

DETERMINATION OF THE EFFECT OF TREATMENT WITH UV IRRADIATION AND OZONATION  
ON THE DEGREE OF CONTAMINATION OF THE MYCOBIOTA OF THE EGG SURFACES  
AND THE CONVEYOR BELT FOR COLLECTION IN THE POULTRY HOUSE

**Breslavets V. O., Yaroshenko M. O.**

*NSC "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine*

**Pavlichenko O. V., Stegny O. O.**

*Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine*

**Marchuk I. V.**

*OJSC "Kurgan Broiler", branch "Golden Cross"*

*The use of ozone and UV irradiation in the poultry house for the primary de-processing of the shell surface and the conveyor belt for collecting eggs contributes simultaneously to a decrease in the level of bacterial contamination (the surface of the shell is 10–15 times or 90 %, of air in the area of the apparatus – almost 10 times. The surface of the tape to collect eggs after passing through the whole house – twice), and increase the degree of mycological load of these surfaces by almost 1.5 times.*

**Keywords:** *poultry house, disinfection, ozone, UV-irradiation, hatching eggs, conveyor belt, mold micromycetes, degree of contamination*

УДК:619:616.98:578.828.11:620.6:576.535:633.22/.28

ВПЛИВ АКТОВЕГІНУ НА МОРФОЛОГІЮ КУЛЬТУРИ  
КЛІТИН ТА ЕКСПРЕСІЮ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ

**Горбатенко С. К., Кузнецова О. В., Мягких Н. В., Зданевич П. П.**

*Науковий научний центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua*

*Додавання до поживного середовища 0.14 % актовегіну позитивно впливає на адгезивні властивості клітин культури FLK-BLV, пролонгує у порівнянні з контролем термін їх функціональної активності. Активність отриманої експериментальної серії лейкозного антигену, виготовленого на стимульованому поживному середовищі, у 1,9 разів вища у порівнянні із контрольним зразком.*

**Ключові слова:** *антиген, біологічний стимулятор, живильне середовище, культура клітин, лейкоз ВРХ*

Завдання по обмеженню епізоотії чи ерадикації інфекційного захворювання неодмінно пов'язане з необхідністю використання надійного діагностичного засобу, призначеного для своєчасного виявлення та ізоляції із загального стада інфікованих тварин, як основного джерела збудника інфекції. У сучасних умовах на рівні виробничого впровадження для індикації інфікованих вірусом лейкозу тварин розроблені два серологічні методи: реакція імунодифузії в агаровому гелі (РІД) та метод імуноферментного аналізу (ІФА) [1]. Реакція імунодифузії у системі протилейкозних заходів має за тридцятирічний термін використання після впровадження у 80-ті роки минулого сторіччя. У переважній більшості державних лабораторій ветеринарної медицини обласних та районних рівнів України серологічна диспансеризація поголів'я великої рогатої худоби на лейкоз проводиться саме з використання РІД у агаровому гелі. Завдяки високій специфічності та невибагливості при використанні метод застосовується в діагностичній практиці більшості країн світу, хоч йому і властивий відносно невисокий поріг чутливості, що обумовлює реєстрацію процесу сероконверсії у інфікованих вірусом лейкозу тварин на 2–3 тижні пізніше у порівнянні з результативністю використання ІФА [2]. У зв'язку з цим нагальним є проблема удосконалення тест-системи, що використовується в РІД, у напрямку пониження ролі вищезначеного недоліку стосовно порогу чутливості [3]. Цього можна досягти оптимізацією складу поживного середовища – продуцента вірусної маси для подальшого напрацювання лейкозного антигену [7, 8].

У значній мірі від активності антигену залежить чутливість діагностичного тесту, спроможність забезпечувати індикацію інфікованих тварин не лише на рівні розвиненої сероконверсії, яка пов'язана з активним проявом інфекційного процесу, а й на рівні сумнівної чи слабо позитивної реакції, що свідчить, як правило, про розвиток перших етапів захворювання. Саме видалення із стада інфікованих тварин на початковій стадії розвитку інфекційного процесу обумовлює позитивний вплив у забезпеченні оздоровчих протилейкозних заходів [2].

