

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].

Результати аналізу літературних джерел та власні багаторічні дослідження свідчать, що хламідіоз великої рогатої худоби переважно викликають *C. abortus*, *pidше C. pecorum*, *C. pneumoniae* та *C. psittaci*; хламідіоз овець і кіз – *C. abortus*; хламідіоз коней – *C. pecorum*, *C. pneumoniae*; хламідіоз свиней, частіше за все, викликають *C. abortus*, *C. suis* та *C. pecorum*, а у спорадичних випадках *C. pneumoniae* й *C. psittaci* [3].

Метою роботи було розробити чотири ПЛР-тест-системи для індикації і видової диференціації *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* та *C. suis*, тобто етіологічних чинників хламідіозів сільськогосподарських тварин. Слід зазначити, що оскільки *C. psittaci* виділяється від худоби в спорадичних випадках, то розроблення діагностикуму для диференціації цього виду хламідій не планувалось – така ПЛР-тест-система розробляється в рамках визначення етіології хламідійних інфекцій птахів.

Матеріали та методи. Дослідження проводились в умовах лабораторій здоров'я тварин та генетики Інституту свинарства та агропромислового виробництва НААН.

Для конструювання дизайну праймерів ПЛР-тест-систем із баз даних нуклеотидних послідовностей «GenBank» (USA) було залучено 287 первинних послідовностей гена, який кодує основний мембранний білок (МOMP), чотирьох видів бактерій роду *Chlamydia*, що є патогенними для ссавців різних видів, зокрема сільськогосподарських тварин (великої й дрібної рогатої худоби, коней, свиней), а саме *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* та *C. suis* [4–9].

Нуклеотидні послідовності гена, що кодує МOMP чотирьох означених видів хламідій були вирівняні за допомогою програми «MEGA4» та «MEGA7» [10]. Для розроблення дизайну олігонуклеотидних праймерів були обрані індивідуальні для різних видів бактерій роду *Chlamydia* ділянки ДНК.

За допомогою комп'ютерної програми «FastPCR» було отримано послідовності олігонуклеотидних праймерів із параметрами температури їх відпалу [11]. Із отриманих дизайнів праймерів було відібрано по одній парі (прямий і зворотний) для кожного виду бактерій роду *Chlamydia* патогенних для сільськогосподарських тварин.

За розробленими дизайнами було замовлено синтез олігонуклеотидних праймерів у фірмі «Thermo Electron Corporation» (Germany). Отримані синтезовані праймери розводили стерильною деіонізованою бідистильованою водою до стокової концентрації 100 pmol/μl, а потім до робочої концентрації 20 pmol/μl.

Окрім праймерів, у тест-системах використовували реагенти для ПЛР виробництва фірми «Fermentas UAB» (Lithuania), а саме: деіонізовану воду, ПЛР-буфер, MgCl₂, розчин дезоксирибонуклеозидтрифосфатів (dNTP) та Taq-полімерази.

Полімеразну ланцюгову реакцію із застосуванням розроблених чотирьох пар олігонуклеотидних праймерів, що фланкують фрагменти гена МOMP *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* та *C. suis* проводили в поліпропіленових мікроцентрифужних пробірках об'ємом 0,6 см³ на термоциклері «Biometa TRIO-Thermoblock» (Germany) у 25 мкл ПЛР-суміші.

Співвідношення реакційної суміші та програму ампліфікації підбирали дослідно-практичним шляхом до отримання найбільш чітких бендів на електрофореграмах.

Фракціювання продуктів ампліфікації здійснювали методом горизонтального електрофорезу у 2,0 % агарозному гелі в електрофоретичній камері «Cleaver Scientific Ltd.» (UK) із візуальною оцінкою на УФ-трансліюмінаторі виробництва НВО «Прогрес» (Україна), після фарбування бромистим етидієм.

Як маркер розміру ДНК використовували *pUC19/Mspl* («Fermentas UAB», Lithuania).

Виділення ДНК із досліджуваних біологічних зразків проводили за допомогою комерційно доступного комплексу реагентів «ПРОБА-РАПІД» виробництва ООО «НПО ДНК Технологія» (Россія).

Матеріалом для відпрацювання параметрів експериментальних ПЛР-тест-систем слугували зразки контрольних ДНК *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* та *C. suis*, отриманих із лабораторії хламідіозу Інституту імені Фрідріха Льюфлера (Germany); зразки ДНК виділених із польових ізолятів хламідій чотирьох означених видів, отриманих від великої рогатої худоби, коней і свиней; зразки ДНК виділених із лептоспір, отриманих із музею мікроорганізмів лабораторії лептоспірозу Інституту ветеринарної медицини НААН; зразки ДНК виділених із бабезій.

