

// Зоотехнія.– 1996.– №10.– С. 13–15.

5. **Плохинский Н.А.** Руководство по биометрии для зоотехников.– М.: Колос, 1969.– 352 с.

6. **Меркурьева Е.К.** Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных.– М.: Колос, 1970.– 423 с.

УДК 636.09:619:[616.98+579.834]

# Полімеразна ланцюгова реакція для виявлення ДНК патогенних лептоспир

**Анотація.** Наведено результати розробки та валідації методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК патогенних лептоспир за міжнародними вимогами. Встановлено, що розроблена праймерна система проявляє виражену гібридизаційну активність по відношенню до ДНК-матриці при 45°C з концентрацією іонів магнію у реакційній суміші 1,5 мМ/мкл. Представлені показники визначення чутливості, межі виявлення та специфічності методики, які свідчать про можливість її застосування з метою виявлення ДНК патогенних лептоспир при діагностиці лептоспирозу в господарствах України.

**Ключові слова:** лептоспіра, ДНК, ПЛР у режимі реального часу, протокол ампліфікації, оптимізація.

**Development and validation of method of polymerase chain reaction in real time for detection DNA of pathogenic leptospira.** VITALIY V. UKHOVSKIYI, LARISA M. MUZYKINA<sup>1</sup>, IGOR V. GALKAI, VLADYSLAV G. SPYRYDONOV<sup>2</sup> (1 – Institute of veterinary medicine of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv; 2 – Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv)

**Abstract.** The results of the development and validation of the method of PCR real-time for detection DNA of pathogenic leptospira by international guidelines. It was established that the developed primer hybridization system shows pronounced activity against DNA template at 45°C the concentration of magnesium ions in the reaction mixture of 1,5 mM/microliter. Presented parameters determine the sensitivity, specificity and limits of detection techniques that suggest the possibility of its use to detect DNA of pathogenic leptospira in the diagnosis of leptospirosis in farms Ukraine.

**Keywords:** leptospira, DNA, PCR real-time, amplification protocol, optimization.



\* Рецензенти: докт.вет.наук, проф., НУБіП України **Недосєков**

**В.В.;** канд.вет.наук, ст.н.с., ДНДІЛДВСЕ **Іванов М.Ю.**

**В.УХОВСЬКИЙ, Л.МУЗИКІНА<sup>1</sup>, І.ГАЛКА,**  
кандидати вет.наук<sup>1</sup>

**В.СПИРИДОНОВ,** докт. с.-г. наук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

<sup>2</sup>Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК НУБіП, м. Київ

**Л**ептоспіроз - це один з найпоширеніших у всьому світі антропозоонозів, у природних умовах частіше хворіють свині та велика рогата худоба, сприйнятливі також коні, вівці, кози, буйволи, лисиці, норки, пєсці, птиця, собаки, білі миші, комахоїдні,

## Перелік штамів лептоспір та їх серогрупова і сероваріантна відповідність

Серогрупа	Серовар	Штами	Вид лептоспір
<i>Javanica</i>	<i>Javanica</i>	<i>Veldrat Bataviae</i> 46	<i>L. interrogans</i>
<i>Bataviae</i>	<i>Djatzi</i>	HS 26	<i>L. interrogans</i>
<i>Mini</i>	<i>Szwajizak</i>	<i>Szwajizak</i>	<i>L. interrogans</i>
<i>Sejroe</i>	<i>Polonica</i>	493 Poland	<i>L. interrogans</i>
<i>Hebdomadis</i>	<i>Kabura</i>	<i>Kabura</i>	<i>L. interrogans</i>
<i>Tarassovi</i>	<i>Tarassovi</i>	<i>Perepelicyni</i>	<i>L. interrogans</i>
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	<i>L. interrogans</i>
<i>Grippotyphosa</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Moskva</i> V	<i>L. interrogans</i>
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	<i>Hond Utrecht</i> IV	<i>L. interrogans</i>
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Copenhageni</i>	M 20	<i>L. interrogans</i>
<i>Louisiana</i>	<i>Louisiana</i>	LSU	<i>L. interrogans</i>
<i>Shermani</i>	<i>Shermani</i>	LT 821	<i>L. interrogans</i>
<i>Panama</i>	<i>Panama</i>	CZ 214 K	<i>L. interrogans</i>
<i>Celledoni</i>	<i>Whitcombi</i>	<i>Whitcomb</i>	<i>L. interrogans</i>
<i>Australis</i>	<i>Bratislava</i>	<i>Jez-bratislava</i>	<i>L. interrogans</i>
<i>Autumnalis</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Akiyami</i> A	<i>L. interrogans</i>
<i>Cynopteri</i>	<i>Cynopteri</i>	<i>Vleermuis</i> 3868	<i>L. interrogans</i>
<i>Pyrogenes</i>	<i>Pyrogenes</i>	<i>Salinem</i>	<i>L. interrogans</i>
<i>Ballum</i>	<i>Ballum</i>	<i>Mus</i> 127	<i>L. interrogans</i>

