

УДК 619:636.7:636.8:575.1:577.2

ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОСТІ ТА ВАЛІДАЦІЯ РОЗРОБЛЕНИХ ПЛР-ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ХЛАМІДІОЗІВ СВІЙСЬКИХ М'ЯСОЇДНИХ

Т. М. Цівенко, І. М. Ксьонз
ctm_vet@ukr.net, igor.ksyonz@ukr.net

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН,
вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, 36013, Україна

Приведено результати з визначення аналітичної специфічності й валідація ПЛР-тест-систем власної розробки для індикації бактерій роду *Chlamydia* у біологічних зразках відібраних від кішок і собак. Розроблені ПЛР-тест-системи включають пари олігонуклеотидних праймерів, що фланкують ділянки ДНК генів *MOMP Chlamydia felis* і *RNase P RNA Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum* та *Chlamydia psittaci*. Метою досліджень було визначення аналітичної специфічності розроблених ПЛР-тест-систем для діагностики хламідійних інфекцій свійських м'ясоїдних та їх валідація.

Валідація тест-систем власної розробки проводилась методом порівняння з іншими ПЛР-тест-системами для індикації та видової диференціації бактерій роду *Chlamydia*.

Матеріалом для тестування служили 19 зразків біологічного матеріалу (контрольні ДНК *C. felis*, *C. abortus*, *C. pecorum* і *C. psittaci*, а також ізоляти хламідій, виділених із епітеліальних зіскрібків слизових оболонок кон'юнктиви, піхви, препуцію, 20 % суспензій біоптатів внутрішніх органів свійських собак і кішок, а також фекалій та епітеліальних зіскрібків зі слизової оболонки прямої кишки диких м'ясоїдних родин котячих та собакових).

Аналіз електрофореграм продуктів ампліфікації зазначених біологічних зразків, отриманих при застосуванні двох розроблених тест-систем і трьох інших ПЛР-тест-систем для індикації бактерій роду *Chlamydia*, а також мультиплексної ПЛР-тест-системи для диференціації хламідій за видами, свідчить про їх повну відповідність.

Результати досліджень підтверджують специфічність зазначених діагностиків і, відповідно, можливість їх застосування для діагностики хламідійних інфекцій свійських м'ясоїдних.

Ключові слова: ХЛАМІДІОЗИ, СВІЙСЬКІ М'ЯСОЇДНІ, ПЛР-ТЕСТ-СИСТЕМА, ОЛІГОНУКЛЕОТИДНІ ПРАЙМЕРИ, *MOMP*, *RNASE P RNA*

SPECIFICITY DETERMINATION AND VALIDATION OF THE PCR TEST-SYSTEMS DEVELOPED FOR DIAGNOSING CHLAMYDIOSIS OF DOMESTIC CARNIVORES

Т. М. Tsivenko, I. M. Ksyonz
ctm_vet@ukr.net, igor.ksyonz@ukr.net

The NAAS Institute for Pig Breeding and Agro-Industrial Production
Shvedska Mogyla Str., 1, Poltava, 36013, Ukraine

The results are presented on determining the analytic specificity and validation of the self-design PCR test-systems for indicating bacteria of the *Chlamydia* genus in biological samples taken from cats and dogs. The developed PCR test-systems include pairs of oligonucleotide primers flanking the areas of *MOMP* genes DNA of *Chlamydia felis* and *RNase P RNA* of *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum* and *Chlamydia psittaci*. The purpose of the study was to determine the analytical specificity of the designed PCR test-systems for diagnosing Chlamydial infections of domestic carnivores and their validation. Validation of the self-design test-systems was performed by the method of comparing them with other PCR test-systems for indication and species differentiation of the *Chlamydia* genus bacteria.

The total of 19 biological material samples served as the material to be tested (control DNA of the four *Chlamydia* species: *C. felis*, *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci* and *Chlamydia* isolates extracted from epithelial scrapes of the conjunctival mucosa, groin, prepuce, 20%-suspensions of visceral biopsy materials from domestic dogs and cats, and faeces and epithelial scrapes from the rectum mucosa of wild carnivores belonging to *Felidae* and *Canidae* families).

