

PURIFICATION AND CONCENTRATION OF ANTIGEN FOR ELISA USING EPIZOOTIC ISOLATES OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHITIS VIRUS ISOLATED IN UKRAINE

Veretsun A. L., Usova L. P.

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

Infectious laryngotracheitis of chickens is one of the most dangerous viral respiratory diseases of chickens, which causes significant economic losses to poultry farms. A key component in this disease control is timely rapid serological diagnosis. To date, the basic method of serological diagnosis and monitoring is enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The main components of ELISA test systems are purified and concentrated infectious laryngotracheitis virus antigens. Our research aimed to develop a technology for the production of purified and concentrated antigens of infectious laryngotracheitis virus, as well as to test the suitability of epizootic isolates for the production of antigens for ELISA. Based on the results of research, an improved scheme for obtaining purified infectious laryngotracheitis virus antigens using epizootic isolates has been developed. The scheme consists of accumulation of virus raw material, its inactivation, verification of inactivation completeness, concentration of infectious laryngotracheitis virus by PEG-6000 precipitation followed by ultracentrifugation at 14,000 rpm through a 30% sucrose pad. Samples of purified concentrated infectious laryngotracheitis virus antigens from isolates "B 59-11", "B 2-10", "ЧП 96-10", and "A 4-12" with protein content 1,520–3,720 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ have been obtained. The ratio of protein concentration before and after purification ranged from 4.17 to 7.24. ELISA found that all these antigens were suitable for use as antigens. When testing for specificity, it was found that all antigens did not react with heterologous sera to other poultry viral diseases, but reacted only with homologous sera positive for infectious laryngotracheitis, which proves their specificity

Keywords: laboratory diagnostics, chicken embryos

УДК 619:602.3:579.864:579.873.13

DOI 10.36016/VM-2021-107-12

ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ОСНОВНИХ ПОКАЗНИКІВ ПРОБІОТИЧНИХ КУЛЬТУР *LACTOBACILLUS PLANTARUM* № 7 І *BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS* № 17 У СКЛАДІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ СУМІШІ ВПРОДОВЖ ЗБЕРІГАННЯ

Гужвинська С. О., Палій А. П., Корнейков О. М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: aspirantura.iecvm@gmail.com

У статті представлені результати вивчення стабільності основних показників пробіотичних культур *Lactobacillus plantarum* № 7 і *Bifidobacterium adolescentis* № 17 у складі бактеріальної суміші впродовж зберігання. До бактеріальної суміші додано пребіотичний компонент — лактулозу в концентрації 1,5%. Досліджено стабільність синбіотичної бактеріальної суміші у флаконах і капсулах за збереження у відповідних умовах (захищеному від світла місці, за температури 4–8 °С). Дослідження показали, що збереження рідкої форми бактеріальної суміші з додаванням пребіотичного компонента за температури 4–8 °С можливе протягом 1 місяця без зниження показників активності, ліофільно висушеного препарату — протягом 12 місяців

Ключові слова: пребіотик, лактулоза, ліофілізат

В останні роки в Україні гостро постала проблема захворювань шлунково-кишкового тракту тварин різної етіології. Дисбактеріоз включає зміни видового складу та метаболічної активності кишкової мікрофлори, ускладнює перебіг багатьох захворювань за рахунок порушення функціонування імунної системи організму [1, 2]. Сьогодні вирішення проблеми дисбіозу здійснюється двома шляхами, які формуються на розумінні ступеня розладу систем організму [3]. Перший передбачає профілактику дисбактеріозу, другий — його лікування. В обох випадках роль компонентів відновлювання мікрофлори відіграють пробіотичні культури з певними властивостями, такі як лакто- та біфідобактерії, кишкові палички, пропіоновокислі бактерії, аерококи та інші [4, 5].

У результаті зниження рівня пробіотичних бактерій, зокрема лактобактерій та біфідобактерій, порушуються процеси травлення, погіршується всмоктування речовин, знижується стійкість кишечника до надлишкового заселення його умовно-патогенними та патогенними мікроорганізмами [6, 7].

Причинами зниження рівня корисної мікрофлори є багато факторів, серед яких головними є неконтрольоване використання антибіотиків [8]. Для покращання загального стану організму, з метою підвищення імунного захисту та запобігання розладів роботи шлунково-кишкового тракту необхідно використовувати комплексний підхід. Лікування повинно бути спрямовано на зниження надлишкової кількості умовно-патогенної мікрофлори, відновлення нормальної мікрофлори [9, 10].

