 мм, а лунки розташовані відповідно до певного формату, залежно від загальної кількості лунок. Американський національний інститут стандартів (ANSI) опублікував наступні SBS-стандарти для мікропланшетів: "Розміри основи" (ANSI/SBS 1-2004), "Висота" (ANSI/SBS 2-2004), "Розміри зовнішнього фланця днища" (ANSI/SBS 3-2004) і "Положення лунок" (ANSI/SBS 4-2004). Найчастіше користувачі твердофазного ІФА використовують 96-ямкові планшети. Як альтернатива, якщо для аналізу необхідно менш 96 лунок, можна використовувати аж до дванадцяти 8-ямкових "стрипів", так що одночасно використовують тільки частину 96-ямкового планшета.

Служби по тестуванню

У деяких варіантах втілення для перекладу неопрацьованих даних, отриманих у ході аналізу (наприклад, імуоаналізу, твердофазного ІФА) (наприклад, про присутність, відсутність або кількість антигену) (наприклад, дріжджового (1→4)- $\alpha$ -D-глюкану, дріжджового (1→6)- $\beta$ -D-глюкану, дріжджового (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-глюкану) у дані прогностичного значення для кінцевого користувача (наприклад, селекціонера або фахівця з обслуговування худоби або свійських тварин, ветеринарного лікаря, фермера, споживача) використовують програму комп'ютерного аналізу. Кінцевий користувач може одержати доступ до прогностичних даних з використанням будь-яких відповідних засобів. Так, у деяких варіантах втілення, даний винахід забезпечує додаткову перевагу, що полягає в тім, що від кінцевого користувача, що, швидше за все не навчався імуоаналізу, не потрібно розуміння неопрацьованих даних. Дані представляють безпосередньо кінцевому користувачеві в найбільш корисній для нього формі. Потім кінцевий користувач може негайно використовувати інформацію для оптимізації догляду

за суб'єктом (наприклад, худобою або свійською твариною).

Даний винахід розглядає будь-який спосіб, здатний одержувати, обробляти й передавати інформацію, що стосується зразків, що надходить з лабораторій, що виконують аналізи. Наприклад, у деяких варіантах втілення цього винаходу зразок (наприклад, зразок корму, зразок екстракту корму) одержують і представляють аналітичній службі (наприклад, лабораторії й т.д.), що розташована в будь-якій частині миру (наприклад, у тій же країні, де перебуває суб'єкт або де в остаточному підсумку використовується інформація, або в іншій країні) для одержання неопрацьованих даних. Кінцевий користувач може мати зразок (наприклад, екстракт корму), отриманий третьою стороною й відправлений в аналітичний центр, або суб'єкти можуть самі зібрати зразки й відправити їх безпосередньо в аналітичний центр. Якщо зразок включає раніше певну інформацію, кінцевий користувач може направити цю інформацію безпосередньо в аналітичну службу (наприклад, інформаційну карту, що містить інформацію, можна сканувати на комп'ютер і передати дані на комп'ютер аналітичного центра за допомогою систем електронного зв'язку). Після одержання аналітичною службою зразок обробляють і одержують профіль (наприклад, змісту антигену), специфічний у відношенні діагностичної й прогностичної інформації, бажаної для кінцевого користувача.

Потім дані профілю підготовляють у форматі, що підходить для інтерпретації кінцевим користувачем. Наприклад, замість надання неопрацьованих даних, підготовлений формат може являти собою оцінку ризику (наприклад, імовірність присутності антигену) для кінцевого користувача, а також рекомендації для конкретних варіантів догляду за худобою. Дані можна відобразити для кінцевого користувача будь-яким підходящим способом. Наприклад, у деяких варіантах втілення аналітична служба створює звіт, що може бути роздрукований для кінцевого користувача (наприклад, у місці контакту, у місці догляду за худобою) або виведений для кінцевого користувача на монітор комп'ютера.

У деяких варіантах втілення інформацію спочатку аналізують у місці догляду за тваринами або на регіональному підприємстві. Потім неопрацьовані дані відправляють у центр по обробці інформації для подальшого аналізу й/або для перетворення неопрацьованих даних в інформацію, корисну для кінцевого користувача або інших зацікавлених сторін. Центр по обробці інформації забезпечує перевагу конфіденційності (всі дані зберігаються в центрі з використанням єдиних протоколів безпеки), швидкості й однаковості аналізу даних. Центр по обробці інформації потім може контролювати долю даних, використовуючи зв'язок з кінцевим користувачем. Наприклад, за допомогою системи електронного зв'язку, центр може надати дані кінцевому користувачеві.

У деяких варіантах втілення кінцевий користувач має можливість прямого доступу до даних з використанням системи електронного зв'язку. Кінцевий користувач може запросити додаткову раду, ґрунтуючись на результатах. У деяких варіантах втілення дані використовують у дослідницьких цілях. Наприклад, дані можуть бути використані для подальшої оптимізації режиму харчування для худоби або свійських тварин.

#### Композиції й набори

Композиції для використання (наприклад, достатні, необхідні або корисні) відповідно до способів по деяких варіантах втілення цього винаходу включають реагенти для виявлення присутності або відсутності специфічних антигенів (наприклад, дріжджового (1→4)-α-D-глюкану, дріжджового (1→6)-β-D-глюкану, дріжджового (1→4)-α/(1→6)-β-D-глюкану). Кожна із цих композицій, окремо або в сполученні з іншими композиціями по даному винаході, може надаватися у вигляді набору. Набори можуть додатково включати відповідні контролю й/або реагенти для виявлення.

#### Кон'юговання антиген-носії

У деяких варіантах втілення даний винахід представляє композиції (наприклад, антигенів), які знаходять застосування в аналізі (наприклад, імунологічному аналізі; для одержання антитіл) речовин клітинної стінки дріжджів. У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує способи: відділення розчинного (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкану від клітинної стінки дріжджів (див. статті Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:1031; Arvindekar et al. (2002) Yeast 19:131-139, кожна з яких включена в даний документ за допомогою посилання) як антиген для дріжджового (1→6)-β-D- глюкану; окислювання гідроксильних груп даного полісахариду по С-6-положенню глюкопіранозних кілець реагентом Пфіцнера-Моффатта (див. статтю Pfizner et al. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027, повністю включену в даний документ за допомогою посилання) для перетворення їх в альдегідні групи (див. статтю Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248, повністю включену в даний документ за допомогою посилання); і використання даної окисленої форми (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкану в реакції відновного амінування (див. статтю Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862, повністю включену

в даний документ за допомогою посилання) залишками лізину в складі носія (наприклад, білка-носія, наприклад, БСА) для одержання кон'югату полісахарид-носії. У деяких варіантах втілення даний винахід відноситься до застосування методів поділу (наприклад, за допомогою іонообмінників, ДЕАЕ-целюлози й  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -буферів з різною іонною силою) для відділення чистого антигену (наприклад, кон'югату  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-}$  глюкан-БСА), що використовують у якості розчинного імуногену для імунізації тварини (наприклад, кролика) (див. Howard et al. (2001) "Basic Methods in Antibody Production and Characterization", CRC Press, pp. 11-18 і 31-50). У деяких варіантах втілення даний винахід також відноситься до виготовлення покритої БСА афінної фази (див. Matejtschuk (1997) "Affinity Separations: A Practical Approach", Oxford University Press) і її використання для абсорбції специфічних до носія (наприклад, БСА-специфічних) антитіл з антисироватки (наприклад, сироватки кролика), що містить антитіла як до носія (наприклад, БСА), так і до антигену (наприклад,  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-}$  глюкану), у такий спосіб підвищуючи специфічність отриманого препарату антитіл. Способи кон'югування полісахаридів з носіями (наприклад, білковими носіями, наприклад, БСА) у деяких варіантах втілення цього винаходу знаходять застосування у виробництві вакцин для людини й тварин, оскільки такі методи зберігають полісахаридну структуру, а не модифікують кінець, що відновлює, як типові методи кон'югації<sup>о</sup> (див. Moreau et al., патент США № 6596861, повністю включений у даний документ за допомогою посилання).

Слабка антигенність полі- або олігосахаридів часто вимагає модифікації перед їх використанням як антигенів. У деяких варіантах втілення цього винаходу розроблені способи синтезу, згідно яким полісахаридні антигени (утримуючі  $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-}$  глюкан) кон'югували з носієм (наприклад, білковим носієм, наприклад, БСА), що відбувається від видів тварин, що відрізняються від видів, використаних для імунізації (див. Howard et al. (2001) "Basic Methods in Antibody Production and Characterization", CRC Press, pp. 11-18 and 31-50; Matejtschuk (1997) "Affinity Separations: A Practical Approach", Oxford University Press). Хоча даний винахід не обмежується природою або типом, носія, що використовується, найбільш підходящим носієм є БСА через його доступність для придбання й присутності п'яти залишків лізину, кожний з яких містить вільну аміногрупу, яку можна кон'югувати із полі- або олігосахаридами за допомогою різних хімічних способів (див. статті Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862; Lees et al. (1996) Vaccine 14:190-198; Pawlowski et al. (1999) Vaccine 17:1474-1483, кожна із яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання). У деяких кращих варіантах втілення вуглеводна група антигену й носій, використовуваний для кон'югування, є розчинними у воді. У деяких варіантах втілення альдегідні групи кінця, що відновлює, вуглеводної групи антигену (наприклад,  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-}$  глюканового полісахариду) не використовують для прямого кон'югування з носієм (наприклад, БСА), оскільки це істотно змінило б структуру і єднальну здатність полісахаридного антигену. У деяких втілень даний винахід дозволяє максимально зберегти структуру вуглеводної групи за рахунок застосування системи оцтового ангідриду/диметилсульфоксиду ( $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMCO}$ ) (див. Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248; повністю включену в даний документ за допомогою посилання) для окислювання по положенню, що відрізняється від C3.

У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує способи використання компонентів клітинної стінки дріжджів (наприклад, розчинного  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-}$  глюкану клітинної стінки *Saccharomyces cerevisiae*) для синтезу антигену (наприклад, кон'югату  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-}$  глюкан-БСА (бичачий сироватковий альбумін)) для використання при одержанні антитіл (наприклад, поліклональних антитіл). У деяких варіантах втілення даний винахід представляє імуногенну композицію, що включає  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-}$  глюкан і/або кон'югат (наприклад, кон'югат з білком або цукром), що містить його. У деяких варіантах втілення композиція антитіл по даному винаході знаходить застосування при виявленні продуктів клітинної стінки дріжджів у досліджуваних зразках (наприклад, зразках корму для тварин або його похідних, фракціях або їх екстрактах). У деяких варіантах втілення композиції по даному винаході екстрагують із глюкан-збагаченого матеріалу або глюкан-збагаченого продукту (GEM, ALLTECH, Inc., Ніколасвілл, штат Кентуккі, США), наприклад, шляхом кислотної екстракції (див. статтю Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:1031, повністю включену в даний документ за допомогою посилання). У деяких варіантах втілення м'яке окислювання полісахариду (наприклад,  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-}$  глюкану) по C-6-положенню глюкопіранозних кілець за допомогою суміші диметилсульфоксид (ДМСО)/оцтовий ангідрид ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) (див. статтю Pfizner et al. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027; повністю включену в даний документ за допомогою посилання) перетворює C-6-гідроксиметиленові ( $\text{-CH}_2\text{OH}$ ) групи в альдегідні ( $\text{-CH=O}$ ) групи (див. Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248, повністю включену в даний документ за допомогою посилання), і утворить окислену форму антигену (наприклад,

(1→4)-α-(1→6)-β-D-глюкану), здатну вступати у відновне амінування з носієм (наприклад, BSA) (див. роботи Moreau et al., патент США № 6596861; Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання).

Способи кон'югування по даному винаході, наприклад, що включають активацію полісахариду по С6-ОН, забезпечують повністю вихідну структуру, що зберігається, полісахаридної групи, і тому підходять для одержання антигену. Альтернативні способи активації полі- і олігосахаридів, включаючи окислювання періодатом (див. статтю Hay et al. (1973) Methods Carb. Chem. 5:357-370, повністю включену в даний документ за допомогою посилання) або CDAP-Активацию (див. Lees et al. (1996) Vaccine 14:190-198), але не обмежені ними, приводять до одержання істотно модифікованих полісахаридів, що знижує їхню придатність як антигенів.

#### Антитіла

Іншим аспектом даного винаходу є спосіб одержання імуноглобуліну для виявлення компонентів клітинної стінки дріжджів (наприклад, дріжджового (1→4)-α-D-глюкану, дріжджового (1→6)-β-D-глюкану, дріжджового (1→4)-α-(1→6)-β-D-глюкану), що включає етапи імунізації суб'єкта компонентом клітинної стінки дріжджів (наприклад, дріжджовим (1→4)-α-D-глюканом, дріжджовим (1→6)-β-D-глюканом, дріжджовим (1→4)-α-(1→6)-β-D-глюканом, (1→4)-α-(1→6)-β-D-глюкан-БСА або іншими їх фрагментами, варіантами або кон'югатами) і виділення імуноглобуліну з організму реципієнта. Імуноглобулін, отриманий відповідно до даного способу, є ще одним аспектом винаходу.

Інокуляти для продукування поліклональних антитіл звичайно виготовляють шляхом диспергування антигенної композиції у фізіологічно припустимому розріджувачі, наприклад, фізіологічному розчині або інших ад'ювантах, утворюючи водну композицію. Імуностимулюючу кількість інокулята вводять суб'єктові, а потім підтримують щепленого суб'єкта протягом часу, достатнього для індукції захисних антитіл антигенною композицією.

Антитіла можна виділити в бажаному ступені за допомогою добре відомих методик, наприклад, афінної хроматографії (див., наприклад, Harlow and Lane, Antibodies; a Laboratory Manual (1988) Cold Springs Harbor Laboratory Press).

Антитіла включають препарати антисироватки різних часто використовуваних тварин (наприклад, кіз, приматів, кроликів, ослів, свиней, коней, морських свинок, пацюків або людини). У тварин виконують добір крові й виділяють сироватку.

Імуноглобуліни, отримані відповідно до цього винаходу, можуть включати повнорозмірні антитіла, фрагменти або субфрагменти антитіла. Антитіла можуть являти собою повнорозмірні імуноглобуліни будь-якого класу, наприклад, IgG, IgM, IgA, IgD або IgE, химерні антитіла або гібридні антитіла з подвійною специфічністю до двох або більше антигенів по винаходу. Крім того, вони можуть являти собою фрагменти, наприклад F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv і т.п., включаючи гібридні фрагменти.

Як альтернатива, методики, описані для продукування одноланцюгових антитіл, можна адаптувати за допомогою способів, відомих у даній області техніки, для одержання одноланцюгових антитіл, що специфічно зв'язуються з певним антигеном. Антитіла з подібною специфічністю, але різним ідіотиповим складом, можна одержати за допомогою перетасування ланцюгів з рандомізованих комбінаторних бібліотек імуноглобулінів (див., наприклад, Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 11120-23, 1991).

Одноланцюгові антитіла також можна сконструювати за допомогою способу ампліфікації ДНК, наприклад ПЦР, використовуючи гібридну кДНК як матриця (див., наприклад, Thirion et al., 1996, Eur. J. Cancer Prev. 5, 507-11). Одноланцюгові антитіла можуть бути моно- або біспецифічними й можуть бути бівалентними або тетравалентними. Конструювання тетравалентних біспецифічних одноланцюгових антитіл описано, наприклад, в Coloma & Morrison, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 159-63. Конструювання бивалентних біспецифічних одноланцюгових антитіл описано, наприклад, в Mallender & Voss, 1994, J. Biol. Chem. 269, 199-206.

Нуклеотидну послідовність, що кодує одноланцюгове антитіло, можна сконструювати за допомогою ручного або автоматичного нуклеотидного синтезу, клонувати в експресуючому конструкті з використанням стандартних способів рекомбінантних ДНК і впровадити в клітину для експресії послідовності, що кодує, як описано нижче. Як альтернатива одноланцюгові антитіла можна продукувати прямо, наприклад, за допомогою технології нитковидних фарів (див., наприклад, Verhaar et al., 1995, Int. J. Cancer 61, 497-501; Nicholls et al., 1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91).

Антитіла, що специфічно зв'язуються з певним антигеном, також можна продукувати шляхом індукції продукції *in vivo* у популяції лімфоцитів або скринінгу бібліотек імуноглобулінів або



панелей високоспецифічних єднальних реагентів, як описано в літературі (див., наприклад, Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winter et al., Nature 349, 293-299, 1991).

Химерні антитіла можна сконструювати, як описано в WO 93/03151. Крім того, можна одержати єднальні білки, що відбуваються від імуноглобулінів і є полівалентними й поліспецифічними, наприклад, "діатіла", описані в WO 94/13804. Антитіла можна очистити за допомогою способів, добре відомих у даній області техніки. Наприклад, антитіла можна афінно очистити шляхом пропущення через стовпчик, що містить відповідний зв'язаний антиген. Антитіла, що зв'язалися, потім можна елювати зі стовпчика, використовуючи буфер з високою концентрацією солі.

Імуногенну композицію по винаходу можна вводити суб'єктові, що надалі є джерелом імуноглобулінів, що продукуються у відповідь на стимуляцію специфічною імуногенною композицією. Суб'єкт, оброблений таким чином, є донором плазми, з якої можна одержати високоактивні імуноглобуліни з використанням стандартної методології фракціонування плазми.

Композиції по даному винаходу включають антитіла (наприклад, моноклональні й/або поліклональні антитіла), які можуть являти собою повнорозмірні імуноглобуліни будь-якого класу (наприклад, IgG, IgM, IgA, IgD або IgE, химерні антитіла) або гібридні антитіла зі специфічністю до двох або більше антигенів по винаходу, але не обмежуються ними. Крім того, вони можуть являти собою фрагменти, наприклад F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv і т.п., включаючи гібридні фрагменти.

Способи одержання моноклональних антитіл добре відомі в даній області техніки й можуть включати злиття спленоцитів з мієломними клітинами (див., наприклад, Kohler and Milstein 1975 Nature 256; 495; Harlow and Lane, Antibodies; a Laboratory Manual (1988) Cold Springs Harbor Laboratory Press). Як альтернатива, моноклональні Fv-фрагменти можна одержати шляхом скринінга підходящої бібліотеки фагового дисплея (див., наприклад, Vaughan TJ et al 1998 Nature Biotechnology 16; 535). Моноклональні антитіла можуть бути гуманізовані або частково гуманізовані відомими способами.

У деяких варіантах втілення цього винаходу композиції антитіл здатні розпізнавати антигени клітинної стінки дріжджів (наприклад, моноклональні або поліклональні антитіла, здатні розпізнавати дріжджовий (1→4)-α-D-глюкан, дріжджовий (1→6)-β-D-глюкан, дріжджовий (1→4)-α-/(1→6)-β-D-глюкан або їх фрагменти, варіанти або кон'югати). У деяких варіантах втілення композиції антитіл по даному винаході зв'язуються з (1→4)-α-D-глюканом клітинної стінки дріжджів, але не з (1→4)-α-D-глюкан-утримуючими фрагментами, що є присутні у речовинах, що не є (1→4)-α-D-глюкан-утримуючими полімерами клітинної стінки дріжджів (наприклад, (1→4)-α-D-глюканом клітинної стінки дріжджів, (1→4)-α-/(1→6)-β-D-глюканом клітинної стінки дріжджів або їх фрагментів, варіантами або кон'югатами). У деяких варіантах втілення композиції антитіл по даному винаході зв'язуються з (1→6)-β-D-глюканом клітинної стінки дріжджів, але не з (1→6)-β-D-глюкан-утримуючими фрагментами, що є присутні у речовинах, що не є (1→6)-β-D-глюкан-утримуючими полімерами клітинної стінки дріжджів (наприклад, (1→6)-β-D-глюканом клітинної стінки дріжджів, (1→4)-α-/(1→6)-β-D-глюканом клітинної стінки дріжджів або їх фрагментів, варіантами або кон'югатами). У деяких варіантах втілення композиції антитіл по даному винаході зв'язуються з (1→4)-α-/(1→6)-β-D-глюканом клітинної стінки дріжджів, але не з (1→4)-α-/(1→6)-β-D-глюкан-утримуючими фрагментами, що є присутні у речовинах, що не є клітинною стінкою дріжджів (наприклад, (1→4)-α-/(1→6)-β-D-глюканом клітинної стінки дріжджів або його фрагментів, варіантами або кон'югатами).

#### ПРИКЛАДИ

Наступні приклади наведені з метою демонстрації й додаткового ілюстрування певних кращих варіантів реалізації цього винаходу й не повинні розглядатися як обмежуючі його об'єм.

#### Приклад 1

Екстракція (1→4)-α-/(1→6)-β-D-глюкану з харчового β-глюкану клітинної стінки *Saccharomyces cerevisiae*

Виготовлення глюкану клітинної стінки дріжджів

Технічний (1→6)-β-D-глюкан (ALL-BGY, ALLTECH, Inc., Ніколасвілл, штат Кентуккі, США), отриманий з *S. cerevisiae* шляхом ферментативної/лужної/термічної обробки, чотири рази промивали деіонізованою водою для видалення розчинних залишків. Після сублімаційного сушіння одержували "глюкан-збагачений матеріал" ("GEM").

Кислотний гідроліз глюкану клітинної стінки дріжджів

На Фігурі 1 показане виготовлення різних фракцій. Кислотний гідроліз глюкану клітинної стінки дріжджів здійснювали, як описано в роботі Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:151-158, повністю включеної в даний документ за допомогою посилання. "Глюкан-збагачений

матеріал" ("GEM") (70 г) піддавали гідролізу з 700 мл 100 мМ HCl (pH 2,2) при 80 °C протягом 6 г. Після цього суміш центрифугували при 13500 × g/10 °C/10 хв і збирали надосадову рідину. Осад двічі екстрагували 150 мл деіонізованою водою й ліофілізували, одержуючи 57,9 г білого аморфного продукту (P1).

- 5 Розчини, отримані в результаті двох відмивань, поєднували з вихідною надосадовою рідиною й нейтралізували 2 н. NaOH до pH 7,0. Осад, що утворився, збирали (осад P1/7) центрифугуванням (1,82 г після ліофілізації), а надосадову рідину концентрували до об'єму 450 мл за допомогою вакуумного роторного випарника Buchi при температурі нижче 37 °C. Даний розчин надалі концентрували за допомогою пристроїв для ультрафільтрації за допомогою центрифугування 5 кДа AMICON 15 (Millipore Corporation, Делавер, США). Концентрат (~150 мл) двічі відмивали центрифугуванням двома рівними об'ємами деіонізованої води, використовуючи ті ж пристрої для ультрафільтрації, з метою видалення солі й низькомолекулярних компонентів, отриманих при кислотному гідролізі. Відмитий концентрат (S1) ліофілізували, одержуючи 7,5 г білого аморфного продукту. Частину осаду P1 піддавали 15 другої екстракції, використовуючи те ж співвідношення реагентів і умов, як при першій екстракції 0,1 н. HCl. Ці продукти ліофілізували, одержуючи P2 і S2. Друга екстракція 0,1 н. HCl не приводила до утворення осаду після нейтралізації надосадової рідини. Частиною осаду P2 піддавали третьої екстракції, використовуючи те ж співвідношення реагентів і умов, як при 20 першій екстракції 0,1 н. HCl, і ліофілізували продукти, одержуючи P3 і S3. Третя екстракція 0,1 н. HCl не приводила до утворення осаду після нейтралізації надосадової рідини. Вуглеводний склад і структуру полісахаридів розчинних і нерозчинних фракцій, отриманих при екстракції 0,1 н. HCl, установили за допомогою <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії. Зміст маннози й глюкози в зразках аналізували за допомогою аналізу складу за допомогою H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ВЕЖХ (див. статтю Dallies et al. (1998) Yeast 14:1297-1306, повністю включену в даний документ за допомогою посилання).
- 25 Передбачуваний зміст білка розраховували з використанням органічного елементного аналізу LECO, множачи зміст азоту на коефіцієнт 6,25.

#### Приклад 2

##### Одержання антигену

##### As<sub>2</sub>O/ ДМСО-окислювання препарату (1→4)-α/(1→6)-β-D-глюкану

- 30 П'ятсот вісімдесят міліграмів "розчинного" глюкану поміщали в 22-мл скляний флакон, оснащений магнітною мішалкою й закривали гумовою мембраною. У даний флакон за допомогою скляного шприца вносили 10 мл безводного ДМСО й 110 мкл оцтового ангідриду при кімнатній температурі й при перемішуванні. Суспензія глюкану повністю розчинялася протягом 4 год. перемішування при 20 °C. Перемішування суміші продовжували протягом 24 год., після чого реакційну суміш розбавляли 40 мл води. Отриманий прозорий розчин концентрували з використанням пристрою для ультрафільтрації за допомогою центрифугування 30 кДа Amicon® 15 і п'ятикратно відмивали залишок на фільтрі об'ємами деіонізованої води по 12 мл для відділення й очищення продукту окислювання від розчинників і реактивів. Всі стадії центрифугування здійснювали при 4750 × g/30 хв/10 °C. Кінцевий залишок на фільтрі збирали й 40 піддавали сублімаційному сушінню, одержуючи 502 мг окисленого (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкану у вигляді білого порошку. Продукт був частково розчинний у воді й повністю розчинний у ДМСО.