Результати досліджень. Біоінформаційними дослідженнями різних генів бактерій роду *Chlamydia* (16S rRNA, RNase P RNA, МOMP) визначено, що найвищий рівень варіабельності нуклеотидних послідовностей (97,1 %) має ген, який кодує основний мембранний білок (МOMP). Саме тому, первинні послідовності цього гену, отримані з міжнародних баз, були використані при конструюванні дизайну олігонуклеотидних праймерів ПЛР-тест-систем для індикації та диференціації *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* й *C. suis*.

За допомогою комп'ютерної програми «FastPCR» отримано дизайни олігонуклеотидних праймерів. Зі значної кількості пар праймерів було обрано по одній для кожної тест-системи, з огляду на розмір ампліфікованої ділянки, що ними фланкується (найбільш зручної для електрофоретичної детекції) та на оптимальну температуру відпалу праймерів.

Таким чином, у ПЛР-тест-системі для індикації та видової диференціації *Chlamydia abortus* використовується наступна пара праймерів: ChAbMOMPL: 5'-GGATAGACCCCAACATCGCTT-3' та ChAbMOMPR: 5'-GGTTGAATGCCGAGAACTA-3'.

У ПЛР-тест-системі для індикації та видової диференціації *Chlamydia pecorum* використовується така пара праймерів: ChPecMOMPL: 5'-TCCAATACGCACAATCGAAA-3' та ChPecMOMPR 5'-GTAAGACAACGCTGCACCAA-3'.

У ПЛР-тест-системі для індикації та видової диференціації *Chlamydia pneumoniae* використовується така пара праймерів: ChPnMOMPL 5'-GGAACAAAGTCTGCGACCAT-3' та ChPnMOMPR 5'-AAAGAAGGGTCCATGCAGTT-3'.

У ПЛР-тест-системі для індикації та видової диференціації *Chlamydia suis* використовується така пара праймерів: ChSuMOMPL: 5'-TTCTTTGCAATGCTGCTGAA-3', ChSuMOMPR: 5'-ATCAAAGCTTGCTCGAGACC-3'.

Продуктами ПЛР є фрагменти гена МOMP бактерій роду *Chlamydia*, що мають розміри специфічні для кожного із чотирьох видів хламідій патогенних для сільськогосподарських тварин, а саме: *C. abortus* – 158 п.н., *C. pecorum* – 206 п.н., *C. pneumoniae* – 191 п.н., *C. suis* – 215 п.н.

Оптимізація умов ПЛР передбачала підбір складу реакційної суміші та температурний режим ампліфікації.

У результаті відпрацювання протоколу ПЛР найкращими параметрами реакційної суміші виявились наступні – 2,5 мкл 10-кратного буферу (670 мМ Трис-НСІ, рН 8,8 за температури 25 °С, 20 мМ БСА, 166 мМ амонію сірчанокислого (NH₄)₂SO₄, 100 мМ 2-β-меркаптоетанол) («Fermentas UAB», Lithuania), 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP («Fermentas UAB», Lithuania), 2 мкл 50 мМ MgCl₂ («Fermentas UAB», Lithuania) 2–3 од. Таq-полімерази (*Thermus aquaticus*) («Fermentas UAB», Lithuania), 0,5 мкл (0,1 опт. один.) кожного з праймерів та зразок досліджуваної ДНК – до кінцевої концентрації в суміші. 1 мкг/см³ деіонізованої води до об'єму 25 мкл. На ампліфікаційну суміш нашаровували 25 мкл мінеральної олії.

Оптимальні параметри ампліфікації становили:

94 °С	120 сек	} 35 циклів
93 °С	30 сек	
55 °С	30 сек	
72 °С	45 сек	
72 °С	300 сек	

