

– P. 336. 6. PCR Detection and Molecular Identification of Chlamydiae Species [Text] / J.C. Hartley [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39, № 9. – P. 3072–3079. 7. Kaltenboeck, B. Detection and strain differentiation of *Chlamydia psittaci* mediated by a two-step polymerase chain reaction [Text] / B. Kaltenboeck, K.G. Kousoulas, J. Storz // J. Clin. Microbiol. – 1991. – Vol. 29. – P. 1969–1975. 8. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [Text] / N. Saitou, M. Nei // Mol. Biol. Evol. – 1987. – № 4. – P. 406–425. 9. Tamura, K. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [Text] / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24, № 8. – P. 1596–1599.

## STUDY OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF CHLAMYDIA EPIZOOTIC ISOLATES

Danilova I.S., Malakeeva A.G., Bolotin V.I., Stetsenko V.I.

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

The results of the study of biological and molecular genetic characteristics of two isolates of *Chlamydia* "V.Olexandrivka/11" and "Tverdomedove/12" with infectious activity  $10^5$  ELD 50 ml, which were isolated using 6-days-old chicken embryos are presented. The partial adaptation to cell culture McCoy was conducted. As a result of sequencing the *omp1* gene and phylogenetic analysis of the sequences revealed that isolate "V.Olexandrivka/11" has a high level of similarity to *C. psittaci* 6BC (98 %), and isolate "Tverdomedove/12" – to *C. pecorum* E58 (93 %).

УДК 619:579:616-076

## ТИПУВАННЯ ЗБУДНИКІВ БРУЦЕЛЬОЗУ ТВАРИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР

Дегтярьов І.М., Орлов С.М., Обуховська О.В., Герілович А.П., Солодянкі О.С., Горайчук І.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Бруцельоз – контагіозне особливо небезпечне інфекційне захворювання ссавців, що спричиняється бактеріями роду *Brucella*. На сьогодні відомо 9 видів бруцел. Найбільший антропоозонозний потенціал мають види *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*. Інші представники роду патогенні лише для певного виду тварин, хоча є дані, що *B. ceti* та *B. pinipedialis*, які уражають морських ссавців, можуть бути патогенними для людей [1, 2, 3, 4].

Епізоотична ситуація щодо бруцельозу тварин у багатьох регіонах світу є загрозливою та нестабільною. У 2012 р. клінічні прояви бруцельозу, спричиненого *B. abortus* реєстрували в 52 країнах світу, *B. melitensis* – у 40, а *B. suis* – у 12 відповідно. Україна є благополучною щодо бруцельозу тварин з 1975 року, однак на сьогодні існують ризики занесення бруцельозу тварин з неблагополучних щодо цієї інфекції країн (зокрема, Російської Федерації, Грузії, Туреччини, Греції, Сербії, Ірану, Монголії, Китаю) під час експортно-імпорتنих операцій або міграції представників дикої фауни. Усе це піднімає питання контролю бруцельозу на високий державний рівень.

Для діагностики бруцельозу у ветеринарній практиці використовують клініко-епізоотологічні дослідження, серологічні тести (РБП, РА, КР, РЗК, РТЗК, РІД, ІФА), алергопробу, бактеріологічні дослідження (ізоляція та ідентифікація збудника) і біопробу на лабораторних тваринах [5, 6, 7]. Усі перелічені методи вельми трудомісткі, вимагають значної кількості засобів і часу, крім того, деякі з них недостатньо специфічні, що вимагає проведення комплексних досліджень.

Упровадження нових швидких, специфічних і високочутливих методів діагностики бруцельозу є актуальним напрямом досліджень. Одним з таких є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), запропонований в 1983 році американським вченим До. Б. Мюллісом [9, 10].