##### Елементний аналіз

В окисленому глюкані виявлено: C- 40,05 %; H- 6,61 %. Розрахований зміст для C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub> × H<sub>2</sub>O: C- 40,48 %; H- 5,66 %

- 45 Відновне амінування окисленого (1→4)-α/(1→6)-β-D- глюкану-БСА  
Зразок 412 мг окисленого (1→4)-α/(1→6)-β-D-глюкану розчиняли в 20 мл деіонізованої води й поєднували з розчином 256 мг БСА в 2 мл деіонізованої води при перемішуванні магнітною мішалкою. Потім суміш обробляли 60 мг твердого ціанборгідриду натрію. Флакон з реакційною сумішшю закривали гумовою мембраною й перемішували суміш при 20 °C протягом 24 год. 50 Після цього вносили 100 мг ціанборгідриду натрію й перемішували суміш протягом ще 22 год. Потім прозорий розчин фільтрували через пристрій для ультрафільтрації за допомогою центрифугування 30 кДа Amicon® 15 при 4750 × g/30 хв/10 °C. Залишок на фільтрі відмивали чотири рази об'ємами води по 12 мл і ліофілізували кінцевий концентрат, одержуючи 573 мг білого порошку.

##### Елементний аналіз

C 45,01 %, H 6,40 %, N 2,11 %.

Поділ кон'югату (1→4)-α/(1→6)-β-D-глюкан-БСА за допомогою іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі

- 60 Розчин 400 мг неочищеного кон'югата в 5 мл 5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> вносили на вхід 2 × 55-см скляного хроматографічного стовпчика, що містила 50 г ДЕАЕ-целюлози в 5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  у різних концентраціях використовували для елюювання: 40,1 мг (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-глюкану (220 мл, 5 мМ); 132,3 мг чистого кон'югата (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-глюкан-БСА (280 мл, 55 мМ); і 96,7 мг БСА (80 мл, 100 мМ). Розчин чистого кон'югата (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-глюкан-БСА концентрували до об'єму 2 мл, використовуючи пристрій для ультрафільтрації за допомогою центрифугування 30 кДа AMICON15, відмивали деіонізованою водою й ліофілізували, одержуючи 132,3 мг (загальний вихід 24,4 %) білого порошкоподібного продукту. При гель-електрофорезі одержали широку смугу, що виявляється за допомогою фарбування Кумассі блакитним і PAS, із центром при ~170 кДа. На електрофореграмах не виявили вільного БСА або будь-яких інших домішок.

Елементний аналіз

C 40,11 %, H 6,23 %, N 3,06 %, (20,44 мас. % БСА). Розраховане співвідношення  $\beta$ -глюкан: БСА становило 4:1.

Приклад 3

Одержання й очищення поліклонального антитіла

Одержання антигену й імунізація кролика

Десять мг БСА-кон'югованого антигену, отриманого, як описано в Прикладі 2, ліофілізували, зберігали при 4 °C і використовували для імунізації трьох кроликів (200 мкг антигену на імунізацію). Протокол імунізації відповідав перерахованому в Таблиці 1.

Таблиця 1

Протокол імунізації для одержання поліклональних антитіл проти (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-глюкан-БСА в кроликів.

День	Дія
0	Настроювання, попередній добір крові, початкова імунізація
21	Стимуляція
35	Стимуляція
44-45	Добір крові
49	Стимуляція
58-59	Добір крові
63	Добір крові

Очищення поліклональних антитіл на афінній фазі

Один грам епоксі-активованої агарози (Sigma E 6632) суспендували в розчині 2,68 г БСА (SIGMA A2153) в 27 мл 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  і перемішували суміш протягом 4 год. при 4 °C на водяній лазні з льодом. Після цього суміш центрифугували при 2500 × g/5 хв/10 °C, осад промивали й центрифугували ще чотири рази з 30 мл 100 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /0,05 мас. %  $\text{NaN}_3$  щораз.

Осад від останнього центрифугування афінної фази, покритої БСА (описаної вище) суспендували в розчині 750 мкл сироватки (відібраної від кролика, імунізованого кон'югатом "розчинний" глюкан-БСА) в 20 мл 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /0,05мас. % $\text{NaN}_3$ , обробляли в поворотному барабані протягом 2 год. при кімнатній температурі, а потім центрифугували при 1500 × g/5 хв/10 °C. Збирали надосадову рідину й відмивали осад ще три рази 20 мл цього ж буфера, одержуючи колекцію із ще трьох надосадових рідин. Перевіряли специфічність надосадових рідин стосовно БСА й "розчинного" глюкану, як представлено на Фігурі 2. Першу й другу надосадові рідини, що містили значну кількість антитіл, поєднували й концентрували до об'єму 2,5 мл центрифугуванням при 5000 × g/5 хв/10 °C за допомогою центрифужних фільтрів 10 кДа AMICON Ultra-15. Концентрат на фільтрі відмивали 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /0,05мас. %  $\text{NaN}_3$  і розбавляли до об'єму 6 мл (6 г) цим же буфером. Даний розчин при розведенні "афінно очищених антитіл" 1:800 використовували при твердофазному ІФА МІКОСОРБу в кормі для тварин. Отримана калібрована крива представлена на Фігурі 3.

Приклад 4

Виявлення (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-глюкану клітинної стінки дріжджів за допомогою твердофазного ІФА

Матеріали й способи

Реагенти

Використовували тільки реагенти загальноновизнаних аналітичних класів, якщо не зазначене інше, і деіонізовану або демінералізовану воду або воду еквівалентної чистоти (18,2 МΩ/см при 25 °C).

Реагенти й препарати розчинів реагентів являли собою:

- Соляну кислоту, 12,1 н.; HCl  
 - Розведену соляну кислоту, 1 н.; HCl: 41,3 мл HCl 12,1 н. повільно додавали до 400 мл деіонізованої води й перемішували мішалкою до охолодження. Розчин переносили в 500-мл мірну колбу й доводили до об'єму деіонізованою водою, а потім зберігали при кімнатній температурі.

- Диметилсульфоксид: Використовували ДМСО високої чистоти, придатний для спектрофотометрії, рідинної хроматографії й газової хроматографії.

- Реагент для екстракції: Для виготовлення реагенту для екстракції 900 мл ДМСО змішували з 98,75 мл деіонізованої води й 1,25 мл 12,1 н. HCl. Розчин перемішували на мішалці при середній швидкості й кімнатній температурі, а потім зберігали при температурі 20 °C або вище.

- Хлорид натрію ("NaCl")

- Хлорид калію ("KCl")

- Гідрофосфат натрію ("NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>")

- Дигідрофосфат калію ("KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>")

- Фізіологічний розчин з фосфатним буфером ("PBS") 10X: Для виготовлення 10X PBS 80,0 г хлориду натрію [NaCl], 2,0 г хлориду калію [KCl], 14,2 г гідрофосфату натрію [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] і 2,4 г дигідрофосфату калію [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] змішували приблизно з 800 мл деіонізованої води. Розчин перемішували на мішалці до повного розчинення твердих речовин. Розчин переносили в 1000-мл мірну колбу й доводили до об'єму деіонізованою водою, а потім зберігали при кімнатній температурі або при 2-8 °C. Максимальний час зберігання становило 6 місяців при 2-8 °C для нерозбавленої рідини. Розчин нагрівали до кімнатної температури перед використанням.

- Розведений PBS, 1X: Для виготовлення 1X PBS 1 об'єм 10X PBS розбавляли 9 об'ємами деіонізованої води. Розведений розчин перемішували мішалкою при середній швидкості й кімнатній температурі. Максимальний час зберігання становило один день.

- Полісорбат 20

- Фізіологічний розчин з фосфатним буфером, 0,01 М з 0,05 % полісорбату 20, рН 7,4: Для виготовлення вміст одного пакета розчиняли в 1000 мл деіонізованої води. Розчин перемішували на мішалці до повного розчинення, а потім зберігали при кімнатній температурі або при 2-8 °C. Максимальний час зберігання становило 6 місяців при 2-8 °C для нерозбавленої рідини. Розчин нагрівали до кімнатної температури перед використанням.

- Знежирене сухе молоко

- Знежирене сухе молоко, 3 % (мас/об) в PBS, 1X реагент, що блокує: Для виготовлення 1X реагенту, що блокує, сухе молоко повністю розчиняли в 1X PBS перед використанням. Для блокування кожного планшета був потрібний об'єм 10 мл. Максимальний час зберігання становило один день.

- Поліклональні антитіла кролика; первинне антитіло (розчин антитіла №1): Афінно очищені антитіла одержували, як описано тут. Зберігали при -80 °C до використання.

- Розведений розчин поліклональних антитіл кролика: Розбавляли до 1:Хі в PBS, додаючи 1 мкл розчину антитіл №1 до Хі мкл 1X PBS. На кожний титраційний мікропланшет був потрібний об'єм розчину 10 мл. Розведений розчин антитіл ретельно перемішували перед використанням, надлишок розведених антитіл викидали. Максимальний час зберігання становило один день.

- Козячі антитіла афінного ступеня чистоти проти IgG кролика (H+L), кон'юговані з пероксидазою; ПХ-кон'юговані вторинні антитіла, вих. № 111-035-045 (Jackson ImmunoResearch, штат Пенсільванія, США - розчин антитіл №2): Регідратували 1,5 мл деіонізованої води й центрифугували до одержання повністю прозорого розчину. Зберігали в 10-мкл аліквотах при -80 °C до використання. Максимальний час зберігання становив 6 тижнів при 2-8 °C для нерозбавленої рідини.

- Розведені антитіла кози протикролика: Розбавляли до 1:Yі в PBS, додаючи 1 мкл розчину антитіл №2 до Yі мкл 1X PBS. Розведений розчин антитіл ретельно перемішували перед використанням, надлишок розведених антитіл викидали. Максимальний час зберігання становило один день.

- Субстрат пероксидази (тетраметилбензидин) для мікропланшетів (SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate): Необхідний об'єм виготовляли тільки в суліях Nalgene HDPE і LDPE бурштинового цвіту. Субстрат нагрівали до кімнатної температури перед використанням. Зберігали в щільно закритому стані без доступу світла. Надлишок субстрату викидали, а реагент зберігали при 2-8 °C. Максимальний час зберігання становило 24 місяця від дати виготовлення при 8 °C.

- Робочий зразок МІКОСОРБу; вихідний номер партії 285965 (ALLTECH, Inc., штат Кентуккі, США): Використовували гомогенний зразок МІКОСОРБу.

- Розведення МІКОСОРБу в кормах: 20 г кормового матеріалу змішували зі зростаючими

кількостями продукту МІКОСОРБ (0,01; 0,02; 0,08; 0,10; 0,12 г) в 250-мл центрифужному флаконі в трьох повторностях для створення стандартної кривої. Флакон струшували на круговій качалці при 400 об/хв протягом 1 год. Точність зважування кормових матеріалів складала  $\pm 0,025$  г, а продукту МІКОСОРБ -  $\pm 0,005$  г.

5 - Велика партія розведеного МІКОСОРБу в кормах: Велику партію розведеного продукту МІКОСОРБ у кормі виготовили, використовуючи 1,2 г продукту й 300 г вихідного матеріалу в 1000-мл контейнері. Флакон струшували на круговій качалці при 400 об/хв протягом 1 год. Кінцева концентрація продукту МІКОСОРБ у кормовому матеріалі складала 4,0 кг/т. 20,0 г гомогенізованої суміші корм-продукт 300,0 г з великої партії переносили в 250-мл центрифужний флакон. Перенос повторювали 9 разів, одержуючи 10 однакових зразків. Суміш періодично струшували після виготовлення кожних 3 аліквот, щоб уникнути осідання продукту на дно флакона. Точність зважування кормових матеріалів складала  $\pm 0,025$  г, а продукту МІКОСОРБ -  $\pm 0,005$  г.

15 - Розведення невідомої кількості МІКОСОРБу в кормах: Зразок з невідомою концентрацією виготовляли шляхом переносу невідомої кількості продукту МІКОСОРБ і 20,0 г ( $\pm 0,025$  г) кормового матеріалу в кожний з п'яти 250-мл центрифужних флаконів. Флакон струшували на круговій качалці при 400 об/хв протягом 1 г. Виготовлення зразка(ів) для стандартної кривої завершували одночасно.

Складання зразка

20 Для перевірки аналізу використовували три кормових матеріали (див. Таблиця 4, Таблиця 5, Таблиця 6). Препарат кормового матеріалу вибирали відповідно до композицій, які можна знайти в даній області техніки. Розмір зразка склав у цілому 15 кг кормового матеріалу, що ретельно гомогенізували перед передачею в лабораторію. Зразок зберігали при 2-8 °C протягом усього періоду дослідження.

25 Перевірка гомогенності зразка

Гомогенність розведення продукту МІКОСОРБ у кормовому матеріалі перевіряли шляхом виготовлення великої партії продукту МІКОСОРБ, розведеного в кормі при проміжній концентрації продукту в кормі 4,0 кг/т. Зразок розділяли на 10 менших зразків, екстрагували відповідно до процедури екстракції, а потім визначали коефіцієнт варіації виявлення продукту за допомогою твердофазного ІФА чотири рази для кожного з 10 зразків.

30 Виготовлення зразка

35 Виготовлення стандартного зразка здійснювали, як описано тут і представлено в Таблиці 2, при тестуванні продукту МІКОСОРБ. У цьому випадку вихідний робочий продукт приймали за еталон, як зазначено тут. Зразки з невідомою концентрацією виготовили відповідно до опису, наведеному вище. Диспергування зразка корму перед процедурою екстракції не було потрібно (це було б також у випадку, якщо вихідний матеріал був наданий у гранульованому виді). Установлено, що диспергування кормового матеріалу може вплинути на кінцеву надійність аналізу.

Таблиця 2

Етапи розведення продукту МІКОСОРБ для стандартної кривої.

Коефіцієнт розведення (кг/т) <sup>a</sup>	Номер групи зразків	Корм (г) <sup>b</sup>	МІКОСОРБ (г) <sup>b</sup>	Повторності × Зразки
0	0	20,0	0	2 × 10
0,5	1	20,0	0,01	2 × 3
1,0	2	20,0	0,02	2 × 3
4,0	3	20,0	0,08	2 × 3
5,0	4	20,0	0,10	2 × 3
6,0	5	20,0	0,12	2 × 3
від 0 до 6,0	С <sup>г</sup>	20,0	від 0 до 0,12	4 × 10

<sup>a</sup> Коефіцієнт розведення виражали в кілограмах продукту МІКОСОРБ на тонну кормового матеріалу

<sup>b</sup> Діапазон для корму =  $\pm 0,025$  г,

<sup>b</sup> Діапазон для продукту МІКОСОРБ =  $\pm 0,005$  г

<sup>г</sup> Де С - невідома кількість МІКОСОРБу в кормах

Процедура екстракції

Весь набір флаконів струшували на круговій качалці при 400 об/хв протягом 1 г. Знімали по трьох флаконах за раз, і в кожний флакон вносили 80 мл реагенту для екстракції, використовуючи насадку-дозатор об'єму. Флакони закупорювали. Всі зразки струшували вручну, забезпечуючи повне перемішування з реагентом для екстракції. Флакони поміщали на термостатуючу водяну лазню при 80 °C на 1 год., повністю занурюючи розчин корму у воду. Після інкубування флакони видаляли з водяної лазні, і зміст флаконів перемішували за допомогою стрижнів (марки NALGENE) з використанням лабораторної мішалки з високим крутний моментом. Суміш повністю гомогенізували. Для кожного рівня включення МІКОСОРБу й кожного зразка(ів) з невідомою концентрацією використовували чистий стрижень. Флакони повторно поміщали на термостатуючу водяну лазню при 80 °C на 1 год. Після інкубування флакони видаляли з водяної лазні й у кожний флакон вносили 80 мл деіонізованої води, використовуючи насадку-дозатор об'єму, а потім закупорювали флакони. Флакони струшували вручну до повного перемішування; при необхідності використовували стрижні марки NALGENE і лабораторну мішалку з високим крутний моментом. Флакони центрифугували при 8000 g протягом 10 хв. За допомогою скляних піпеток приблизно 10 мл надосадової рідини переносили в 15-мл стерильні центрифужні пробірки. Пробірки центрифугували при 4000 g протягом 10 хв і переносили шляхом декантації в нові, відповідним чином позначені, 15-мл стерильні центрифужні пробірки. Пробірки зберігали при -20 °C на протязі ночі, після чого використовували в ході твердофазного ІФА.

#### Процедура твердофазного ІФА

Субстрат пероксидази SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate використовували для запуску колориметричної реакції за рахунок його реакції з розведеним кон'югатом вторинного антитіла із ПХ, що додатково реагували з розведеним первинним антитілом, що специфічно реагувало з досліджуваною речовиною, екстрагованою з розведеного продукту МІКОСОРБ і іммобілізованим на титраційному мікропланшеті. Колориметричну реакцію в остаточному підсумку зупиняли через 20 хв за допомогою 1 н. HCl і виконували зчитування поглинання на планшет-ридері при довжині хвилі 450 нм. Таким чином, холості зразки, виготовлені із чистого кормового матеріалу, вимірювали лише для обліку можливої колориметричної зміни за рахунок речовини корму, що дає фоновий сигнал на спектрофотометрі. При розрахунку, значення для холостих зразків віднімали зі значень коефіцієнта поглинання, отриманих для кожного зразка.

Раніше екстраговані зразки, що зберігалися протягом ночі, розморожували, й нагрівали до кімнатної температури. Зразки струшували на вортексі, забезпечуючи однорідність зразків перед використанням у твердофазному ІФА для покриття лунок титраційних мікропланшетів.

Для кожного повтору зразка 100 мкл надосадової рідини переносили в кожну з 3 лунок в 96-ямковому планшеті, як представлено в Таблиці 3. Рандомізований розподіл зразків на планшеті можна виконати в лабораторії, що оснащена роботизованим програмувальним дозатором для лунок мікропланшета. Зразки для стандартної кривої й повтори зразків розподіляли на одному планшеті (тобто всі повтори зразка, що містив 0 кг/т, вносили в лунки E1-F10). Повтори зразків з невідомою концентрацією МІКОСОРБ розподіляли на тім же планшеті (тобто вносили в лунки A11-C12). Титраційні мікропланшети закривали адгезійною плівкою для мікропланшетів і інкубували при 37 °C на протязі 1 год. Після інкубування розчин з кожної лунки титраційного мікропланшета видаляли й заміняли 250 мкл 1X PBS для однократного відмивання. Дану операцію повторювали в цілому ще 2 рази. Кожну лунку титраційного мікропланшета блокували 100 мкл розчином розведеного знежиреного молока в PBS і інкубували при кімнатній температурі протягом 1 год. Після інкубування розчин з кожної лунки видаляли й заміняли на 250 мкл 1X PBS для однократного відмивання, а потім 250 мкл PBS, що містить 0,05 % полісорбат 20, для 2-кратного відмивання.

У кожну лунку вносили 100 мкл розведеного первинного антитіла. Титраційний мікропланшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 год. Після інкубування розчин з кожної лунки титраційного мікропланшета видаляли й заміняли 250 мкл 1X PBS, що містить 0,05 % полісорбат 20, для 3-кратного відмивання.

У кожну лунку вносили 100 мкл розведеного вторинного антитіла. Титраційний мікропланшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 год. Після інкубування розчин з кожної лунки титраційного мікропланшета видаляли й заміняли 250 мкл 1X PBS, що містить 0,05 % полісорбат 20, для 3-кратного відмивання.

У кожну лунку вносили 100 мкл субстрату ТМБ, попередньо нагрітого до кімнатної температури, і титраційний мікропланшет інкубували протягом 20 хв. при кімнатній температурі. Через рівно 20 хвилин інкубування із субстратом ТМБ у кожну лунку вносили 100 мкл 1 н. HCl для зупинки колориметричної реакції. Кожний титраційний мікропланшет зчитували на ридері

титраційних мікропланшетів при 450 нм.

Таблиця 3

Розподіл груп зразків на титраційному мікропланшеті.

**	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C <sub>.1</sub> *	C <sub>.2</sub>	C <sub>.3</sub>	C <sub>.4</sub>	C <sub>.5</sub>	C <sub>.6</sub>	C <sub>.7</sub>	C <sub>.8</sub>	C <sub>.9</sub>	C <sub>.10</sub>	-	-
B	C <sub>.1</sub>	C <sub>.2</sub>	C <sub>.3</sub>	C <sub>.4</sub>	C <sub>.5</sub>	C <sub>.6</sub>	C <sub>.7</sub>	C <sub>.8</sub>	C <sub>.9</sub>	C <sub>.10</sub>	-	-
C	C <sub>.1</sub>	C <sub>.2</sub>	C <sub>.3</sub>	C <sub>.4</sub>	C <sub>.5</sub>	C <sub>.6</sub>	C <sub>.7</sub>	C <sub>.8</sub>	C <sub>.9</sub>	C <sub>.10</sub>	-	-
D	C <sub>.1</sub>	C <sub>.2</sub>	C <sub>.3</sub>	C <sub>.4</sub>	C <sub>.5</sub>	C <sub>.6</sub>	C <sub>.7</sub>	C <sub>.8</sub>	C <sub>.9</sub>	C <sub>.10</sub>	5 <sub>.1</sub>	5 <sub>.1</sub>
E	0 <sub>.1</sub>	0 <sub>.2</sub>	0 <sub>.3</sub>	0 <sub>.4</sub>	0 <sub>.5</sub>	0 <sub>.6</sub>	0 <sub>.7</sub>	0 <sub>.8</sub>	0 <sub>.9</sub>	0 <sub>.10</sub>	5 <sub>.2</sub>	5 <sub>.2</sub>
F	0 <sub>.1</sub>	0 <sub>.2</sub>	0 <sub>.3</sub>	0 <sub>.4</sub>	0 <sub>.5</sub>	0 <sub>.6</sub>	0 <sub>.7</sub>	0 <sub>.8</sub>	0 <sub>.9</sub>	0 <sub>.10</sub>	5 <sub>.3</sub>	5 <sub>.3</sub>
G	1 <sub>.1</sub>	1 <sub>.2</sub>	1 <sub>.3</sub>	2 <sub>.1</sub>	2 <sub>.2</sub>	2 <sub>.3</sub>	3 <sub>.1</sub>	3 <sub>.2</sub>	3 <sub>.3</sub>	4 <sub>.1</sub>	4 <sub>.2</sub>	4 <sub>.3</sub>
H	1 <sub>.1</sub>	1 <sub>.2</sub>	1 <sub>.3</sub>	2 <sub>.1</sub>	2 <sub>.2</sub>	2 <sub>.3</sub>	3 <sub>.1</sub>	3 <sub>.2</sub>	3 <sub>.3</sub>	4 <sub>.1</sub>	4 <sub>.2</sub>	4 <sub>.3</sub>

\* Де С - невідомий рівень включення продукту МІКОСОРБ у кормах

\*\* Ідентифікацію групи зразків див. Таблиця 2.

Виключення даних з повторів

- 5 Статистичний аналіз даних був необхідний для підтвердження подібності всіх повторів, за винятком тих, які не проходили згідно Q-критерію Діксона - й, отже, ідентифікувалися як викиди відповідно до визначення:

$$Q_n = \frac{|x_a - x_b|}{R}$$

10

де R - діапазон всіх крапок даних;  $x_a$  - передбачуваний викид;  $x_b$  - крапка даних, найближча до  $x_a$ . Якщо  $Q_{\text{розрахований}} > Q_{\text{табличний}}$ , то відхилення сумнівної крапки перевищувало 95 % довірчий інтервал.

Складання стандартної кривої

- 15 Для кількісної оцінки використовували калібровані криві. Їх будували для кожного кормового матеріалу, використовуючи, щонайменше, п'ять рівнів (включаючи нульовий) у межах робочого діапазону продукту, як зазначено в Директиві Ради 96/23. Для кожної групи зразків розраховували середнє по трьох повторних значеннях коефіцієнта поглинання в лунках OD<sub>450</sub>. Для кожного холостого зразка корму розраховували середнє по десяти повторних значенням
- 20 коефіцієнта поглинання в лунках OD<sub>450</sub>. Потім будували стандартну криву або калібровану криву, розташовуючи отриману різницю  $\Delta OD_{450}$  (OD<sub>450</sub> групи зразків - OD<sub>450</sub> холостого корму) по осі ординат, а різні діапазони концентрації продукту МІКОСОРБ, 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 кг/т - на осі абсцис.