Analysis of the amplification products electrophoregrams of the mentioned biological samples obtained by using two designed test-systems and three other PCR test-systems for indicating Chlamydia genus bacteria, as well as the multiplex PCR test-system for differentiating Chlamydia as to their species, proves their absolute adequacy.

The results of the study prove specificity of the mentioned diagnosticums, and respectively, the possibility of their using for diagnosing Chlamydial infections of domestic carnivores.

Keywords: CHLAMYDIOSES, DOMESTIC CARNIVORES, PCR TEST-SYSTEM, OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS, MOMP, RNASE P RNA

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ВАЛИДАЦИЯ РАЗРАБОТАННЫХ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗОВ ДОМАШНИХ ПЛОТОЯДНЫХ

Т. М. Цивенко, И. М. Ксёنز
ctm_vet@ukr.net, igor.ksyonz@ukr.net

Институт свиноводства и агропромышленного производства НААН
ул. Шведская Могила, 1, г. Полтава, 36013, Украина

Представлены результаты по определению аналитической специфичности и валидации ПЦР-тест-систем собственной разработки для индикации бактерий рода Chlamydia в биологических пробах, отобранных от кошек и собак. Разработанные ПЦР-тест-системы включают пары олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих участки ДНК генов MOMP Chlamydia felis и RNase P RNA Chlamydia abortus, Chlamydia pecorum и Chlamydia psittaci.

Целью исследований было определение аналитической специфичности разработанных ПЦР-тест-систем для диагностики хламидийных инфекций домашних плотоядных и их валидация.

Валидация тест-систем собственной разработки проводилась методом сравнения с другими ПЦР-тест-системами для индикации и видовой дифференциации бактерий рода Chlamydia.

Материалом для тестирования служили 19 образцов биологического материала (контрольные ДНК C. felis, C. abortus, C. pecorum и C. psittaci, а также изоляты хламидий, выделенных из эпителиальных соскобов слизистых оболочек конъюнктивы, влагалища, препуция, 20 % суспензий биоптатов внутренних органов домашних собак и кошек, а также фекалий и эпителиальных соскобов со слизистой оболочки прямой кишки диких плотоядных семейств кошачьих и псовых).

Анализ электрофореграмм продуктов амплификации указанных биологических проб, полученных при использовании двух разработанных тест-систем и трёх других ПЦР-тест-систем для индикации бактерий рода Chlamydia, а также мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации видов хламидий, свидетельствует об их полном соответствии.

Результаты исследований подтверждают специфичность указанных диагностикумов и, следовательно, возможность их использования для диагностики хламидийных инфекций домашних плотоядных.

Ключевые слова: ХЛАМИДИОЗЫ, ДОМАШНИЕ ПЛОТОЯДНЫЕ, ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМА, ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПРАЙМЕРЫ, MOMP, RNASE P RNA

Хламідіози свійських кішок та собак, за результатами попередніх досліджень, реєструються у 45 % тварин із симптомами, притаманними цьому захворюванню (ураження очей, органів респіраторного та уrogenітального трактів, суглобів) [1].

Загальноновизнаним є факт, що одним

із найважливіших складових проблеми хламідійних інфекцій, і серед свійських м'ясоїдів зокрема, є їх діагностика. Із лабораторних методів найбільш чутливими та специфічними є молекулярно-генетичні, зокрема полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Разом з тим, точність постановки діагнозу має

пряму залежність від якості ПЛР-тест-системи, що застосовується [1–3].

Нами розроблено дві ПЛР-тест-системи для індикації хламідій у біологічних зразках, отриманих від свійських м'ясоїдних. Тест-система для діагностики хламідіозу кішок містить пару олігонуклеотидних праймерів, що фланкують консервативну ділянку гена, який кодує МОР *Chlamydia felis* [4]. Праймери тест-системи для діагностики хламідіозу собак фланкують консервативну ділянку гена, який кодує RNase P RNA *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum* та *Chlamydia psittaci*, що є патогенними для цього виду тварин.