У 1990 році D. Fekete et al. уперше застосували метод ПЛР для детекції бруцел, пізніше окремі вчені повідомили про успішне використання даного методу для родової та видової ідентифікації цих мікроорганізмів [4, 5]. За літературними даними ПЛР проявила себе як високоспецифічний і чутливий метод лабораторної діагностики у разі гострого і хронічного перебігу бруцельозу у людей та ВРХ, який перевершує за чутливістю та специфічністю традиційні бактеріологічний і серологічний методи [7, 8, 12, 13].

Метою наших досліджень було розробити оптимальні параметри постановки ПЛР з праймерами специфічними до ділянки гена BCSP 31, що типові для всього роду бруцел [7, 9, 13] та визначити специфічні ділянки, що відповідають нуклеотидній послідовності ДНК генів збудників *B. suis* та *B. abortus*.

**Матеріали та методи.** Постановку ПЛР проводили на базі лабораторії молекулярної епізоотології та діагностики ННЦ «ІЕКВМ». Відбір зразків ДНК матеріалу з типовими видоспецифічними характеристиками, та попередні вивчення культурально-морфологічних, тінкторіальних і антигенних властивостей штамів бруцел (референтних та епізоотичних) здійснювали на базі лабораторії вивчення бруцельозу ННЦ «ІЕКВМ».

Для дослідження сумарної ДНК збудника бруцельозу були використані наступні зразки:

- 1) зразки референтного матеріалу:
  - виробничий штам *B. abortus* 19-770;
  - виробничий штам *B. abortus* B-1;
  - типовий штам *B. abortus* 544;
  - типовий штам *B. suis* 1330;
  - комерційний єдиний бруцельозний антиген для РА, РЗК (РТЗК) з штаму *B. abortus* 19 (розведення 1:10);
- 2) епізоотичні штами:
  - *B. abortus* (28/210, 34/394, 42/780, 48/3990, 160/528, 88/7-26);
  - *B. suis* (161/1600, 167/1586, 170/77, 171/0184, 172/112);
- 3) зразки контролю:
  - епізоотичні штами *B. ovis* (67/Б, 76/982);
  - деіонізована вода.

Тридобові агарові культури штамів змивали фізіологічним розчином 0,85 % NaCl рН (6,8–7,2). Виготовляли суспензію, яку стандартизували до концентрації  $10^8$  КУО/см<sup>3</sup>, інактивували на водяній бані за температури 100 °С упродовж 30 хв. Зразки фасували в епідорфи по 0,5 см<sup>3</sup> і зберігали для подальших досліджень за температури -20 °С.

Ізоляцію сумарної ДНК проводили за допомогою комерційного набору для екстракції ДНК «ДНК-сорб-В» виробництва «ЦНДІЕ» (РФ). Напрацьовані зразки ДНК використовували для постановки ампліфікації за допомогою базових наборів АмпліСенс (РФ) та системи праймерів із застосуванням адаптованого методу постановки ампліфікації. Ампліфікацію зразків проводили за допомогою наборів «АмпліСенс», виробництва ФГУН «ЦНДІЕ РосСпоживНагляд» (РФ). Електрофоретичний аналіз проводили за допомогою набору для електрофорезу виробництва НВО Нарвак, РФ. Концентрація агарози в гелі складала 1,5 %, напруга у електрофоретичній камері відповідає 120 В.

## Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

Ампліфіковані фрагменти аналізованої ДНК виявляли у вигляді світлих жовтогарячих смужок при проходженні УФ- випромінювання з довжиною хвилі 310 нм. У негативному контрольному зразку (деіонізована вода) смужки були відсутні.

