

УДК 636.09:577.213:579.882:598.265.1

Ю. Р. РОМАНИШИНА, аспірант*

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ)

ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ ЯК ЕЛЕМЕНТУ ЕПІЗООТОЛОГІЧНОГО МОНІТОРИНГУ ХЛАМІДІОЗУ ПТАХІВ

У статті наведено результати дослідження поширеності хламідіозу серед синантропних голубів міст Києва та Білої Церкви. Діагноз було підтверджено в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) у реальному часі в 15,6 % птахів. Встановлено той факт, що 17,1 % клінічно здорових голубів можуть бути носіями збудника хламідіозу та виділяти його у навколишнє середовище із секретами та екскретами організму, а у тварин із симптомами, характерними для хламідіозу, лише у 10 % випадків діагноз підтверджується лабораторно.

Доведено можливість використання ПЛР у реальному часі як елементу епізотологічного моніторингу хламідіозу птахів.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, хламідіоз, ДНК збудника, синантропні голуби.

Хламідії – облигатні внутрішньоклітинні паразити тварин, що можуть спричинювати захворювання очей, органів дихання, статевих органів, артрити, розлади шлунково-кишкового тракту тощо. Багато авторів відмічали у своїх працях поширеність хламідіозу серед синантропних птахів [1, 2], що, зважаючи на хронічний та субклінічний перебіг інфекції, при якому тварини залишаються хламідієносіями, та здатність збудника долати міжвидовий бар'єр, може становити значну небезпеку зараження людей і тварин [3, 4, 5, 6]. За повідомленнями Центру з контролю і профілактики захворювань (CDC) до впровадження антибіотикотерапії від пситактозу (пташиного хламідіозу, або орнітозу) помирало близько 15-20% захворілих людей. Проте навіть на сьогоднішній день від захворювання помирають до 1% хворих на орнітоз людей [7].

Важливим етапом у контролюванні поширеності хламідіозу є його діагностика. Відповідно до рекомендацій Міжнародного Епізотичного Бюро (МЕБ) ізоляція хламідій у культурі клітин чи у курячих ембріонах вважається «золотим стандартом», проте її проводять лише спеціалізовані лабораторії через значну трудоемкість методик, необхідність у спеціальному обладнанні та забезпеченні відповідного рівня біобезпеки. Окрім цього, одним із ключових моментів у діагностиці захворювання даними методами є збереження життєздатних хламідій, а отже невід'ємними складовими цього процесу є використання спеціальних транспортних середовищ та організація швидкої доставки матеріалу. Серологічні методи діагностики можуть давати хибнопозитивні результати через перехресну реакцію з ліпополісахаридним (LPS) антигеном інших грамнегативних бактерій [8]. Тому висока чутливість цих методів, як правило, пов'язана із низькою специфічністю, і навпаки, підвищення специфічності призводить до значного зниження

їхньої чутливості. У зв'язку з недостатніми чутливістю (44-91%) або специфічністю (48-98%) серологічних методів, їх доцільно використовувати лише у випадку неможливості проведення індивідуальних скринінгових досліджень [9, 10].

Альтернативою можуть стати молекулярно-генетичні методи, імуногістохімічне фарбування та гістологічні дослідження, що набули популярності у лабораторіях через свою простоту (немає потреби у наявності живого збудника) та швидкість отримання результатів [9]. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та ПЛР у реальному часі можуть мати високу чутливість, оскільки здатні детектувати навіть кілька геномних копій хламідій [1]. Мішенню для ПЛР найчастіше є *ompA*, *ompB*, *enoA* гени та *16S*, *23S* гени рибосомальної РНК [11, 12, 13].

Метою роботи було вивчення поширеності хламідіозу серед синантропних голубів (*Columbalivia*) методом кількісної ПЛР у реальному часі.

Матеріали і методи досліджень. Для дослідження на хламідіоз у Києві та Білій Церкві (Київська область) було відловлено 135 голубів, від яких відбирались клоакальні, кон'юнктивальні та назофарингіальні зішкрібки [14]. Птахи відловлювались незалежно від наявності або відсутності клінічних ознак захворювання, проте наявність таких відмічалась для подальшого аналізу. За симптоми хламідіозу приймалися: наявність кон'юнктивіту, світлобоязнь, витьоки ексудату з носової порожнини, пронос зеленкуватого кольору, хрипи, атаксія, кахексія. Матеріал відбирався за допомогою одноразових стерильних зондів-тампонів або цитологічних шпиків і поміщався у пробірки типу «Eppendorf» із 1 мл ізотонічного розчину NaCl. Проби зберігались за температури -80°C .