Метою досліджень було перевірити розроблені ПЛР-тест-системи для діагностики хламідійних інфекцій свійських кішок і собак на аналітичну специфічність з одночасною їх валідацією.

Матеріали і методи

Для досягнення поставленої мети дослідженню піддано 19 зразків наступних біологічних матеріалів: контрольної ДНК *C. felis* (1); контрольної ДНК *C. abortus* (2); контрольної ДНК *C. pecorum* (3); контрольної ДНК *C. psittaci* (4); епітеліального зіскрібка зі слизової оболонки кон'юнктиви кота (5), епітеліального зіскрібка зі слизової оболонки піхви кішки (6); епітеліального зіскрібка зі слизової оболонки препуцію кота (7); 20 % суспензії біоптатів внутрішніх органів кота (8); фекалій ягуара (9); фекалій леопарда (10); фекалій рисі звичайної (11); епітеліального зіскрібка зі слизової оболонки кон'юнктиви пса (12); епітеліального зіскрібка зі слизової оболонки піхви суки (13); епітеліального зіскрібка зі слизової оболонки препуцію пса (14); 20 % суспензії біоптатів внутрішніх органів пса (15); фекалій енотоподібної собаки (16); фекалій полярного вовка (17); фекалій койота (18); епітеліального зіскрібка зі слизової оболонки прямої кишки червоної лисиці (19). Зазначені зразки біологічного

матеріалу обрані з розрахунку на те, що чотири із них є контрольними зразками ДНК, а інші — зразками ДНК, виділеними з ізолятів хламідій, відібраних від свійських і диких м'ясоїдних родини котячих та собакових.

Для валідації розроблених ПЛР-тест-систем з метою діагностики хламідійних інфекцій свійських кішок та собак використовували ПЛР-тест-системи для індикації фрагментів ДНК, що кодують 16S рРНК та МОР представників роду *Chlamydia* патогенних для тварин [5, 6], ПЛР-тест-систему «Полимик» (НПФ «Литех», Россия), а також мультиплексну ПЛР-тест-систему для видової диференціації хламідій [7].

Олігонуклеотидні праймери для розроблених ПЛР-тест-систем були синтезовані за нашим замовленням у фірмі «Thermo Electron Corporation» (Germany). Окрім праймерів, у всіх ПЛР-тест-системах, за винятком комерційно доступної тест-системи «Полимик», використовували реагенти для ПЛР виробництва фірми «Fermentas UAB» (Lithuania), а саме: деіонізовану воду, ПЛР-буфер, $MgCl_2$, розчин dNTP та Taq-полімеразу («Fermentas UAB», Lithuania).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на термоциклері «Терцик-2» виробництва «ДНК-технологии» (Россия).

Фракціювання продуктів ампліфікації здійснювали методом горизонтального електрофорезу у 1,5–2,0 % агарозному гелі в електрофоретичній камері «mini VAGOPHOR 01» із візуальною оцінкою на транслюмінаторі виробництва НВО «Прогрес», після фарбування бромистим етидієм.

Як маркери розміру ДНК використовували $\Phi X 147$ DNA/*BsuRI*, $\Phi X 174$ DNA/*HinfI*, *pUC19/MspI*, *O'RangeRuler™ 20bp Ladder* та *O'Range Ruler™ 100bp Ladder* («Fermentas UAB», Lithuania).

Результати й обговорення

На електрофореграмі продуктів ампліфікації фрагментів ДНК 19

вищезазначених біологічних зразків та негативного контролю (рис. 1) при застосуванні розробленої тест-системи для індикації *C. felis*, на 5 доріжках (№№ 1, 5–8) має місце смуга розміром 221 п. н., що за

електрофоретичною рухливістю відповідає фрагменту гена, який кодує MOMP *C. felis*, а на 15 доріжках (№№ 2–4, 9–19) та доріжці негативного контролю (-) така смуга відсутня.