На сьогоднішній день у різних країнах створено велику кількість біологічно активних добавок і лікарських препаратів, основу яких складають засоби, розроблені на основі індигенної мікрофлори макроорганізму [11–13].

З цією метою, як правило, використовуються різні штами біфідо- та лактобактерій, непатогенні штами кишкової палички та ентерококів. Найвідоміші мікроорганізми, що використовуються як основа біопрепаратів — лактобацили. Відомо про використання *Lactobacillus plantarum*, *L. fennentum*, *L. casei*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. reuleri*, *L. lactis* для виробництва пробіотиків. Поряд з лактобактеріями широкого використання набули біфідобактерії, зокрема *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. thermophilus* [14, 15].

Останнім часом для корекції дисбіотичних розладів доведено перспективність використання пребіотиків — інгредієнтів, які частково або повністю не перетравлюються та вибірково стимулюють розмноження та/або метаболічну активність однієї чи кількох груп бактерій, які є наявними в кишечнику тварин [16–18].

Метою наших досліджень було вивчення стабільності основних показників пробіотичних культур *Lactobacillus plantarum* № 7 і *Bifidobacterium adolescentis* № 17 у складі бактеріальної суміші впродовж зберігання.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були штами біфідобактерій *Bifidobacterium adolescentis* № 17 і штаму лактобацил *Lactobacillus plantarum* № 7. Культивування лактобактерій і біфідобактерій проводили на середовищах MRS та Блаурока відповідно впродовж 24–72 год за температури 37 °С. До поживних середовищ додавали лактулозу у концентрації 1,5 %.

Визначення активності кислотоутворення культур проводили титриметричним методом. У кожному експерименті враховували показники від двох вимірювань. Культуру бактерій об'ємом 2,5 см³ переносили в широкі пробірки (діаметром 2 см, висотою 20 см) з 25,0 см³ печінкового середовища Блаурока (із розрахунку 1,0 см³ культури на 10,0 см³ середовища), потім витримували протягом 72 год за температури 38,0 ± 0,5 °С, після чого проводили визначення кислотності в кожній пробірці (у двох паралельних пробах), для чого кожну пробу (10,0 см³ мікробної суспензії) титрували розчином натрію гідроксиду в концентрації 0,1 М до появи стійкого блідо-рожевого забарвлення (індикатор ФФ — 2 краплі). Значення рН контролювали потенціометрією. Титрування вели до рН 8,5. Кислотність виражали в градусах Тернера (°Т) і обчислювали за формулою:

$$T = A \times K \times 10$$

де: А — кількість 0,1 М розчину натрію гідроксиду, яка пішла на титрування, см³;
К — поправка до титру 0,1 М розчину натрію гідроксиду, що використовувався;
10 — ступінь розбавлення мікробної суспензії.

Середню величину кислотоутворення обчислювали за показниками, отриманими для двох вимірювань за умови, що кожен з них не нижче 90 °Т. У випадку отримання в одній із проб показника нижче 90 °Т спробу повторювали.

Кількість живих мікробних клітин лакто- та біфідобактерій визначали методом серійних розведень одержаної суспензії у фізіологічному розчині з наступним висівом культур бактерій по 0,1 см³ із розведень 10⁶ на середовища з подальшим підрахунком кількості колонієутворюючих одиниць (КУО). Усі дослідження проводили у триразовій повторності. Статистичну обробку результатів проводили за традиційними методами варіаційної статистики з використанням програми MS Excel і Statistica 10.

Результати досліджень. Для створення бактеріальної суміші були використані штами біфідобактерій *B. adolescentis* № 17 та штами лактобактерій *L. plantarum* № 7. Для проведення експерименту культивування біфідобактерій та лактобактерій проводили на середовищах з додаванням до них пребіотичного препарату лактулози в концентрації 1,5 %.

Так суміш пробіотичних бактерій з додаванням пребіотичного компонента має бути ліофілізованою з метою використання у сухій лікарській формі, або як основа для інших лікарських форм (капсули). Однак, перед дослідженням технології ліофілізації необхідно провести вивчення стабільності препарату (рідкого концентрату) і визначити термін, протягом якого рідка форма може зберігатися без втрати показників активності.

Для вирішення цього питання, нами проведено ряд досліджень, дані наведено у табл. 1. Бактеріальну суміш з пребіотичним компонентом зберігали у скляних флаконах (по 200 см³ у флаконі). Флакони з бактеріальною сумішшю закривали гумовими пробками та металевими ковпачками. Флакони зберігали у холодильнику за температури 4–8 °С.