Експериментальна частина була проведена у Федеральному дослідному інституті ім. Фрідріха Лефлера (FLI, Єна, Німеччина), на базі якого функціонує Національна референс-лабораторія та Референс-лабораторія МEB з хламідіозу. Усі етапи досліджень були проведені згідно протоколів, що затверджені у Референс-лабораторії МEB.

Виділення ДНК проводили за допомогою набору High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics (Німеччина) відповідно до настанови по застосуванню.

Для детекції ДНК хламідій використовували TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems, Weiterstadt) та наступні праймери і зонд (5'-3') (канал FAM):

1. Ch23S-F (CTG AAA CCA GTA GCT TAT AAG CGG T);
2. Ch23S-R (ACC TCG CCG TTT AAC TTA ACT CC);
3. Зонд Ch23S-p (FAM-CTC ATC ATG CAA AAG GCA CGC CG-TAMRA).

Довжина ПЛР-продукту при використанні даних праймерів становила 111 пар нуклеотидів.

Для внутрішнього контролю (канал HEX) використовували:

1. EGFP-1-F (GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC);
2. EGFP-10-R (CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC);
3. Зонд EGFP-HEX (HEX-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ1).

Довжина кінцевого продукту - 177 пар нуклеотидів.

У виготовлену суміш вносили по 1 мкл ДНК. За позитивний зразок було використано штамп *S. psittaci*10DC15 у 6 різних концентраціях (1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1×10^0 та 1×10^{-1} копій/мкл). Кожний досліджуваний зразок, позитивні та негативні контролю вносили у парних послідовностях (рис. 1).

Well Information		Return to Run Screen										Print	
All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	13G1530 Unknown	13G1530 Unknown	13G1545 Unknown	13G1545 Unknown	13G1637 Unknown	13G1637 Unknown	13G1664 Unknown	13G1664 Unknown	13G1671 Unknown	13G1671 Unknown	13G1685 Unknown	13G1685 Unknown	
	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	
B	13G1688 Unknown	13G1688 Unknown	13G1689 Unknown	13G1689 Unknown	NTC	NTC	13G1691 Unknown	13G1691 Unknown	13G1692 Unknown	13G1692 Unknown	13G1694 Unknown	13G1694 Unknown	
	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	
C	13G1695 Unknown	13G1695 Unknown	13G1697 Unknown	13G1697 Unknown	13G1698 Unknown	13G1698 Unknown	13G1699 Unknown	13G1699 Unknown	13G1700 Unknown	13G1700 Unknown	13G1701 Unknown	13G1701 Unknown	
	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	HEX FAM	
D													
E	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	DC15 Standard	
	1.00e-001 1.00e-001	1.00e-001 1.00e-001	1.00e+000 1.00e+000	1.00e+000 1.00e+000	1.00e+001 1.00e+001	1.00e+001 1.00e+001	1.00e+002 1.00e+002	1.00e+002 1.00e+002	1.00e+003 1.00e+003	1.00e+003 1.00e+003	1.00e+004 1.00e+004	1.00e+004 1.00e+004	
F													
G													
H													

Рис. 1 Схема розташування зразків для проведення ПЛР у реальному часі (MX 3000 Real-TimePCRSystem, Stratagene, Amsterdam)

Примітка: ряд E – позитивні контролю; NTC – негативні контролю

Для ампліфікації використовували термальний профіль наведений у таблиці 1.

Таблиця 1

Температурний режим для проведення детекції ДНК хламідій

№	Час	Температура	Кількість циклів
1	2 хв	50 °C	1 цикл
2	10 хв	95 °C	1 цикл
3	15 с	95 °C	45 циклів
	60 с	60 °C	

Облік ПЛР у реальному часі проводили за принципом, прийнятим у Референс-лабораторії МЕБ з хламідіозу (FLI, Єна, Німеччина). Достовірними вважали дослідження, якщо усі 12 позитивних контролю в каналі FAM мали C_t (пороговий цикл) ≤ 38 , R^2 (коефіцієнт детермінації для лінійної регресії) позитивних контролів було в межах 0,85-0,99, а C_t пари негативних контролів було відсутнє або становило ≥ 40 . Позитивним вважали зразок, значення C_t якого у обох послідовностях було нижчим за 38. У сумнівних випадках повторювали дослідження. Якщо флюоресценція в каналі Hex була відсутня, то припускали, що у пробі наявні інгібітори, а тому даний зразок досліджували повторно, але у розведенні 1:10. Результати ампліфікації наведені на рис. 2.