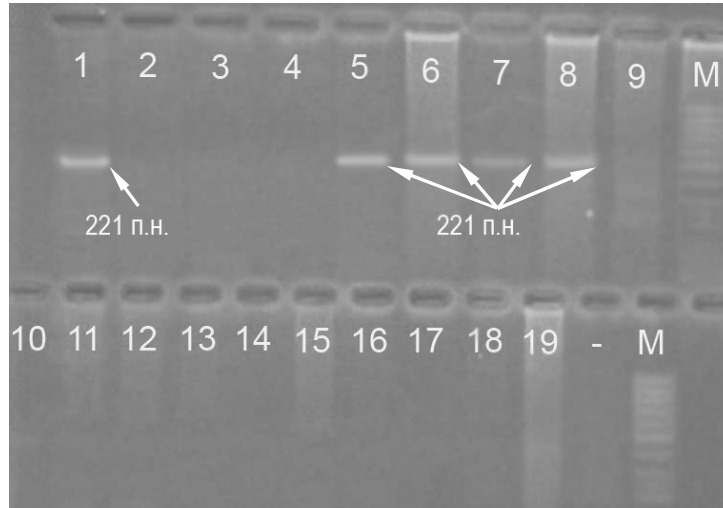


Рис. 1. Електрофореграма ПЛР-продуктів 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для індикації *C. felis*. Доріжки: 1, 5–8 — позитивний результат; 2–4, 9–19 — негативний результат; «-» — негативний контроль; М — маркер розміру ДНК *ΦX147 DNA/HinfI* («Fermentas UAB», Lithuania)

На електрофореграмі продуктів ампліфікації фрагментів ДНК 19 вищезазначених біологічних зразків та негативного контролю (рис. 2) при застосуванні тест-системи для індикації *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, на 14 доріжках (№№ 2–4, 9–19) має місце смуга

розміром 253 п. н., що за електрофоретичною рухливістю відповідає фрагменту гена, який кодує RNase P RNA *C. abortus*, *C. pecorum* та *C. psittaci*, а на 5-ти доріжках (№№ 1, 5–8) та доріжці негативного контролю (-), така смуга відсутня.

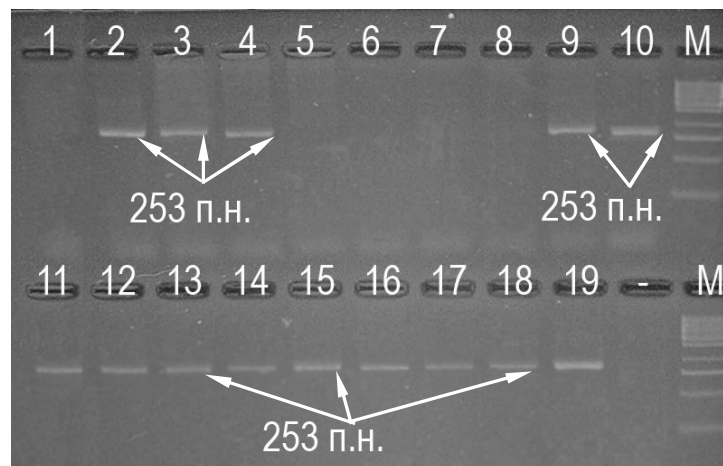


Рис. 2. Електрофореграма ПЛР-продуктів 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для індикації *C. abortus*, *C. pecorum* та *C. psittaci*. Доріжки: 2–4, 9–19 — позитивний результат; 1, 5–8 — негативний результат; «-» — негативний контроль; М — маркер розміру ДНК *ΦX 147 DNA/BsuRI* («Fermentas UAB», Lithuania)