Як видно з табл. 1, активність кислотоутворення у культур *B. adolescentis* № 17 у день виготовлення становила 280 ± 9 °Т, через 15 діб — 260 ± 7 °Т, через 30 діб — 210 ± 5 °Т, а через 45 діб — 160 ± 4 °Т. Активність кислотоутворення у культур *L. plantarum* № 7 спостерігалась відповідно 380 ± 13 °Т, 370 ± 14 °Т, 320 ± 10 °Т і 180 ± 7 °Т. Кількість живих мікробних клітин *Lactobacillus plantarum* № 7 у день виготовлення становила 6,5 ± 0,23×10⁹ КУО/см³, через 15 діб — 4,7 ± 0,22×10⁹ КУО/см³, через 30 діб — 3,3 ± 0,14×10⁹ КУО/см³, а через 45 діб — 2,2 ± 0,06×10⁷ КУО/см³. Кількість живих бактерій *B. adolescentis* № 17 впродовж місяця залишалася майже незмінною, лише на 45-ту добу значно знижувалася та становила 10⁶–10⁷.

Таблиця 1 — Визначення стабільності основних показників біфідобактерій *B. adolescentis* № 17 та лактобактерій *L. plantarum* № 7 у складі бактеріальної суміші з пребіотичним компонентом у рідкій формі впродовж зберігання

Термін зберігання	Активність кислотоутворення, °Т		Кількість живих бактерій, КУО/см ³		рН
	<i>B. adolescentis</i> № 17	<i>L. plantarum</i> № 7	<i>B. adolescentis</i> № 17	<i>L. plantarum</i> № 7	
У день виготовлення	280 ± 9	380 ± 13	10 ¹¹ –10 ¹²	6,5 ± 0,23×10 ⁹	4,50 ± 0,3
Через 15 діб	260 ± 7*	370 ± 14	10 ¹⁰ –10 ¹¹	4,7 ± 0,22×10 ⁹	4,30 ± 0,1
Через 30 діб	210 ± 5	320 ± 10	10 ⁹ –10 ¹⁰	3,3 ± 0,14×10 ⁹	4,20 ± 0,1
Через 45 діб	160 ± 4	180 ± 7	10 ⁶ –10 ⁷	2,2 ± 0,06×10 ⁷	3,80 ± 0,1

Примітка. * — різниця вірогідна відносно показників терміну зберігання препарату у день виготовлення (p ≤ 0,05).

Таким чином збереження рідкої форми бактеріальної суміші з додаванням пребіотичного компонента за температури 4–8 °С можливе протягом 1 місяця без зниження показників активності. Цього терміну достатньо для проведення контролю препарату та ліофільного висушування.

Метою проведення наших досліджень є створення синбіотичної бактеріальної суміші профілактично-лікувальної дії. Розроблену синбіотичну бактеріальну суміш можна використовувати у рідкій формі, але для тривалого зберігання або можливості застосування у складі інших лікарських форм (капсули) необхідна ліофілізація суспензії бактерій. Тому ми провели ліофільне висушування синбіотичної бактеріальної суміші. Суха лікарська форма у флаконах є ліофільно висушеною мікробною масою біфідобактерій *B. adolescentis* № 17 і лактобактерій *L. plantarum* № 7 з додаванням пребіотичного компонента лактулози у концентрації 1,5%. Форма випуску препарату — ліофільно висушений препарат у флаконах (кристалічна або пориста маса біло-кремового кольору).

На наступному етапі роботи ми вивчали стабільність ліофільно висушеного препарату (табл. 2). Данні табл. 2 свідчать, що активність кислотоутворення *B. adolescentis* № 17 у день виготовлення становила 270 ± 7 °Т, через 6 місяців — 260 ± 8 °Т, а через 12 місяців — 240 ± 5 °Т.

Таблиця 2 — Результати аналізу сухої лікарської форми у флаконах на основі синбіотичного бактеріальної суміші в процесі тривалого зберігання

Термін зберігання	Активність кислотоутворення, °Т		Кількість живих бактерій, КУО/см ³	
	<i>B. adolescentis</i> № 17	<i>L. plantarum</i> № 7	<i>B. adolescentis</i> № 17	<i>L. plantarum</i> № 7
У день виготовлення	270 ± 7	360 ± 12	10 ¹¹ –10 ¹²	5,7 ± 0,22×10 ⁹
6 місяців	260 ± 8*	340 ± 11	10 ¹¹ –10 ¹²	5,1 ± 0,24×10 ⁹
12 місяців	240 ± 5	310 ± 9**	10 ¹⁰ –10 ¹¹	4,7 ± 0,19×10 ⁸

Примітка. ** — різниця вірогідна відносно показників терміну зберігання препарату у день виготовлення ($p \leq 0,01$).