- 25 Коефіцієнт регресії й рівняння залежності нанесених на графік рівнів включення від коефіцієнта поглинання OD<sub>450</sub> розраховували відповідно до лінійної регресії, використовуючи максимально відповідну лінію,  $\Delta OD_{450} = Ax$  (МІКОСОРБ) після корекції значень із урахуванням усередненого значення холостого зразка. Діапазон прийнятності й лінійність каліброваної кривої підтверджували за значенням коефіцієнта кореляції ( $r^2$ ), що перевищує 0,95. Відповідне рівняння кривої потім використовували для визначення рівня включення продукту МІКОСОРБ у зразку(ax) з невідомою концентрацією шляхом рішення відповідного рівняння.

Інтерполяція

- 30 У випадку, якщо коефіцієнт кореляції для стандартної кривої перевищував  $r^2 > 0,95$ , що відповідає рівнянню скоректованої кривої  $F(x) = Ax$ , (віднімається з фоновому сигналу й що перетинає початок координат) використовували для визначення рівня включення продукту МІКОСОРБ у зразку(ax) з невідомою концентрацією. Розраховували середнє по десяти повторних значеннях OD<sub>450</sub> для невідомого рівня включення (C) продукту МІКОСОРБ. Отримане середнє віднімали із середнього по десяти повторам коефіцієнта поглинання OD<sub>450</sub> для холостого зразка корму, розрахованого раніше. Потім середнє значення OD<sub>450</sub> використовували для рішення рівняння скоректованої кривої  $F^{-1}(y_c)$ , де  $y_c = Ax_c$ :

$$40 \quad x_c = \frac{y_c}{A},$$

де  $x_C$  являє собою отримане середнє  $OD_{450}$  для зразка з невідомою концентрацією (C) мінус  $OD_{450}$  холостого зразка,  $x_C$  являє собою відповідний рівень включення продукту МІКОСОРБ, і A являє собою нахил стандартної кривої в кг/т  $OD_{450}$ .

Межа виявлення й кількісної оцінки

5 Межа виявлення ( $L_D = 3\sigma_{\text{холост}}$ ) і межа кількісної оцінки ( $L_Q = 10\sigma_{\text{холост}}$ ) вимірювали відповідно до номенклатури ІЮПАК і виражали як  $\Delta OD_{450}$ .

Межу виявлення ( $L_D$ ) і межу кількісної оцінки ( $L_Q$ ) визначали на основі аналізу холостого матеріалу й перераховували в концентрацію на підставі лінійної регресії, скоректованої з обліком середнього фонового значення  $OD_{450}$  за допомогою каліброваної кривої  $F(x) = Ax$ , розв'язуваної відповідно до:

10  $L_D = \frac{3\sigma_{\text{холост}}}{A}$  і  $L_Q = \frac{3\sigma_{\text{холост}}}{A}$ , де  $L_D$  являє собою мінімальну виявлену концентрацію продукту або межу виявлення;  $L_Q$  являє собою мінімальну обумовлену концентрацію продукту або межу кількісної оцінки.

Однорідність

15 Коефіцієнт варіації однорідності ( $RSD_N = CV_N$ ) визначали як середній коефіцієнт варіації по 10 незалежних повторях, що отримані при вимірі того самого зразка в той самий день тим самим співробітником з використанням того самого обладнання й способу.

Точність: Відтворюваність

20 Внутрісерійну точність відтворюваності ( $RSD_{\text{intra}} = CV_{\text{intra}}$ ) визначали як середній коефіцієнт варіації по повторях, отриманим при вимірі того самого зразка в той самий день в одній і тій же серії вимірів тим самим співробітником з використанням того самого встаткування й способу.

Межсерійна точність відтворюваності ( $RSD_{\text{inter}} = CV_{\text{inter}}$ ) являла собою середній коефіцієнт варіації за незалежними результатами, отриманим при вимірі того самого зразка в різні дати в різних серіях вимірів тим самим співробітником з використанням того самого встаткування й способу.

Точність: Загальна точність

Точність оцінює дисперсію (або ступінь) відповідності між послідовними вимірами тої самої кількості. Дисперсію в наборі вимірів звичайно виражають у термінах стандартного відхилення. Точність, таким чином, розраховували зі стандартного відхилення результатів однократного окремого експерименту при одному рівні включення, отриманих при вимірі того самого зразка в той самий день, тим самим співробітником з використанням того самого встаткування й способу; зі стандартного відхилення при порівнянні кожної окремої серії вимірів, тим самим співробітником з використанням того самого встаткування й способу відповідно до формули:

$$35 \quad \sigma_{\text{Total}} = \sqrt{\left[ \frac{\sigma_{\text{intra}}^2}{n} + \sigma_{\text{inter}}^2 \right]},$$

де  $\sigma_{\text{Total}}$  являє собою стандартне відхилення загального набору експериментів,  $\sigma_{\text{intra}}$  - стандартне відхилення одного окремого експерименту,  $\sigma_{\text{inter}}$  - стандартне відхилення між декількома експериментами, а n - кількість повторів.

40 Порівняння стандартного відхилення одержували шляхом дисперсійного аналізу (однобічного дисперсійного аналізу), використовуючи F-тест (значення  $p \leq 0,05$ ) між дисперсією групового середнього й середнього внутрішньогрупових дисперсій.

Вірогідність

45 Вірогідність являє собою ступінь відповідності між результатами тесту й прийнятим еталонним значенням вимірюваного продукту. Вірогідність, таким чином, оцінювали по вимірі виходу продукту, вираженого в процентилях. Вихід продукту при цьому представляв частку кількості присутньої або привнесеної аналізованої речовини, екстраговану й доступну для виміру. Погрішність являє собою різницю між результатами тесту й прийнятим еталонним значенням (додана концентрація аналізованої речовини). Розрахунки виконували відповідно до формул:

$$55 \quad \text{Вихід продукту (\%)} = \frac{(X_c - X_b)}{X_{\text{TH}}} \times 100,$$

де  $X_c$  - концентрація, обмірювана в зразку з доданою аналізованою речовиною;  $X_b$  - концентрація, обмірювана в зразку без доданого аналізованої речовини (холостого зразку);  $X_{\text{TH}}$  -



теоретична концентрація.

Кормовий матеріал, використовуваний для перевірки тестів

- В Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition в ALLTECH, Inc, штат Кентуккі, США проводили випробування по складанню корму для молочної худоби, складанню корму для курей і складанню корму для свиней з кормового матеріалу з додаванням різних рівнів включення продукту МІКОСОРБ. Повний опис складу корму наведено нижче.

Кормовий матеріал для молочної худоби

- Кормовий матеріал був складений в Coralis Vern (Vern sur Seiche, Франція, вих. №111605) по формулі за назвою "Spirit Lait 2L5" (Таблиця 4). Розмір зразка склав у цілому 15 кг кормового матеріалу, що ретельно гомогенізували перед передачею в лабораторію. Зразок зберігали при 2-8 °C протягом усього періоду дослідження. Кормовий матеріал для молочної худоби надали в гранульованому виді. Диспергування зразка корму перед проведенням процедури екстракції не було потрібно.

Таблиця 4

Склад корму для молочної худоби, використовуваний для перевірки способу.

Інгредієнти	Частка
Пшениця стандартна, %	20,00
Ячмінь, %	6,00
Пальмове масло (експериментальна макуха), %	12,00
Рапс (знежирений), %	8,10
Соева макуха 48/Бразилія, %	4,20
Пшениця, дрібні відрубай, %	24,94
Пшениця амурус (тритикале), %	20,00
Меласса, %	1,00
Барда (екстракт від шумування), %	1,50
Порошок карбонату кальцію, %	1,06
Очищена сіль, %	0,50
EMROD, %	0,20
Super 26 Eсо aa, % (премікс вітамінів і мінералів)	0,50
Усього, %	100
Живильна речовина	
Суша речовина, %	88,324
Сирий білок, %	17,002
Жир, %	3,144
Целюлоза, %	8,378
Зольний залишок, %	6,723
Крохмаль, %	24,955
Загальні цукри, %	4,420
Крохмаль і цукри, %	29,376
Рубцевий вуглевод, г/кг	352 926
PDIN*, г/кг	117,260
PDIE*, г/кг	103,028
PDIA*, г/кг	49,723
Рубцевий азот, г/кг	124,906
Лізін, засвоюваний у рубці, г/кг	6,794
Метіонін, засвоюваний у рубці, г/кг	1,873
Кальцій, %	0,800
Загальний фосфор, %	0,659
Натрій, %	0,500
Магній, %	0,236
Фосфор, засвоюваний у рубці, %	0,466
Структурне значення, %	0,220
Пшенична макуха, %	20,000
Пшенична макуха тритикале, %	20,000
Макуха зернових, %	26,000
Загальний результат, пшеничні відрубай, %	44,940
Рапсова макуха, %	8,100

Усього. MP Granul +, твердість гранул %	20,000
Вітамін А, МЕ/кг	4000
Вітамін D3, МЕ/кг	2000

- \* Служить для визначення цінності білка кормів і потреби тварини в білку; оба ці параметра виражають у термінах чистого білка, засвоюваного в тонкому кишечнику ("PDI"). Зміст PDI у раціоні є сумою (i) фракції PDIA, харчового білка, що не розкладається в рубці, але засвоюваного в тонкому кишечнику; (ii) фракції PDIM, мікробного чистого білка, засвоюваного в тонкому кишечнику. Кожний кормовий продукт вносить вклад у мікробний синтез білка як за рахунок азоту, що розкладається, (PDIMN), так і за рахунок доступної енергії, який він постачає мікроорганізми рубця (PDIME). Значення кожного кормового продукту задається безпосередньо сумою PDIA і PDIM з обліком наступних двох рівнянь: (1) PDIN=PDIA+PDIMN і (2) PDIE=PDIA+PDIME.

- Кормовий матеріал для курей
- Кормовий матеріал був складений в Coldstream University of Kentucky, Об'єднаною дослідницькою групою (Alliance Research Group) між університетом штату Кентуккі й ALLTECH, Inc., штат Кентуккі, США (Таблиця 5). Препарат виготовлений відповідно до композицій, що зустрічаються в даній області техніки, які можна узагальнити в рамках складів, що часто зустрічаються в Європейському Союзі, Північній Америці, Латинській Америці й т.д. Розмір зразка склав у цілому 15 кг кормового матеріалу, що ретельно гомогенізували перед передачею в лабораторію. Зразок зберігали при 2-8 °C протягом усього періоду дослідження.

Таблиця 5

Склад корму для курей, використовуваний для перевірки способу.

Інгредієнти	Формула для курчат, 22-42 доби
	Основний корм кукурудза-соя
Кукурудза	62,15
Соевий шрот (48 %)	31,31
Кукурудзяне масло	3,10
Крейда	1,37
Дикальцію фосфат	1,30
Сіль	0,45
Вітамінно-мінеральна суміш а	0,25
DL-метіонін	0,07
L-Лізин	-
Усього	100
Живильна речовина	
МЕ, ккал/кг	3120
Сирий білок, %	20
Кальцій, %	0,90
Доступний фосфор, %	0,35
Лізин, %	1,11
Метіонін, %	0,39
Метіонін + Цистеїн, %	0,72
Na, %	0,20

<sup>a</sup> Вітаміни на кг раціону: 2200 МЕ вітаміну А; 720 ІСВ вітаміну D3; 27 МЕ вітаміни Е; 0,91 мг вітаміну К3 (2 -мітив-1, 4-нафтохіноні); 2 мг тіаміни; 8 мг рибофлавіну; 55 мг ніацину; 18 мг кальцію пантотената; 5 мг вітаміну В6 (піридоксину); 0,221 мг біотину; 1 мг фолієвої кислоти; 478 мг холіну; 28 мкг вітаміну В12 (ціанкобаламіну).

20

Кормовий матеріал для свиней

Кормовий матеріал був складений в Coldstream University of Kentucky, Об'єднаною дослідницькою групою (Alliance Research Group) між університетом штату Кентуккі й ALLTECH, Inc., штат Кентуккі, США (Таблиця 6).

Препарат виготовлений відповідно до композицій, що зустрічаються в даній області техніки, які можна узагальнити в рамках складів, що часто зустрічаються в Європейському Союзі, Північній Америці, Латинській Америці й т.д. Розмір зразка склав у цілому 15 кг кормового матеріалу, що ретельно гомогенізували перед передачею в лабораторію. Зразок зберігали при 2-8 °C протягом усього періоду дослідження.

Таблиця 6

Склад корму для свиней, використовуваний для перевірки способу.

Інгредієнти	Формула для супоросних свиней і свиноматок		
	Основний корм кукурудза-соя		
Кукурудза (мелена, жовта)		81,540	
Лущений соєвий шрот (47,5 %)		12,310	
Кукурудзяне масло		2,000	
Крейда (мелений)		0,690	
Дикальція фосфат		2,630	
Сіль		0,500	
Вітамінна суміш (BASF) *		0,050	
Суміш мікроелементів (Prince) **		0,080	
Холіну хлорид (60 %)		0,150	
Chromax		0,050	
Усього		100	
Живильна речовина			
МЕ, ккал/кг		3258	
СР, %		12,4	
Са, %		0,54	
Доступний Р, %		0,60	
Лізин, %		0,54	
* Склад вітамінної суміші:	Премікс BASF (концентрація/кг змішаного раціону)		
	Концентрації/кг змішаного раціону		
Вітамін А, МЕ		5500	
Вітамін D, МЕ		550	
Вітамін Е, МЕ		33	
Вітамін К, мг		1,1	
Вітамін В12, мкг		15,125	
Ніацин, мг		15,125	
Пантотенова кислота, мг		13,75	
Рибофлавін, мг		4,125	
Біотин, мг		0,17875	
Фолієва кислота, мг		0,825	
Піридоксин, мг		2,475	
Тіамін, мг		0,825	
Мінерал	%	м. д. (1,5 # премікс/тонну)	Джерело
Залізо	13,33	100	Сульфат
Цинк	16,67	125	Оксид
Марганець	6,672	50	Оксид
Мідь	2,000	15	Сульфат
Йод	0,1709	1,28	EDDI
Селен	0,0402	0,30	селеніт
Кальцій	4,815	36	-

Перевірка з використанням кормового матеріалу для молочної худоби

Випробування виконували в Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition в ALLTECH, Inc, штат Кентуккі, США на складі твердого корму європейського типу для молочної худоби з додаванням п'яти різних концентрацій продукту MIKOCORB.

Кормові матеріали для молочної худоби, індивідуально змішані з 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 кг/т продукти МІКОСОРБ аналізували поряд зі зразком цього ж кормового матеріалу для молочної худоби, змішаного з невідомим рівнем продукту МІКОСОРБ, при розподілі на тому самому титраційному мікропланшеті.

#### 5 Застосовність

Перевірку здійснювали з метою визначення характеристик аналізу твердофазного ІФА, розробленого для специфічного аналізу продукту МІКОСОРБ і його аналогів, як кінцевої процедури, що забезпечує єдність вимірів для цілей відстеження продукту в кормах складного складу.

10 Шість рівнів продукту МІКОСОРБ (0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 кг/т), змішаного зі зразком корму, використовували для перевірки, що відповідає робочому діапазону рівня включення.

Розчин розведеного поліклонального антитіла кролика: розведення первинного антитіла адаптували відповідно до фонового рівня. Антитіла, таким чином, розбавляли до 1:2500 в PBS, додаючи 1 мкл розчину антитіл №1 до 1,2 мл 1X PBS. На кожний титраційний мікропланшет був

15 потрібний об'єм розчину 10 мл.

Розведене антитіло кози проти IgG кролика: розведення вторинне антитіла адаптували відповідно до фонового рівня. Антитіла, таким чином, розбавляли до 1:20000 в PBS, додаючи 1 мкл розчину антитіл №2 до 20,0 мл 1X PBS.

#### Гомогенність

20 Перевірку гомогенності зразка виконували на середньому рівні включення продукту МІКОСОРБ (4,0 кг/т) в експериментальному плані. Аналіз даного конкретного рівня повторювали 5 разів по 10 окремих зразків з використанням 4 повторів для кожного зразка.

Відповідно до розрахованих значень, докладно наведеними в Таблиці 7,  $CV_H$  становило 4,53 %.

25

Таблиця 7

Оцінка гомогенності при концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т, змішаного з раціоном європейського типу для молочної худоби, виконана з використанням процедури твердофазного ІФА в 5 серіях вимірів на 10 окремих зразках препарату в 4 повторюваностях.

№ серії	4	5	8	9	11	Середнє значення
n	4 × 10	4 × 10	4 × 10	4 × 10	4 × 10	4 × 10
Середня $OD_{450\text{ нм}}$	1,155	1,055	0,833	1,166	1,044	1,051
$\sigma_h$	0,118	0,080	0,077	0,083	0,100	-
% $CV_h$	10,21	7,58	9,27	7,09	9,59	-
Гомогенність, $CV\%_H$	8,75					

#### Калібрування

30 Калібрування аналізу виконували з використанням корму, змішаного зі стандартним зразком з відомою концентрацією, як описано тут, і в діапазоні від 0,0 до 6,0 кг/т продукту МІКОСОРБ. Апроксимацію лінійної кривої  $y = Ax$  використовували для визначення зв'язку між концентрацією й відповіддю ( $OD_{450}$ ). Усереднена стандартна крива, отримана для 5 серій вимірів, показана на фігурі 4.

#### Лінійність

35 Лінійність стандартних кривих оцінювали за допомогою розрахунку коефіцієнта регресії відповідно до рівняння залежності нанесених на графік рівнів включення від коефіцієнта поглинання  $OD_{450}$ , використовуючи максимально відповідну лінію, що проходить через початок координат,  $\Delta OD_{450} = Ax(\text{МІКОСОРБ})$  після вирахування відповіді на холосту пробу. Лінійність каліброваної кривої перевіряли за допомогою значення коефіцієнта кореляції, що перевищував  $r^2 > 0,95$ , Таблиця 8.

40

Таблиця 8

Лінійність стандартних кривих.

№ серії	4	5	8	9	11	Середнє з усередненої кривої
Дата	6/10/09	6/17/09	6/30/09	7/14/09	8/5/09	1/6 Викид
n	50	50	50	50	50	-
Нахил (A)	0,2702	0,2249	0,2161	0,2179	0,2444	0,2347
Середньоквадратична помилка (MSE) *	0,0037	0,0005	0,0034	0,0008	0,0009	-
Лінійність ( $r^2$ )	0,969	0,974	0,970	0,949	0,978	0,979

\* Середньоквадратичну помилку визначають у моделях лінійної регресії в такий спосіб:

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2, \text{ де } e_i = y_i - \hat{y}_i; y_i - \text{експериментально обмірюване значення } y; \hat{y}_i - \text{теоретичне}$$

значення для прогнозованої концентрації  $x_i$  продукту МІКОСОРБ

Відтворюваність

Відтворюваність є мірою внутрішньої дисперсії при оцінці стандартного відхилення відтворюваності. Внутрісерійну оцінку відтворюваності одержали для того самого зразка в той самий день в одній і тій же серії вимірів тим самим співробітником, з використанням того самого обладнання й способу, представляючи внутрісерійну дисперсію виявлення  $CV_{intra}$  (Таблиця 9).

Міжсерійну оцінку відтворюваності одержали для того самого зразка в різні дати в різних серіях вимірів тим самим співробітником, з використанням того самого обладнання й способу, представляючи міжсерійну дисперсію виявлення  $CV_{inter}$  (Таблиця 10).

Результати показали, що стандартні криві, отримані як у той самий день, так і в різні дати, характеризувалися незначною мінливістю, при середній точності протягом дня 5,70 % і точності в різні дати 7,86 % у робочому діапазоні стандартної кривої від 0,0 до 6,0 кг/т. Загальна точність становила 8,28 % (Таблиця 11).

Таблиця 9

Внутрісерійна точність відтворюваності побудови стандартної кривої.

Концентрація (кг/т)		0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
День 1 Серія № 4	OD <sub>450 nm</sub>	1,022	1,221	1,425	2,284	2,292	2,564
	$\sigma_{intra}$	0,033	0,056	0,117	0,071	0,062	0,132
	%cv	3,26	4,60	8,20	3,11	2,69	5,14
День 2 Серія № 5	OD <sub>450 nm</sub>	1,024	1,238	1,335	2,039	2,076	2,335
	$\sigma_{intra}$	0,031	0,073	0,030	0,215	0,077	0,153
	% CV	3,03	5,91	2,21	10,54	3,72	6,55
День 3 Серія № 8	OD <sub>450 nm</sub>	0,871	1,066	1,231	1,807	1,953	2,088
	$\sigma_{intra}$	0,044	0,053	0,051	0,136	0,192	0,127
	% CV	5,06	4,96	4,17	7,53	9,82	6,08
День 4 Серія № 9	OD <sub>450 nm</sub>	1,049	1,218	1,468	2,026	2,138	2,247
	$\sigma_{intra}$	0,041	0,059	0,035	0,266	0,095	0,141
	% CV	3,93	4,86	2,39	13,12	4,44	6,26
День 5 Серія № 11	OD <sub>450 nm</sub>	0,915	1,053	1,284	1,787	2,251	2,336
	$\sigma_{intra}$	0,044	0,067	0,049	0,095	0,247	0,189
	% CV	4,79	6,34	3,85	5,30	10,98	8,09
% CV <sub>intra</sub> (внутрісерійна точність)		4,01	5,33	4,16	7,92	6,33	6,42
Середня точність, % CV <sub>intra</sub>		5,70					

Таблиця 10

Міжсерійна точність відтворюваності побудови стандартної кривої.

Концентрація (кг/т)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
OD <sub>450 нм</sub>	0,976	1,159	1,348	1,988	2,142	2,314
$\sigma_{\text{Inter}}$	0,078	0,091	0,098	0,203	0,136	0,172
% CV <sub>Inter</sub>	8,01	7,88	7,27	10,22	6,36	7,45
Середня точність, % CV <sub>Inter</sub> (міжсерійна точність)	7,86					

Таблиця 11

Загальна точність побудови стандартної кривої.

Концентрація (кг/т)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
n	30	30	30	30	30	30
$\sigma_{\text{intra}}$	0,039	0,062	0,056	0,157	0,135	0,148
$\sigma_{\text{Inter}}$	0,078	0,091	0,098	0,203	0,136	0,172
$\sigma_{\text{Total}}$	0,080	0,095	0,101	0,215	0,149	0,185
Точність, % CV <sub>total</sub>	8,20	8,23	7,50	10,81	6,95	7,98
Загальна точність, % CV <sub>total</sub>	8,28					

L<sub>D</sub> і L<sub>Q</sub> (чутливість)

- 5 Значення L<sub>D</sub> і L<sub>Q</sub> наведені в Таблиці 12. Виявлено, що значення L<sub>Q</sub> були нижче мінімальної рекомендованої частки включення продукту МІКОСОРБ 2 кг/т, що дозволяло виконувати його кількісне визначення в кормовому матеріалі.

Межа виявлення L<sub>D</sub>=0,501±0,103 кг/т

Межа кількісної оцінки L<sub>Q</sub> = 1,800±0,389 кг/т

Таблиця 12

Визначення L<sub>D</sub> і L<sub>Q</sub>.

№ серії	n	OD <sub>450</sub> холостого зразка		3 σ (Δ OD <sub>450</sub> )	10σ (Δ OD <sub>450</sub> )	L <sub>D</sub> (кг/т)	L <sub>Q</sub> (кг/т)
		x <sub>b</sub> внутр. intra	σ холост				
День 1	10	0,046	0,033	0,100	0,334	0,370	1,323
День 2	10	0,048	0,031	0,093	0,311	0,415	1,488
День 3	10	-0,105	0,044	0,132	0,441	0,612	2,233
День 4	10	0,072	0,041	0,124	0,412	0,568	2,100
День 5	10	0,915	0,044	0,132	0,438	0,538	1,858
Середнє значення				0,116±0,018	0,387±0,061	0,501±0,103	1,800±0,389

Вірогідність

Вірогідність вимірювали в 5 незалежних експериментах, що включають по 10 незалежних зразків в 4 повторностях для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом. Кінцеву концентрацію для кожного зразка розраховували відповідно до рівняння, наведеного вище, використовуючи спостережувані значення, отримані для розрахунку гомогенності (Таблиця 13). Потім розраховували середню точність із усередненої точності, отриманої для всіх серій і зіставленої з доданою концентрацією продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом. Розрахунки виконували відповідно до рівнянь, наведених вище.

