

РОЗРОБКА ПРОТОКОЛУ ВИЯВЛЕННЯ ПАТОГЕННИХ ЛЕПТОСПІР МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

В. В. Уховський, кандидат ветеринарних наук*,

старший науковий співробітник,

В. В. Куликова, кандидат ветеринарних наук,

старший науковий співробітник,

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ,

А. П. Герілович, доктор ветеринарних наук,

старший науковий співробітник,

О. С. Солодянкін, кандидат біологічних наук,

старший науковий співробітник,

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

Стаття присвячена розробці ПЛР-протоколу виявлення генетичного матеріалу патогенних лептоспір. Встановлено, що праймерна система LipL 32 проявляє виражену гібридизаційну активність по відношенню до ДНК-матриці при 55°C. Протокол, створений на основі праймерної системи LipL 32, забезпечував виявлення восьми серогруп патогенних лептоспір, найбільш розповсюджених в Україні: *Australis*, *Canicola*, *Grippotiphosae*, *Hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Sejroe*, *Tarassovi*. Встановлено, що створені праймери не утворюють ампліконів з ДНК-матрицями мікоплазм, хламідій та сапрофітних (непатогенних) лептоспір.

Лептоспіра, лептоспіроз, полімеразна ланцюгова реакція, протокол ампліфікації, оптимізація.

Лептоспіроз – це зооантропонозна природно-вогнищева інфекція, яка характеризується короткочасною гарячкою, явищами анемії, жовтяничним забарвленням, некрозами на слизових оболонках і шкірі, кривавою сечею, атонією шлунково-кишкового тракту і схудненням тварин, абортами та народженням нежиттєздатного приплоду [1].

Незважаючи на значне генетичне різноманіття серед патогенних лептоспір, клінічні прояви захворювання, викликаного цими бактеріями, схожі й коливаються від легкої форми перебігу (в основному безсимптомної хронічної інфекції) до гострої форми – потенційно смертельної інфекції [2]. У світі спостерігається щонайменше 0,5 млн. випадків захворювання людей в рік, а рівень смертності від лептоспірозу в людей коливається від 5 % до 15 % [3].

Сталому розвитку тваринництва перешкоджають багато заразних захворювань, в тому числі й лептоспіроз, який є однією з найбільш розповсюджених до цих пір антропозоонозних інфекцій в багатьох країнах світу та в Україні зокрема [4-6].

* Науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор В.В. Недосєков

© В.В. Уховський, В.В. Куликова, А.П. Герілович, О.С. Солодянкін, 2014

За даними М. О. Росади [13], в Україні спостерігається значна захворюваність людей на лептоспіроз, яка реєструється щорічно (2,0-3,0 на 100 тис. чол. населення); також, дане захворювання серед людей характеризується високою летальністю – 8,0 %-10,0 %. Одним із основних джерел лептоспіроза для людей є сільськогосподарські тварини.

Лептоспіроз у сільськогосподарських тварин в більшості випадків характеризується поліморфізмом клінічних ознак і патологічних змін, та вражає тварин усіх вікових груп. У дорослих захворювання переважно супроводжується безсимптомним перебігом. Хворі та перехворілі тварини тривалий час залишаються лептоспіроносіями та джерелом інфекції. У результаті цих чинників, лептоспіроз сільськогосподарських тварин має значне поширення та наносить значні економічні збитки.

В останній час ведуться активні дослідження з розробки і використання ПЛР з метою визначення генетичних та патологічних характеристик лептоспір та діагностики лептоспірозу [7].

За допомогою ПЛР можливо виявляти незначні кількості ДНК лептоспір у клінічних зразках, в навколишньому середовищі та при ідентифікації культур. Рання діагностика лептоспірозу має велике значення, оскільки, тяжка форма лептоспірозу може перебігати блискавично [10-12].

