

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

отриманою конструкцією було трансформовано компетентні клітини *E. coli*. Наявність вставки контролювалось ампіциліновою селекцією клонів та за допомогою ПЛР. Ефективність застосування отриманої конструкції, копійність якого дорівнювала $7,65 \times 10^{10}$ молекул ДНК в 1 мкл, доводили шляхом установаження кореляції значень показнику *St* з кількістю ДНК у досліджуваному зразку. Випробування серії кратних розведень позитивного плазмідного контролю з концентраціями від 10^1 до 10^7 копій ДНК в 1 мкл в ПЛР у форматі реального часу було побудовано лінію регресії ($R^2 = 0,993$)

Ключові слова: ДНК, *Chlamydia*, pTZ19R

Захворювання, спричинені представниками родини Chlamydiaceae, протягом тривалого часу були поза увагою клініцистів через потребу в особливих лабораторних умовах для виявлення цієї групи внутрішньоклітинних збудників. Поступово більш детальні вивчення хламідій виявили їхню здатність легко змінювати господаря, а більшість з них можуть передаватися від тварин до людини [1]. Для сільськогосподарських тварин та птиці актуальними збудниками хламідіозів вважаються *Ch. psittaci*, *Ch. abortus*, *Ch. pecorum*, *Ch. suis*, *Ch. felis* та *Ch. caviae*, які спричинюють кон'юнктивіти, риніти, пневмонію, мастит, плацентит, що призводить до абортів, мертворождення або появи слабкого молодняку, безпліддя й ентериту [2, 3]. Потрібно відмітити, що клінічні прояви хламідіозу не є патогномонічними та часто можуть вказувати на інфікування іншими збудниками, наприклад *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Coxiella* [4]. Тому важливо вчасно проводити диференціацію. Виділення культури хламідії дозволяє остаточно підтвердити діагноз на хламідіоз, проте облігатний внутрішньоклітинний паразитизм цього збудника вимагає тривалого культивування в курячих ембріонах або клітинних культурах, що потребує значних витрат. Тому з метою швидкого виявлення збудника існують чутливі та швидкі тести, зокрема полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [5, 6]. Останнім часом лабораторії ветеринарної медицини адаптували ПЛР у режимі реального часу, що значно скорочує час реакції та дозволяє визначити кількість копій генома в досліджуваному зразку.

Метою цього дослідження було створення простого, швидкого та надійного методу детекції ДНК представників роду *Chlamydia* у різних клінічних зразках на основі ПЛР у режимі реального часу.

Матеріали та методи. Для отримання позитивного плазмідного контролю була напрацьована в ПЛР ділянка оперона 16s–23s рибосомальної РНК хламідій довжиною 142 п. н., що фланкується послідовностями прамерів Chlam_F 5'-CATAAGGGCCATGCTGACTTGA-3' і Chlam_R 5'-GCCGTGAGGTGTTGGGTAAAGT-3', з подальшим виділенням амплікона з гелю за допомогою комерційного набору «GeneJet Gel Extraction kit» відповідно до інструкції виробника. Як матрицю використовували ДНК *Ch. abortus* S26/3. На наступному етапі отриманий продукт ампліфікації вбудовували до плазмідного вектора pTZ19R шляхом лігування з використанням комерційного набору «Ins TA clone PCR Cloning Kit» за інструкцією виробника. З метою клонування отриманої конструкції її використовували для трансформації хімічно компетентних клітин *E. coli* штаму DH5 α , які потім висівали LB-агаром з додаванням ампіциліну (100 мкг/см³) та інкубували за температури 37 °C впродовж 16 год.

З метою селекційного відбору стійких до ампіциліну колоній кишкової палички до середовища додавали IPTG (50 мг/см³) та X-Gal (50 мг/см³), після чого обирали для подальших досліджень лише білі колонії. Правильність трансформації клітин *E. coli* визначали за допомогою ПЛР з використанням системи праймерів Chlam_F і Chlam_R. На завершальному етапі напрацьовували бактеріальну масу трансформованих плазмідною клітин *E. coli* у 50 см³ рідкого LB середовища та виділяли плазмідну ДНК за допомогою комерційного набору «Plasmid Miniprep Kit» згідно з інструкцією виробника.