Результати показали, що оцінка виходу продукту на 21 % перевищила реальний зміст кормового матеріалу при доданій концентрації продукту МІКОСОРБ (Таблиця 14).

Таблиця 13

Вірогідність і точність, обмірювані в 5 незалежних експериментах, що включають по 10 незалежних зразків в 4 повторюваностях для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом.

№ серії	x <sub>TH</sub> , додана (кг/т)	№ повтору, x <sub>c</sub> (OD <sub>450</sub> )										$\bar{x}_c$	% CV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
День 1	4,0	5,0	4,0	5,1	3,8	4,3	4,3	3,9	4,4	3,9	4,1	4,3	9,69
День 2	4,0	4,2	5,0	5,1	4,7	4,6	4,6	4,5	4,2	4,8	5,2	4,7	7,19
День 3	4,0	3,6	3,6	4,1	4,4	3,8	3,9	3,7	3,9	3,3	4,3	3,9	8,79
День 4	4,0	5,4	5,0	5,0	4,9	5,2	5,6	5,1	5,5	5,7	6,1	5,4	6,73
День 5	4,0	4,4	4,5	3,7	4,4	4,2	4,4	3,5	4,4	4,3	4,9	4,3	9,10
% CV <sub>intra</sub> (міжсерійна точність)													8,30

Таблиця 14

Загальний вихід продукту, обмірюваний із середнього по 5 незалежних експериментах, що включає по 10 незалежних зразків в 4 повторюваностях для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом.

x <sub>TH</sub> , додана (кг/т)	Середнє значення $\bar{x}_c$	$\sigma_c$
4,0	4,5	0,6
% CV <sub>inter</sub> (міжсерійна точність)		12,62
Загальний вихід продукту (% теоретичної концентрації)		112,21

Перевірка з використанням кормового матеріалу для курей

- 5 Випробування виконували в Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition в ALLTECH, Inc, штат Кентуккі, США на складі твердого корму для курей з додаванням п'яти різних концентрацій продукту МІКОСОРБ.

- Кормові матеріали для курей, індивідуально змішані з 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 кг/т продукти МІКОСОРБ аналізували поряд зі зразком цього ж кормового матеріалу для курей, змішаного з невідомим рівнем продукту МІКОСОРБ, при розподілі на тому самому титраційному мікропланшеті.

Застосовність

- 15 Перевірку здійснювали з метою визначення характеристик аналізу твердофазного ІФА, розробленого для аналізу продукту МІКОСОРБ і його аналогів, як кінцевої процедури, що забезпечує єдність вимірів для цілей відстеження вищезгаданого продукту в кормах складного складу.

Шість рівнів продукту МІКОСОРБ (вих. № 285965) (0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 кг/т), змішаного зі зразком корму, використовували для перевірки, що відповідає робочому діапазону рівня включення.

- 20 Розчин розведеного поліклонального антитіла кролика: розведення первинного антитіла адаптували відповідно до фонового рівня. Антитіла, таким чином, розбавляли до 1:7500 в PBS, додаючи 1 мкл розчину антитіл №1 (4,15) до 7,5 мл 1X PBS. На кожний титраційний мікропланшет був потрібний об'єм розчину 10 мл.

- 25 Розведене антитіло кози проти антитіла кролика: розведення вторинного антитіла адаптували відповідно до фонового рівня. Антитіла, таким чином, розбавляли до 1:30000 в PBS, додаючи 1 мкл розчину антитіл №2 до 30,0 мл 1X PBS.

Гомогенність

- 30 Перевірку гомогенності зразка виконували на середньому рівні включення продукту МІКОСОРБ (4,0 кг/т) в експериментальному плані. Аналіз даного конкретного рівня повторювали 5 разів по 10 окремих зразків з використанням 4 повторів для кожного зразка (Таблиця 15).

Таблиця 15

Оцінка гомогенності при концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т, змішаного з кормовим матеріалом для курей, виконана з використанням процедури твердофазного ІФА в 5 серіях вимірів на 10 окремих зразках препарату в 4 повторностях.

№ серії	2	3	4	5	6	Середнє значення
n	4 × 10	4 × 10	4 × 10	4 × 10	4 × 10	4 × 10
Середня OD <sub>450 nm</sub>	1,419	0,908	0,777	0,991	1,290	1,034
σ <sub>h</sub>	0,048	0,060	0,081	0,060	0,069	-
% CV <sub>h</sub>	3,08	6,11	10,38	5,65	6,39	-
Гомогенність, CV% <sub>h</sub>	6,32					

#### Калібрування

- Калібрування аналізу виконували з використанням корму, змішаного зі стандартним зразком з відомою концентрацією й у діапазоні від 0,0 до 6,0 кг/т продукту МІКОСОРБ. Апроксимацію лінійної кривої  $y = Ax$  використовували для визначення зв'язку між концентрацією й відповіддю (OD<sub>450</sub>). Усереднена стандартна крива, отримана для 5 серій вимірів, показана на Фігурі 5.

#### Лінійність

- Лінійність стандартних кривих оцінювали за допомогою розрахунку коефіцієнта регресії відповідно до рівняння залежності нанесених на графік рівнів включення від коефіцієнта поглинання OD<sub>450</sub>, використовуючи максимально відповідну лінію, що проходить через початок координат,  $\Delta OD_{450} = Ax$  (МІКОСОРБ) після вирахування відповіді на холосту пробу. Лінійність каліброваної кривої перевіряли за допомогою значення коефіцієнта кореляції, що перевищує  $r^2 > 0,95$ . Коефіцієнт регресії, розрахований для кожної серії стандартних кривих і для усередненої стандартної кривої, представлений у Таблиці 16.

**Таблиця 16.** Лінійність стандартних кривих для кормового матеріалу для курей.

№ серії	2	3	4	5	6	Середнє з усередненої кривої
Дата	4/21/09	4/22/09	4/23/09	4/24/09	4/28/09	1/6 Викид
n	50	50	50	50	50	-
Нахил (A)	0,2954	0,1904	0,1555	0,2282	0,2302	0,2199
Середньоквадратична помилка (MSE) *	0,0123	0,0018	0,0118	0,0003	0,0006	-
Лінійність ( $r^2$ )	0,995	0,999	0,991	0,992	0,992	0,997

\* Середньоквадратичну помилку визначають у моделях лінійної регресії в такий спосіб:

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2, \text{ де } e_i^2 = y_i - \hat{y}_i; y_i - \text{експериментально обмірюване значення } y; \hat{y}_i -$$

теоретичне значення для прогнозованої концентрації x і продукту МІКОСОРБ.

#### Відтворюваність

- Відтворюваність є мірою внутрішньої дисперсії при оцінці стандартного відхилення відтворюваності. Внутрісерійну оцінку відтворюваності одержали для того самого зразка в той самий день в одній і тій же серії вимірів тим самим співробітником, з використанням того самого обладнання й способу, представляючи внутрісерійну дисперсію виявлення CV<sub>intra</sub> (Таблиця 17). Міжсерійну оцінку відтворюваності одержали для того самого зразка в різні дати в різних серіях вимірів тим самим співробітником, з використанням того самого обладнання й способу, представляючи міжсерійну дисперсію виявлення CV<sub>inter</sub> (Таблиця 18).

- Результати показали, що стандартні криві, отримані як у той самий день, так і в різні дати, характеризувалися незначною мінливістю, при середній точності протягом дня 6,00 %. У той же час розходження між зразками було більше вираженим при точності в різні дати 21,52 % і загальної точності 21,75 % (Таблиця 19) при застосуванні до робочого діапазону стандартної кривої від 0,0 до 6,0 кг/т.



Таблиця 17. Внутрісерійна точність відтворюваності для побудови стандартної кривої.

Концентрація (кг/т)		0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
День 1 Серія № 2	OD <sub>450 нм</sub>	0,380	0,606	0,728	1,622	1,837	2,114
	$\sigma_{intra}$	0,031	0,018	0,041	0,104	0,070	0,098
	% CV	8,17	3,01	5,59	6,40	3,82	4,62
День 2 Серія № 3	OD <sub>450 нм</sub>	0,310	0,401	0,492	1,092	1,237	1,463
	$\sigma_{intra}$	0,030	0,034	0,021	0,030	0,016	0,050
	% CV	9,55	8,44	4,30	2,77	1,32	3,40
День 3 Серія № 4	OD <sub>450 нм</sub>	0,227	0,344	0,418	0,856	0,950	1,192
	$\sigma_{intra}$	0,019	0,017	0,020	0,025	0,041	0,035
	% CV	8,14	5,08	4,86	2,89	4,31	2,97
День 4 Серія № 5	OD <sub>450 нм</sub>	0,343	0,457	0,617	1,338	1,491	1,644
	$\sigma_{intra}$	0,058	0,032	0,029	0,057	0,140	0,124
	% CV	17,01	6,96	4,70	4,23	9,42	7,52
День 5 Серія № 6	OD <sub>450 нм</sub>	0,361	0,517	0,588	1,341	1,561	1,661
	$\sigma_{intra}$	0,064	0,011	0,035	0,069	0,109	0,047
	% CV	17,61	2,09	5,99	5,12	6,99	2,84
% CV <sub>intra</sub> (внутрісерійна точність)		12,10	5,12	5,09	4,28	5,17	4,27
Середня точність, % CV <sub>intra</sub>		6,00					

Таблиця 18. Міжсерійна точність відтворюваності побудови стандартної кривої.

Концентрація (кг/т)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
OD <sub>450 нм</sub>	0,324	0,465	0,568	1,250	1,415	1,615
$\sigma_{Inter}$	0,060	0,102	0,119	0,289	0,337	0,337
% CV <sub>Inter</sub>	18,54	21,88	20,93	23,14	23,78	20,86
Середня точність, % CV <sub>Inter</sub> (міжсерійна точність)	21,52					

Таблиця 19. Загальна точність побудови стандартної кривої.

Концентрація (кг/т)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
n	30	30	30	30	30	30
$\sigma_{intra}$	0,059	0,034	0,034	0,071	0,060	0,060
$\sigma_{Inter}$	0,060	0,102	0,119	0,289	0,337	0,337
$\sigma_{Total}$	0,063	0,102	0,120	0,290	0,338	0,338
Точність, % CV <sub>Total</sub>	19,35	21,99	21,05	23,22	23,90	20,96
Загальна точність, % CV <sub>Total</sub>	21,75					

5 L<sub>D</sub> і L<sub>Q</sub> (чутливість)

Значення L<sub>D</sub> і L<sub>Q</sub> наведені в Таблиці 20. Виявлено, що значення L<sub>Q</sub> були нижче рекомендованої частки включення продукту МІКОСОРБ, що дозволяло виконувати його кількісне визначення в кормовому матеріалі.

Межа виявлення L<sub>D</sub>=0,547±0,237 кг/т.

10 Межа кількісної оцінки L<sub>Q</sub> = 1,864±0,806 кг/т.

Таблиця 20. Визначення  $L_D$  і  $L_Q$  у кормовому матеріалі для курей.

	n	OD <sub>450</sub> холостого зразка		$L_D(\Delta OD_{450})$	$L_Q(\Delta OD_{450})$	$x_D(\text{кг/т})$	$x_Q(\text{кг/т})$
		$x_{b \text{ inter}} - \bar{x}_b$ Intra	$\sigma_{\text{холост}}$				
День 1	10	0,056	0,031	0,093	0,311	0,316	1,093
День 2	10	-0,014	0,030	0,089	0,297	0,467	1,552
День 3	10	-0,097	0,019	0,056	0,185	0,357	1,228
День 4	10	0,018	0,058	0,175	0,583	0,767	2,622
День 5	10	0,037	0,064	0,191	0,636	0,829	2,827
Середнє значення					0,121±0,059	0,402±0,196	0,547±0,237

Вірогідність

- Вірогідність вимірювали в 5 незалежних експериментах, що включають по 10 незалежних зразків в 4 повторностях для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом. Кінцеву концентрацію для кожного зразка розраховували, як описано тут, використовуючи спостережувані значення, отримані для розрахунку гомогенності (Таблиця 21). Потім розраховували середню точність із усередненої точності, отриманої для всіх серій і зіставленої з доданою концентрацією продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом. Розрахунки виконували відповідно до рівнянь, наведених тут.

Результати показали, що оцінка виходу продукту на 18 % перевищила реальний зміст кормового матеріалу при доданій концентрації продукту МІКОСОРБ (Таблиця 22).

Таблиця 21. Вірогідність і точність, обмірювані в 5 незалежних експериментах, що включають по 10 незалежних зразків в 4 повторностях для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом.

№ серії	$x_{\text{тн}}$ додана (кг/т)	№ повтору, $x_c$ (OD <sub>450</sub> )										$\bar{x}_c$	% CV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
День 1	4,0	4,8	5,2	4,8	4,7	4,8	4,6	5,0	4,8	4,7	4,7	4,8	2,92
День 2	4,0	5,0	4,6	4,9	4,5	4,9	4,2	4,6	5,0	5,0	4,9	4,8	5,80
День 3	4,0	4,9	6,2	4,6	5,5	4,9	5,0	4,7	5,0	5,0	4,3	5,0	9,84
День 4	4,0	4,7	4,4	4,0	4,2	3,9	4,7	4,4	4,4	4,3	4,3	4,3	5,36
День 5	4,0	4,1	4,3	4,8	4,4	4,8	4,6	4,8	5,0	5,0	5,0	4,7	6,060
% CV <sub>intra</sub> (внутрісерійна точність)													6,00

Таблиця 22. Загальний вихід продукту, обмірюваний із середнього по 5 незалежних експериментах, що включає по 10 незалежних зразків в 4 повторностях для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом.

$x_{\text{тн}}$ додана (кг/т)	Середнє значення $\bar{x}_c$	$\sigma_c$
4,0	4,7	0,2
% CV <sub>Inter</sub> (міжсерійна точність)		5,07
Загальний вихід продукту (% теоретичної концентрації)		117,95

Перевірка з використанням кормового матеріалу для свиней

- Випробування виконували в Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition в ALLTECH, Inc, штат Кентуккі, США на складі твердого корму для свиней з додаванням п'яти різних концентрацій продукту МІКОСОРБ.

Кормові матеріали для свиней, індивідуально змішані з 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 кг/т продукти МІКОСОРБ аналізували поряд зі зразком цього ж кормового матеріалу для свиней, змішаного з

невідомим рівнем продукту МІКОСОРБ, при розподілі на тому самому титраційному мікропланшеті.

#### Застосовність

Перевірку здійснювали з метою визначення характеристик аналізу твердофазного ІФА, розробленого для аналізу продукту МІКОСОРБ і його аналогів, як кінцевої процедури, що забезпечує єдність вимірів для цілей відстеження продукту в кормах складного складу.

Шість рівнів продукту МІКОСОРБ (при 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 кг/т), змішаного зі зразком корму, використовували для перевірки, що відповідає робочому діапазону рівня включення.

Розчин розведеного поліклонального антитіла кролика: розведення первинного антитіла адаптували відповідно до фонового рівня. Антитіла, таким чином, розбавляли до 1:3500 в PBS, додаючи 1 мкл розчину антитіл №1 до 3,5 мл 1X PBS. На кожний титраційний мікропланшет був потрібний об'єм розчину 10 мл.

Розведене антитіло кози проти антитіла кролика: розведення вторинного антитіла адаптували відповідно до фонового рівня. Антитіла, таким чином, розбавляли до 1:30000 в PBS, додаючи 1 мкл розчину антитіл №2 до 30,0 мл 1X PBS.

#### Гомогенність

Перевірку гомогенності зразка виконували на середньому рівні включення продукту МІКОСОРБ (4,0 кг/т) в експериментальному плані. Аналіз даного конкретного рівня повторювали 5 разів по 10 окремих зразків з використанням 4 повторів для кожного зразка (Таблиця 23).

**Таблиця 23.** Оцінка гомогенності при концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т, змішаного з кормовим матеріалом для свиней, виконана з використанням процедури твердофазного ІФА в 5 серіях вимірів на 10 окремих зразках препарату в 4 повторностях.

№ серії	1	2	3	4	5	Середнє значення
<i>n</i>	4 × 10	4 × 10	4 × 10	4 × 10	4 × 10	4 × 10
Середня OD <sub>450 нм</sub>	1,091	1,533	1,486	1,845	0,856	1,362
$\sigma_{intra}$	0,109	0,161	0,077	0,199	0,048	-
% CV <sub>n</sub>	10,02	10,51	5,15	10,76	5,57	-
Гомогенність, % CV <sub>n</sub>	8,40					

#### Калібрування

Калібрування аналізу виконували з використанням корму, змішаного зі стандартним зразком з відомою концентрацією й у діапазоні від 0,0 до 6,0 кг/т продукту МІКОСОРБ. Апроксимацію лінійної кривої  $y = Ax$ , що проходить через початок координат, використовували для визначення зв'язку між концентрацією й відповіддю (OD<sub>450</sub>). Усереднена стандартна крива, отримана для 5 серій вимірів, показана на Фігурі 6.

#### Лінійність

Лінійність стандартних кривих оцінювали за допомогою розрахунку коефіцієнта регресії відповідно до рівняння залежності нанесених на графік рівнів включення від коефіцієнта поглинання OD<sub>450</sub>, використовуючи максимальню відповідну лінію, що проходить через початок координат,  $\Delta OD_{450} = Ax(\text{МІКОСОРБ})$  після вирахування відповіді на холосту пробу. Лінійність каліброваної кривої перевіряли за допомогою значення коефіцієнта кореляції, що перевищує  $r^2 > 0,95$ . Коефіцієнт регресії, розрахований для кожної серії стандартних кривих і для усередненої стандартної кривої, представлений у Таблиці 24.

**Таблиця 24.** Лінійність стандартних кривих для кормового матеріалу для свиней.

№ серії	1	2	3	4	5	Середнє з усередненої кривої
Дата	5/7/09	5/12/09	5/13/09	5/22/09	8/18/09	1/6 Викид
n	50	50	50	50	50	-
Нахил (A)	0,2522	0,2593	0,2620	0,2856	0,1818	0,1929
Середньоквадратична помилка (MSE) *	0,0017	0,0021	0,0020	0,0073	0,0181	-
Лінійність ( $r^2$ )	0,996	0,995	0,990	0,974	0,987	0,997

Середньоквадратичну помилку визначають у моделях лінійної регресії в такий спосіб:

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2, \text{ де } e_i^2 = y_i - \hat{y}_i; y_i - \text{експериментально обмірюване значення } y; \hat{y}_i -$$

теоретичне значення для прогнозованої концентрації x і продукту МІКОСОРБ.

#### Відтворюваність

- Відтворюваність є мірою внутрішньої дисперсії при оцінці стандартного відхилення відтворюваності. Внутрісерійну оцінку відтворюваності одержали для того самого зразка в той самий день в одній і тій же серії вимірів тим самим співробітником, з використанням того самого обладнання й способу, представляючи внутрісерійну дисперсію виявлення  $S_{intra}$  (Таблиця 25). Міжсерійну оцінку відтворюваності одержали для того самого зразка в різні дати в різних серіях вимірів тим самим співробітником, з використанням того самого обладнання й способу, представляючи міжсерійну дисперсію виявлення  $CV_{inter}$  (Таблиця 26).

Результати показали, що стандартні криві, отримані як у той самий день, так і в різні дати, характеризувалися незначною мінливістю, при середній точності протягом дня 7 % і точності в різні дати 20 % у робочому діапазоні стандартної кривої від 0,0 до 6,0 кг/т.

**Таблиця 25.** Внутрісерійна точність відтворюваності побудови стандартної кривої.

Концентрація (кг/т)		0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
День 1 Серія № 1	OD <sub>450 nm</sub>	0,284	0,430	0,540	1,372	1,542	1,757
	$\sigma_{intra}$	0,012	0,040	0,055	0,051	0,111	0,121
	% CV	4,29	9,35	10,19	3,70	7,22	6,90
День 2 Серія № 2	OD <sub>450 nm</sub>	0,279	0,419	0,598	1,376	1,510	1,839
	$\sigma_{intra}$	0,035	0,028	0,011	0,040	0,201	0,137
	% CV	12,59	6,61	1,79	2,92	13,35	7,46
День 3 Серія № 3	OD <sub>450 nm</sub>	0,259	0,432	0,490	1,417	1,590	1,742
	$\sigma_{intra}$	0,020	0,007	0,028	0,118	0,044	0,174
	% CV	7,91	1,56	5,67	8,34	2,75	10,02
День 4 Серія № 4	OD <sub>450 nm</sub>	0,305	0,455	0,737	1,447	1,556	2,142
	$\sigma_{intra}$	0,027	0,024	0,101	0,271	0,104	0,060
	% CV	9,01	5,17	13,70	18,73	6,70	2,81
День 5 Серія № 5	OD <sub>450 nm</sub>	0,236	0,308	0,374	0,735	0,876	0,984
	$\sigma_{intra}$	0,020	0,018	0,017	0,029	0,048	0,023
	% CV	8,39	5,87	4,58	3,99	5,52	2,31
% CV <sub>intra</sub> (внутрісерійна точність)		8,44	5,71	7,18	7,53	7,10	5,90
Загальний % (CV <sub>intra</sub> )		6,98					

**Таблиця 26.** Міжсерійна точність відтворюваності побудови стандартної кривої.

Концентрація (кг/т)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
OD <sub>450 nm</sub>	0,273	0,409	0,548	1,269	1,415	1,693
$\sigma_{Inter}$	0,026	0,058	0,134	0,300	0,302	0,428
% CV <sub>Inter</sub>	9,62	14,16	24,45	23,67	21,38	25,28
<b>Середня точність, %</b> <b>CV<sub>Inter</sub></b> (міжсерійна точність)	19,76					

**Таблиця 27.** Загальна точність побудови стандартної кривої.

Концентрація (кг/т)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
<i>n</i>	30	30	30	30	30	30
$\sigma_{intra}$	0,023	0,023	0,042	0,102	0,102	0,103
$\sigma_{Inter}$	0,026	0,058	0,134	0,300	0,302	0,428
$\sigma_{Total}$	0,028	0,059	0,135	0,304	0,306	0,430
<b>Точність, % CV<sub>Total</sub></b>	10,33	14,39	24,70	23,94	21,63	25,42
<b>Загальна точність,</b> <b>% CV<sub>Total</sub></b>	20,07					

$L_D$  і  $L_Q$  (чутливість)

- Значення  $L_D$  і  $L_Q$  наведені в Таблиці 28. Виявлено, що значення  $L_Q$  були нижче рекомендованої частки включення продукту МІКОСОРБ, що дозволяло виконувати його кількісне визначення в кормовому матеріалі.

Межа виявлення  $L_D = 0,403 \pm 0,150$  кг/т

Межа кількісної оцінки  $L_Q = 1,363 \pm 0,498$  кг/т.

**Таблиця 28.** Визначення  $L_D$  і  $L_Q$  у кормовому матеріалі для свиней.

	<i>n</i>	OD <sub>450</sub> холостого зразка		$3\sigma$ ( $\Delta$ OD <sub>450</sub> )	$10\sigma$ ( $\Delta$ OD <sub>450</sub> )	$L_D$ (кг/т)	$L_Q$ (кг/т)
		$\bar{x}_{b inter} - \bar{x}_{b intra}$	$\sigma_{холост}$				
День 1	10	0,064	0,071	0,111	0,371	0,613	2,054
День 2	10	-0,006	0,035	0,105	0,351	0,407	1,386
День 3	10	-0,027	0,020	0,061	0,205	0,234	0,795
День 4	10	0,019	0,027	0,082	0,275	0,289	0,991
День 5	10	-0,050	0,020	0,059	0,198	0,471	1,591
<b>Середнє значення</b>				0,084±0,024	0,280±0,080	0,403±0,150	1,363±0,498

Вірогідність

Вірогідність вимірювали в 5 незалежних експериментах, що включають по 10 незалежних зразків в 4 повторностях для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом. Кінцеву концентрацію для кожного зразка розраховували, як описано тут, використовуючи спостережувані значення, отримані для розрахунку гомогенності (Таблиця 29). Потім розраховували середню точність із усередненої точності, отриманої для всіх серій і зіставленої з доданою концентрацією продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом. Розрахунки виконували відповідно до рівнянь, описаних тут.

Результати показали, що оцінка виходу продукту на 20 % перевищила реальний зміст кормового матеріалу при доданій концентрації продукту МІКОСОРБ (Таблиця 30).

**Таблиця 29.** Вірогідність і точність, обмірювані в 5 незалежних експериментах, що включають по 10 незалежних зразків в 4 повторностях для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом.