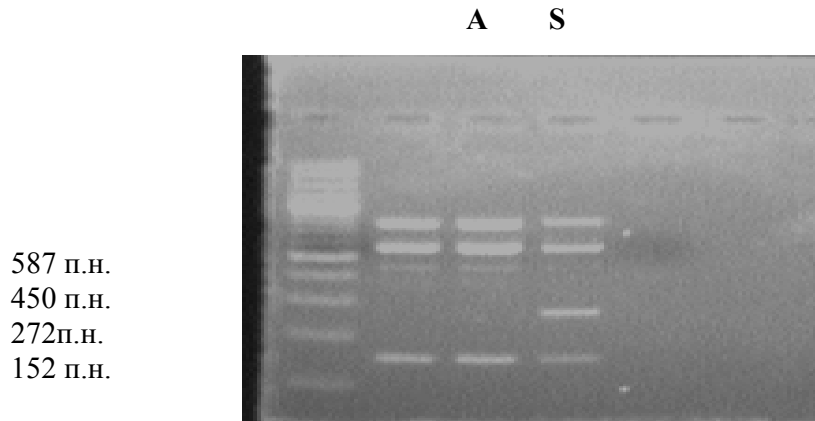
Подальші дослідження проводили згідно до лабораторного регламенту виявлення бруцел методом ПЛР.

Отримані результати документували фотографуванням гелів з використанням комп'ютерних систем з цифровими відеокамерами.

**Результати досліджень.** На першому етапі наших досліджень було проведено серію дослідів щодо визначення параметрів типізації референтних, виробничих та епізоотичних штамів бруцел в ПЛР із застосуванням певного набору праймерів для визначення типових для різних видів фрагментів ДНК.

Перший етап досліджень був присвячений визначенню та розробці протоколу оптимальних параметрів ампліфікації та температурних циклів відпалу підібраних праймерів. Також визначена оптимальна концентрація агарозного гелю при постановці електрофорезу.

Для цього провели попередні досліді з визначення типових фрагментів ДНК генів штамів *B. abortus* 19-770 і *B. suis* 1330.

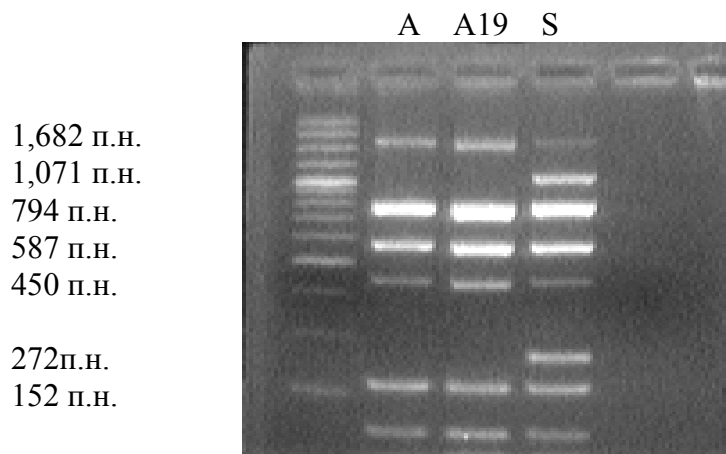


**Рис. 1.** Електрофореграма ПЛР типування референтних штамів *B. abortus* та *B. suis* (А – зразок ДНК *B. abortus* 19-770, S – зразок ДНК *B. suis* 1330)

На рисунку відображені смужки з довжиною хвилі від 152 п.н. до 587 п.н. При ампліфікації ділянки з гена *B. abortus*, *B. suis* не вдалося виявити окремі нуклеотидні послідовності, що є характерними для бруцел (довжиною від 587 п.н до 1682 п.н.). Однак, нами була виявлена смужка з довжиною хвилі 272 п.н., що відповідає специфічній нуклеотидній послідовності ДНК гену збудника *B. suis*.

У подальшому були проведені досліді з удосконалення протоколів ампліфікації та температури відпалу праймерів, здійснені розрахунки з оптимізації реакційної суміші (рис. 2). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містить 2,5 мкл десятикратного ПЛР-буфера (з 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 0,5 ОД Taq-ДНК-полімерази – 0,7 мкл, по 8,0 мкл праймерів MhpF/R (з концентрацією 1 пМ/мкл), 13 Master mix, 2 мкл розчину досліджуваної проби сумарної ДНК і до 25 мкл деіонізованої води. Температура відпалу складала 95 °С впродовж 7 хв., 95 °С 35 с, 64 °С 45 с, 72 °С 3 хв., 72 °С 3 хв.