Сумарну ДНК виділяли сорбентним методом з використанням DNeasyMiniSpincolumn. Сумарна кількість виділеного генетичного матеріалу вимірювали за допомогою спектрофотометру DeNovix за довжини хвилі 230–280 нм. Розрахунок кількості копій плазмідної ДНК в 1 мкл (N) проводили за формулою:

$$N = \frac{A \times 6,022 \times 10^{23}}{B \times 1 \times 10^9 \times 660}$$

де: A — вихідна концентрація ДНК, нг/мкл;
B — довжина плазмідної ДНК, п. н.

Виходячи з отриманої концентрації, готували серію послідовних розведень очищених плазмід у концентраціях від 10^7 до 10^1 копій у 5 мкл, які досліджували за допомогою ПЛР у реальному часі. Для визначення кореляції показника Ct з кількістю копій ДНК у зразку проводили вимірювання показників лінійності та ефективності методики. Для цього було визначено рівень сигналу флюоресценції в послідовних розведеннях, після чого на підставі отриманих даних була побудована лінія регресії, за якою проводився розрахунок коефіцієнта кореляції ($R^2 \geq 0,98$). Полімеразну ланцюгову реакцію у режимі реального часу проводили з використанням реактивів виробництва фірми Applied Biosystems (AmpliQa Gold) згідно з інструкцією виробника (табл. 1).

Таблиця 1 — Склад реакційної суміші для проведення ПЛР-РЧ

Назва компонента	Об'єм на 1 реакцію, мкл
10-кратний ПЛР-буфер	2,5
25мМ Mg ²⁺	1,5
dNTP	0,5
праймери <i>Chlam_F/R</i>	по 1,0 кожного
зонд <i>Chlam_Probe</i> (FAM)	0,5
Taq-полімераза, 5 од/мкл	0,13
стерильна H ₂ O, вільна від нуклеаз, для ПЛР	до 20

Готовий мастермікс вносили у пластикові пробірки типу Eppendorf. Як негативний контрольний зразок використовували 5 мкл стерильної деіонізованої води, а як позитивний — 5 мкл розчину ДНК референтного штаму *Ch. abortus* S26/3. Також використовували обладнання Fast 7500 Real-time PCR system за протоколом, наведеним у табл. 2.

Таблиця 2 — Режими ампліфікації для детекції генетичного матеріалу *Chlamydia* spp.

Назва етапу	Режим	Кількість циклів
Початкова денатурація	95 °C — 5 хв	1
Денатурація	95 °C — 15 с	40
Відпал	60 °C — 20 с	
Елонгація	72 °C — 40 с	

Результати досліджень. З метою підтвердження правильності постановки ПЛР під час дослідження клінічних зразків щодо вмісту генетичного матеріалу хламідій необхідно мати стабільний і специфічний позитивний контроль. Останнім часом все більше як позитивний контроль використовується не екстрагована безпосередньо з культури збудника ДНК, а сконструйовані за допомогою біоінженерних рекомбінантних плазмід, які у своєму складі містять відповідні специфічні ділянки генома патогена. Це дозволяє більш точно стандартизувати такі зразки та за необхідності синтезувати відповідну кількість контролів, маючи законсервовану культуру рекомбінантних клонів *E. coli*, які є трансформованими вищезазначеними плазмідними конструкціями. Тому на наступному етапі досліджень було сконструйовано плазмідний вектор pTZ19R, який містить вставку довжиною 142 п. н., що фланкується праймерами *Chlam_F* і *Chlam_R*, розробленими на попередньому етапі. Сконструйована плазміда довжиною 2 969 п. н. була трансформована до компетентних клітин *E. coli* DH5 α (рис. 1).