За аналізом літературних повідомлень оптимізація поживного середовища може забезпечуватись введенням до його складу деяких біологічних та хімічних інгредієнтів. У своїх дослідженнях ми використали біологічний компонент, а саме актовегін. Останній є фармакопейним препаратом біологічного походження, отриманим методом ультрафільтрації із дефібрінованої крові молочних телят, підданої гемолізу. Актовегін позитивно впливає на процеси метаболізму клітин, а саме: підсилює транспорт глюкози до клітини та покращує поглинання кисню завдяки прямій активації в її мембрані глікопротеїдної фракції (ІФО).

**Матеріали та методи.** Клітини перещеплюваної культури FLK-BLV вирощували за загальноживаними методиками, а саме: засів клітин проводили у стерильні флакони об'ємом 50 – 100 см<sup>3</sup> та бактеріологічні пробірки з покривними скельцями з концентрацією 100 – 300x10<sup>3</sup> клітин/см<sup>3</sup> поживного середовища, яке складалось з 45 % середовища Ігла, 45 % середовища 199, 10 % нативної сироватки ВРХ. Експериментальним шляхом було підібрано оптимальні режими перещеплення культури клітин FLK-BLV та склад модифікованого поживного середовища для забезпечення підвищення продукції антигенів ВЛВРХ.

З метою дослідження вірусстимулюючої дії актовегіну останній вводився у різних концентраціях до поживного середовища для культивування клітин FLK-BLV. Кінцеві досліджувані концентрації актовегіну у поживному середовищі склали 0,12; 0,14; 0,16 % від вмісту ростового середовища. З метою адаптації клітин культури до експериментальних ростових середовищ було проведено 4 сліпих пасажі, з метою поетапної заміни стандартного ростового середовища на модифіковане з вмістом актовегіну за схемою: 1 пасаж – 25 %, другий – 50 %, третій – 75 % і лише на 4-му пасажі була виконана повна заміна на дослідне ростове середовище. Пересів культури виконували по мірі виповнення моношару.

Адгезивну та проліферативну активність стимульованої культури клітин FLK-BLV оцінювали на кожному пасажі її росту; антигенпродукуючу дію визначали після адаптаційного періоду (5 пасажів). Адгезивну дію та токсичний вплив стимулюючого препарату визначали по здібності прилипання клітин до субстрату, їх розпластанню, утворенню колоній, формуванню, ущільненню та збереженню моношару. Оцінку впливу актовегіну на морфологічні властивості, життєздатність клітин, швидкість виконання моношару культури FLK-BLV проводили мікроскопією моношару, а також зафіксованих та забарвлених клітин FLK-BLV, що вирощували на покривних скельцях, щоденно в динаміці пасажування з додаванням різних концентрацій препарату. Контролем виступала культура клітин, що вирощувалась без додавання актовегіну.

Ростові якості дослідних середовищ визначали шляхом підрахунку індексу проліферації (відношення кількості вирощених клітин до чисельності засіяних), підрахованих в камері Горяєва на 4 добу росту культури.

Для дослідження віруспродукуючих властивостей культури клітин FLK-BLV передбачалось отримання експериментальних та контрольних зразків антигенів ВЛ ВРХ для реакції імунодифузії з культуральною рідиною, зібраною з кожного 5 пасажу. Для цього культуральну рідину клітин FLK-BLV було освітлено шляхом низькошвидкісного центрифугування з послідовним концентруванням до 1/100 від первинного об'єму методом форсованого діалізу проти ПЕГ 6000. Сконцентрований у такий спосіб антиген було ресуспендовано у забуференому фосфатно-сольовому фізіологічному розчині, рН 7,0 – 7,2. Отриманий кінцевий продукт піддано тестуванню на специфічність та активність в РІД методом граничних розведень з використанням контрольних позитивної та негативної діагностичних сироваток проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби.

**Результати досліджень.** У залежності від об'єму доданого до поживного середовища для культивування перещеплюваної культури клітин FLK-BLV актовегіну сформовано три дослідні групи, де співвідношення препарату становило від 0.12 % до 0.16 %, та одну контрольну, без додавання стимулятора. Вплив актовегіну на адгезивні властивості клітин культури та прикріплення їх до скла визначали по виповненню цільного моношару.

Процес формування моношару клітин культури FLK-BLV під впливом актовегіну та без додавання останнього на рівні 5-го пасажу відображено в таблиці 1.