На електрофореграмі продуктів ампліфікації фрагментів ДНК 19 вищезазначених біологічних зразків та позитивного й негативного контролів (рис. 3) при застосуванні тест-системи для індикації хламідій «Полимик» виробництва НПФ «Литех» (Россия), на усіх 21 доріжці має місце смуга розміром 308 п.н., що за електрофоретичною рухливістю відповідає

внутрішньому контролю реакції; на 20 доріжках (№№ 1–19) та доріжці позитивного контролю (±) має місце смуга розміром 501 п. н., що за електрофоретичною рухливістю відповідає фрагменту ДНК хламідії; на доріжці негативного контролю (-) розміром 501 п. н. смуга відсутня.

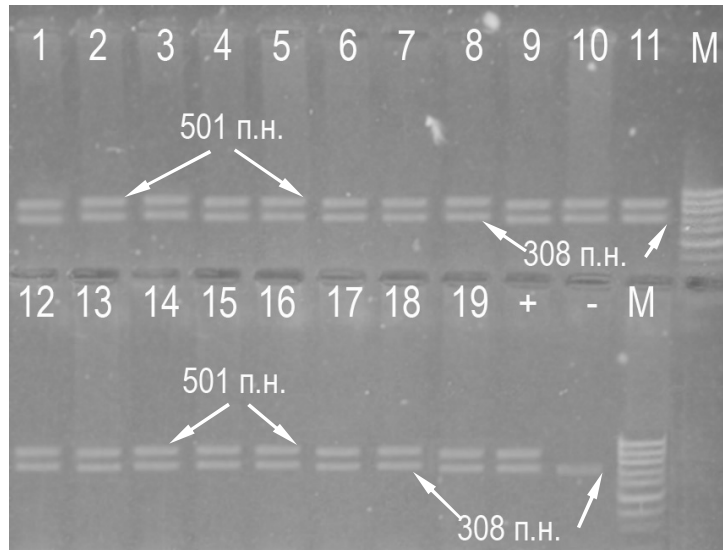


Рис. 3. Електрофореграма ПЛР-продуктів 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для індикації хламідій «Полимик» виробництва НПФ «Литех» (Россия). Доріжки: 1–19 — позитивний результат; «±» — позитивний контроль; «-» — негативний контроль; М — маркер розміру ДНК *Phi 147 DNA/HinfI* («Fermentas UAB», Lithuania)

На електрофореграмі продуктів ампліфікації фрагментів ДНК 19 вищезазначених біологічних зразків та негативного контролю (рис. 4) при застосуванні тест-системи для індикації хламідій за консервативною ділянкою гену, який кодує 16S рРНК, на 19 доріжках (№№ 1–19) має місце смуга розміром 832 п. н., що за електрофоретичною рухливістю відповідає фрагменту ДНК бактерій роду *Chlamydia* семи видів, патогенних для ссавців і птахів; на доріжці негативного контролю така смуга відсутня.

На електрофореграмі продуктів ампліфікації фрагментів ДНК 19 вищезазначених біологічних зразків та негативного контролю (рис. 5) при застосуванні тест-системи для індикації хламідій за консервативною ділянкою гена, який кодує МОМР, на 19 доріжках (№№ 1–19) має місце смуга розміром 221 п. н., що за електрофоретичною рухливістю відповідає фрагменту ДНК бактерій роду *Chlamydia* восьми видів, патогенних для ссавців і птахів; на доріжці негативного контролю така смуга відсутня.