Треба відмітити, що комерційний вектор pTZ519R має у своєму складі ген стійкості до ампіциліну та ген *lacZ*, що дає змогу проводити селекцію колоній *E. coli* DH5 α , які з більшою долею вірогідності мають у своєму складі специфічну вставку. Після проведення трансформації з використанням ІПТГ та X-Gal у поживному середовищі для перевірки клонів методом ПЛР було відібрано чотири поодинокі білі колонії *E. coli*, які були виявлені на агаровому середовищі у чашках Петрі після інкубування. Перевірку проводили з використанням специфічних праймерів *Chlam_F* і *Chlam_R* (рис. 2).

За підсумками проведеної реакції всі колонії показали наявність специфічного амплікона, що дозволило їх обрати для подальших досліджень, а саме було напрацьовано бактеріальну масу в об'ємі 50 см³ і за допомогою комерційного набору виділено плазмідну ДНК.

Отже, було сконструйовано плазмиду рTZ19F_Chla зі вставкою ділянки оперона 16s–23s рибосомальної РНК хламідій довжиною 142 п. н., якою трансформували ампіцилін-резистентну кишкову паличку, що дає можливість використовувати її як позитивний контроль для детекції генетичного матеріалу збудників хламідіозу методом ПЛР у режимі реального часу.

З метою розроблення ефективного протоколу проведення ПЛР у реальному часі проводили оптимізацію реакції за показниками концентрації праймерів та зонда, підбору температури відпалу, а також визначення концентрації іонів магнію.

На першому етапі проводили серію експериментів для встановлення оптимальної концентрації праймерів. Для цього проводили ПЛР з концентрацією олігонуклеотидів у діапазоні від 0,1 до 0,6 мкМ з шагом 0,1. При цьому враховували найнижчі стандартні відхилення показників флюоресценції між трьома повторами.

За результатами титрування праймерів та зонда оптимальні показники були в межах 0,4–0,5 мкМ та 0,2–0,3 мкМ відповідно.

Було також встановлено, що оптимальна температура відпалу праймерів є в межах від 60 до 62 °С. Для визначення оптимальної концентрації іонів магнію готували реакційну суміш з таким вмістом розчину MgCl₂ — від 0,5 до 5 мкМ з кроком 0,5 мкМ. Найвищий рівень флуоресценції спостерігався в межах від 2 до 3 мкМ. Концентрацію Taq-полімерази та dNTP було обрано за рекомендацією виробника.

З метою встановлення кореляції значень показника Ct з кількістю ДНК у досліджуваному зразку було проаналізовано лінійність та ефективність запропонованої методики.

Для цього проводили оцінку рівнів флуоресценції у стандартних кратних розведеннях зразків рекомбінантного плазмідного контролю рTZ19F-Chla. Спочатку вираховували його копійність, яка дорівнювала $7,65 \times 10^{10}$ в 1 мкл. Потім готували серію кратних розведень плазмиди з концентраціями від 10^1 до 10^7 копій ДНК в 1 мкл та проводили ПЛР у форматі реального часу. За результатами цих випробувань було побудовано лінії регресії та розраховано R² — коефіцієнт кореляції, який дорівнював 0,993 (рис. 3).

Ці результати свідчать про пряму залежність сигналу флуоресценції від ступеня розведення ДНК, тобто дана методика є високоефективною, а отриманий результат — прямо пропорційним концентрації зразка.

Таким чином, створено методику проведення реакції ампліфікації у форматі реального часу з використанням розроблених праймерів Chlam_F і ChlamR та зонда Chlam_probe з порогом чутливості 10 копій ДНК хламідій в 1 мкл.