Після удосконалення параметрів були проведені повторні дослідження з визначення фрагменту ДНК гена збудників *B. abortus* і *B. suis*.



**Рис. 2.** Електрофореграма ПЛР типування штамів бруцел (A19 – зразок ДНК *B. abortus* 19-770, А – зразок ДНК *B. abortus* 544, S – зразок ДНК *B. suis* 1330.

У процесі відпрацювання методики постановки та удосконалення параметрів ПЛР, було встановлені видові та родові відмінності збудників, що дозволило типувати представників видів *B. abortus* і *B. suis*. Визначена специфічна смужка з довжиною хвилі 272 п.н., що відповідає специфічній нуклеотидній послідовності ДНК гена збудника *B. suis*.

Встановлено, що оптимальною концентрацією агарозного гелю в електрофорезі є 1,5 % за сили струму 30 мА та напруженості електричного поля 15 В/см.

Таким чином, розпочаті дослідження з визначення специфічності та чутливості методу ПЛР для типування польових ізолятів і музейних штамів бруцел видів *B. abortus* і *B. suis*.

Висока специфічність ПЛР є важливим чинником при проведенні диференційної діагностики бруцельозу з іншими інфекційними захворюваннями, збудники яких мають спільні антигенні детергенти з бруцелами.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому планується проведення робіт з молекулярно-генетичної паспортизації музейних штамів та ізолятів, що зберігаються в колекції штамів і мікроорганізмів ННЦ «ІЕКВМ» **Висновки.** 1. Сформовано попередні дані секвенованих послідовностей геномного матеріалу збудників бруцельозу (*B. abortus* і *B. suis*), встановлені видові та родові відмінності їх геному.

2. Встановлені оптимізовані протоколи ампліфікації, які забезпечують високу специфічність і чутливість реакції при детекції ДНК збудника бруцельозу.

#### Список літератури

1. Бусол, В.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных [Текст] / В.А. Бусол, А.Ф. Бабкин, П.Н. Жованик. – К. : Урожай, 1991. – 176 с.
2. Балахонов, С.В. Оптимизация детекции бруцелл с помощью полимеразной цепной реакции [Текст] / С.В. Балахонов, М.Ю. Шестопалов, А.И. Калиновский // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 1996. – № 4. – С. 33–35.
3. Шумилов, К.В. Идентификация бруцелл методом ПЦР [Текст] / К.В. Шумилов [и др.] // Ветеринария. – 1996. – № 12. – С. 19–23.
4. Шарова, И.Н. Совершенствование тест-системы для выявления возбудителя бруцеллеза методом ПЦР [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук / И.Н. Шарова. – Саратов, 2001. – 20 с.
5. Інструкція про заходи з профілактики та боротьби з бруцельозом тварин [Текст] / затв. Департаментом вет. медицини Мінагропрому України № 4 від 25.01.2000. – К., 2000. – 20 с.
6. Настанова по діагностиці бруцельозу тварин [Текст] / затв. Міністерством АПК України № 15-14/55 від 10.02.1998. – К., 1998. – 58 с.
7. Желудков, М.М. Метод ПЦР для идентификации и дифференциации бруцелл [Текст] / М.М. Желудков, Ю.К. Кулаков, Т.А. Толмачева // Материалы IX съезда Всерос. науч.-практ. общ-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2007. – Ч. 3. – С. 5.
8. Дубинина, И.Г. Роль метода полимеразной цепной реакции в генодиагностике [Текст] / И.Г. Дубинина // Новые генетические технологии. – М., 1998. – С. 20–37.
9. Дентовская, С.В. Использование молекулярно-генетических подходов для лабораторной диагностики бруцеллеза [Текст] / С.В. Дентовская, А.Н. Куличенко // Пробл. особо опасных инф. – Саратов, 1999. – С. 3–11.
10. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* de DNA amplification [Text] / G.G. Baily [et al.] // J. Trop. Med. Hyg. – 1992. – Vol. 95, № 4. – P. 271–275.
11. Bassam, B.J. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [Text] / B.J. Bassam, G. Gaetano-Anolles, P.M. Gresshoff // Anal. Biochem. – 1991. – Vol. 196. – P. 80–83.
12. Rapid and simple method for purification of nucleic acids [Text] / R. Boom [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28. – P. 495.
13. Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure C-erb B-2 oncogene amplification [Text] / S. Jelmini [et al.] // Clin. Chem. – 1997. – Vol. 43, № 5. – P. 752–758.