ПЛР, на думку багатьох авторів, зарекомендувала себе як сучасний метод діагностики лептоспірозу, що дозволяє виявляти ДНК збудника у органах, тканинах, сечі в перші дні після зараження. Особливо слід відмітити те, що за допомогою ПЛР можна проводити контроль санації нирок після антибіотикотерапії.

У межах роду *Leptospira* виділяють два види – *Leptospira interrogans* (паразитичні) і *Leptospira biflexa* (вільноживучі), котрі диференціюються на основі певних, не цілком достовірних, фенотипових ознак (патогенність для лабораторних тварин, температура тварин і культурально-біохімічні тести).

Ідентифікація та диференціація лептоспір у межах роду *Leptospira* можлива шляхом проведення молекулярно-генетичного аналізу ДНК з визначенням видоспецифічних маркерів патогенних лептоспір.

Мета роботи – розробити діагностичну тест-систему для діагностики та ідентифікації ДНК патогенних лептоспір методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та здійснити оптимізацію умов проведення реакції ампліфікації.

Матеріали і методика досліджень. З метою аналізу нуклеотидних послідовностей з баз даних *GenBank* в режимі *on-line* були зібрані опубліковані ділянки геному патогенних лептоспір, котрий кодує синтез ліпопротеїдну *Lip L 32* – основного білка зовнішньої мембрани патогенних лептоспір. Даний ліпопротеїн, за даними М. С. Земської (2009 р.) [9], присутній лише у патогенних лептоспір і повністю відсутній у сапрофітних.

Екстракцію ДНК проводили сорбентним методом [8]. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою комерційного набору «PCR-Core» виробництва фірми *IsoGene* (Російська Федерація).

Склад реакційної суміші та температурні параметри ампліфікації визначали з використанням ДНК референтного патогенного штаму лептоспір М 20 (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*) в якості контрольного зразку.

Вивчення чутливості та специфічності методики проводили в відповідності з протоколами валідації ПЦР-методик, запропонованих МEB [14]

з використанням ДНК-екстрактів з восьми патогенних та однієї сапрофітної культури лептоспір (табл. 1), референтними штамами мікоплазм (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma agalactia*) та хламідій (*Chlamidia psittaci*). Окрім того, проводились порівняльні випробування з тест-системою для виявлення ДНК патогенних лептоспір виробництва IsogeneLab. Ltd. – «Набор реагентів для ампліфікації ДНК *Leptospira spp. (pathogenic serovars)*».

1. Перелік штамів лептоспір та їх серогрупова і сероваріантна відповідність

№ п/п	Серогрупа	Серовар	Штам	Вид лептоспір
1.	<i>Sejroe</i>	<i>polonica</i>	493 Poland	<i>L. interrogans</i>
2.	<i>Hebdomadis</i>	<i>kabura</i>	Kabura	<i>L. interrogans</i>
3.	<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>	<i>Perepelicyni</i>	<i>L. interrogans</i>
4.	<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	<i>Pomona</i>	<i>L. interrogans</i>
5.	<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V	<i>L. interrogans</i>
6.	<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>
7.	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>	M 20	<i>L. interrogans</i>
8.	<i>Australis</i>	<i>bratislava</i>	Jez-bratislava	<i>L. interrogans</i>
9.	<i>Semaranga</i>	<i>patoc</i>	Patoc 1	<i>L. biflexa</i>

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

З метою аналізу нуклеотидних послідовностей з баз даних *GenBank* в режимі *on-line* були зібрані опубліковані ділянки геному патогенних лептоспір, котрий кодує синтез ліпопротеїду *Lip L 32* – основного білку зовнішньої мембрани патогенних лептоспір. Даний ліпопротеїн, за даними М. С. Земської (2009 р.) [9], присутній лише у патогенних лептоспір і повністю відсутній у сапрофітних.

Проаналізувавши опубліковані в доступній літературі список праймерних систем, ми зупинилися на використанні праймерів *Lepto F/R*, які, *in silico*, демонстрували високу специфічність, дозволяючи теоретично виявляти весь спектр основних патогенних серогруп лептоспір [9] (табл. 2).