хижаки і сумчасті. За своєю актуальністю, епізоотологічним значенням він знаходиться поряд з туберкульозом та бруцельозом, а за кількістю відомих сероварів лептоспіри поступаються лише ентеробактеріям [1, 2]. Збудником хвороби є спірохети, виділені в самостійне сімейство *Leptospiraceae*, порядку *Spirochaetales*, у який включений рід *Leptospira*, об'єднуючий два види лептоспір: *L. interrogans* (патогенні лептоспіри) та *L. biflexa* (лептоспіри-сапрофіти).

Останнім часом ведуться активні дослідження з розробки і використання ПЛР для визначення генетичних та патологічних характеристик лептоспір і діагностики лептоспірозу [4].

За допомогою ПЛР можливо виявляти незначні кількості ДНК лептоспір у клінічних зразках, у навколишньому середовищі та при ідентифікації культур. Рання діагностика лептоспірозу має велике значення, оскільки, тяжка форма хвороби може перебігати блискавично [5, 6].

ПЛР, на думку багатьох авторів, зарекомендувала себе як сучасний метод діагностики лептоспірозу, що

дає змогу виявляти ДНК збудника у органах, тканинах та сечі в перші дні після зараження. Особливо слід відмітити те, що за допомогою ПЛР можна проводити контроль санації нирок після антибіотикотерапії.

В Україні розроблена лише діагностична тест-система класичної ПЛР щодо детекції ДНК патогенних лептоспір з обліком результатів аналізу електрофорезом в агарозному гелі [7].

**Мета роботи. Розробити та провести валідацію методики виявлення ДНК патогенних лептоспір шляхом постановки якісної полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу та здійснити оптимізацію умов проведення реакції ампліфікації.**

З метою аналізу нуклеотидних послідовностей з баз даних *GenBank* в режимі *on-line* були зібрані опубліковані ділянки геному патогенних лептоспір, котрий кодує синтез ліпопротеїну зовнішньої мембрани лептоспір *LipL* 32 (основний білок зовнішньої мембрани,

## Характеристика олігонуклеотидних праймерів для детекції ДНК патогенних лептоспир

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність, 5'-3'	Координати згідно гену <i>LipL 32*</i>
<i>LipL 32 F</i>	CGGATAYGTAAAGCCAGGACAAG	199-221
<i>LipL 32 R</i>	CGAACTCCCATTTTCAGCGATTA	285-306
<i>LipL 32 P</i>	FAM-CGGACGGTTTAGTCGAYGGAAACA-BHQ1	225-248

\*GenBank: KC800990, *Leptospira interrogans* serovar *Canicola*

що демонструє високий ступінь експресії в організмі інфікованого господаря).

Ампліфікацію продуктів ПЛР проводили за допомогою приладу ампліфікації ДНК у реальному часі *Rotor-Gene 6000Q* (виробник «QIAGEN Hilden», Німеччина).

Екстрагували ДНК сорбентним методом, з використанням комплекту реагентів для виділення ДНК «ДНК-сорб-В» (ФГУ «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россія).

Склад реакційної суміші та температурні параметри ампліфікації визначали з використанням ДНК 7-ми референтних штамів патогенних лептоспир: *493 Poland* (серогрупа *Sejroe*), *Kabura* (серогрупа *Hebdomadis*), *Perepelicyni* (серогрупа *Tarassovi*), *Pomona* (серогрупа *Pomona*), *Moskva V* (серогрупа *Grippotyphosa*), *Hond Utrecht IV* (серогрупа *Canicola*), *M 20* (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*).

Чутливість методики перевіряли з використанням ДНК-екстракту референтного патогенного штаму лептоспир *M 20* (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*).

Специфічність методики вивчали на таких штамів мікроорганізмів: сапрофітний вид *Leptospira biflexa*, штам *Patoc 1* (серогрупа *Semarang*); *Chlamydomphila psittaci*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Brucella abortus*; *Actinobacillus lignieresii*; *Salmonella cholerae suis*; *Salmonella dublin*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus zooepidemicus*; *Pasteurella multocida*; *Fusobacterium necrophorum*; *Clostridium perfringens*; *Clostridium septicum*.