**Таблиця 1** – Формування та збереження моношару культури клітин FLK-BLV дослідних і контрольних зразків на рівні 5-го пасажу

Прикріплення та збереження моношару клітин FLK-BLV								
Назва групи	1 доба	2 доба	3 доба	4 доба	5 доба	6 доба	7 доба	Кратність поділу клітин при пасажуванні
K1	-	85%	100	100	95	70	45	1×1
A1(0.12 %)	65	100	100	100	100	100	85	1×3
A2(0.14 %)	90	100	100	100	100	100	100	1×3(×4)
A3(0.16 %)	70	100	100	100	100	100	100	1×3

Примітка: кратність поділу клітин визначали від числа збережених типових молодих клітин моношару, здібних до проліферації

З таблиці 1 видно, що додавання актовегіну у співвідношеннях від 0.12 % до 0.16 % не чинило негативного впливу на клітини культури. Клітини моношару добре прикріплювалися до стінок культурального посуду, розпластовувалися і впродовж першої доби формували моношар на 95 – 100 % (на відміну від контрольних груп, де цей процес відстрочувався на 1,5 – 2 доби, а його руйнування спостерігалось на 2–3 доби раніше). Варто відзначити, що найбільш позитивний вплив на формування моношару спостерігався у групі, де додавали актовегін у співвідношенні 0.14 % від об'єму ростового середовища. У останньому випадку формування моношару було більш активним вже на першу добу спостережень у п'ятому пасажі, а кратність поділу клітин при черговому пасажі, на відміну від інших двох дослідних груп, забезпечувалась на рівні 1x3 (x4).

Вивчаючи морфологію клітин культури FLK-BLV дослідних і контрольних зразків на рівні 5 пасажу, особливу увагу звертали на їхню спроможність до активної проліферації, тривалості продуктивного стану клітин моношару, форму, розміри клітин по мірі виповнення моношару, наявність вакуолей та включень. Особливості морфології клітин наведені у таблиці 2.

**Таблиця 2 – Морфологія клітин культури FLK-BLV дослідних і контрольних зразків на прикладі 5-го пасажу**

Гр.	доба1	2 доба	3 доба	4 доба	5 доба	6 доба	7 доба
K1	завись клітин	кл. типові, окремими островками	кл. ущільнені, є зони росту	кл. типові з активними зонами росту	напластування, 30 % округлих, вакуолі	напластування, 45 % округлих, вакуолі	перещеплення 1x1
A1	кл. витягнуті типові	кл. типові, щільно прилягають, є зони росту	типові з активними зонами росту	типові з активними зонами росту	ущільнені з активними зонами росту	типові з активними зонами росту	перещеплення 1x3
A2	кл. витягнуті, типові	кл. типові, щільно прилягають, є зони росту	щільні, типові з активними зонами росту	ущільнені з активними зонами росту	типові з зонами росту	ущільнені, типові з активними зонами росту	перещеплення 1x4
A3	кл. витягнуті, типові	кл. типові, щільно прилягають, є зони росту	щільні, типові з активними зонами росту	ущільнені з активними зонами росту	типові з зонами росту	типові з зонами росту	перещеплення 1x3

Як свідчать наведені у таблиці 2 матеріали, експериментально встановлено, що актовегін у всіх випробуваних концентраціях позитивно впливає на стан клітин моношару впродовж 5 пасажів досліді, продовжує вік їхньої функціональної активності, про що свідчить типова для даної культури витягнута форма клітин без включень та вакуолей, цілісність моношару та наявність зон росту. Їх висока функціональна активність зберігалась впродовж всього пасажу, на відміну від контрольних зразків, які лише перші 2–3 доби після перещеплення були активними щодо поділу клітин, у наступні терміни культивування клітини округлялись, старіли, спостерігались включення та вакуолізація в цитоплазмі, утворювались зони нашарування, що призводило до швидкого руйнування моношару.

Додавання до поживного середовища всіх дослідних доз актовегіну суттєво впливало на адгезію клітин до субстрату впродовж всього терміну експериментального культивування (10 пасажів). До кінця 1-ї доби кожного пасажу виповнювався суцільний прозорий моношар з типових клітин культури FLK-BLV, в контролі цей процес спостерігався наприкінці 2-ї доби. Для груп культури клітин FLK-BLV A-2, де додано 0.14 % актовегіну, щільність моношару була масивною настільки, що його диспергування лише розчином версену було недостатнім, тому використовували суміш 0,02 % версену (90 %) та 0,25 % розчину трипсину (10 %).

Вивчення проліферативної активності клітин культури FLK-BLV під впливом актовегіну оцінювали на 4 добу першого, п'ятого та десятого пасажів культивування, результати дослідів наведено в таблиці 3.