2. Праймерні системи для індикації ДНК патогенних лептоспір *Leptospira interrogans*

Таргетний ген	Назва праймеру	Послідовності олігонуклеотидів (праймерів), 5'→3'	Довжина ампулікону
Ген ліпопротеїну зовнішньої мембрани <i>Lip L 32</i>	<i>Lepto F</i>	CGC-TTG-TGG-TGC-TTT-CGG-TGG-T	264
	<i>Lepto R</i>	CTC-ACC-GAT-TTC-GCC-TGT-TGG-G	

Зазначені олігонуклеотиди мали найвищі показники ПЛР-якості. Параметрами, задовільними для детекції патогенних варіантів збудника (табл. 1), були визнані рекомендовані автором олігонуклеотидів (табл. 3).

3. Температурні параметри проведення ампліфікації з праймерними системами *Lepto F/R*

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95 °С	3 хв.	1
	94 °С	30 с.	
2	55 °С	30 с.	40
	72 °С	30 с.	
3	72 °С	5 хв.	1

Таким чином, наступним етапом наших досліджень була валідація методики виявлення ДНК-матриці за ПЛР.

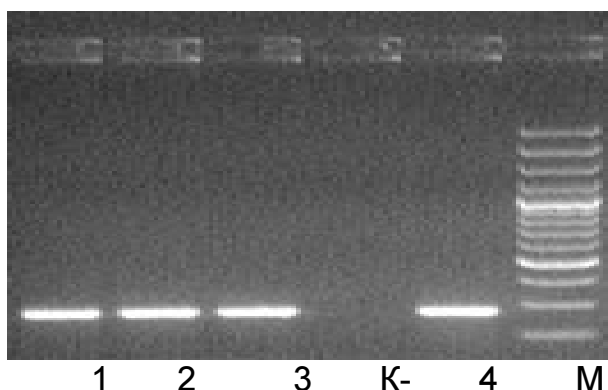


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу визначення патогенних лептоспир: 1 – культура патогенних лептоспир серогрупа *Icterohaemorrhagiae* (штам *M 20*); 2 – культура патогенних лептоспир серогрупа *Grippotyphosa* (штам *Moskva V*); 3 – культура патогенних лептоспир серогрупа *Sejroe* (штам *493 Poland*); K- – негативний контрольний зразок; 4 – культура патогенних лептоспир серогрупа *Canicola* (штам *Hond Utrecht IV*); M – Маркер молекулярної ваги.

Для дослідження чутливості методу детекції ми виміряли оптичну щільність екстрагованої ДНК та перераховували кількісні показники з нг/мкл на кількість молей. 1 Моль ми приймали за одну геном-одиницю.

Дослідження зразків з різною кількістю мікробних клітин патогенних лептоспир показало, що поріг детекції методики становить 87 геномних одиниць в реакції, що відповідає кількості 8700 мо/мл досліджуваної рідини.

Діагностичну чутливість та внутрішньовидову специфічність методики визначали в порівняльних випробуваннях з тест-системою для виявлення ДНК патогенних лептоспир виробництва *IsogeneLab. ltd.* – «Набір реагентів для ампліфікації ДНК *Leptospira spp. (pathogenic serovars)*». При паралельному дослідженні восьми референтних штамів патогенних лептоспир та одного сапрофітного (табл. 4) встановлено, що тест-системи мають ідентичну чутливість та специфічність. Це свідчить про точність створеної методики у порівнянні до референтного набору.