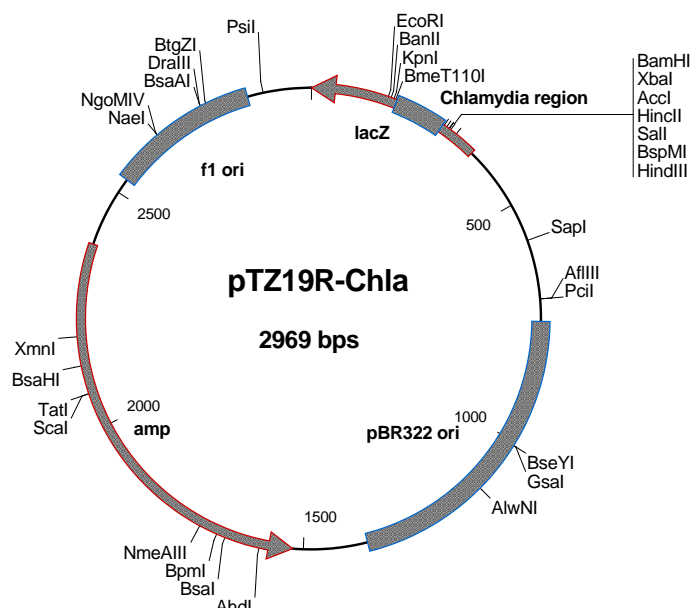


Рис. 1. Схематичне зображення будови позитивного плазмідного контрольного зразка рTZ19F-Chla для детекції генетичного матеріалу збудників хламідіозу методом ПЛР.

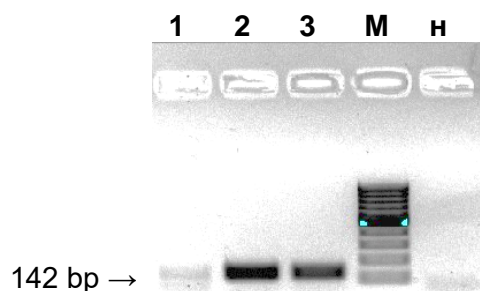


Рис. 2. Електрофореграма результатів ампліфікації отриманих клонів *E. coli*, трансформованих плазмидою рTZ19F-Chla: М — маркер молекулярної маси, 1 — негативний клон; 2, 3 — позитивні клони, н — негативний контроль реакції.