**Таблиця 3 – Оцінка проліферативної активності клітин культури FLK-BLV**

групи	Приріст клітин на 4 добу культивування (%)		
	1 пасаж	5 пасаж	10 пасаж
A1	16	24	26
A2	29	46	38
A3	15	18	21

Наведені у таблиці 3 дані свідчать, що додавання 0,14 % актовегіну максимально активізувало процес проліферації в культурі FLK-BLV, де приріст клітин складав на 1 пасажі – 29 %±2,5, на 5 – 46 %±3, на 10 – 38 %±2,8 при засівній концентрації клітин 100–300×10<sup>3</sup> кл/см<sup>3</sup>. Внесення 0,16 % актовегіну до поживного середовища суттєво не впливало на процес ділення клітин.

З метою отримання антигенів вірусмішучою рідиною була відібрана з 5 та 10 пасажів в об'ємі 1000 см<sup>3</sup>, перевірена на бактеріологічне та грибокве забруднення, піддана дефростації шляхом дворазового заморожування та розморожування, сконцентрована в плівці методом форсованого діалізу проти ПЕГ-6000 до 1/10 від початкового об'єму. Таким чином для визначення антигенпродукуючих властивостей експериментальної та контрольної культури клітин FLK-BLV з накопиченої культуральної рідини було виготовлено чотири культуральні антигени ВЛ ВРХ для РІД (три дослідні та один контрольний).

Останні було піддано тестуванню на специфічність та активність в РІД методом граничних розведень з використанням контрольних позитивної та негативної діагностичних сироваток. Порівняльні показники активності отриманих зразків антигенів наведено у таблиці 4.

**Таблиця 4 – Антигенна активність дослідних і контрольних зразків**

Група	5 пасаж		10 пасаж	
	Активність антигену в РІД	Вища активність від К у раз	Активність антигену в РІД	Вища активність від К у разів
K1	1:2		1:1,8	
A1	1:2,5	1,25	1:2,2	1,2
A2	1:3,5	1,75	1:3,4	1,9
A3	1:1,8	≤0,1	1:1,5	≤0,3

Наведені у таблиці 4 результати свідчать, що найбільш активними в РІД були антигени, отримані з клітин культури FLK-BLV, культивованих на поживному середовищі з додаванням 0,14 % актовегіну (в 1,75 разів вище за контроль в 5-му та у 1,9 разів – у 10 пасажі). Антигенна активність показників 10-го пасажу експериментальної культури вища за такі показники 5-го пасажу та відповідних контролів, що вказує на зростання функціональної активності клітин експериментальної культури у подальших, до 10, пасажуваннях.

**Висновки.** 1. Встановлено, що додавання 0.14 % актовегіну позитивно впливає на стан клітин моношару впродовж 10 пасажів досліду, пролонгує у порівнянні з контролем термін їх функціональної активності.

2. Активність отриманої експериментальної серії антигену проти ВЛ ВРХ, виготовленого на поживному середовищі з додаванням 0.14 % антигенстимулюючого препарату актовегіну, у 1,9 разів вища у порівнянні із контрольним зразком.

3. Система виготовлення антигену з використанням розробленого оптимізованого поживного середовища може бути рекомендована до апробації в умовах біологічних підприємств з метою підвищення антигенпродукуючої активності культури клітин та використання у наукових дослідженнях.

#### Список літератури

- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 2008. – ch. 2.4.11 Enzootic Bovine Leukosis. – P. 729-738.
- Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу: – Затв. Державним комітетом ветеринарної медицини України 21.12.2007. – наказ N 21. - Видання офіц. – Київ, 2008.
- Wahid Interface /Country information [Electronic resource]. — Mode to access : URL : // [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countrytimelines](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countrytimelines). — Title from the screen.
- Purification of simian immunodeficiency virus, SIV<sub>MAC251</sub>, and of its external envelope glycoprotein, gp148 / G. Gilljam, K. Siridewab, L. Hammar// J. of Chromatography A – 1994. - V.67, N5. – P. 89-100.
- Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay / De Giuseppe A. et. al. // Clin Diagn Lab Immunol. – 2004. - N 11. – P. 147-151.
- Колосков А.В. Современное представление о показаниях для трансфузии эритроцитарных компонентов крови // Гематология и трансфузиология. -2004. -No 6. -С.38-42.
- Нордвик Б. Актовегин. Новые аспекты клинического применения. – М., 2002. – С.18-24.
- 8.Obermaier-Kusser B., Muehlbacher C., Mushack J. et al. Regulation of glucose carrier activity by AICl and phospholipase C in fan cells // Biochem. J. – 1988 – 256- P. 515-520.