Для відпрацювання параметрів ПЛР для розроблених тест-систем та їх випробування на аналітичну специфічність було використано 19 наступних біологічних матеріалів: зразок контрольної ДНК *C. abortus* (1); зразок контрольної ДНК *C. pecorum* (2); зразок контрольної ДНК *C. pneumoniae* (3); зразок контрольної ДНК *C. suis* (4); зразок контрольної ДНК *C. psittaci* (5); зразок контрольної ДНК *C. felis* (6); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *C. abortus* від корови ДСП «Агрокомплекс» концерну «Нафтаенерго» Смілянського району Черкаської області (7); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *C. pecorum* від корови СТОВ «Агрофірма Зоря» Оржицького району Полтавської області (8); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *C. pneumoniae* від коня ПП «Астея» Пирятинського району Полтавської області (9); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *C. pneumoniae* від кобили ТОВ «Авангард плюс» Пирятинського району Полтавської області (10); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *C. abortus* від кнура ДП «Дібрівський кінний завод № 62» Миргородського району Полтавської області (11); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *C. pecorum* від свиноматки СП «Інтерагро-Сквира» Сквирського району Київської області (12); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *C. suis* від свиноматки ТОВ «Агрофірма Агротіс» філія «Павлівська» Мар'їнського району Донецької області (13); зразок ДНК виділеної із штаму лептоспіри (штам LSU, Серовар *Louisiana*, серогрупа *Louisiana*) (14); зразок ДНК виділеної із штаму лептоспіри (штам 493 *Poland*, Серовар *polonica*, серогрупа *Sejroe*) (15); зразок ДНК виділеної із штаму лептоспіри (штам *Hond Utrecht IV*, Серовар *canicola*, серогрупа *Canicola*) (16); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *Babesia canis* від собаки мешканця м. Полтава (17); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *Babesia bovis* від телиці приватного господарства с. Верхи Камінь-Каширського району Волинської області (18); зразок ДНК виділеної із польового ізоляту *Babesia divergens* від корови приватного господарства с. Сокілець Буцацького району Тернопільської області (19).

На першій електрофореграмі ПЛР-продуктів означених 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для індикації та видової диференціації *C. abortus*, було виявлено смуги розміром 158 пар нуклеотидів (п.н.) на трьох доріжках – 1, 7, 11, що відповідають зразкам: контрольної ДНК *C. abortus*, польового ізоляту (диференційованого раніше як *C. abortus*) від корови та польового ізоляту (диференційованого раніше як *C. abortus*) від кнура. На інших 17 доріжках, включаючи негативний контроль, будь-які смуги відсутні.

На другій електрофореграмі продуктів ампліфікації тих же 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для індикації та видової диференціації *C. pecorum*, було виявлено смуги розміром 206 п.н. на трьох доріжках – 2, 8, 12, що відповідають зразкам: контрольної ДНК *C. pecorum*, польового ізоляту (диференційованого раніше як *C. pecorum*) від корови та польового ізоляту (диференційованого раніше як *C. pecorum*) від свиноматки. На інших 17 доріжках, включаючи негативний контроль, будь-які смуги відсутні.

На третій електрофореграмі ПЛР-продуктів вищевказаних 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для індикації та видової диференціації *C. pneumoniae*, було виявлено смуги розміром 191 п.н. на трьох доріжках – 3, 9, 10, що відповідають зразкам: контрольної ДНК *C. pneumoniae* та польових ізолятів (диференційованих раніше як *C. pneumoniae*) від двох коней. На інших 17 доріжках, включаючи негативний контроль, будь-які смуги відсутні.

На четвертій електрофореграмі продуктів ампліфікації означених 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для індикації та видової диференціації *C. suis*, було виявлено смуги розміром 215 п.н. на двох доріжках – 4, 13, що відповідають зразкам: контрольної ДНК *C. suis* та польового ізоляту (диференційованого раніше як *C. suis*) від свиноматки. На інших 18 доріжках, включаючи негативний контроль, будь-які смуги відсутні.

Дослідження 19 означених зразків ДНК за допомогою кожної із чотирьох ПЛР-тест-систем проводили у 3 повторах, при цьому результати були аналогічними.

Таким чином, результати електрофореграм вказують на їх адекватність та на аналітичну специфічність розроблених ПЛР-тест-систем.

Висновок. Розроблені ПЛР-тест-системи до складу яких входять олігонуклеотидні праймери, що фланкують різні за розміром фрагменти ДНК гена, який кодує МOMP чотирьох видів бактерій роду *Chlamydia*, дає можливість виявляти ДНК *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis*, що є збудниками ссавців і сільськогосподарських тварин зокрема. Індикація та диференціація хламідій за видом забезпечується візуальною оцінкою ампліфікованих фрагментів за різним розміром бендів на електрофореграмі у 2,0 % агарозному гелі.

Перспективами подальших досліджень є застосування розроблених ПЛР-тест-систем у наукових дослідженнях при вивченні різних аспектів хламідіозів сільськогосподарських тварин, зокрема їх етіологічних чинників, а також у проведенні епізоотологічного моніторингу хламідійних інфекцій.