Всього під час проведення дослідів було використано 19 штамів патогенних лептоспир (табл.1).

Валідацію методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК патогенних лептоспир проводили відповідно до стандартів у бактеріологічному секторі лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН України, що має рівень біобезпеки BSL 2, та акредитованої за міжнародним стандартом ISO-17025.

**Результати досліджень.** На першому етапі нашої роботи був проведений аналіз нуклеотидних послідовностей ділянки гену *Lip L 32*.

Для цього з баз даних *GenBank* в режимі *on-line* були зібрані опубліковані ділянки геному патогенних лептоспир, котрий кодує синтез ліпопротеїдну *Lip L 32* – основного білка зовнішньої мембрани патогенних лептоспир, який, за даними ряду авторів [8, 9], присутній лише у патогенних лептоспир і повністю відсутній у сапрофітних.

Проведено аналіз консервативних ділянок нуклеотидних послідовностей гену *LipL 32* різних штамів патогенних лептоспир шляхом множинного вирівнювання цільових послідовностей. Виявлена консервативна ділянка була використана для підбору праймерів та зонду із використанням комп'ютерного програмного забезпечення *Primer Express* (*Applied Biosystems*, США).

Таким чином, за допомогою комп'ютерної програми було розроблено специфічну праймерну пару (табл. 2).

Зонд для детекції ампліфікації у реальному часі було відмічено флуоресцентним барвником FAM, на 5'кінці олігонуклеотиду та гасником флуоресценції BHQ1 – на 3'кінці.

Нуклеотидна послідовність розроблених праймерів відповідає консервативній ділянці геному збудників лептоспірозу тварин та людини, а саме: гену мембранного протеїну, властивого до геномного складу патогенних серогруп лептоспир.

На основі проведеного пошуку у програмному модулі *BLAST on-line* встановлено, що підібрані послідовності праймерів специфічні лише до збудників лептоспірозу, тому є змога виключити ймовірність перехресного відпалу з матрицями нуклеїнових кислот інших бактерій, вірусів та ссавців.

**Вивчення специфічності ампліфікації при різних температурах відпалу праймерів.**

На першому етапі були застосовані зразки ДНК референтних штамів патогенних лептоспир семи серогруп: *493 Poland* (серогрупа *Sejroe*), *Kabura* (серогрупа *Hebdomadis*), *Perepelicyni* (серогрупа *Tarassovi*), *Pomona* (серогрупа *Pomona*), *Moskva V* (серогрупа *Grippotyphosa*), *Hond Utrecht IV* (серогрупа *Canicola*) та *M 20* (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*). Результати досліджень наведені в табл.3.

Ефективність специфічного відпалу праймерів *Lip L 32* на матрицях ДНК патогенних лептоспир при різних температурах (40 циклів ампліфікації)

Серогрупа лептоспир	Показники РТ ПЛР (Ct) за різної температури відпалу (Threshold – 0,02)			
	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C
<i>L. Sejroe</i>	24,17	24,07	25,18	25,47
<i>L. Hebdomadis</i>	25,16	25,50	26,26	27,09
<i>L. Tarasovi</i>	25,54	25,93	26,35	27,33
<i>L. Pomona</i>	22,26	22,36	23,66	24,27
<i>L. Grippotyphosa</i>	23,36	23,79	24,93	24,98
<i>L. Canicola</i>	24,88	25,91	26,79	26,29
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	22,95	23,84	24,88	25,14
K-	-	-	-	-

При випробуванні традиційних режимів відпалу праймерів від 45 до 60 °C встановлено, що олігонуклеотидна система *Lip L 32* специфічно реагує з ДНК патогенних лептоспир в градієнті температур від 45 до 60 °C. Амплікон виявлено в усіх проаналізованих семи зразках ДНК патогенних лептоспир. Пониження робочої температури відпалу призводило до збільшення порогу чутливості появи специфічних ампліконів. При підвищенні температури відпалу на кожні 5 °C чутливість методики знижувалась (табл.3).

Отже встановлено, що оптимальною температурою відпалу для індикації ДНК патогенних лептоспир можна вважати режими 45 °C без втрати чутливості методики.