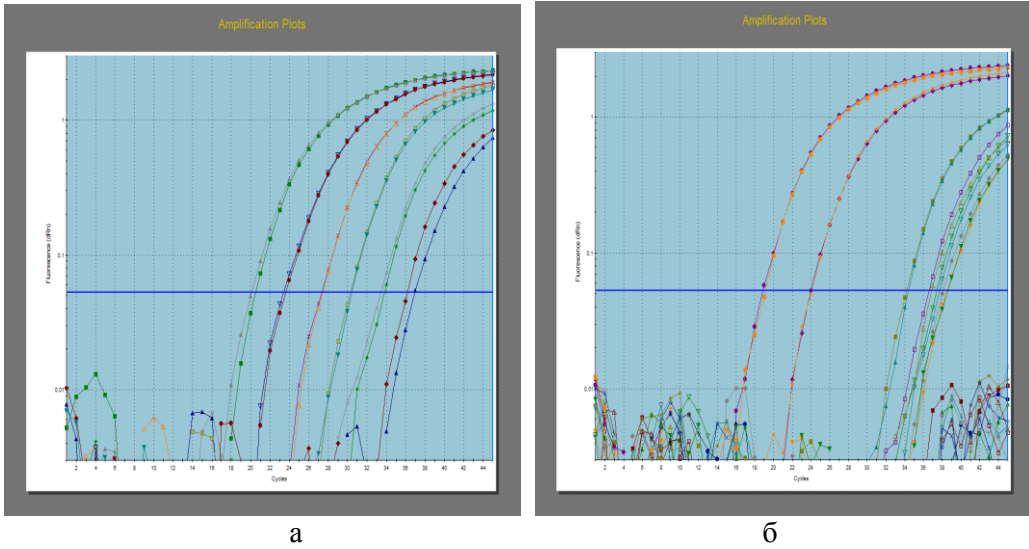


Рис. 2 Результати ПЛР у реальному часі, канал FAM:
а – позитивні контролю; б – досліджувані зразки.

Отримані результати обробляли статистично, при цьому кількість зразків позначали N, а кількість повторів.

Результати досліджень. Після серії досліджень 135 зразків біологічного матеріалу птахів в ПЛР у реальному часі в 21 пробі вдалося виявити ДНК збудника родини *Chlamydiaceae*, що становить 15,6 % від загальної кількості зразків (рис. 3).

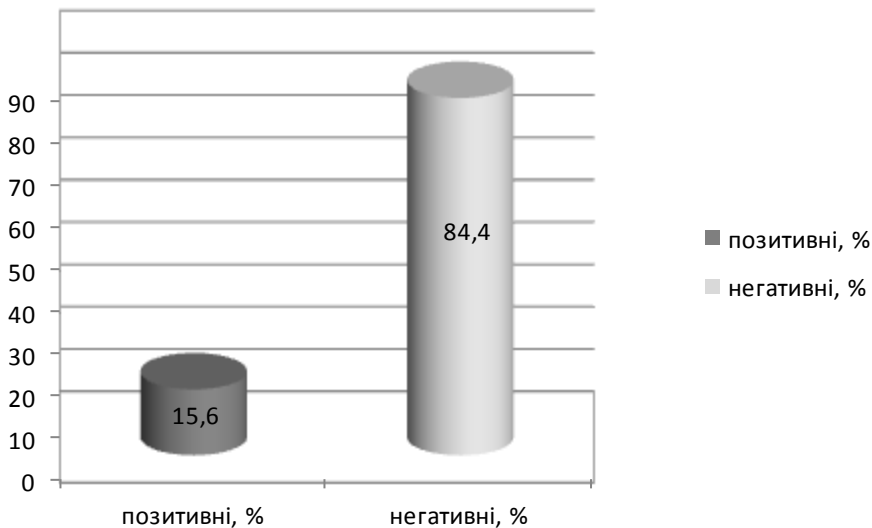


Рис. 3 Поширеність хламідіозу серед голубів міст Києва та Білої Церкви

З метою встановлення значення клінічного обстеження птахів у діагностиці захворювання було проведено порівняння результатів такого дослідження з

результатами ПЛР у реальному часі. Симптоми хламідіозу відмічено у 30 голубів, що становить 22,2 % від їх загальної кількості, у той час, як ДНК збудника детектовано у 21 (15,6 %) (Таблиця 2).