#### TYPING OF ANIMAL BRUCELLOSIS AGENTS BY PCR

*Degtiaryov I.M., Orlov S.M., Obuhovska O.V., Gerilovych A.P., Solodianskin O.S., Goraichuk I.V.*

*National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov*

*The research to test the parameters of the PCR for typing of field isolates and museum strains of *Brucella* species *B. abortus* and *B. suis* has been conducted. Specific and generic differences between their genome were established. The specificity of the strip with a wavelength of 272 bp, which corresponds to the nucleotide sequence of the DNA of the gene *B. suis* was defined.*

УДК 619: 616.98:579.882.11-07

#### УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ РЕТРОСПЕКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗА ЖИВОТНЫХ

*Евстифеев В.В., Барбарова Л.А., Нигматуллина Д.И., Хусаинова Г.И., Мифтахов Н.Р.*

*ФГБУ «Федеральный Центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация*

Несмотря на достижения в молекулярной биологии в последние десятилетия и внедрение новых методов диагностики, таких как ПЦР в ветеринарную практику основными и массовыми исследованиями на хламидиоз у животных остаются ретроспективные методы РСК и ИФА. Они основаны на выявлении специфических антител в сыворотках крови животных к хламидиям, выявляемым при помощи антигенов обладающих родовой специфичностью по отношению к этим возбудителям.

Однако имеющиеся в настоящий момент способы изготовления этих антигенов, не позволяют добиться нужной чувствительности, специфичности и активности препаратов или же не имеют промышленных (полупромышленных) перспектив ввиду сложности изготовления и получения малых объемов антигенов. Одновременно с этим, имеющиеся способы вредны ввиду применения в технологии изготовления антигенов сильнодействующих и ядовитых веществ, наносящих вред здоровью человека и загрязняющие окружающую среду.

Несмотря на то, что метод ИФА применялся различными исследователями для диагностики хламидиоза и даже были разработаны наборы, все это осталось только на уровне научных исследований и не нашло применения в широкой ветеринарной практике ввиду отсутствия способа получения таких антигенов, которые при условии получения высокой специфичности и активности, необходимой для постановки ИФА, имели бы промышленную технологию изготовления.

В ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» было налажено серийное производство «Наборов антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов животных» на основе родоспецифического антигена хламидий изготавливаемого по методу Боровика Р.В. с соавторами (Авт. св-во № 543259, 1976 г.) в технологии изготовления, которого использовали 2-меркаптэтанол, являющийся сильнодействующим ядовитым веществом. Антигены, приготовленные по этому способу, не всегда удовлетворяли своей активностью, иногда проявляли антикомплементарные свойства и не позволяли выявлять специфические антитела методом ИФА ввиду своей низкой специфичности.

Исходя из этого, необходимо было разработать метод получения специфического хламидийного антигена, который бы имел более высокую активность и специфичность по сравнению с аналогами позволяя проводить исследования в РСК и ИФА. Одновременно с этим из технологии следовало исключить 2-меркаптэтанол, что сильно затрудняло его изготовление ввиду специальных условий производства.