№ серії	$x_{TH}$ додана (кг/т)	№ повтору, $x_c$ ( $OD_{450}$ )										$\bar{x}_c$	% $CV$
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
День 1	4,0	4,3	4,6	3,6	3,8	4,1	3,4	5,2	4,4	5,0	4,2	4,3	12,80
День 2	4,0	6,1	4,9	4,1	4,5	4,6	4,5	4,7	4,2	5,2	5,7	4,8	12,50
День 3	4,0	4,9	4,4	4,3	5,1	4,6	4,9	4,6	4,4	4,7	5,1	4,7	5,91
День 4	4,0	5,0	4,2	5,9	4,3	5,6	5,4	5,4	5,6	6,6	5,6	5,4	12,64
День 5	4,0	4,6	4,8	4,9	4,9	4,8	5,5	4,4	5,3	4,6	5,3	4,9	6,97
% $CV_{intra}$ (міжсерійна точність)													10,16

**Таблиця 30.** Загальний вихід продукту, обмірюваний із середнього по 5 незалежних експериментах, що включає по 10 незалежних зразків в 4 повторностях для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом.

$x_{TH}$ , додана (кг/т)	Середнє значення $\bar{x}_c$	$\sigma_c$
4,0	4,4	0,3
% $CV_{inter}$ (міжсерійна точність)		8,47
Загальний вихід продукту (% теоретичної концентрації)		120,46

5

Перевірка з використанням кормового матеріалу для курей і свиней

Твердофазний ІФА кормів для виявлення МІКОСОРБу виконували в матеріалах для курей і свиней, підтверджували в незалежній лабораторії й порівнювали з результатами перевірки. Аналіз підтверджували в Alimetris, Ltd., Koskelontie 19B, Еспоо, Фінляндія.

Калібрування аналізу виконували у дві незалежні дати з використанням корму, змішаного зі стандартним зразком з відомою концентрацією в діапазоні від 0,0 до 6,0 кг/т продукту МІКОСОРБ. Апроксимацію лінійної кривої  $y = Ax$ , що проходить через початок координат, використовували для визначення зв'язку між концентрацією й відповіддю ( $OD_{450}$ ) у кормах для свиней і курей. Коефіцієнт поглинання й отриманих калібрувань істотно різнилися між різними серіями; у той же час абсолютні концентрації для відомих і сліпих зразків залишалися тими ж.

Лінійність

Лінійність стандартних кривих оцінювали за допомогою розрахунку коефіцієнта регресії відповідно до рівняння залежності нанесених на графік рівнів включення від коефіцієнта поглинання  $OD_{450}$ , використовуючи максимально відповідну лінію, що проходить через початок координат,  $\Delta OD_{450} = Ax(\text{МІКОСОРБ})$  після вирахування відповіді на холосту пробу. Лінійність каліброваної кривої перевіряли за допомогою значення коефіцієнта кореляції, що перевищує  $r^2 > 0,95$ . Коефіцієнт кореляції перебував у діапазоні від 0,991 до 0,994 (Таблиця 31).

20

Таблиця 31. Лінійність стандартних кривих для кормового матеріалу для курей і свиней.

№ серії	1	2	3	4	Середнє значення з усередненої кривої
Основна речовина	Корм для курей		Корм для свиней		-
Дата	4/6/10	4/7/10	4/6/10	4/6/10	-
n	15	15	15	15	-
Нахил (A)	0,0954	0,0775	0,0828	0,0809	-
Лінійність (г <sup>2</sup> )	0,991	0,994	0,993	0,992	0,997

Середньоквадратичну помилку визначають у моделях лінійної регресії в такий спосіб:

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2, \text{ де } e_i^2 = y_i - \hat{y}_i; y_i - \text{експериментально обмірюване значення } y; \hat{y}_i -$$

теоретичне значення для прогнозованої концентрації  $x_i$  продукту МІКОСОРБ.

5  $L_D$  і  $L_Q$  значення були визначені в матриці 40 % соляної кислоти. Оцінки відповідних значень  $L_D$  і  $L_Q$  склали відповідно 0,35 і 1,20 кг/т МІКОСОРБу при змішуванні з кормами для курей і 0,27 і 0,91 кг/т МІКОСОРБу при змішуванні з кормами для свиней (Таблиця 32 і Таблиця 33, відповідно).

Таблиця 32. Результати, отримані на холостих зразках корму для курей у двох окремих серіях, виконаних з інтервалом в один день лабораторією, що перевіряє.

	Дата	ID зразка	Споживання зразка (г)	Результат (кг/Т)
День 1	4/6/2010	0,3	20	0,230
		0,4	20	0,150
		0,6	20	0,010
День 2	4/7/2010	0,1	20	0,320
		0,4	20	0,110
		0,10	20	0,020
Середнє значення			0,140	

Таблиця 33. Результати, отримані на холостих зразках корму для свиней у двох окремих серіях, виконаних з інтервалом в один день лабораторією, що перевіряє.

	Дата	ID зразка	Споживання зразка (г)	Результат (кг/Т)
День 1	4/6/2010	0,2	20	0,230
		0,3	20	0,290
		0,4	20	0,082
День 2	4/7/2010	0,1	20	0,220
		0,3	20	0,110
		0,7	20	0,064
Середнє значення			0,170	

Вірогідність і точність для "відомих" зразків

Вірогідність вимірювали в 2 незалежних експериментах, що включають по 6 повторів для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом. Середню точність розраховували з усередненої точності, отриманої для всіх серій і зіставленої з доданою концентрацією продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом.

Отримані значення відповідали критеріям для вірогідності й точності, як зазначено нижче.

Внутрісерійну оцінку відтворюваності одержали для того самого зразка в той самий день в одній і тій же серії вимірів тим самим співробітником, з використанням того самого обладнання й способу, представляючи внутрісерійну дисперсію виявлення  $CV_{intra}$ . Міжсерійну оцінку

відтворюваності одержали для того самого зразка в різні дати в різних серіях вимірів тим самим співробітником, з використанням того самого обладнання й способу, представляючи міжсерійну дисперсію виявлення  $CV_{Inter}$ .

5 Отримані значення відповідали критеріям для вірогідності й точності, як зазначено нижче для основної речовини для корму курей і свиней (Таблиця 34 і Таблиця 35).

**Таблиця 34.** Вірогідність і точність, обмірювані в 6 повторних тестах, виконаних в 2 різні дати при використанні відомих зразків продукту МІКОСОРБ (4,0 кг/т) при змішуванні з кормовим матеріалом для курей.

	Дата	ID зразка	Споживання зразка (г)	Результати (кг/Т)
День 1	3/4/2010	H.1	20	4,4
		H.2	20	4,4
		H.3	20	3,9
		H.4	20	4,1
		H.5	20	4,4
		H.6	20	4,2
День 2	3/5/2010	H.7	20	3,8
		H.8	20	3,3
		H.9	20	3,7
		H.10	20	3,4
		H.11	20	3,8
		H.12	20	4,1
Середнє значення				4,0
% $CV_{intra}$ (міжсерійна точність)			6,6	
% $CV_{inter}$ (міжсерійна точність)			9,7	
Загальний вихід продукту (% теоретичної концентрації)			99%	

**Таблиця 35.** Вірогідність і точність, обмірювані в 6 повторних тестах, виконаних в 2 різні дати при використанні відомих зразків продукту МІКОСОРБ (4,0 кг/т) при змішуванні з кормовим матеріалом для свиней.

	Дата	ID зразка	Споживання зразка (г)	Результати (кг/Т)
День 1	3/4/2010	H.1	20	4,7
		H.2	20	4,1
		H.3	20	4,4
		H.4	20	4,6
		H.5	20	3,8
		H.6	20	4,3
День 2	3/5/2010	H.7	20	3,5
		H.8	20	3,7
		H.9	20	3,1
		H.10	20	3,2
		H.11	20	3,6
		H.12	20	3,5
Середнє значення			3,9	
% CV <sub>intra</sub> (міжсерійна точність)			7,5	
% CV <sub>Inter</sub> (міжсерійна точність)			14,0	
Загальний вихід продукту (% теоретичної концентрації)			96%	

10 Вірогідність і точність для "невідомих" зразків

Вірогідність вимірювали в 2 незалежних експериментах, що включають по 3 повтори для концентрації продукту МІКОСОРБ 4,0 кг/т при змішуванні з кормовим матеріалом у сліпому



тесті. Отримані значення відповідали критеріям для вірогідності й точності, як зазначено нижче (Таблиця 36 і Таблиця 37).

**Таблиця 36.** Вірогідність і точність, обмірювані в 3 повторних тестах при використанні невідомих зразків продукту МІКОСОРБ (4,0 кг/т) при змішуванні з кормовим матеріалом для курей.

Дата виміру	ID зразка (мл)	Споживання зразка (г)	Результати (кг/Т)
4/6/2010	C.6	20	4,0
	C.7	20	3,8
	C.8	20	4,1
<b>Середнє значення</b>		4,0	
<b>Стандартне відхилення відтворюваності</b>		0,11	
<b>RSD (%)</b>		3,0%	

5

**Таблиця 37.** Вірогідність і точність, обмірювані в 3 повторних тестах при використанні невідомих зразків продукту МІКОСОРБ (4,0 кг/т) при змішуванні з кормовим матеріалом для свиней.

Дата виміру	ID зразка (мл)	Споживання зразка (г)	Результати (кг/Т)
4/6/2010	C.6	20	4,5
	C.7	20	3,8
	C.8	20	4,4
<b>Середнє значення</b>		4,2	
<b>Стандартне відхилення відтворюваності</b>		0,36	
<b>RSD (%)</b>		8,5%	

#### Надійність

Аналіз надійності оцінював здатність способу виміру не змінювати результати при впливі незначних змін у змінних факторах навколишнього середовища й процедури.

Стабільність твердофазного ІФА вивчали шляхом зміни розведення первинних і вторинних антитіл, стабільності первинного антитіла, шляхом зміни розподілу різних зразків, що тестують, на титраційних мікропланшетах (одному планшеті, що містить всі вимірювані зразки й включає холості, стандартні й невідомі зразки, у порівнянні з декількома титраційними мікропланшетами, що включають більшу кількість повторень на аналізований зразок, де холості, стандартні й невідомі зразки перебувають на різних титраційних мікропланшетах). У Таблиці 38 наведені зміни й показана, що результати були стабільні навіть у випадку внесення змін, що вказує на високу надійність тесту, особливо при змінах розведень антитіл.

**Таблиця 38.** Тест надійності. Стандартні умови показані напівжирним шрифтом.

Десятивідсоткові зміни також виділені, при їх наявності.

Змінений параметр	Значення параметра	Зразок корму	$x_c$	Вихід продукту	$CV_{intra}$	$CV_{Inter}$	$CV_{Total}$
Первинне антитіло, Вторинне антитіло <b>1:20000</b>	1:2000	Для молочної худоби	4,45	120,98	7,90	10,85	12,06
	1:2500		4,47	121,06	8,98	13,86	15,13
	1:4000		4,44	121,01	10,54	10,18	14,12
	1:5000		4,49	123,30	9,57	13,42	16,14
Первинне антитіло, Вторинне антитіло <b>1:30000</b>	1:2000	Для молочної худоби	4,37	119,56	10,03	9,39	12,70
	1:2500		4,55	121,75	8,86	14,58	15,73
	1:4000		4,30	115,85	10,66	11,11	14,10
	1:5000		4,35	117,29	9,91	14,55	16,33
Стабільність первинного антитіла	2 - 8 °C 1 тиждень, к.т.	Для курей	4,8	134,80	5,59	-	-
			4,9	138,10	6,85	-	-
Розподіл на планшетах	<b>Один планшет</b> Кілька планшетів	Для курей	4,72	120,68	6,13	5,19	8,07
			4,82	124,23	5,99	5,89	8,11

## Приклад 5

Тестування специфічності моноклонального антитіла

## 5 Способи

Для визначення перехресної реакційної здатності моноклональних антитіл проти кон'югата дріжджовий (1→4)- $\alpha$ -D-глюкан/(1→6)- $\beta$ -D-глюкан-БСА тестували сімнадцять сполук у концентрації 50 мкг/мл в PBS.

10 Тестовані сполуки являли собою: Розчинний картопляний крохмаль, рисовий крохмаль, пшеничний крохмаль, кукурудзяний крохмаль, БСА, глікоген (кролика), глікоген (устриці), глікоген (бичачий), маннан, ламінарин, зимозин А, мальтрин QD, глюкан пекарських дріжджів, (1→3)- $\beta$ -D- глюкан *Eug. gracilis*, дріжджі *Torula*, Ysw- 02 bead beater (фракція клітинної стінки дріжджів – препарат bead beater),  $\beta$ -глюкан ячменя.

15 Екстракт клітинної стінки дріжджів (MIKOCOPB № партії 08FS001) і антиген (1→4)- $\alpha$ -D-глюкан/(1→6)- $\beta$ -D-глюкан-БСА, використані для індукції моноклональних антитіл, також тестували в концентраціях 1 мкг/мл, 2 мкг/мл і 5 мкг/мл. Обидва моноклональні антитіла (513A161.1 і 513A431.1) аналізували в наступному діапазоні розведень: 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:1500 і 1:2000. Використовували дев'яностошестилункові титраційні мікропланшети Nunc з № партії 0702013. Планшети покривали 100 мкл сполуки/лунку й струшували шляхом постукування пальцями 8-10 разів. Планшети покривали герметизуючою стрічкою й інкубували протягом 1 год. при 37° С. Розчин видаляли, а планшети 3-кратно відмивали 200 мкл PBS на відмивання за допомогою многоканальної піпетки. Планшети постукували пальцями 8-10 разів перед видаленням кожного розчину для відмивання. Між відмиваннями надлишок рідини видаляли шляхом вибивача планшета на паперові рушники. Для блокування вносили 100 мкл/лунку 3 % молока (не центрифугованного). Планшети інкубували 1 год. при кімнатній температурі. Розчин, що блокує, видаляли й відмивали лунки 1 × 200 мкл PBS, 2 × 200 мкл PBS+0,05 % полісорбату 20. Планшети струшували шляхом постукування пальцями 8-10 разів перед видаленням кожного розчину для відмивання. Між відмиваннями надлишок рідини видаляли шляхом вибивача планшета на паперові рушники.

30 Вносили 100 мкл кожного розведення відповідних сироваток на лунку. Для холостих лунок використовували PBS (100 мкл/лунку). Планшет інкубували в закритому виді протягом 1 год. при кімнатній температурі. Розчин видаляли, а лунки 3-кратно відмивали 200 мкл PBS+0,05 % полісорбат 20 на лунку. Планшети постукували пальцями 8-10 разів для струшування перед видаленням кожного розчину для відмивання. Між відмиваннями надлишок рідини видаляли шляхом вибивача планшета на паперові рушники. Вносили сто мкл вторинного антитіла (1:10000 кон'югованих з пероксидазою IgG кози проти антитіл миші) на лунку. Планшет інкубували в закритому виді протягом 1 год. при кімнатній температурі. Розчин видаляли, а лунки 3-кратно відмивали 200 мкл PBS+0,05 % полісорбат 20 на відмивання. Планшети постукували пальцями 8-10 разів для струшування перед видаленням кожного розчину для

відмивання. Між відмиваннями надлишок рідини видаляли шляхом вибивача планшета на паперові рушники.

Вносили 100 мкл ТМБ-субстрату, нагрітого до кімнатної температури, на лунку. Через 5 хвилин реакцію зупиняли 100 мкл 1 н. HCl на лунку. Днища планшетів дочиста протирали від відбитків пальців і після 10-секундного струшування зчитували поглинання при 450 нм за допомогою ридера титраційних мікропланшетів.

#### Результати

Гістограми даних твердофазного ІФА наведені на Фігурах 9-14. Як 513A161.1, так і 513A431.1 дуже енергійно реагували з антигеном 499-73-3 у концентрації 1 мкг/мл, забезпечуючи максимальний коефіцієнт поглинання при 2 мкг/мл. Антитіла також були здатні розпізнавати 08FS001 у концентраціях від 1 мкг/мл до 5 мкг/мл, з максимальним коефіцієнтом поглинання при 5 мкг/мл. У той же час коефіцієнт поглинання був значно менше для 08FS001, чим для антигену 499-73-3. Антитіло 513A161.1 розпізнавало ламінарин і в значній мірі реагувало з ним, а 513A431.1 - немає. Обидва антитіла демонстрували дуже високе показання коефіцієнта поглинання для зимозина А, що було близько до і іноді перевищувало коефіцієнт поглинання, спостережуваний з антигеном 499-73-3. Примітно, що антитіла демонстрували значну перехресну реакційну здатність із зимозином А, мальтрином QD, глюканом пекарських дріжджів, (1→3)-β-D-глюканом *Eug. gracilis*, дріжджами *Torula* і осадом uscw-02 bead beater, що обмежувало їх використання для кількісного твердофазного ІФА.

#### Приклад 6

Спроби оптимізації умов твердофазного ІФА з використанням моноклональних антитіл для виявлення антигену, екстрагованого з корму

Розведення в PBS у порівнянні з PBS+3 % знежирене сухе молоко

Спроби використання моноклонального антитіла 513A161.1 (Приклад 5) для виявлення антигену, екстрагованого з корму, за допомогою кількісного твердофазного ІФА привели до низьких показань коефіцієнта поглинання. Щоб визначити, чи впливає розведення антитіл в 3 % молоці, на відміну від PBS, на показання коефіцієнта поглинання (наприклад, викликаючи надлишкове блокування в сполученні з компонентами екстракту корму), виконували наступний протокол:

Екстракт клітинної стінки дріжджів (MIKOCORB, № партії 08FS001) піддавали хімічній екстракції, як описано в Прикладі 4, за допомогою розчину, що містить 0,5 % HCl. Твердофазний ІФА проводили, як описано в Прикладі 5, з використанням моноклонального антитіла 513A161 у розведенні 1:400 як первинне антитіло й кон'югата ПХ-антитіло кози проти IgG миші (1:10000), розведеного PBS або 3 % молоком, як вторинне антитіло. Титраційні мікропланшети покривали екстрактом клітинної стінки дріжджів при 100 мкл/лунку або екстрактом, розведеним 1:1 PBS, при 200 мкл/лунку.

Результати, показані на Фігурі 15, установили, що спостерігався слабкий статистично незначущий ефект розріджувачів антитіла. Крім того, спроби використовувати моноклональні антитіла для виявлення антигену в стандартних зразках кормів, екстрагованих 0,5 % HCl, у трьох повторях привели до великої мінливості показань між повторами, високим значенням стандартного відхилення й завищених показань коефіцієнта поглинання.

Етап покриття антигеном - температура й час

Спроби використання моноклонального антитіла 513A161.1 (Приклад 5) для виявлення антигену, екстрагованого з корму, за допомогою кількісного твердофазного ІФА привели до низьких показань коефіцієнта поглинання. Для збільшення показань коефіцієнта поглинання при твердофазному ІФА з використанням моноклонального антитіла миші 513A161.1 виконали наступні експерименти з метою визначення того, чи можна за рахунок зміни часу й температури на етапі інкубування при покритті антигеном поліпшити виявлення антигену, екстрагованого з корму, без збільшення фонового/неспецифічного зв'язування.

Протокол складався з екстракції корму, як описано вище, для одержання зразків для аналізу. Аліквоти зразків наносили на планшети негайно або зберігали протягом ночі при -25 °C. Виготовлення зразка повторювали тричі, одержуючи три повтори екстракції. Шеститочкову калібровану криву (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,8; 2,4 кг/т) одержували з використанням антигену в препаратах корму для курей. Планшети покривали екстрактами корму для побудови стандартної кривої й залишали інкубуватися при 4 °C протягом ночі (у нерухливому стані), 4 °C протягом ночі (на качалці) або 37 °C протягом 1 години (у нерухливому стані). Твердофазний ІФА проводили, як описано в Прикладі 5, з використанням моноклонального антитіла 513A161.1 у розведенні 1:400 в 3 % молоці як первинне антитіло й кон'югата ПХ-антитіло кози проти IgG миші (1:10000), розведеного 3 % молоком, як вторинне антитіло. Інкубування із субстратом здійснювали протягом 30 хвилин і визначали коефіцієнт поглинання при 450 нм.

Результати, показані на Фігурі 16, указують, що зміна часу й температури, при яких антиген наносили на планшет, не збільшувало коефіцієнт поглинання до оптимального діапазону, а також не впливало на лінійність стандартної кривої. Крім того, фон збільшувався незалежно від часу інкубації.

#### 5 Приклад 7

Тестування селективності (інтерференції) поліклонального антитіла

Для визначення ступеня інтерференції виконали ряд аналізів з використанням кормового матеріалу для курей, описаного тут, при відсутності в присутності продукту МІКОСОРБ (вих. № 285965) у кількості 1 кг/т, причому в останньому випадку додатково були присутні або були відсутні можливі інтерферуючі продукти в декількох пропорціях (50 %, 100 %, 200 % у порівнянні з рівнем включення продукту МІКОСОРБ, мас/мас), що відносяться до вуглеводів або побічних продуктів, що зустрічаються в кормових складах. У зв'язку із цим досліджували й протестували вплив недоступних продуктів на виявлення продукту МІКОСОРБ, точно дотримуючись описаної тут методології:

- 15 - Амілоза (картопляний крохмаль): (1→4):(1→6)-α-D-глюкани в співвідношенні 30:1.
- Мальтодекстрини й тверді речовини кукурудзяної патоки: легко засвоювані вуглеводи на основі природного кукурудзяного крохмалю, полімери декстрози.
- Глікоген (з бичачої печінки, тип IX): (1→4):(1→6)-α-D-глюкани в співвідношенні 10:1.
- Ламінарин (з *Laminaria digitata*): (1→3):β(1→6)-β-D-глюкани в співвідношенні 3:1.
- 20 - Суха барда; побічні продукти виробництва біоетанолу з кукурудзи.
- Сухі активні винні дріжджі для виробництва шампанського Red Star® Pasteur Champagne Active Dry Wine Yeast (з *Saccharomyces bayanus*): дріжджі й клітинна стінка дріжджів (вуглеводи складного складу на основі (1→3):β(1→6)-β-D- глюканів, (1→4):(1→6)-α-D-поліманнози, пов'язаної з білками, (1→2):(1→4)-β-N- ацетилглюкозаміну).

25 Як показано на Фігурі 7 і Фігурі 8, сума різниць між сигналами, отриманими в присутності продукту МІКОСОРБ і продукту МІКОСОРБ, змішаного з 50, 100, 200 % (мас/мас) речовини, що заважає, наближалася до нульового значення OD<sub>450</sub>. Результати вказують на відсутність інтерференції й, таким чином, на специфічні властивості аналізу для виявлення продукту МІКОСОРБ у кормових матеріалах складного складу, що складаються з різних вуглеводів, що заважають.

30 Докладні результати для кожної окремо взятої речовини, що заважає, і межі однобічного дисперсійного аналізу ANOVA для 95 % довірчого інтервалу наведені в Таблицях 39-44, де розраховані середні значення оптичної щільності (450 нм) і розходження між зразками, а також стандартне відхилення й коефіцієнт варіації. Однорідність дисперсії в межах кожної сполуки, що заважає, оцінювали з використанням критеріїв Левену, О'Брайену й Брауна-Форсайту. У випадку непостійної дисперсії використовували непараметричний однобічний дисперсійний аналіз ANOVA Краскела-Уоллісу з перетворенням рангів, що приводить до більше надійних тестів в умовах відсутності нормальності й до стійкості до викидів. Аналізи виконували на окремих планшетах для кожної концентрації тестуючої речовини, що заважає, або на одному індивідуальному планшеті. Для цих двох способів підготовки планшетів отримані ідентичні результати.

**Таблиця 39.** Середні значення OD<sub>450</sub>, отримані для продукту МІКОСОРБ при змішуванні з 0, 50, 100, 200% (мас/мас) амілози в кормі для курей. Розходження між значеннями аналізували за середнім значенням у ході однобічного дисперсійного аналізу ANOVA і статистичних критеріїв порівняння середніх з 95% довірчим інтервалом.