Активність кислотоутворення *L. plantarum* № 7 у день виготовлення була 360 ± 12 °Т, через 6 місяців — 340 ± 11 °Т, а через 12 місяців — 310 ± 9 °Т. Кількість живих бактерій *B. adolescentis* № 17 у день виготовлення та через 6 місяців становила 10¹¹–10¹² КУО/см³, а через 12 місяців — 10¹⁰–10¹¹ КУО/см³. Кількість живих мікробних клітин *L. plantarum* № 7 у день випуску становила 5,7 ± 0,22×10⁹ КУО/см³, через 6 місяців — 5,1 ± 0,24×10⁹ КУО/см³, а через 12 місяців — 4,7 ± 0,19×10⁸ КУО/см³.

У процесі довгострокових досліджень вивчення стабільності препарату встановлено, що термін придатності препарату складає 1 рік (табл. 2) за зберігання у відповідних умовах. Основними показниками контролю активності препарату є активність кислотоутворення бактерій і кількість живих клітин.

Висновки. Доведено можливість використання лактулози як пребіотичного компонента у складі бактеріальної суміші на основі пробіотичних штамів бактерій. Установлена його оптимальна концентрація (1,5 %), за якої спостерігається зростання показників біологічної активності бактеріальної суміші. Досліджено стабільність синбіотичної бактеріальної суміші рідкої та ліофільно висушеної форм за зберігання у відповідних умовах — захищеному від світла місці за температури 4–8 °С. Збереження рідкої форми бактеріальної суміші з додаванням пребіотичного компонента за температури 4–8 °С можливе протягом 1 місяця без зниження показників активності, ліофільно висушеного препарату — впродовж 12 місяців.

Список літератури

- Rosenfeld C. S. Gut dysbiosis in animals due to environmental chemical exposures. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017. Vol. 7. P. 396. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00396>.
- DeGruttola A. K., Low D., Mizoguchi A., Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2016. Vol. 22, iss. 5. P. 1137–1150. DOI: <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>.
- Belizário J. E., Faintuch J. Microbiome and gut dysbiosis. In: Silvestre R., Torrado E., eds. *Metabolic Interaction in Infection*. Experientia Supplementum, Vol. 109. Cham : Springer, 2018. P. 459–476. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7_13.
- Paliy A. P., Gujvinska S. O., Kalashnyk M. V., Ivleva O. V., Petrov R. V., Baidevliatov Yu. A., Baidevliatova Yu. V., Husiev V. O., Hilko S. M., Kiralhazi I. I., Lohvynenko M. V., Paliy A. P., Bakun Yu. Yu. Development of technical regulations for the capsulated probiotic manufacture. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020. Vol. 10, iss. 5. P. 170–176. DOI: https://doi.org/10.15421/2020_226.
- Chaucheyras-Durand F., Durand H. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*. 2010. Vol. 1, iss. 1. P. 3–9. DOI: <https://doi.org/10.3920/BM2008.1002>.
- Paliy A. P., Gujvinska S. O., Livoshchenko L. P., Nalivayko L. I., Livoshchenko Ye. M., Risovaniy V. I., Dubin R. A., Berezhna N. V., Paliy A. P., Petrov R. V. Specific composition of indigenous microflora (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp.) in farm animals. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020. Vol. 10, iss. 1. P. 43–48. DOI: https://doi.org/10.15421/2020_7.
- Jensen A. P., Bjørnvad C. R. Clinical effect of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: A systematic review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2019. Vol. 33, iss. 5. P. 1849–1864. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.15554>.
- Гадзевич О. В., Палій А. П., Кінаш О. В., Петров Р. В., Палій А. П. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів, ізольованих з молока. *Світ медицини та біології*. 2019. № 3(69). С. 245–250. DOI: <https://doi.org/10.26724/2079-8334-2019-3-69-245-250>.
- Culligan E. P., Hill C., Sleator R. D. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut Pathogens*. 2009. Vol. 1, iss. 1. P. 19. DOI: <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-19>.