**Підбір оптимального вмісту іонів магнію у реакційній суміші.**

Наступним етапом дослідження був підбір оптимального вмісту іонів магнію (оптимальна кількість  $MgCl_2$ ) у реакційній суміші, оскільки синтез ланцюга ДНК можливий лише при їх наявності. У якості матриці використовували ДНК-екстракти

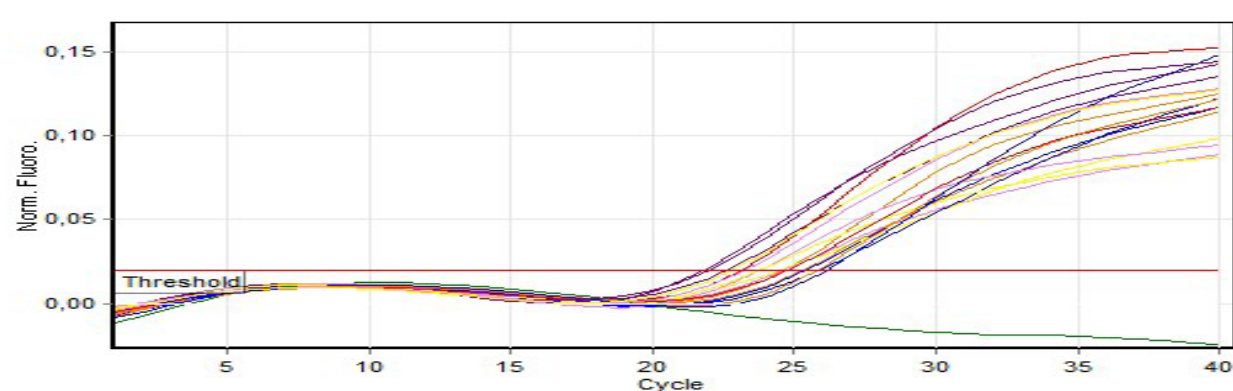
Таблиця 4

Ампліфікація ДНК патогенних лептоспир при різних концентраціях іонів магнію (40 циклів ампліфікації)

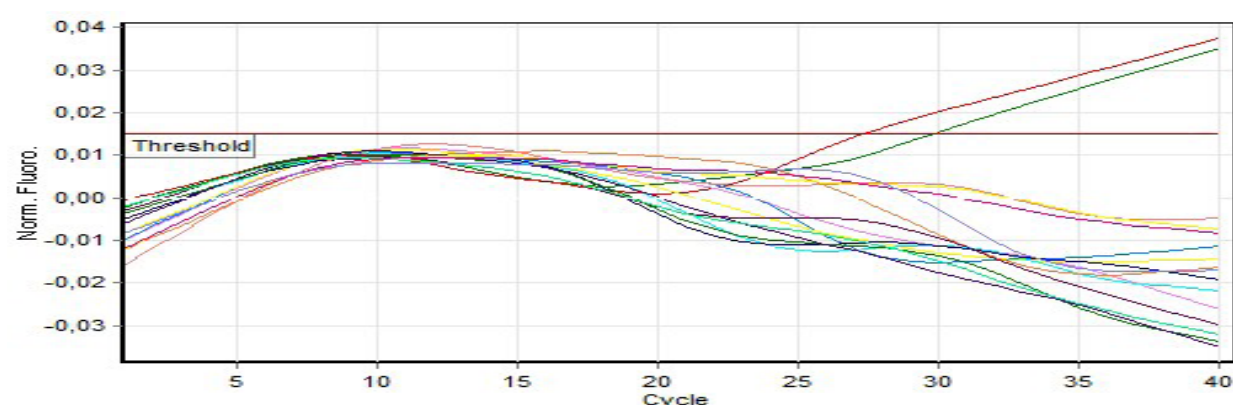
Серогрупа лептоспир	Показники РТ ПЛР (Ct) за різної концентрації магнію хлориду ( $MgCl_2$ ) (Threshold – 0,02)			
	1,5 мМ/мкл	2,0 мМ/мкл	2,5 мМ/мкл	3,0 мМ/мкл
<i>L. Sejroe</i>	23,16	24,35	24,17	24,80
<i>L. Hebdomadis</i>	24,70	25,31	25,16	25,84
<i>L. Tarasovi</i>	25,47	25,87	25,54	26,15
<i>L. Pomona</i>	21,83	22,62	22,26	22,05
<i>L. Grippotyphosa</i>	24,66	23,79	23,36	23,26
<i>L. Canicola</i>	30,61	28,84	24,88	25,85
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	24,50	23,79	22,95	22,81
K-	-	-	-	-