МІКОСОРБ 1 кг/т		Співвідношення МІКОСОРБ/ речовина, що заважає (мас/мас)		
		+ 50 %	+ 100 %	+ 200 %
Дисперсійний аналіз (ANOVA)		Непараметричний однобічний аналіз Краскела-Уоллісу		
Амілоза	Холостий зразок (тільки корм) <i>N</i>	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,3317 20,396 <sup>C</sup>	0,3538 40,479 <sup>C</sup>	0,3638 48,625 <sup>C</sup>
	Середній ранг	0,0157	0,0234	0,0242
	$\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	4,7471	6,6116	6,6448
	Контроль <i>N</i>	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,6601 154,25 <sup>AB</sup>	0,7073 196,48 <sup>A</sup>	0,6294 113,17 <sup>B</sup>
	Середній ранг	0,0348	0,0351	0,0206
	$\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	5,2709	4,9578	3,2661
	Контроль + амілоза <i>N</i>	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,6352 <sup>B</sup> 122,40 <sup>B</sup>	0,6561 <sup>AB</sup> 151,13 <sup>AB</sup>	0,6365 <sup>B</sup> 129,58 <sup>B</sup>
	Середній ранг	0,0200	0,0221	0,0346
	$\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	3,1418	3,3738	5,4299
	Середнє розходження (OD <sub>450</sub> )	-0,0249	-0,0512	0,071
	Середній ранг розходження	-31,85	-45,35	16,41
	Критичне значення Z	3,197		
	Критичне значення для порівняння	57,678		

**Таблиця 40.** Середні значення OD<sub>450</sub>, отримані для продукту МІКОСОРБ при змішуванні з 0, 50, 100, 200% (мас/мас) мальтодекстринів у кормі для курей. Розходження між значеннями аналізували за середнім значенням у ході однобічного дисперсійного аналізу ANOVA і статистичних критеріїв порівняння середніх значень із 95% довірчим інтервалом.

МІКОСОРБ 1 кг/т		Співвідношення МІКОСОРБ/ речовина, що заважає (мас/мас)		
		+ 50 %	+ 100 %	+ 200 %
Дисперсійний аналіз ANOVA		Однобічний параметричний і критерій порівняння Тьюкі		
Мальтодекстрини	Холостий зразок (тільки корм) <i>N</i> Середнє значення (OD <sub>450</sub> ) $\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	24 0,3628 <sup>C</sup> 0,0274 7,5505	24 0,3818 <sup>B</sup> 0,0288 7,5414	24 0,3587 <sup>C</sup> 0,0367 10,218
	Контроль <i>N</i> Середнє значення (OD <sub>450</sub> ) $\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	24 0,7022 <sup>A</sup> 0,0276 3,9264	24 0,6426 <sup>B</sup> 0,0247 3,8422	24 0,6822 <sup>A</sup> 0,0276 4,0480
	Контроль + Мальтодекстрини <i>N</i> Середнє значення (OD <sub>450</sub> ) $\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	24 0,7088 <sup>A</sup> 0,0490 6,9145	24 0,6271 <sup>B</sup> 0,0449 7,1518	24 0,6407 <sup>B</sup> 0,0342 5,3306
	Розходження	0,0066	-0,0155	-0,0415*
	Критичне значення	0,0308		
	$\sigma$ для порівняння	0,0099		

**Таблиця 41.** Середні значення OD<sub>450</sub>, отримані для продукту МІКОСОРБ при змішуванні з 0, 50, 100, 200% (мас/мас) глікогену в кормі для курей. Розходження між значеннями аналізували за середнім значенням у ході однобічного дисперсійного аналізу ANOVA і статистичних критеріїв порівняння середніх значень із 95% довірчим інтервалом.

МІКОСОРБ 1 кг/т		Співвідношення МІКОСОРБ/ речовина, що заважає (мас/мас)		
		+ 50 %	+ 100 %	+ 200 %
Дисперсійний аналіз ANOVA		Непараметричний однобічний аналіз за Краскелом-Уоллісом		
Глікоген	Холостий зразок (тільки корм)			
	N	24	24	16
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,4452 35,604 <sup>B</sup>	0,4414 33,458 <sup>B</sup>	0,4495 40,437 <sup>B</sup>
	Середній ранг	0,0311	0,0235	0,0270
	$\sigma_{intra}$	6,9773	5,3259	6,0070
	% CV <sub>intra</sub>			
	Контроль			
	N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,8522 150,33 <sup>A</sup>	0,8423 143,69 <sup>A</sup>	0,8339 137,54 <sup>A</sup>
	Середній ранг	0,0610	0,0433	0,0312
	$\sigma_{intra}$	7,1611	5,1412	3,7443
	% CV <sub>intra</sub>			
	Контроль + глікоген			
	N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,8474 149,94 <sup>A</sup>	0,8367 140,06 <sup>A</sup>	0,8051 124,58 <sup>A</sup>
	Середній ранг	0,0358	0,0576	0,0584
	$\sigma_{intra}$	4,2302	6,8847	7,2482
	% CV <sub>intra</sub>			
	Середнє розходження (OD <sub>450</sub> )	-0,0048	-0,0056	-0,0288
	Середній ранг розходження	0,39	-3,63	-12,96
	Критичне значення Z	3,197		
	Критичне значення для порівняння	55,547 - 62,103		

**Таблиця 42.** Середні значення OD<sub>450</sub>, отримані для продукту МІКОСОРБ при змішуванні з 0, 50, 100, 200% (мас/мас) ламінаріну в кормі для курей. Розходження між значеннями аналізували за середнім значенням у ході однобічного дисперсійного аналізу ANOVA і статистичних критеріїв порівняння середніх значень із 95% довірчим інтервалом.

МІКОСОРБ 1 кг/т		Співвідношення МІКОСОРБ/ речовина, що заважає (мас/мас)		
		+ 50 %	+ 100 %	+ 200 %
Дисперсійний аналіз ANOVA		Непараметричний однобічний аналіз за Краскелом-Уоллісом		
Ламінарин	Холостий зразок (тільки корм) N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,3580 37,88 <sup>DE</sup>	0,3478 31,15 <sup>E</sup>	0,3673 40,48 <sup>DE</sup>
	Середній ранг	0,0428	0,0522	0,0553
	$\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	11,951	14,998	15,063
	Контроль N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,5618 126,96 <sup>BC</sup>	0,5981 157,79 <sup>AB</sup>	0,5224 94,708 <sup>CD</sup>
	Середній ранг	0,0488	0,0229	0,0233
	$\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	8,6916	3,8358	4,4521
	Контроль + Ламінарин N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,6288 187,33 <sup>A</sup>	0,5630 125,50 <sup>BC</sup>	0,6155 174,21 <sup>AB</sup>
	Середній ранг	0,0245	0,0341	0,0312
	$\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	3,8924	6,0501	5,0624
	Середнє розходження (OD <sub>450</sub> )	-0,0670	-0,0351	0,0931
	Середній розходження ранг	60,37 *	-32,29	79,502 *
Критичне значення Z		3,197		
Критичне значення для порівняння		57,68		



**Таблиця 43.** Середні значення OD<sub>450</sub>, отримані для продукту МІКОСОРБ при змішуванні з 0, 50, 100, 200% (мас/мас) винних дріжджів RED STAR у кормі для курей. Розходження між значеннями аналізували за середнім значенням у ході однобічного дисперсійного аналізу ANOVA і статистичних критеріїв порівняння середніх значень із 95% довірчим інтервалом.

МІКОСОРБ 1 кг/т		Співвідношення МІКОСОРБ/ речовина, що заважає (мас/мас)		
		+ 50 %	+ 100 %	+ 200 %
Дисперсійний аналіз ANOVA		Непараметричний однобічний аналіз Краскела-Уоллісу		
Винні дріжджі	Холостий зразок (тільки корм)			
	N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,3533	0,3396	0,3490
	Середній ранг	41,75 <sup>B</sup>	29,90 <sup>B</sup>	37,85 <sup>B</sup>
	$\sigma_{intra}$	0,0240	0,0205	0,0261
	% CV <sub>intra</sub>	6,7991	6,0454	7,4902
	Контроль			
	N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,6223	0,5566	0,5846
	Середній ранг	169,90 <sup>A</sup>	117,38 <sup>A</sup>	135,13 <sup>A</sup>
	$\sigma_{intra}$	0,0534	0,0546	0,0413
	% CV <sub>intra</sub>	8,5726	9,8003	7,0725
	Контроль + дріжджі Red Star®			
	N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,5977	0,6098	0,5950
	Середній ранг	145,65 <sup>A</sup>	156,17 <sup>A</sup>	142,79 <sup>A</sup>
	$\sigma_{intra}$	0,0257	0,0253	0,0274
	% CV <sub>intra</sub>	4,2986	4,1468	4,6038
	Середнє розходження (OD <sub>450</sub> )	-0,0246	0,0532	0,0104
	Середній ранг розходження	-24,25	38,79	7,66
	Критичне значення Z	3,197		
	Критичне значення для порівняння	57,68		

**Таблиця 44.** Середні значення OD<sub>450</sub>, отримані для продукту МІКОСОРБ при змішуванні з 0, 50, 100, 200% (мас/мас) сухої барди в кормі для курей. Розходження між значеннями аналізували за середнім значенням у ході однобічного дисперсійного аналізу ANOVA і статистичних критеріїв порівняння середніх значень із 95% довірчим інтервалом.

МІКОСОРБ 1 кг/т		Співвідношення МІКОСОРБ/ речовина, що заважає (мас/мас)		
		+ 50 %	+ 100 %	+ 200 %
Дисперсійний аналіз ANOVA		Непараметричний однобічний аналіз Краскела-Уолліса		
суха барда	Холостий зразок (тільки корм)			
	N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,3504 38,81 <sup>C</sup>	0,3465 35,85 <sup>C</sup>	0,3458 34,83 <sup>C</sup>
	Середній ранг	0,0464	0,0515	0,0510
	$\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	13,228	14,858	14,744
	Контроль			
	N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,8338 151,46 <sup>AB</sup>	0,7825 108,19 <sup>B</sup>	0,7793 129,58 <sup>AB</sup>
	Середній ранг	0,0411	0,0240	0,0934
	$\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	4,9341	3,0669	11,990
суха барда	Контроль + суха барда			
	N	24	24	24
	Середнє значення (OD <sub>450</sub> )	0,8476 162,73 <sup>AB</sup>	0,8136 134,40 <sup>AB</sup>	0,8741 180,65 <sup>A</sup>
	Середній ранг	0,0382	0,0489	0,0465
	$\sigma_{intra}$ % CV <sub>intra</sub>	4,5019	6,0098	5,3191
	Розходження	0,0138 11,27	0,0311 26,21	0,0948 51,07
	Критичне значення	3,197		
	$\sigma$ для порівняння	57,68		

Всі публікації й патенти, згадані у вищенаведеному описі, включені в даний документ за допомогою посилань. Різні модифікації й зміни описаного способу й системи відповідно до винаходу, що перебувають у рамках даного винаходу, очевидні для фахівців у даній області. Хоча даний винахід описаний стосовно до конкретних кращих варіантів реалізації, варто розуміти, що даний винахід не повинен надмірно обмежуватися такими конкретними варіантами реалізації. Фактично, різні модифікації описаних способів здійснення винаходу, очевидні для фахівців в області хімії вуглеводів, мікробіології, кормів і харчування для тварин, імунології або суміжних областей, варто розглядати як ті, що перебувають у рамках наступної формули винаходу.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб виявлення компонентів клітинної стінки дріжджів у зразку, що включає:
  - забезпечення зразка;
  - обробку зразка первинним антитілом, здатним зв'язуватися з антигеном, вибраним з групи, що складається з (1→4)- $\alpha$ -D-глюкану, (1→6)- $\beta$ -D-глюкану та (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-глюкану, тим самим утворюючи комплекс первинне антитіло-антиген; і
  - визначення ступеня зв'язування первинного антитіла й антигену за допомогою вторинного антитіла.
2. Спосіб за п. 1, у якому зразок витягнутий з субстанції, вибраної з групи, що складається з корму для худоби, корму для свійських тварин, кормів, повної кормової суміші (TMR), фуражу, кормових гранул, кормового концентрату, кормової суміші побічних продуктів, зерна, барди,

патоки, клітковини, грубих кормів, трави, сіна, ядер горіхів, листя, борошна, розчинного корму, кормової добавки і проміжних продуктів їх виробництва.

3. Спосіб за п. 2, у якому витягання зразка досягається шляхом екстракції субстанції з одержанням зразку, причому екстракцію виконують з використанням етапу, вибраного з групи, що складається з кислотної екстракції, лужної екстракції, екстракції органічною сполукою, фізичної обробки та їх комбінації.

4. Спосіб за п. 3, у якому екстракцію виконують з використанням органічного розчинника і кислоти або з використанням диметилсульфоксиду і соляної кислоти.

5. Спосіб за п. 3, у якому етап екстракції додатково включає інкубування при температурі вище кімнатної температури.

6. Спосіб за п. 1, у якому визначення ступеня зв'язування первинного антитіла й антигену виконують з використанням вторинного антитіла, кон'югованого з речовиною, вибраною з групи, що складається з ферменту, флуорогенного матеріалу, хромогенного матеріалу та ізотопу з радіоактивною міткою.

7. Спосіб за п. 1, у якому зразок іммобілізований на твердому носії.

8. Спосіб за п. 1, у якому виявлення зв'язування первинного антитіла й антигену здійснюють шляхом визначення рівня сигналу, що відповідає присутності вторинного антитіла, зв'язаного з комплексом первинне антитіло-антиген у зразку.

9. Спосіб за п. 8, у якому сигнал вибраний з групи, що складається з хромогенного сигналу, флуоресцентного сигналу, молекули, що виявляється за розміром, молекули, що виявляється за поглинанням світла, радіації та ізотопного сигналу.

10. Імуногенна композиція, що включає  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-глюкан}$ , ковалентно зв'язаний з білком.

11. Застосування імуногенної композиції за п. 10 у способі одержання антитіла специфічного для клітинної стінки дріжджів.

12. Композиція, що включає антитіло зі специфічністю до вуглеводу клітинної стінки дріжджів, вибраного з групи, що складається з  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-глюкану}$ ,  $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-глюкану}$  та  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-глюкану}$ .

13. Набір для виявлення клітинної стінки дріжджів у зразку, що включає:

- реагенти для етапу екстракції, де етап екстракції приводить до вивільнення вуглеводу клітинної стінки дріжджів, вибраного з групи, що складається з  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-глюкану}$ ,  $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-глюкану}$  та  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-(1}\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-глюкану}$ ; і

- первинне антитіло зі специфічністю до вуглеводу клітинної стінки дріжджів, екстрагованого на етапі екстракції, тим самим утворюючи комплекс первинне антитіло-антиген; і

- вторинне антитіло, здатне приєднуватися до комплексу первинне антитіло-антиген, тим самим утворюючи комплекс первинне антитіло-антиген-вторинне антитіло.

Фіг. 1

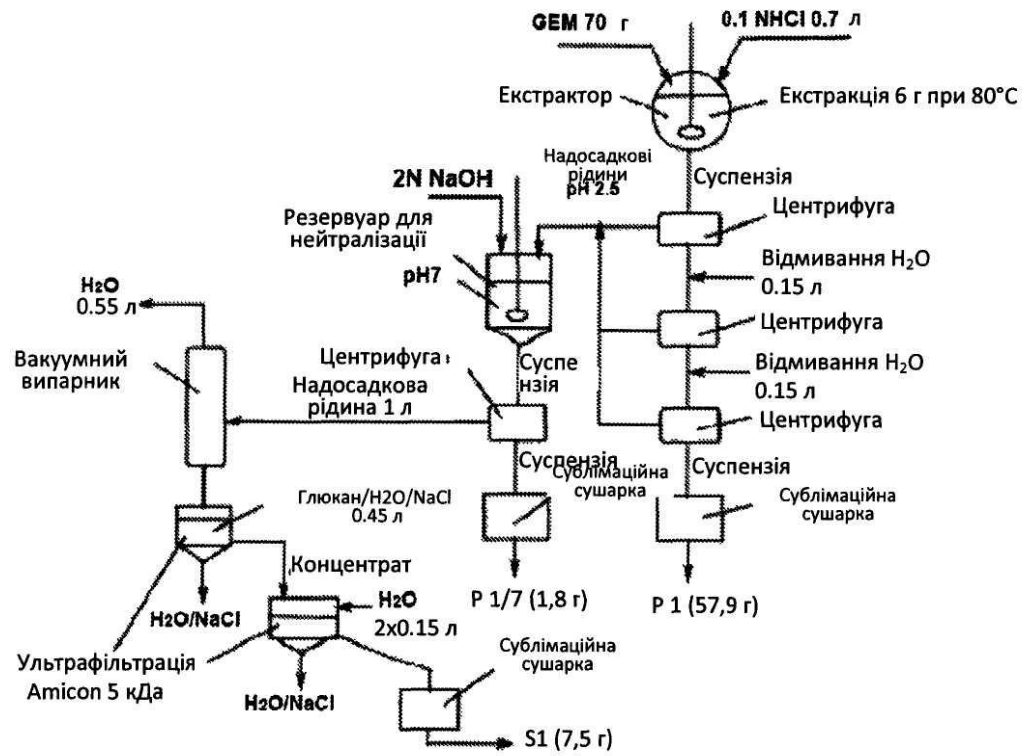
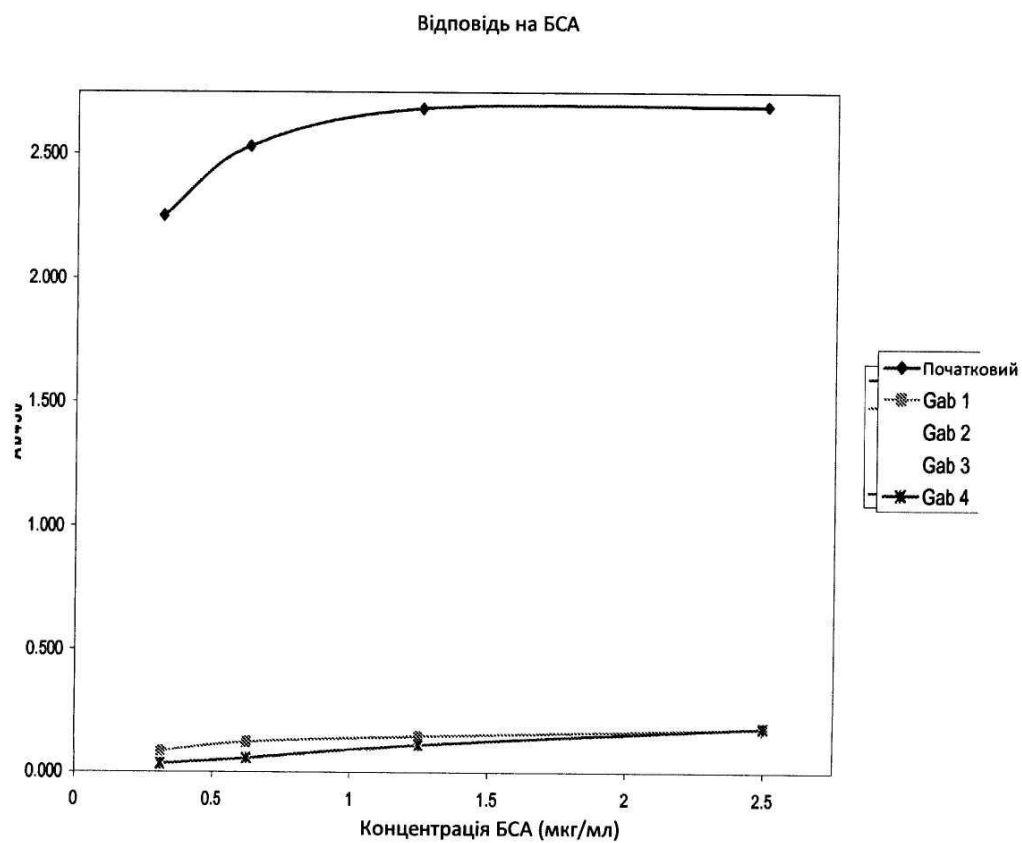
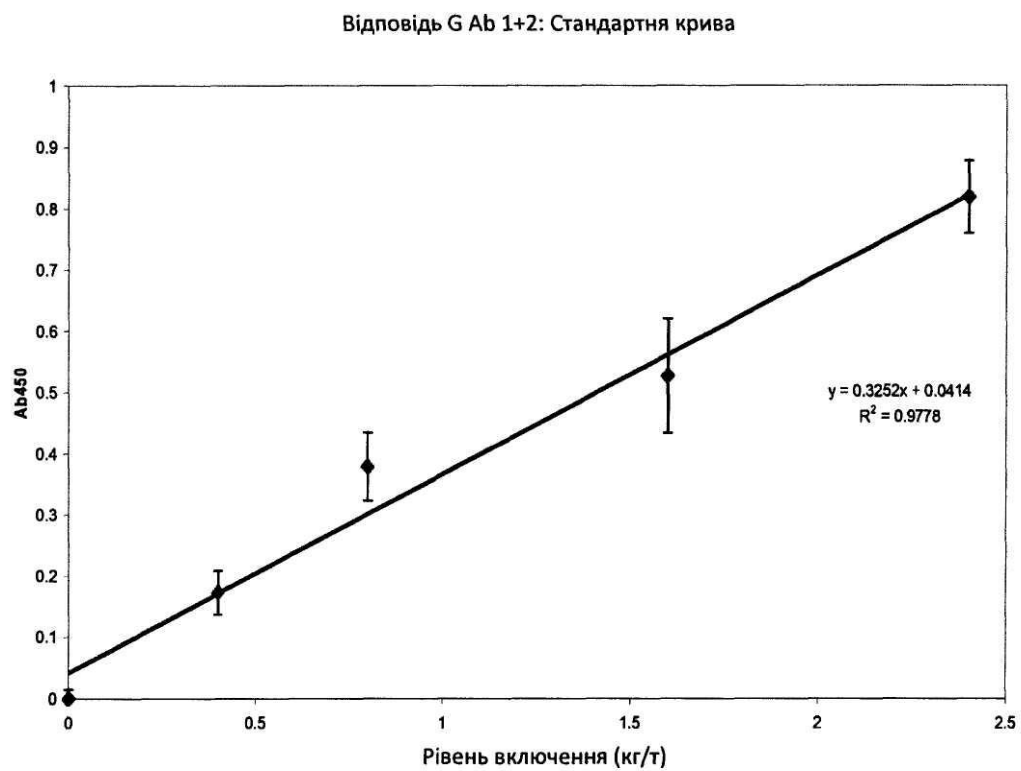


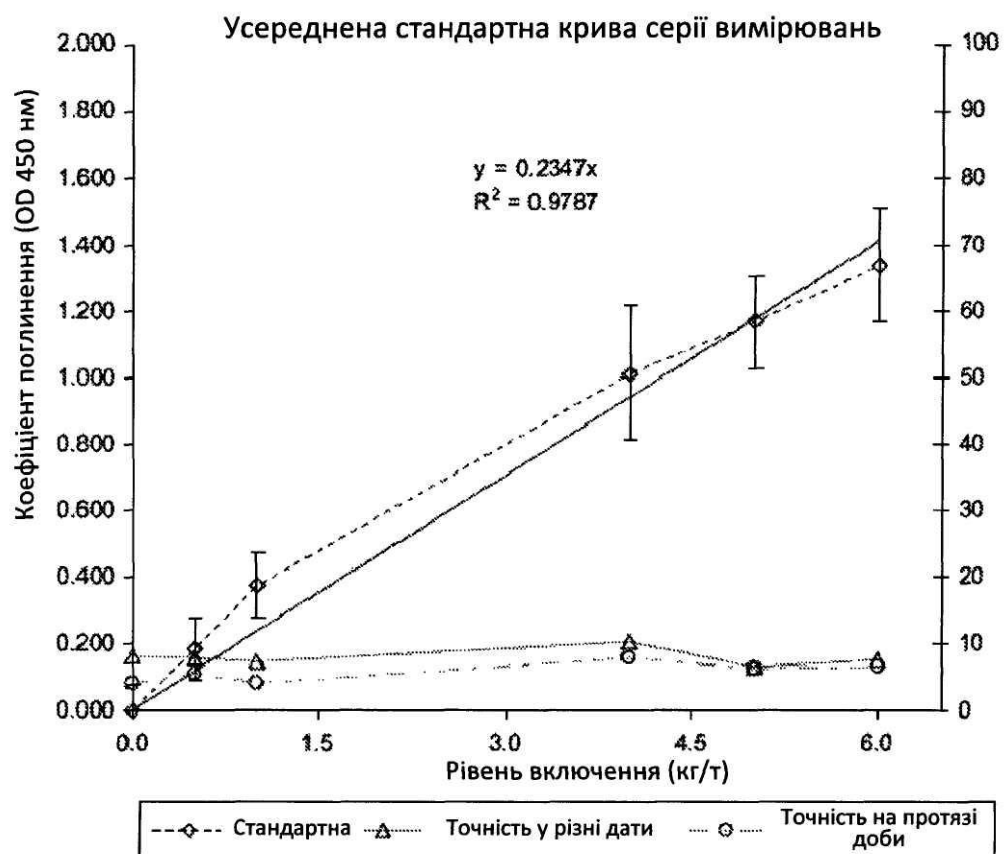
Fig. 2



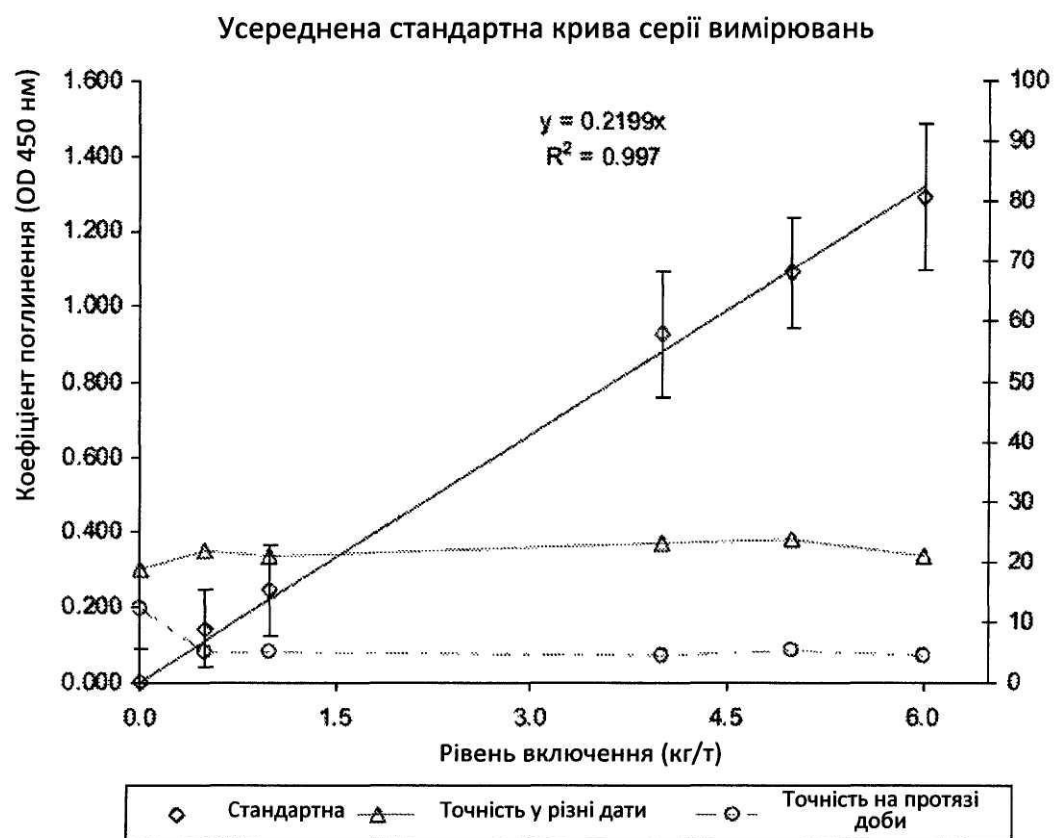
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5