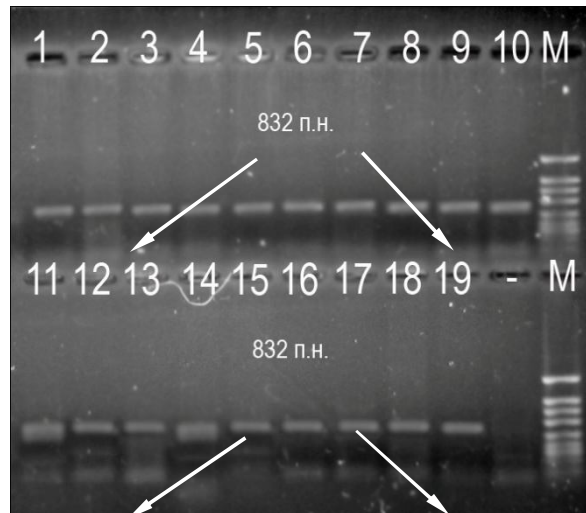


Рис. 4. Електрофореграма ПЛР-продуктів 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для індикації бактерій роду *Chlamydia* семи видів, патогенних для ссавців і птахів, за консервативною ділянкою гена, який кодує 16S рРНК. Доріжки: 1–19 — позитивний результат; «-» — негативний контроль; М — маркер розміру ДНК *O'RangeRuler™ 100bp Ladder* («Fermentas UAB», Lithuania)

На електрофореграмі продуктів ампліфікації фрагментів ДНК 19 вищезазначених біологічних зразків та негативного контролю (рис. 6) при застосуванні тест-системи, призначеної для диференціювання збудників хламідіозів за видами у мультиплексній ПЛР, на п'яти доріжках електрофореграми (№№ 1, 5–8) має місце смуга розміром 796 п. н. (*C. felis*), що за електрофоретичною рухливістю відповідає фрагменту ДНК гену, який кодує МОРМ *C. felis*; на двох доріжках (№№ 2, 13) має місце смуга розміром 466 п. н., що

за електрофоретичною рухливістю відповідає фрагменту ДНК гену, який кодує МОРМ *C. abortus*; на одинадцяти доріжках (№№ 3, 9–12, 14–19) має місце смуга розміром 306 п. н., що за електрофоретичною рухливістю відповідає фрагменту ДНК гену, який кодує МОРМ *C. pecorum*; на двох доріжках (№№ 4, 12) має місце смуга розміром 627 п. н., що за електрофоретичною рухливістю відповідає фрагменту ДНК гена МОРМ *C. psittaci*. На доріжці негативного контролю (–) будь-які смуги відсутні.

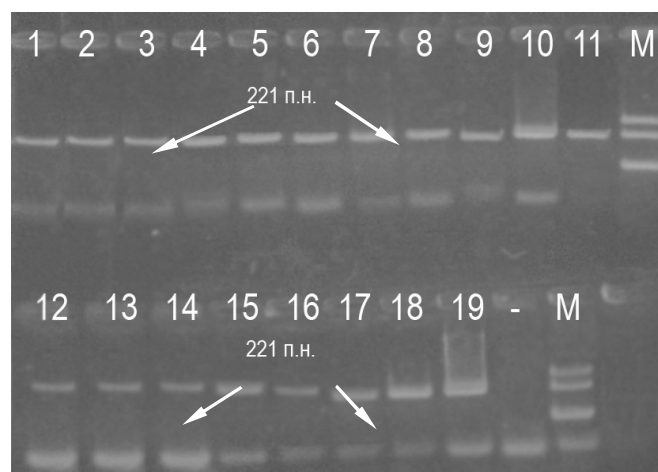


Рис. 5. Електрофореграма ПЛР-продуктів 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для індикації бактерій роду *Chlamydia* восьми видів, патогенних для ссавців і птахів, за консервативною ділянкою гена, який кодує МОРМ. Доріжки: 1–19 — позитивний результат; «-» — негативний контроль; М — маркер розміру ДНК *O'RangeRuler™ 20bp Ladder* («Fermentas UAB», Lithuania)