Таблиця 2

Результати клінічного та лабораторного (ПЛР у реальному часі) обстеження синантропних голубів міст Києва та Білої Церкви (N=135, n=5)

Тварини	Клінічне обстеження		Лабораторне дослідження (ПЛР у реальному часі)	
	Гол.	%	Гол.	%
Клінічно хворі тварини або тварини, у яких виявлено ДНК хламідій	30	22,2	21	15,6
Клінічно здорові тварини, аботварини, у яких не виділено ДНК хламідій	105	77,8	114	84,4
Усього досліджено	135	100	135	100

Для підтвердження діагнозу на хламідіоз у тварин із клінікою захворювання було враховано результати ПЛР у реальному часі. На основі цих даних встановлено, що лише у 3 голубів з 30 вдалося лабораторно підтвердити діагноз, що становить 10 % від кількості клінічно хворих (Таблиця 3).

Таблиця 3

Результати досліджень в ПЛР у реальному часі птахів із клінічними ознаками хламідіозу (N=30, n=5)

Тварини, у яких виявлено ДНК хламідій	Тварини, у яких не виявлено ДНК хламідій	Досліджено голубів, всього
3 гол.	27 гол.	30 гол.
10 %	90 %	100 %

Отже, серед поголів'я синантропних голубів циркулюють захворювання, що мають схожі із хламідіозом ознаки захворювання.

Також проведено аналіз даних молекулярно-генетичних досліджень серед клінічно здорових тварин. При цьому вдалось встановити, що із 105 зразків біологічного матеріалу голубів, що не мали ознак, характерних для хламідіозу, ДНК збудника родини *Chlamydiaceae* вдалось детектувати у 18 (17,1 %) (Таблиця 4).

Таблиця 4

Результати досліджень на хламідіоз клінічно здорових голубів за допомогою ПЛР у реальному часі (N=105, n=5)

Тварини, у яких виявлено ДНК хламідій	Тварини, у яких не виявлено ДНК хламідій	Досліджено голубів, всього
18 гол.	87 гол.	105 гол.
17,1 %	82,9 %	100 %

Ці дані вказують на те, що навіть клінічно здорові тварини можуть бути носіями збудника хламідіозу. А порівнявши цей показник (17,1 %) із показниками серед клінічно хворих (10 %) та серед усіх досліджених птахів (15,6 %), можна стверджувати, що хламідіоз у синантропних голубів найчастіше має безсимптомний перебіг, а клінічні ознаки, характерні для захворювання, у цього виду тварин мають незначне діагностичне значення.

Отже, отримані результати свідчать про значне розповсюдження (15,6 %) збудника хламідіозу серед синантропних голубів. Захворювання протікає переважно безсимптомно, проте птахи залишаються хламідієносіями та виділяють збудник у навколишнє середовище із фекальними масами, витьоками з очей, ексудатом з носової порожнини. Тому синантропні голуби, навіть клінічно здорові, можуть становити потенційну небезпеку для людей та тварин у зв'язку із персистенням збудника.

Висновки. 1. Експериментально встановлено, що 15,6 % синантропних голубів міст Києва та Білої Церкви (Київська область) є хворими на хламідіоз.

2. У результаті клінічного обстеження та лабораторного дослідження встановлено, що у синантропних голубів присутні хвороби, що мають схожі із хламідіозом ознаки захворювання.

3. Підтверджено, що клінічно здорові синантропні голуби можуть бути носіями збудника хламідіозу (17,1 %), тобто він найчастіше має безсимптомний перебіг.

4. На основі отриманих даних експериментально доведено можливість використання ПЛР у реальному часі як елементу епізоотичного моніторингу хламідіозу птахів.

З огляду на отримані результати перспективним вбачається проведення подальших досліджень щодо поширення хламідійної інфекції серед птахів на території України, видова диференціація виявлених у голубів хламідій та їх генотипізація.

Список використаної літератури:

1. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications / S. Magnino, D. Haag-Wackemagel, I. Geigenfeind, S. Helmecke, A. Dovč., E. Prukner-Radovčić, E. Residbegović, V. Plieski, K. Laroucau, M. Donati, S. Martinov, E.F. Kaleta // *Veterinary Microbiology*. – 2009. – Vol. 135. – P. 54-67.