Список літератури

1. Sachse K. Neues aus dem NRL Chlamydiose / Sachse K. // Sekond European Meeting on [«Animal Chlamydioses and Zoonotic Smplications (EMAC-2)»], (Germany, Jena, 13–14 june 2013), Friedrich Loffler Institut. – 2013. – P. 95–96.
2. Ксьонз І.М. Зміни у класифікації хламідій / І.М. Ксьонз, В.Й. Любецький // Ветеринарна медицина України. – 2014. – № 9 (223). – С. 11–16.
3. Зоонозні хламідіози : [монографія] / [Ксьонз І.М., Скрипник В.Г., Нехороших З.М. і ін.]. – К., ДНДІЛДВСЕ, 2014. – 229 с.
4. Акулова Т.А. Хламидиоз крупного рогатого скота / Т.А. Акулова, В.Л. Ковалев, И.А. Гуренко // Сборник научных трудов ЛНАУ. – 2003. – №31/43. – С. 158–278.
5. Барбарова Л. А. Хламидиоз лошадей : эпизоотология, диагностика и меры борьбы : дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / Барбарова Любовь Андреевна. – Казань, 2002. – 167 с.
6. Лобзин Ю.В. Хламидийные инфекции / Ю.В. Лобзин, Ю.И. Ляшенко, А.Л. Позняк – СПб. : ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2003. – 400 с.
7. Самуйленко А.Я. Инфекционная патология животных : том V : Хламидиозы / А.Я. Самуйленко, В.Н. Сюрин, Е.С. Воронин. – М. : ВНИИТИБП, 2003. – 207 с.
8. Хламидиозы сельскохозяйственных животных / [Хазипов Н.З., Гафаров Х.З., Шафикова Р.А. и др.] ; под ред. Н.З. Хазипова, А.З. Равилова. – М. : Колос, 1984. – 223 с.
9. Possible pathogenic interplay between *Chlamydia suis*, *Chlamydia abortus* and PCV-2 on a pig production farm / K. Schautteet, D. S. Beeckman, P. Delava, D. Vanrompay // Vet. Rec. – 2010. – Vol. 166, No 11. – P. 329–333.
10. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. / Tamura K.K., Dudley J., Nei M. [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – V.24. – P.1596–1599.
11. Kalendar R. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis / R. Kalendar, D. Lee, A.H. Schulman // Methods Mol Biol. – 2014. – V.1116. – P. 271–302.

**DEVELOPMENT OF PCR TEST-SYSTEMS FOR SPECIES
DIFFERENTIATION OF FARM ANIMALS CHLAMYDIOSIS AGENTS**

Ksyonz I. M.

Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production NAAS, Poltava, Ukraine

Korniyenko M. V.

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

Under the currently existing classification, adopted at the Second European Symposium «Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications (EMAC-2)», Chlamydia pathogens of animals and humans are intracellular gram-negative bacteria belonging to Chlamydiales order, which includes 8 families (3 of them having the status of candidate) represented by 13 genera (5 having the status of candidate) i 25 species (including 7 microorganisms having the status of candidate). Genus Chlamydia includes 11 species: C. abortus, C. avium, C. caviae, C. felis, C. gallinacea, C. muridarum, C. pecorum, C. pneumoniae, C. psittaci, C. suis and C. trachomatis, which are pathogenic for mammals and birds.

The aim of the study was to develop four PCR test-systems for indication and species differentiation of C. abortus, C. pecorum, C. Pneumoniae and C. suis, i.e. etiological factors of Chlamydioses in farm animals.

To design the test systems, a bioinformatic study was previously performed on 287 primary nucleotide DNA sequences, obtained from the «GenBank» international electronic database, of the gene encoding the main outer membrane protein (MOMP) of Chlamydia for the above mentioned four agents of farm animals' chlamydial infections. It was determined that the MOMP gene sequences had the variability level of 97.1 %. By means of the said gene's primary sequences alignment, using computer «MEGA4» and «MEGA7» software, we defined polymorphic nucleotide fragments of DNA sequences for C. abortus, C. pecorum, C. Pneumoniae, C. suis and constructed designs of the oligonucleotide primers. According to the said designs, four pairs of primers were synthesized, flanking the different sized DNA fragments specific to each of the four Chlamydiosis pathogens. The primers' annealing temperature, the ratio of the reaction mixture and the amplification mode have been selected and adjusted. Analytical specificity of the developed PCR test-systems was confirmed by the amplification results on 19 biological materials samples, 13 of them containing Chlamydiae.

The developed PCR test systems to indicate and differentiate farm animals Chlamydia pathogens species permit to reliably study various aspects of chlamydial infection.

Keywords: Chlamydioses, farm animals, PCR test-system, species differentiation, C. abortus, C. pecorum, C. pneumoniae, C. suis