Фіг. 6

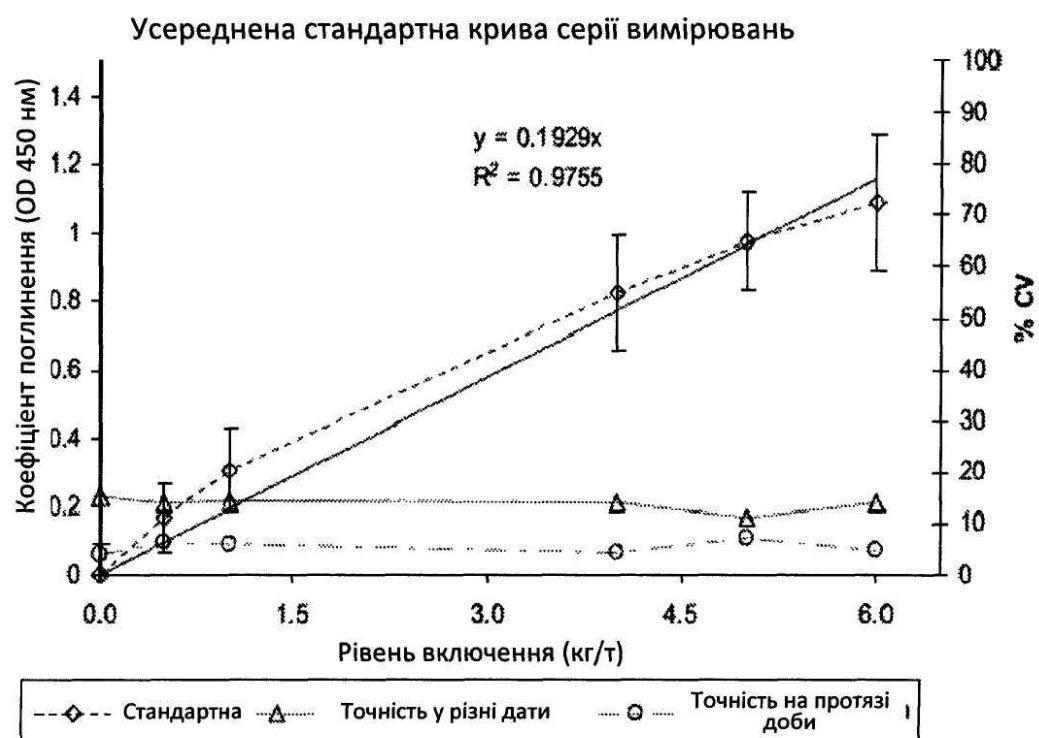
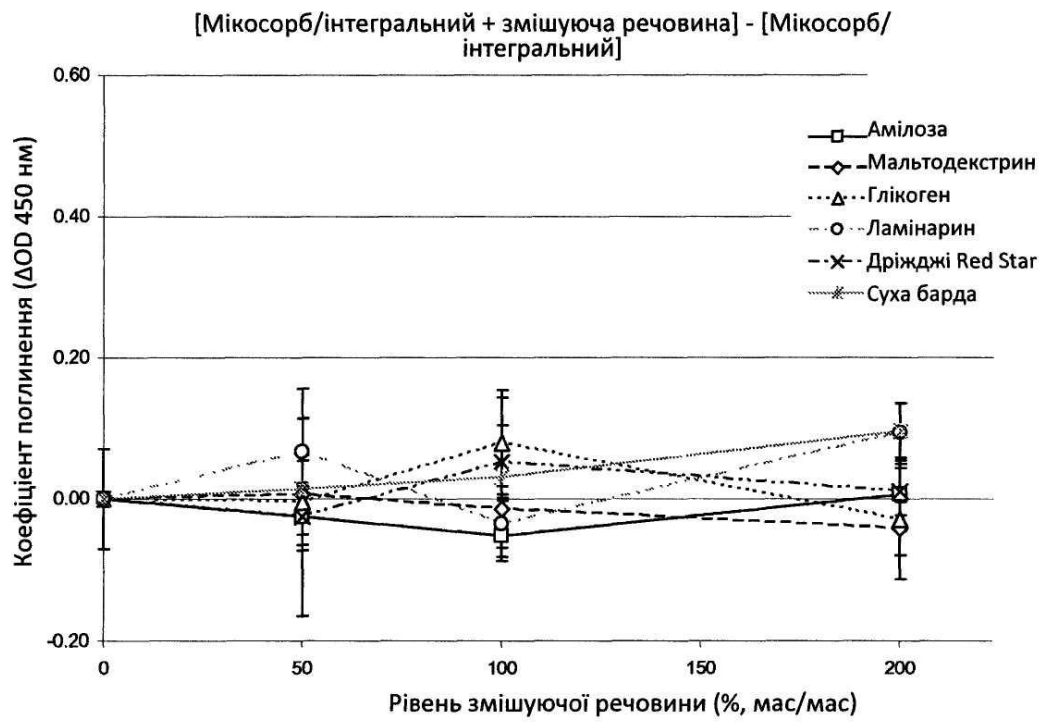


Fig. 7



Фіг. 8

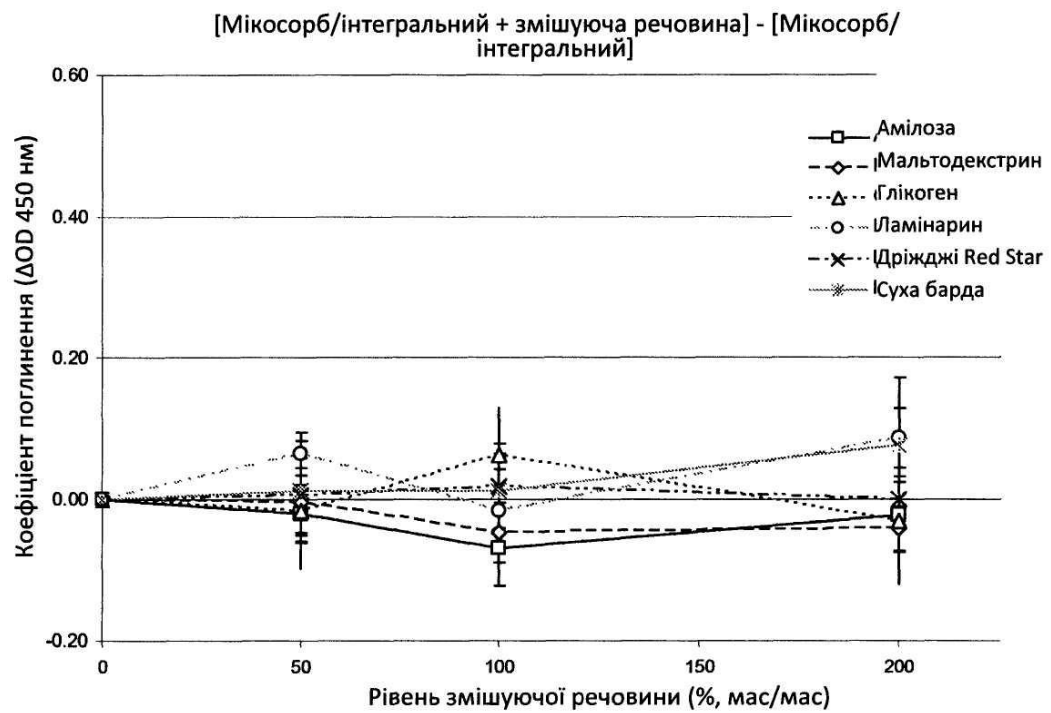
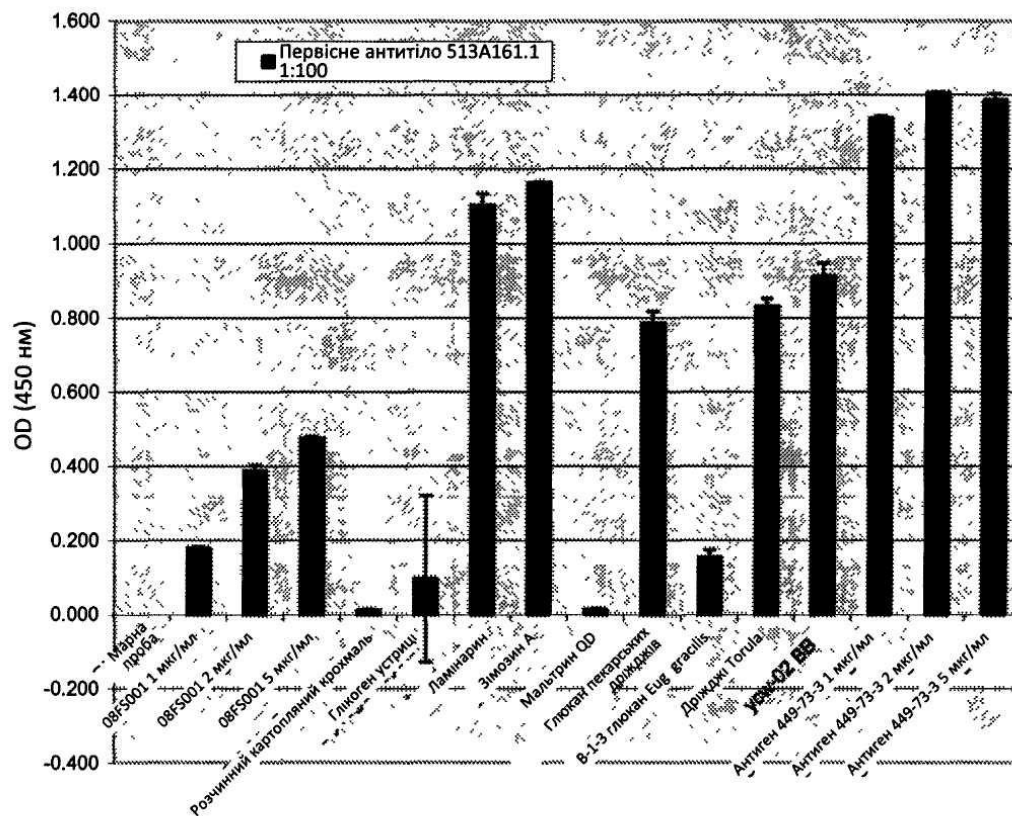
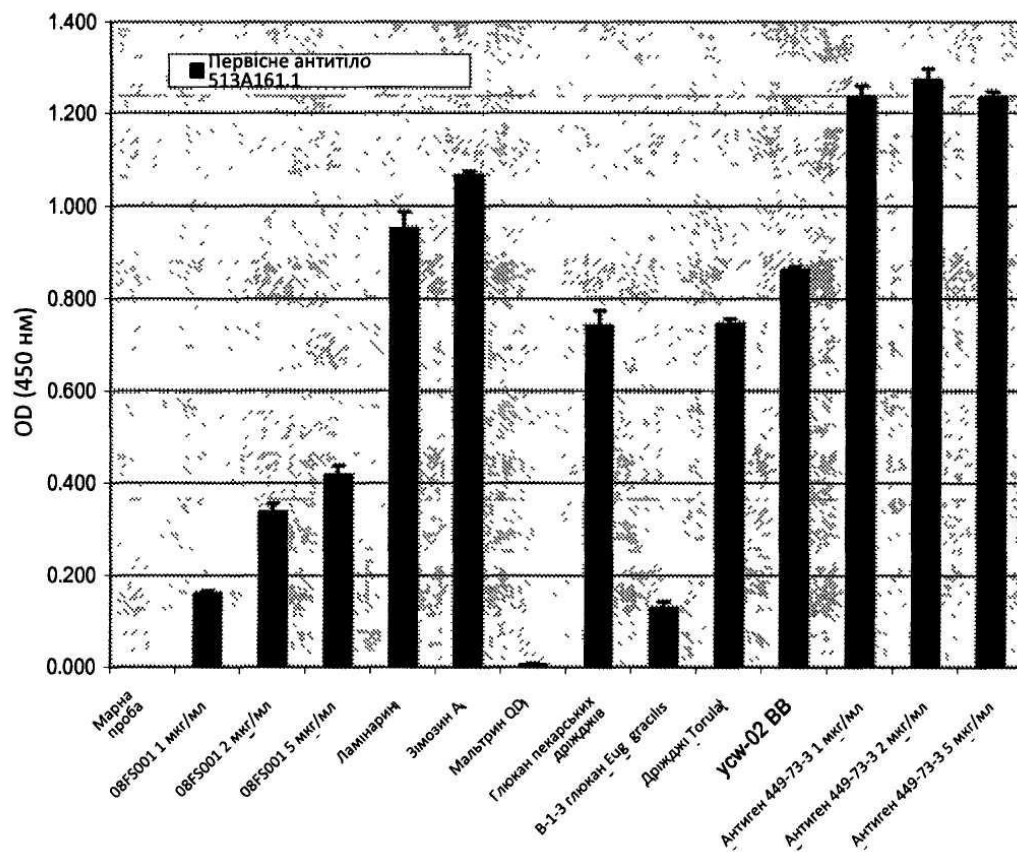


Fig. 9



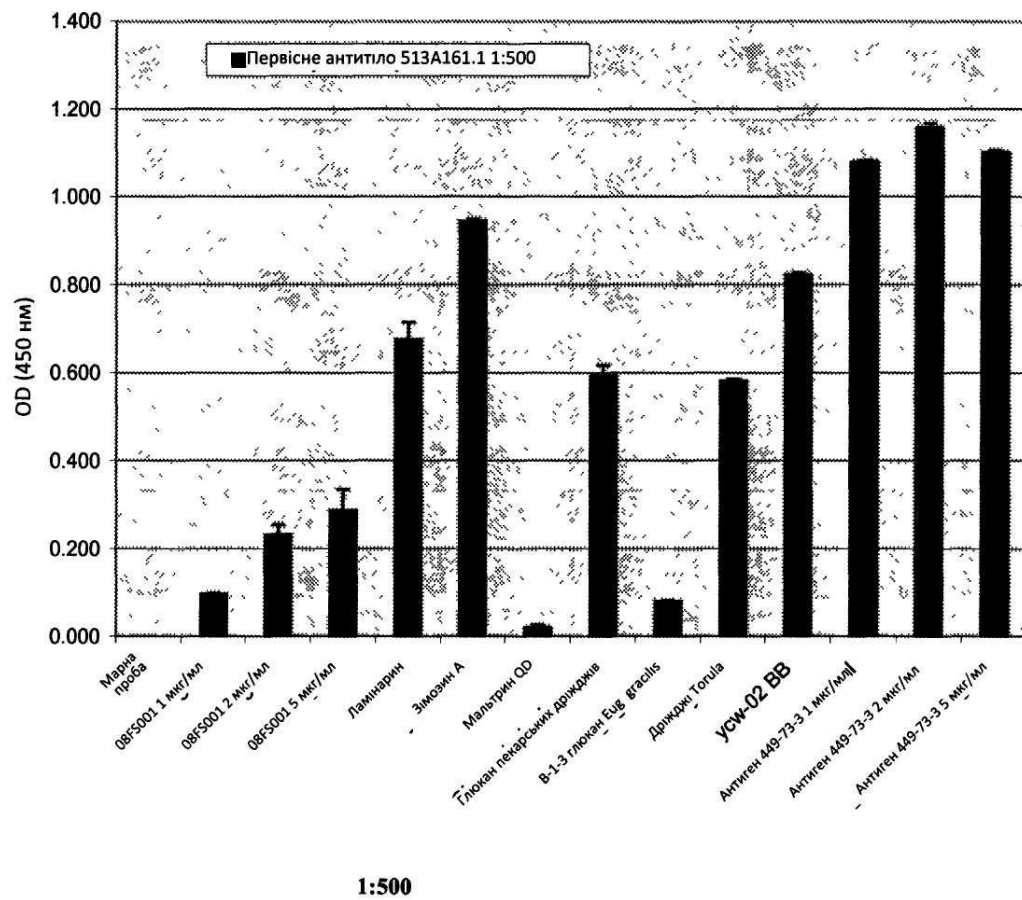
1:100

Фіг. 9 (продовження)



1:200

Fig. 10



Фіг. 10 (продовження)

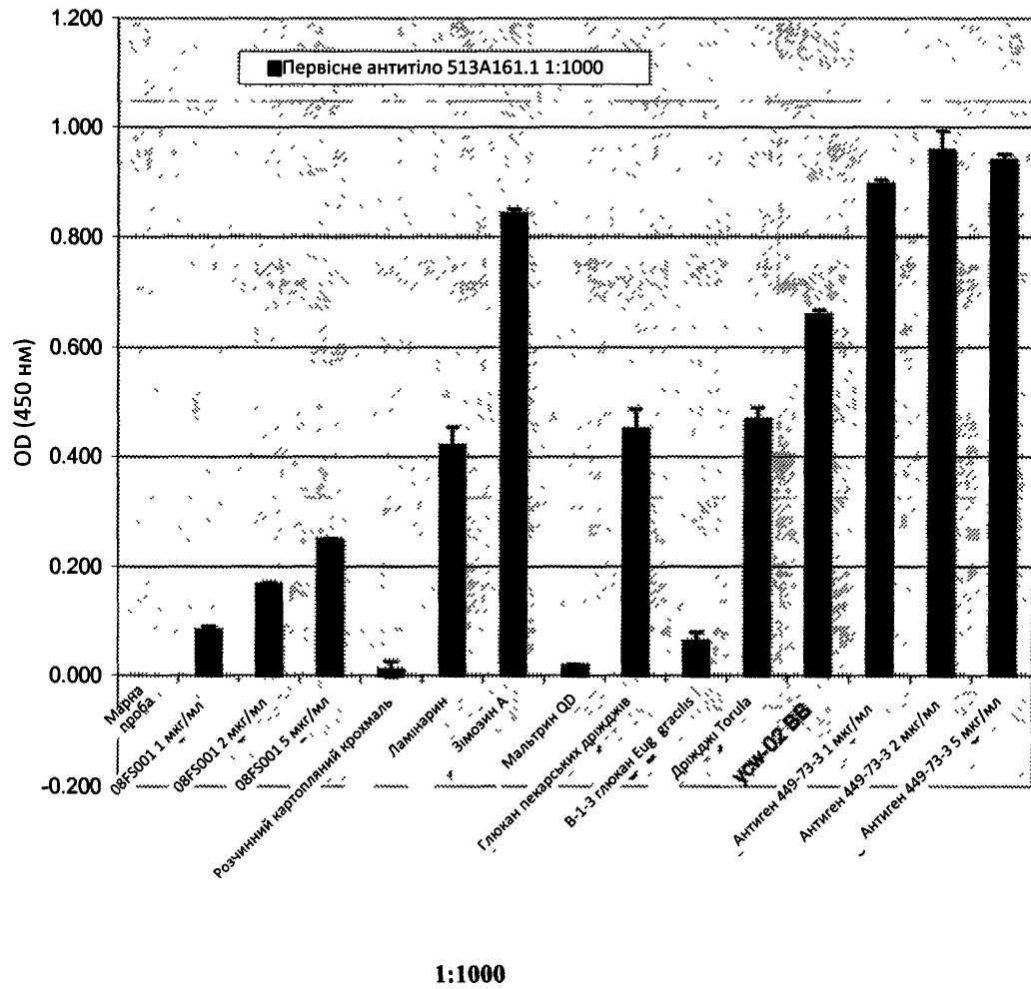
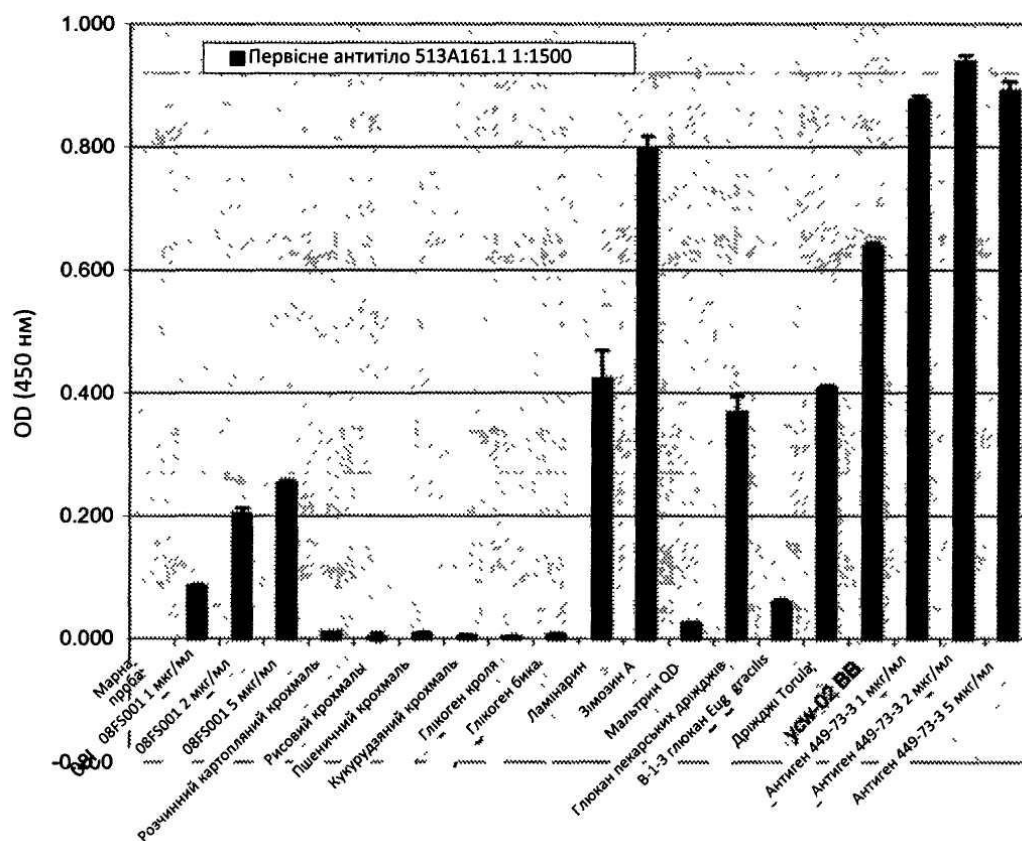