10. Wernimont S. M., Radosevich J., Jackson M. I., Ephraim E., Badri D. V., MacLeay J. M., Jewell D. E., Suchodolski J. S. The effects of nutrition on the gastrointestinal microbiome of cats and dogs: impact on health and disease. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 1266. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01266>.
11. Paliy A. P., Gujvinska S. A., Rodionova K. O., Alekseeva N. V., Ponomarenko O. V., Alrawashdeh M. S., Yeletskaia T. A., Ponomarenko G. V., Kushnir V. Yu., Paliy A. P. Enhanced cultivation technology for lacto- and bifidobacteria. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020. Vol. 10, iss. 3. P. 83–87. URL: <https://www.ujecology.com/articles/enhanced-cultivation-technology-for-lacto-and-bifidobacteria.pdf>.
12. Grzeškowiak Ł., Endo A., Beasley S., Salminen S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*. 2015. Vol. 34. P. 14–23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002>.
13. Shi L. H., Balakrishnan K., Thiagarajah K., Mohd Ismail N. I., Yin O. S. Beneficial properties of probiotics. *Tropical Life Sciences Research*. 2016. Vol. 27, iss. 2. P. 73–90. DOI: <https://doi.org/10.21315/tlsr2016.27.2.6>.
14. Gujvinska S. O., Paliy A. P., Dunaeva O. V., Paliy A. P., Berezna N. V. Biotechnology production of medium for cultivation and lyophilization of lactic acid bacteria. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8, iss. 2. P. 5–11. URL: <https://www.ujecology.com/articles/biotechnology-production-of-medium-for-cultivation-and-lyophilization-of-lactic-acid-bacteria.pdf>.
15. Abdelhamid A. G., El-Masry S. S., El-DougDoug N. K. Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains possess safety characteristics, antiviral activities and host adherence factors revealed by genome mining. *The EPMA Journal*. 2019. Vol. 10, iss. 4. P. 337–350. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13167-019-00184-z>.
16. Davani-Davari D., Negahdaripour M., Karimzadeh I., Seifan M., Mohkam M., Masoumi S. J., Berenjian A., Ghasemi Y. Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods (Basel, Switzerland)*. 2019. Vol. 8, iss. 3. P. 92. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8030092>.
17. Brosseau C., Selle A., Palmer D. J., Prescott S. L., Barbarot S., Bodinier M. Prebiotics: mechanisms and preventive effects in allergy. *Nutrients*. 2019. Vol. 11, iss. 8. P. 1841. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11081841>.
18. Paliy A. P., Gujvinska S. A., Livoshchenko L. P., Kytaieva D. V., Opanasenko Y. M., Tymoshenko R. Y., Shvets O. G., Kushnir V. Y., Anforova M. V., Paliy A. P. Influence of various prebiotic components on the main growth indicators of probiotic bacteria. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2021. Vol. 11, iss. 3. P. 231–239. URL: <https://www.ujecology.com/articles/influence-of-various-prebiotic-components-on-the-main-growth-indicators-of-probiotic-bacteria.pdf>.

**STUDY OF THE STABILITY OF THE MAIN INDICATORS OF PROBIOTIC CULTURES
LACTOBACILLUS PLANTARUM No. 7 AND BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS No. 17
IN THE BACTERIAL MIXTURE DURING STORAGE**

Guzhvyńska S. O., Paliy A. P., Kornieikov O. M.

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

*The article presents the results of studying the stability of the main indicators of probiotic cultures *Lactobacillus plantarum* No. 7 and *Bifidobacterium adolescentis* No. 17 as part of a bacterial mixture during storage. The prebiotic component lactulose was added to the bacterial mixture at a concentration of 1.5%. The stability of the synbiotic bacterial mixture in vials and capsules when stored under appropriate conditions (in a place protected from light, at a temperature of 4–8°C) has been studied. Experiments have shown that the preservation of the liquid form of the bacterial mixture with the addition of a prebiotic component at a temperature of 4–8°C is possible for one month without a decrease in activity indicators, and for lyophilized form — for 12 months*

Keywords: *prebiotic, lactulose, lyophilisate*

УДК 619:616.98-076:579.882.11:577.2.08:602.64

DOI [10.36016/VM-2021-107-13](https://doi.org/10.36016/VM-2021-107-13)

**РОЗРОБЛЕННЯ ТА ВАЛІДАЦІЯ ПОЗИТИВНОГО ПЛАЗМІДНОГО
КОНТРОЛЮ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ ХЛАМІДІЙ
У ПОЛІМЕРАЗНІЙ ЛАНЦЮГОВІЙ РЕАКЦІЇ У ФОРМАТІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ**

Паєлов С. Л.

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: psl600@i.ua*

Дослідження присвячені конструюванню та випробуванню плазмідного позитивного контролю для проведення полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу з метою детекції генома хламідій. Було клоновано ділянку оперона 16s–23s рибосомальної РНК хламідій довжиною 142 п. н і лігровано до відкритого плазмідного вектора pTZ19R, після чого