## Ампліфікація ДНК патогенних лептоспір при різних концентраціях мікробних клітин

Концентрація лептоспір, мікробних клітин/мл	Кількість мікробних клітин взята для виділення ДНК	Значення Ct по каналу FAM/Green	Результати аналізу щодо виявлення ДНК патогенних лептоспір
$4 \times 10^6$	$4 \times 10^5$	20,56	Позитивний
$4 \times 10^5$	$4 \times 10^4$	22,76	Позитивний
$4 \times 10^4$	$4 \times 10^3$	26,81	Позитивний
$4 \times 10^3$	$4 \times 10^2$	30,26	Позитивний
$4 \times 10^2$	$4 \times 10^1$	0	Негативний
$4 \times 10^1$	4	0	Негативний
К-		0	Негативний



Результати ампліфікації ДНК 19-ти патогенних серогруп лептоспір щодо визначення специфічності



Ампліфікація ДНК патогенних лептоспір, сапрофітних лептоспір та інших мікроорганізмів (хламідій, мікоплазм, сальмонел та ін.) щодо визначення специфічності

7-ми референтних штамів патогенних лептоспір.

Випробовували ефективність ампліфікації з використанням наступних кількостей  $MgCl_2$ : 1,5 мМ/мкл; 2,0 мМ/мкл; 2,5 мМ/мкл; 3,0 мМ/мкл. (табл. 4).

Оцінка результатів ампліфікації показала, що оптимальною концентрацією іонів  $MgCl_2$  для одержання специфічної ділянки ДНК патогенних лептоспір є 1,5

мМ/мкл. При інших концентраціях (2,0 мМ/мкл; 2,5 мМ/мкл; 3,0 мМ/мкл) кількісні показники Ct були значно вищими, що свідчить про зниження чутливості системи індикації утворення специфічного амплікону (фрагменту гена *Lip L 32*).

**Визначення чутливості методики РТ ПЛР.** Для визначення чутливості створеної тест-системи ми про-

## Оцінка специфічності методики ПЛР у режимі реального часу для виявлення ДНК патогенних лептоспір

Культура	Значення Ct по каналу FAM/ Green	Аналіз щодо виявлення ДНК патогенних лептоспір
<i>Leptospira Javanica</i> «Veldrat Bataviae 46»	24,57	Позитивний
<i>Leptospira Bataviae</i> «HS 26»	21,57	Позитивний
<i>Leptospira Mini</i> «Szwajizak»	23,62	Позитивний
<i>Leptospira Sejroe</i> «493 Poland»	24,17	Позитивний
<i>Leptospira Hebdomadis</i> «Kabura»	25,16	Позитивний
<i>Leptospira Tarassovi</i> «Perepelicyни»	25,54	Позитивний
<i>Leptospira Pomona</i> «Pomona»	22,26	Позитивний
<i>Leptospira Grippytyphosa</i> «Moskva V»	23,36	Позитивний
<i>Leptospira Canicola</i> «Hond Utrecht IV»	24,88	Позитивний
<i>Leptospira Icterohaemorrhagiae</i> «M 20»	22,95	Позитивний
<i>Leptospira Louisiana</i> «LSU»	23,71	Позитивний
<i>Leptospira Shermani</i> «LT 821»	24,57	Позитивний
<i>Leptospira Panama</i> «CZ 214 K»	23,87	Позитивний
<i>Leptospira Celledoni</i> «Whitcomb»	25,43	Позитивний
<i>Leptospira Australis</i> «Jez-bratislava»	28,37	Позитивний
<i>Leptospira Autumnalis</i> «Akiyami A»	24,63	Позитивний
<i>Leptospira Cynopteri</i> «Vleermuis 3868»	25,18	Позитивний
<i>Leptospira Pyrogenes</i> «Salinem»	22,95	Позитивний
<i>Leptospira Ballum</i> «Mus 127»	23,47	Позитивний
<i>Leptospira Semarang</i> «Patoc 1» (сапрофітний)	0	Негативний
<i>Actinobacillus lignieresii</i> «Малинівський»	0	Негативний
<i>Salmonella cholerae suis</i> «Запорізький 32»	0	Негативний
<i>Salmonella dublin</i> «Донецький-515»	0	Негативний
<i>Escherichia coli</i> «Миргородський 1»	0	Негативний
<i>Staphylococcus aureus</i> «Шахтарський-1»	0	Негативний
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	0	Негативний
<i>Pasteurella multocida</i> «Полонський»	0	Негативний
<i>Fusobacterium necrophorum</i> «Чернігівський»	0	Негативний
<i>Clostridium perfringens</i> тип А «Запорізький»	0	Негативний
<i>Clostridium septicum</i> «Черкаський-97»	0	Негативний
<i>Chlamydomphila psittaci</i>	0	Негативний
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	0	Негативний
<i>Brucella abortus bovis</i>	0	Негативний
K-	0	Негативний