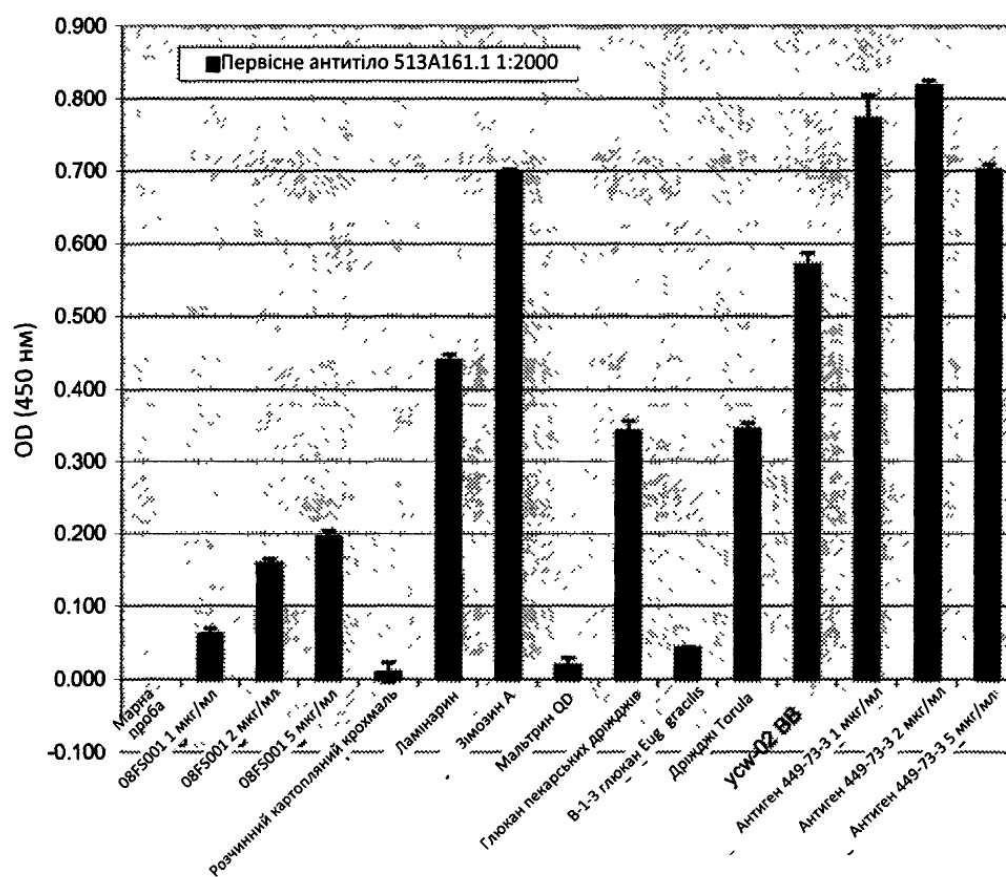
Fig. 11



1:1500

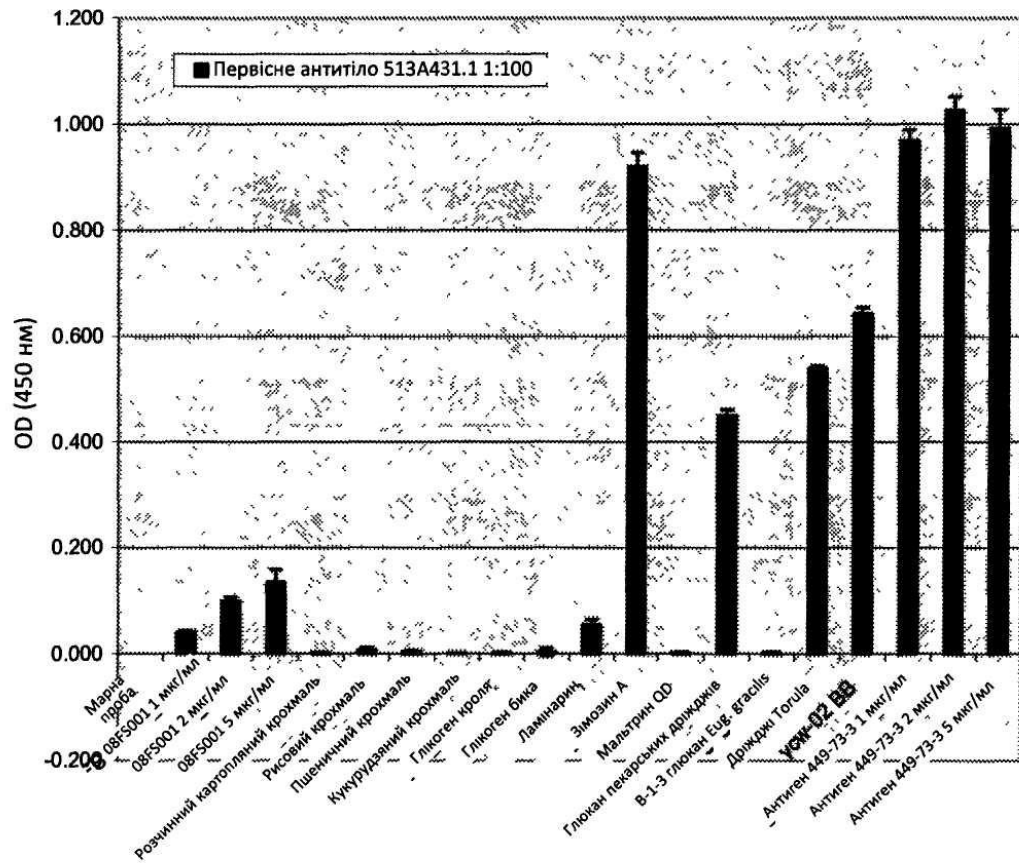


Фіг. 11 (продовження)



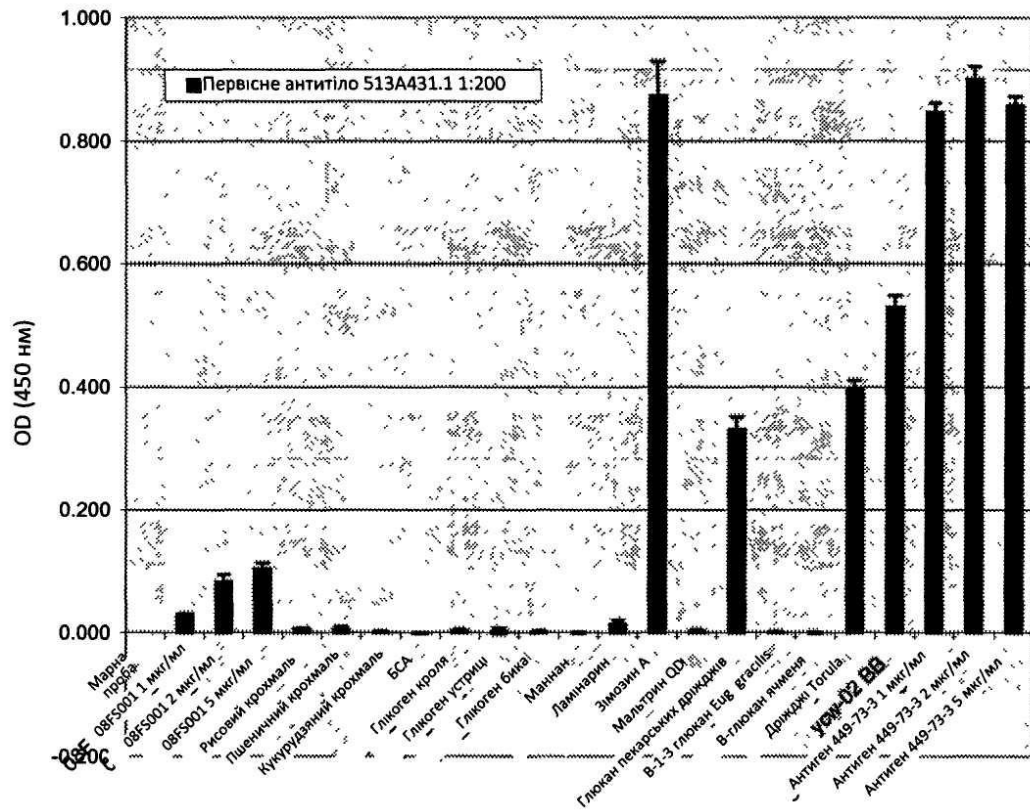
1:2000

Фіг. 12



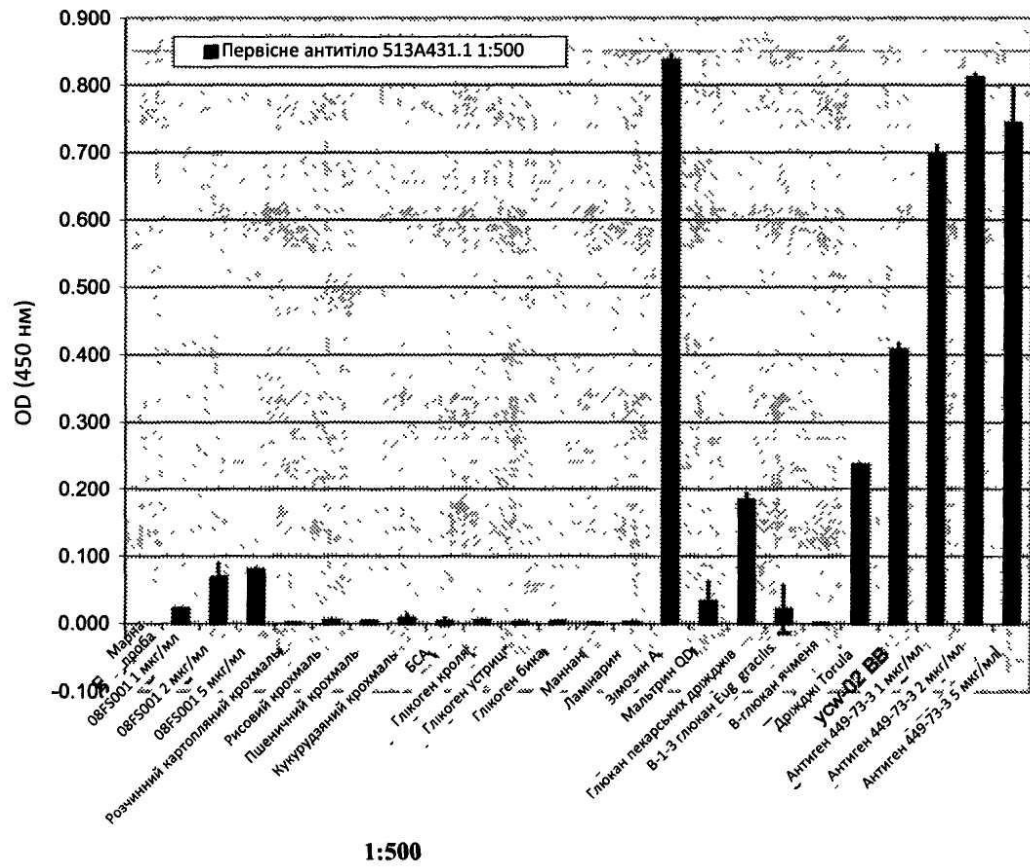
1:100

Фіг. 12 (продовження)

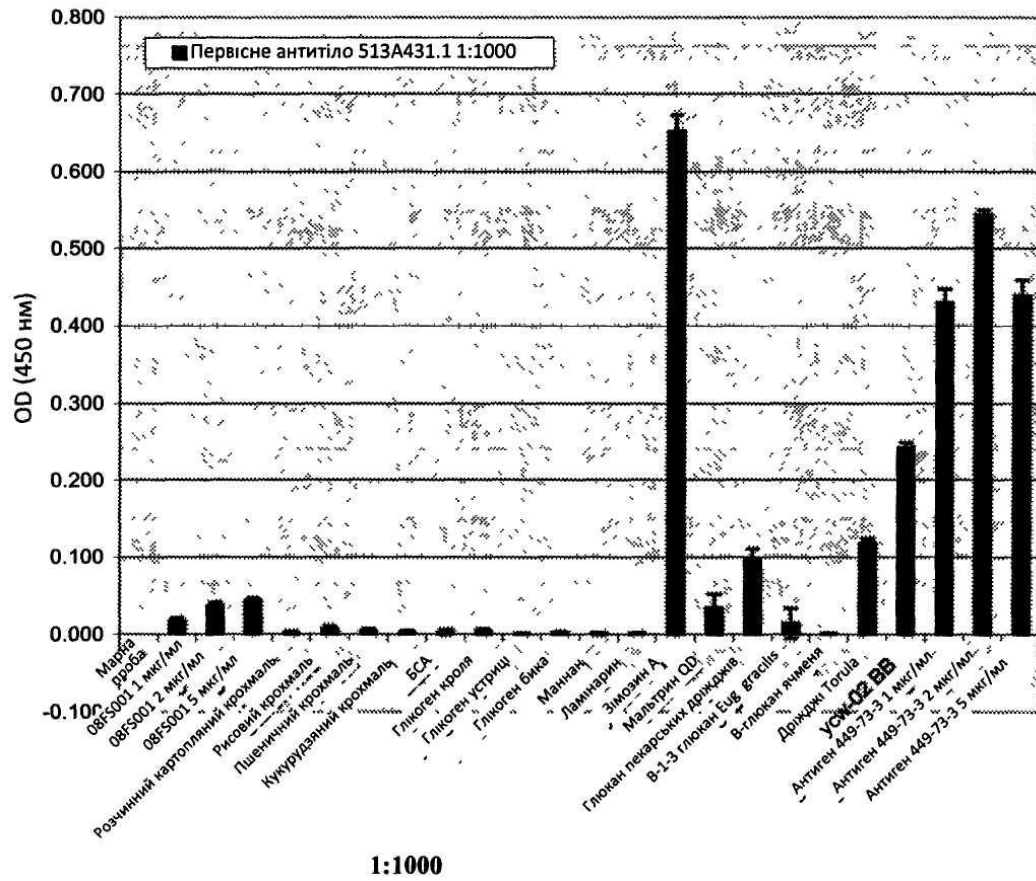


1:200

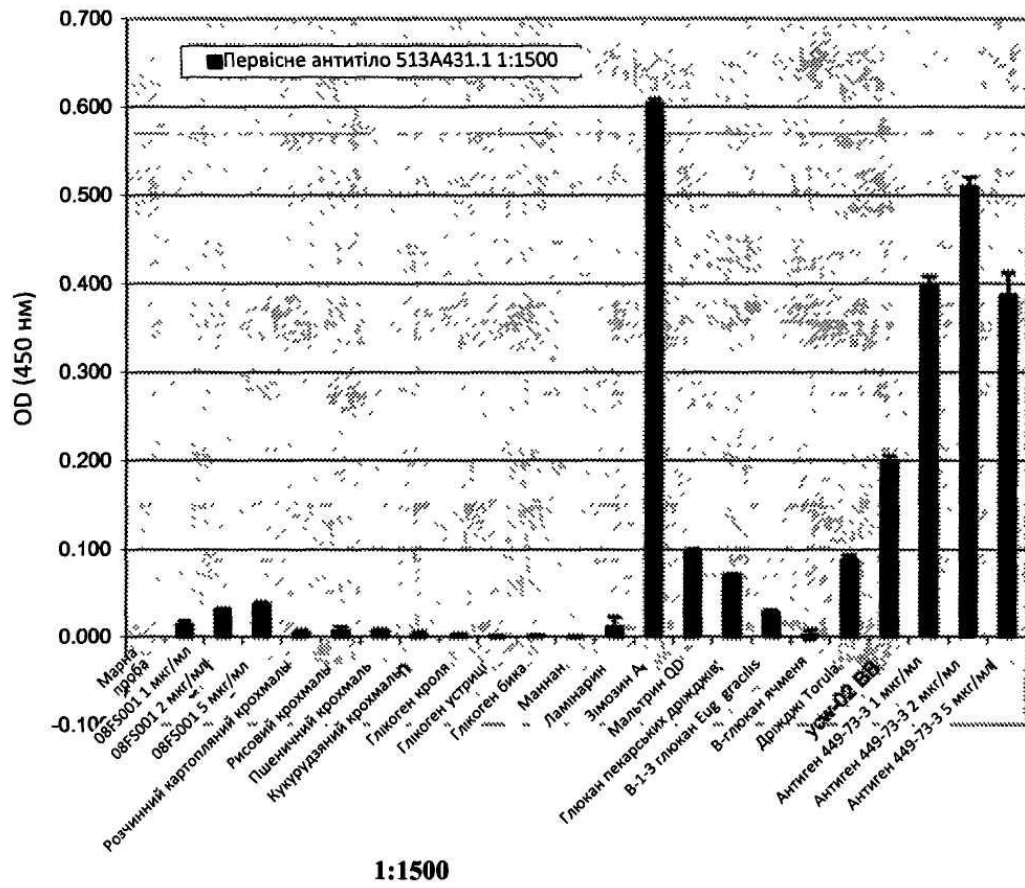
Fig. 13



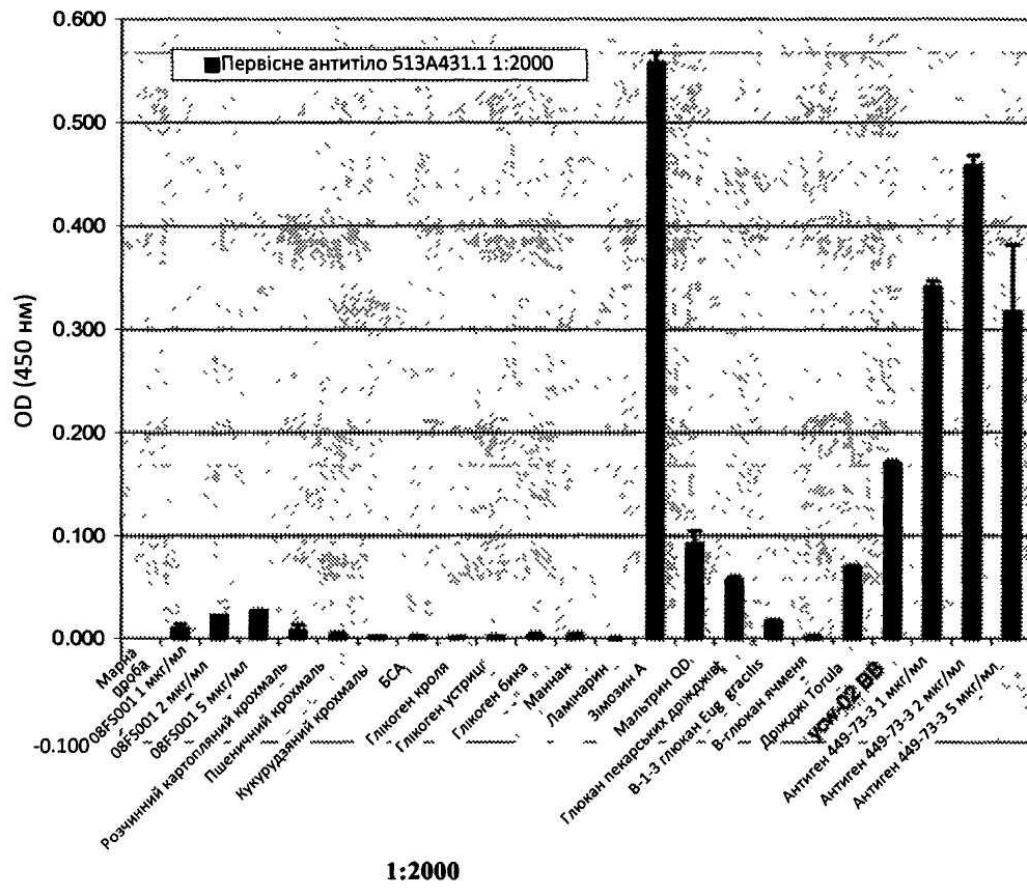
Фіг. 13 (продовження)



Фіг. 14



Фіг. 14 (продовження)



Фіг. 15

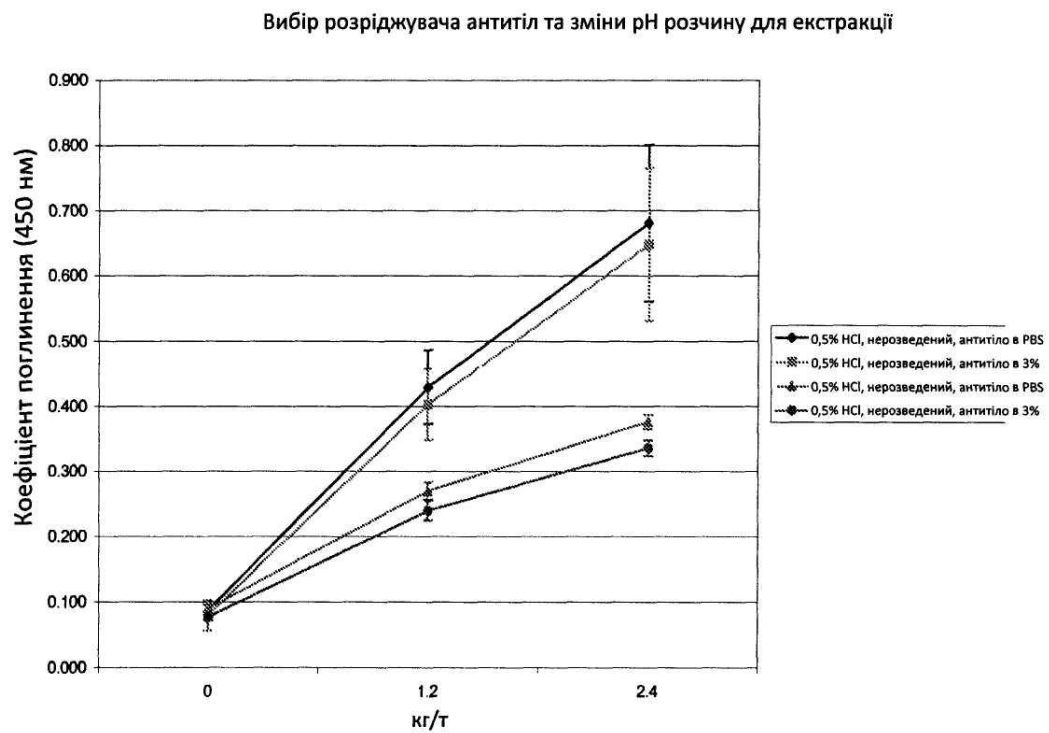
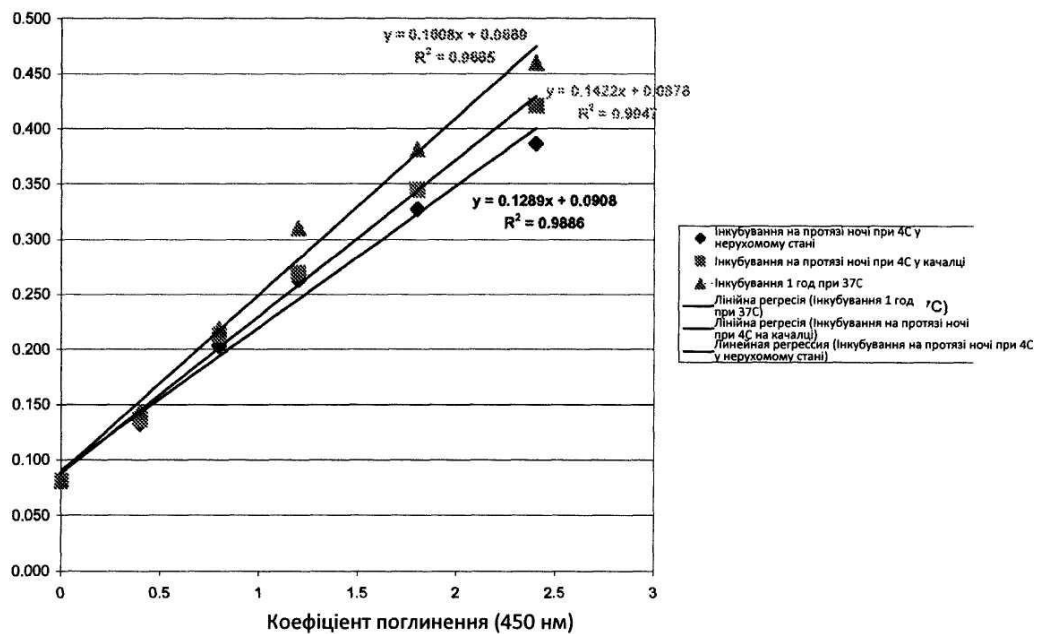




Fig. 16

## Оптимізація часу покриття та температури інкубування



Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601