## EFFEKT AKTOVEGIN THE MORPHOLOGY OF CELL CULTURE AND EXPRESSION LEUKEMIA VIRUS

Gorbatenko S. K., Kuznetsova O. V., Myagkich N. V., Zdanevich P. P.

Scientific Research Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

Adding to the nutrient medium actovegin 0.14 % positive impact on the adhesive properties of cell culture FLK-BLV, prolongs compared with the control period of their functional activity. The activity of the experimental series leukemia antigen produced in stimulated nutrient medium, 1.9 times higher compared to the control sample.

**Material and methods.** The standard nutrient medium used for the reproduction of inoculated culture FLK-BLV, actovegin added in ratios of 0.12; 0.14; 0.16 % of its content to determine the optimum rate.

**Results.** The most positive influence on the formation of a monolayer was obtained in the group where actovegin added at a ratio of 0.14 %. Monolayer formation was more active than in groups where added Actovegin in other relationships at the first day of observation in the fifth passage and frequency of cell division in the next passage, unlike the other two experimental groups was provided at 1h3 (x4). The most active in the family were antigens derived from cell culture FLK-BLV, cultured in nutrient medium with the addition of 0.14 % actovegin (1.75 times higher than the control in the 5th and 1.9 times – 10 passages). Antigenic activity indexes 10th passage of experimental culture is above these indexes 5th passage and the corresponding controls, indicating an increase of functional activity of experimental cell culture subsequent to 10 passage.

**Conclusions.** 1. It is established that the addition of 0.14 % actovegin positive effect on the state of monolayer cells within 10 passages of the experiment, prolongs compared with the control period of their functional activity.

2. Aktyviti the experimental series against the antigen overhead cattle produced on nutrient media with the addition of 0.14 % antyhenstimulating drug actovegin, 1.9 times higher compared to the control sample.

3. The system of antigen production using the developed optimized nutrient medium may be recommended for testing under conditions of biological enterprises to improve antyhenprodukyuchoyi activity and cell cultures used in research.

**Keywords:** Antigen, biological stimulant, culture medium, cell culture, bovine leukemia

УДК: 619:636.1.2.3.4:616.9:579:577

## РОЗРОБЛЕННЯ ПЛР-ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВИДОВОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ ЗБУДНИКІВ ХЛАМІДІОЗІВ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Ксьонз І. М.

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН,  
м. Полтава, Україна, e-mail: igor.ksyonz@ukr.net

Корнієнко М. В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
м. Харків, Україна, e-mail: marina-kirniienko@mail.ru

Розроблено чотири ПЛР-тест-системи для індикації та диференціації бактерій роду *Chlamydia*, що є етіологічними чинниками хламідіозів ссавців і сільськогосподарських тварин зокрема, а саме: *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* та *C. suis*. Базовим є сконструйовані і синтезовані чотири пари олігонуклеотидних праймерів, що фланкують різні за розміром фрагменти ДНК гена, які кодують МОМР хламідій. Аналітична специфічність розроблених ПЛР-тест-систем підтверджена результатами ампліфікації 19 зразків біологічних матеріалів, з яких 13 є хламідієвмісними, а саме: 3 із них містять – *C. abortus*, 3 – *C. pecorum*, 3 – *C. pneumoniae*, 2 – *C. pneumoniae*, 1 – *C. psittaci* та 1 – *C. felis*. Окрім хламідій дослідженню підлягали зразки ДНК лептоспір та бабезій.

**Ключові слова:** сільськогосподарські тварини, ПЛР-тест-система, видова диференціація, *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis*

Хламідіози є групою інфекційних захворювань, що викликаються грамнегативними внутрішньоклітинними бактеріями порядку *Chlamydiales*. За сучасною класифікацією, прийнятою на II Європейському симпозиумі «Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications (EMAC-2)», до означеного порядку належить 8 родин (3 з яких мають статус кандидатів) представлених 13 родами (5 зі статусом кандидатів) і 25 видами (серед яких у статусі кандидатів перебувають 7 мікроорганізмів). Для ссавців і птахів патогенними є бактерії роду *Chlamydia*, зокрема *C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. suis* та *C. trachomatis*. [1, 2].