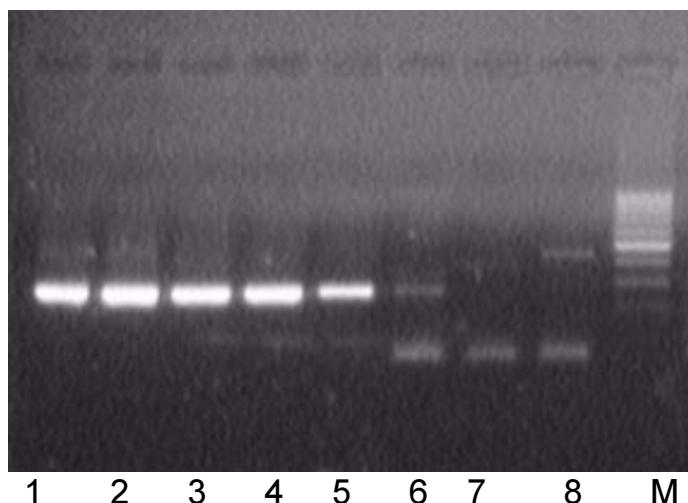


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР при визначенні чутливості праймерних системам *Lepto F/R*: 1 – Первинний зразок – містив кількість генетичного матеріалу відповідну 8780987 геномній одиниці – позитивно; 2 – Перше розведення – 878098 геномній одиниці – позитивно; 3 – Друге розведення 87809 геномних одиниць – позитивно; 4 – Третє розведення 8780 геномних одиниць – позитивно; 5 – Четверте розведення 878 геномних одиниць – позитивно; 6 – П’яте розведення 87 геномних одиниць – позитивно; 7 – Шосте розведення 8 геномних одиниць – негативно; М – Маркер молекулярної ваги.

4. Результати дослідження діагностичної чутливості та внутрішньовидової специфічності методу ПЛР з праймерними системами *Lepto F/R*

№ п/п	Вид мікроорганізму	Штам	IsogeneLab. ltd.	Lepto F/R
1.	<i>L. interrogans</i>	493 Poland	позитивний	позитивний
2.	<i>L. interrogans</i>	Kabura	позитивний	позитивний
3.	<i>L. interrogans</i>	Perepelicyni	позитивний	позитивний
4.	<i>L. interrogans</i>	Pomona	позитивний	позитивний
5.	<i>L. interrogans</i>	Moskva V	позитивний	позитивний
6.	<i>L. interrogans</i>	Hond Utrecht IV	позитивний	позитивний
7.	<i>L. interrogans</i>	M 20	позитивний	позитивний
8.	<i>L. interrogans</i>	Jez-bratislava	позитивний	позитивний
9.	<i>L. biflexa</i>	Patoc 1	негативний	негативний
	<i>M. gallisepticum</i>	S6	негативний	негативний
	<i>M. agalactia</i>	S-11	негативний	негативний
	<i>Ch. psittaci</i>	PM-11	негативний	негативний

Внутрішньовидова специфічність методики доведена по відношенню до ДНК мікоплазм (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma agalactia*), хламідій (*Chlamidi psittaci*) та сапрофітного референтного штаму лептоспір *L. Biflexa* серовар *patoc* (серогрупа *Semaranga*). З даними зразками, використані праймери не гібридизувались за оптимальних умов реакції на фоні успішного утворення специфічних продуктів ампліфікації ДНК патогенних лептоспір.

Висновки

1. На основі аналізу нуклеотидних послідовностей гена ліпопротеїну зовнішньої мембрани *Lip L 32* патогенних лептоспир виявлені консервативні ділянки, котрі дозволили провести підбір специфічних праймерів *Lepto F/R*, фланкуючих 264 п. н. ділянку, які мають високі показники ПЛР-якості та гібридизуються специфічно з таргетними матрицями ДНК.

2. На основі цих праймерів був створений протокол виявлення ДНК патогенних лептоспир при 40-циклічній ампліфікації з температурою відпалу 55° С та вмістом іонів магнію в реакційній суміші на рівні 2,5 мМ/мкл, котрий є специфічним, точним та забезпечує детекції ДНК патогенних лептоспир в зразках з кількістю 87 геномних одиниць і вище.

3. Валідація протоколу показала, що він є чутливим та специфічним у порівнянні з референтною методикою.