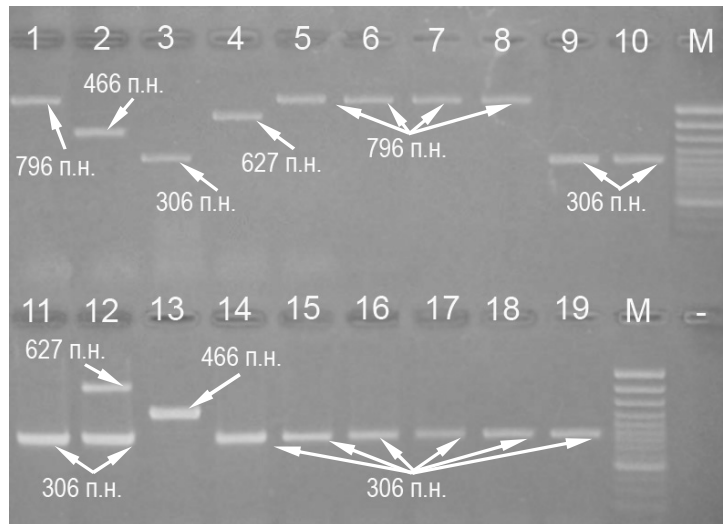


Рис. 6. Електрофореграма ПЛР-продуктів 19 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою мультиплексної тест-системи для видового диференціювання бактерій роду *Chlamydia*. Доріжки: 1, 5–8 — смуги розміром 796 п. н. (*C. felis*); 2, 13 — смуги розміром 466 п. н. (*C. abortus*); 3, 9–12, 14–19 — смуга розміром 306 п. н. (*C. pecorum*); 4, 12 — смуги розміром 627 п. н. (*C. psittaci*); «-» — негативний контроль; М — маркер розміру ДНК *ΦX 174 DNA/HinfI* («Fermentas UAB», Lithuania)

Висновки

Результати випробувань та валідації свідчать, що розроблені ПЛР-тест-системи для індикації бактерій роду *Chlamydia* у біологічних зразках відібраних від кішок і собак мають високу аналітичну специфічність і, відповідно, можуть використовуватись за призначенням.

Перспективи подальших досліджень. Застосування розроблених ПЛР-тест-систем дає змогу для широких моніторингових досліджень хламідійної інфекції серед свійських м'ясоїдних. Оскільки хламідіози у свійських собак викликають три види бактерій роду *Chlamydia*, перспективним є розроблення мультиплексної ПЛР-тест-системи для їх видового диференціювання. Для цього планується розробити дві системи олігонуклеотидних праймерів, що фланкуватимуть найбільш варіабельні ділянки генів RNase P RNA та MOMP, з яких буде обрано найбільш специфічну.

1. Ksyonz I. M. *Chlamydioses of Animals*: [monograph]. Poltava, Oriyana, 2012. 318 p. (In

Ukrainian).

2. Lobzin Y. V., Lyashenko Y. I., Poznyak A. L. *Chlamydial infections*. SPb, FOLIANT, 2003, 400 p. (In Russian).

3. Obukhov I. L., Gruzdyov K. N., Panin A. N. Using polymerase chain reaction at practical veterinary laboratories. *Veterinary Science*, 1997, no. 2, pp. 24–27 (in Russian).

4. Ksyonz I. M., Tsivenko T. M., Pochernyayev K. F., Korinnyi S. M. Designing PCR test-system for indicating *Chlamydia felis* in biological samples taken from domestic cats. *Bulletin of Sumy National Agrarian University*, 2014, vol. 1 (34), pp. 101–103 (in Ukrainian).

5. Ksyonz I. M., Pochernyayev K. F. *Method of determining DNA of seven Chlamydial infection agents of mammals and birds in the single polymerase chain reaction*. Patent of Ukraine, no. 34868, 2008 (in Ukrainian).

6. Ksyonz I. M., Pochernyayev K. F. *Method of determining DNA of Chlamydiaceae family bacteria in polymerase chain reaction by means of amplifying the fragment of main membrane protein gene (MOMP)*. Patent of Ukraine, no. 51635, 2010 (in Ukrainian).

7. Ksyonz I. M., Pochernyayev K. F., Kurman A. F. *Method of determining DNA of Chlamydial agents in the multiplex polymerase chain reaction*. Patent of Ukraine, no. 11834, 2006 (in Ukrainian).