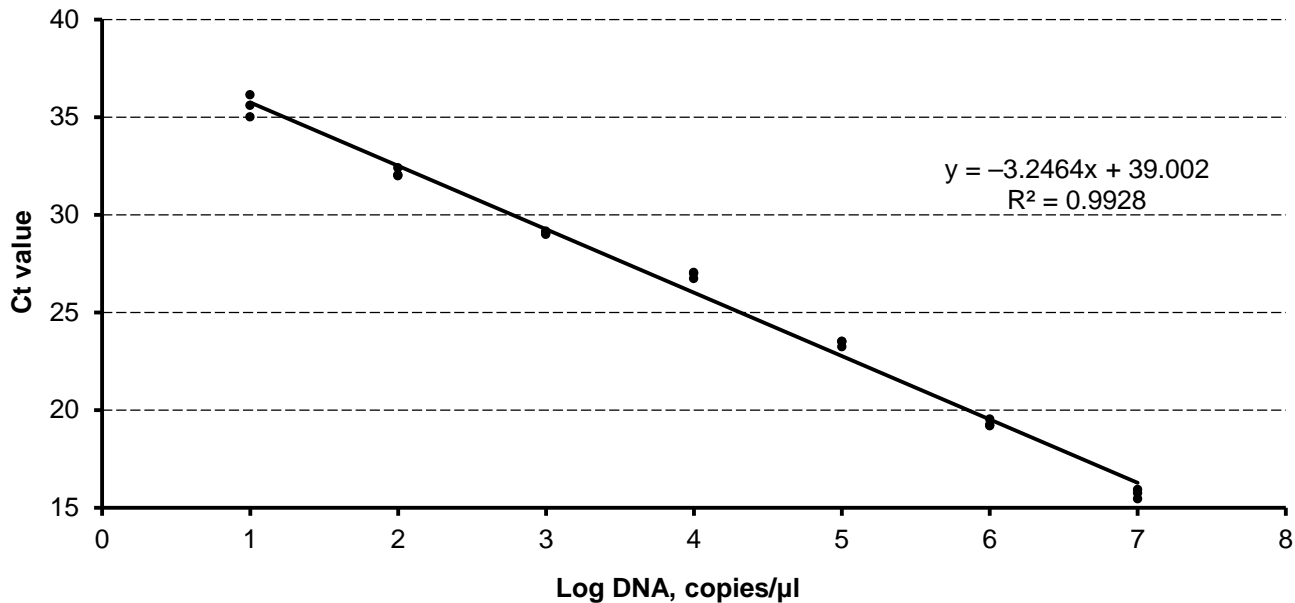


Рис. 3. Калібрувальний графік результатів проведення ПЛР у форматі реального часу для виявлення генетичного матеріалу *Chlamydia* spp. за допомогою послідовних десятикратних розведень зразків плазмідного позитивного контролю pTZ19F-Ch1a у трьох повтореннях.

Висновки. Проведені дослідження дозволили отримати позитивний плазмідний контроль pTZ19F-Ch1a, а також трансформовану культуру *E. coli*, що є джерелом таргентної ділянки оперона 16s–23s рибосомальної РНК хламідій довжиною 142 п. н. для його застосування в ПЛР в режимі реального часу. Випробування отриманого контролю показало його придатність для проведення реакції ампліфікації.

Список літератури

1. Elwell C., Mirrashidi K., Engel J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*. 2016. Vol. 14, iss. 6. P. 385–400. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.30>.
2. Borel N., Polkinghorne A., Pospischil A. A review on chlamydial diseases in animals: still a challenge for pathologists? *Veterinary Pathology*. 2018. Vol. 55, iss. 3. P. 374–390. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985817751218>.
3. Cheong H. C., Lee C. Y. Q., Cheok Y. Y., Tan G. M. Y., Looi C. Y., Wong W. F. *Chlamydiaceae*: diseases in primary hosts and zoonosis. *Microorganisms*. 2019. Vol. 7, iss. 5. P. 146. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146>.
4. Vidal S., Kegler K., Greub G., Aeby S., Borel N., Dagleish M. P., Posthaus H., Perreten V., Rodriguez-Campos S. Neglected zoonotic agents in cattle abortion: tackling the difficult to grow bacteria. *BMC Veterinary Research*. 2017. Vol. 13, iss. 1. P. 373. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1294-y>
5. Lienard J., Croxatto A., Aeby S., Jatou K., Posfay-Barbe K., Gervais A., Greub G. Development of a new chlamydiales-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011. Vol. 49, iss. 7. P. 2637–2642. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00114-11>
6. Rohde G., Straube E., Essig A., Reinhold P., Sachse, K. Chlamydial zoonoses. *Deutsches Arzteblatt International*. 2010. Vol. 107, iss. 10. P. 174–180. DOI: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0174>

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A POSITIVE PLASMID CONTROL FOR DETECTION OF CHLAMYDIA GENETIC MATERIAL IN REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Pavlov S. L.

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

The studies was devoted to the construction and testing of a plasmid positive control for real-time polymerase chain reaction to detect the chlamydia genome. A 142-bp region of 16s–23s rRNA operon of the chlamydia was cloned and ligated to the open plasmid vector pTZ19R, and competent *E. coli* cells were transformed with the resulting construct. The presence of the insert was monitored by ampicillin selection of clones and by PCR. The effectiveness of the application of the obtained structure, the copy number of which was equal to 7.65×10^{10} DNA molecules per μl , was proven by establishing the correlation of the values of the Ct to the amount of DNA in the sample. Testing a series of multiple dilutions of a positive plasmid control with concentrations from 10^1 to 10^7 DNA copies per μl in real-time PCR, a regression line was constructed ($R^2 = 0.993$)

Keywords: DNA, *Chlamydia*, pTZ19R