Перспективи подальших досліджень. Планується впровадження протоколу індикації ДНК патогенних лептоспир в практику діагностики лептоспірозу в господарствах України та розробка діагностичного набору на їх основі.

Список літератури

1. 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: спец. 03.00.07 «Микробиология» / М. С. Земская. – Москва, 2009. – 24 с.

2. Лептоспироз животных / Ю. А. Малахов, А. Н. Панин, Г. Л. Соболева. – Я. : ДИА-пресс, 2000. – 584 с.

3. Наконечна Т. Епізоотологічна та епідеміологічна ситуація з лептоспірозу на півдні України / Т. Наконечна // Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 7. – С. 27-29.

4. Росада М. О. Удосконалення епідеміологічного нагляду за лептоспірозами шляхом застосування серологічних методів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.02.02 „Епідеміологія” / М. О. Росада. – Київ, 2003. – 21 с.

5. Романюк Ж. В. Епізоотологічні особливості та удосконалення профілактики лептоспірозу великої рогатої худоби в господарствах Житомирської області: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: спец. 16.00.08 „Епізоотологія та інфекційні хвороби” / Ж. В. Романюк. – К., 2006. – 20 с.

6. Уховський В. В. Епізоотолого-географічна характеристика лептоспірозу ВРХ на території України / В. В. Уховський // Науково-технічний бюлетень. – Львів. – 2010. – Вип. 11, № 2-3. – С. 263-268.

7. 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 / M. R. Bomfim, M. C. Koury // *Vet. Microbiol.* – 2006. – Vol. 118(3-4). – P. 278-288.

8. Calcium binds to Lip L 32, a lipoprotein from pathogenic *Leptospira*, and modulates fibronectin binding / J. Y. Tung, C. W. Yang, S. W. Chou [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 3245-3252.

9. Gel purified Lip L 32: a prospective antigen for detection of leptospirosis / P. Tahiliani, M. M. Kumar, D. Chandu [et al.] // *J. Postgrad. Med.* – 2005. – Vol. 51(3). – P. 164-168.

10. *Leptospira and leptospirosis* / S. Faine, B. Adler, C. Bolin, P. Perolat. – Melbourne: MediSci, – 1999. – 154 p.

11. Leptospirosis worldwide // Weekly Epidemiol. Rec. – 1999. – Vol. 74. – P. 237-242.
12. Pinne M., Haake D. A. LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies / M. Pinne, D. A. Haake // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(1). – P. 302-310.
13. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom, C. J. Sol, M. M. Salimans [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 1990. – 28(3). – P. 495-503.
14. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. In OIE manual 2004 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.oie.int/eng/normes/manual/a_00014.htm.

Статья посвящена разработке ПЦР-протокола выявления генетического материала патогенных лептоспир. Установлено, что праймерная система Lip L 32 проявляет выраженную гибридизационную активность по отношению к ДНК-матрице при 55° С. Протокол, созданный на основе праймерной системы Lip L 32 обеспечивал обнаружение восьми серогрупп патогенных лептоспир, наиболее распространенных в Украине: Australis, Canicola, Grippotiphosae, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe, Tarassovi. Установлено, что созданные праймеры не образуют ампликонов с ДНК-матрицами микоплазм, хламидий и сапрофитных (непатогенных) лептоспир.

Лептоспира, лептоспироз, полимеразная цепная реакция, протокол амплификации, оптимизация.

Paper shows the creation of the PCR detection protocol of genetic material of pathogenic leptospira. It is established that primer system Lip L 32 shows a strong hybridization activity against DNA template at 55° C. The protocol which is based on primer system Lip L 32 ensures the detection of eight serogroups of pathogenic leptospira that are most common in Ukraine: Australis, Canicola, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe, Tarassovi. Experimentally proved that the created primers do not form amplicons with DNA template of mycoplasma, chlamydia and saprophytic (non-pathogenic) leptospira.

Leptospira, leptospirosis, polymerase chain reaction, amplification protocol, optimization.