водили 10-ти кратні розведення культури референтного патогенного штаму лептоспир М 20 (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*). У дослідженні використовували наступні концентрації:  $4 \times 10^6$  кл/см<sup>3</sup>,  $4 \times 10^5$  кл/см<sup>3</sup>,  $4 \times 10^4$  кл/см<sup>3</sup>,  $4 \times 10^3$  кл/см<sup>3</sup>,  $4 \times 10^2$  кл/см<sup>3</sup>,  $4 \times 10^1$  кл/см<sup>3</sup>. Після одержання різних розведень культури лептоспир відбирали по 0,1 см<sup>3</sup> з кожного розведення та проводили виділення ДНК. Результати досліджень екстрактів ДНК наведені у табл. 5.

Одержані дані вказують на чутливість тест системи  $4 \times 10^2$  клітин, що відповідає  $4 \times 10^3$  клітин/см<sup>3</sup>.

**Визначення специфічності методики РТ ПЛР.** З цією метою нами були використані референтні штами патогенних лептоспир (усі штами попередньо були перевірені в реакції мікроаглютинації з гомологічними аглютинуючими сироватками), сапрофітних лептоспир та інших мікроорганізмів (хламідій, мікоплазм, сальмонел тощо).

Специфічність методики визначали шляхом ампліфікації екстрагованої ДНК та гібридизаційно-флуоресцентної детекції продуктів ампліфікації в режимі реального часу. Результат ампліфікації ДНК патогенних лептоспир враховували на каналі FAM/Green. Результати досліджень наведені в табл. 5 та на рис. 1, 2.

В результаті проведених досліджень було встановлено, що розроблена методика полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для виявлення ДНК патогенних лептоспир дає змогу виявляти лише ДНК штамів патогенних лептоспир (*Leptospira interrogans*). Проби культур сапрофітних лептоспир (*Leptospira biflexa*) та мікроорганізмів інших видів були негативні.

#### **Висновки.**

1. На підставі аналізу нуклеотидних послідовностей гену ліпопротеїну зовнішньої мембрани Lip L 32 патогенних лептоспир виявлені консервативні ділянки, що дозволили провести розрахунок специфічних праймерів LipL 32 F/R.

2. На основі цих праймерів був створений протокол виявлення ДНК патогенних лептоспир при 40-цикліч-

ній ампліфікації з температурою відпалу 45°C та вмістом іонів магнію в реакційній суміші на рівні 1,5 мМ/мкл, що є специфічним, точним і забезпечує детекцію ДНК патогенних лептоспир в зразках з кількістю 400 клітин в пробі, що відповідає 4000 клітин/см<sup>3</sup>.

#### **ЛІТЕРАТУРА**

1. **Малахов Ю. А., Панин А. Н., Соболева Г.Л.** Лептоспироз животных.– Я.: ДИА-пресс, 2000.– 584с.
2. *Leptospirosis worldwide // Weekly Epidemiol. Rec.– 1999.– Vol. 74.– P. 237–242.*
3. **Наконечна Т.** Епізоотологічна та епідеміологічна ситуація з лептоспирозу на півдні України // *Ветеринарна медицина України.– 2002.– №7.– С. 27–29.*
4. **Bomfim M.R., Koury M.C.** Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira* spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis // *Vet. Microbiol.– 2006.– Vol. 118 (3-4)– P. 278–288.*
5. **Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P.** *Leptospira and leptospirosis.– Melbourne, Australia: MediSci, 1999.– 154 p.*
6. **Pinne M., Haake D.A.** LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies // *PLoS One.– 2013.– Vol. 8 (1)– P. 302–310.*
7. **Уховський В.В., Кучерявенко О.О., Куликова В.В. та ін.** Методичні рекомендації щодо індикації ДНК патогенних лептоспир за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.– Ніжин : ПП Лисенко М.М., 2014.– 16 с.
8. **Земская М.С.** Дифференциация лептоспир различных экологических групп на основе гена, кодирующего липопротеин наружной мембраны LipL32 / автореф. дис. на соискание научн. степени канд. мед. наук.– М., 2009.– 24 с.