2. Prevalence of *Chlamydomytila psittaci* in Fecal Droppings from Feral Pigeons in Amsterdam, The Netherlands / E. R. Heddema, S. ter Sluis, J. A. Buys, C. M. Vandenbroucke-Grauls, J. H. van Wijnen, and C. E. Visser // *Applied And Environmental Microbiology*. – 2006. – Vol. 72(6). – P. 4423-4425.

3. Evaluation of a *Chlamydomytila psittaci* Infection Diagnostic Platform for Zoonotic Risk Assessment / K. Verminnen, B. Duquene, D. De Keukeleie, B. Duim, Y. Pannekoek, L. Braeckman, D. Vanrompay // *J. of Clinical Microbiol.* – 2008. – Vol. 46(1). – P. 281-285.

4. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France / K. Laroucau, B. de Barbeyrac, F. Vorimore, M. Clerc, C. Bertin, T.-Harkinezhad, K. Verminnen, F. Obeniche, I. Capek, C. Bébéar, B. Durand, G. Zanella, D. Vanrompay, B. Garin-Bastuji, K. Sachse // *Veterinary Microbiology*. – 2009. – Vol. 135(1-2). – P. 82-90.

5. Chlamydien im Rinderbestand – ein Wolf im Schafspelz? / P. Reinhold, B. Kaltenboeck, C. Ostermann, K. Sachse // Tierärztliche Umschau. – 2013. – Vol. 68. – P. 515-527.
6. Longbottom D. Animal chlamydioses and zoonotic implications / D. Longbottom, L. J. Coulter // Journal of Comparative Pathology. – 2003. – Vol. 128(4). – P. 217-244.
7. Compendium of Measures To Control Chlamydia psittaci Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 1998 // Morbidity and Mortality weekly report: Recommendation and Reports / Centers for Disease Control and Prevention. – Atlanta: CDC, 1998. – Vol. 47(RR-10). – 15 p.
8. Andersen A. A. Avian chlamydiosis / A. Andersen, D. Vanrompay // Revue scientifique et technique de l'office international des epizooties. – 2000. – Vol. 19(2). – P. 396-404.
9. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections / K. Sachse, E. Vretou, M Livingstone, N Borel, A. Pospischil, D. Longbottom // Veterinary Microbiology. – 2009. – Vol. 135(1-2). – P. 2-21.
10. OIE Terrestrial manual. Chapter 2.3.1. Avian Chlamydiosis. – Paris : OIE, 2012. – P. 1-13.
11. Quantitative Detection of Chlamydia psittaci and C. pecorum by High-Sensitivity Real-Time PCR Reveals High Prevalence of Vaginal Infection in Cattle / F. J. DeGraves, D. Gao, H. R. Hehnen, T. Schlapp, B. Kaltenboeck // Journal of Clinical Microbiology – 2003. – Vol. 41 (4). – P. 1726-1729.
12. Detection of all Chlamydomphila and Chlamydia spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 33(6). – P. 473-484.
13. New real-time PCR tests for species-specific detection of Chlamydomphila psittaci and Chlamydomphila abortus from tissue samples / A. Pantchev, R. Sting, R. Bauerfeind, J. Tyczka, K. Sachse // Veterinary Journal. – 2009. – Vol. 181(2). – P. 145-150.
14. Романишина Ю. Р. Способи відбору зразків для дослідження хламідіозу птахів / Ю. Р. Романишина, В. Г. Скрипник, А. В. Скрипник // Наукові пошуки молоді у III тисячолітті «Сучасні проблеми ветеринарної медицини»: тези доповідей міжнародної наук.-практ. конф. вчених, аспірантів та докторантів, 16–17 травня 2013 р., м. Біла Церква. – Біла Церква, 2013. – С. 9-10.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР РЕАЛ ТАЙМ ДЛЯ ЭПИЗООТОЛО-ГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ХЛАМИДИОЗА ПТИЦ / Ю. Р. Романишина

В статье изложены результаты изучения распространенности хламидиоза среди синантропных голубей при помощи ПЦР в реальном времени. Диагноз был подтвержден у 15,6 % исследованных птиц, в том числе среди клинически здоровых голубей - в 17,1 % случаев, а у животных с симптомами, характерными для хламидиоза – в 10 % случаев. Таким образом подтверждено, что клинически здоровые животные могут быть переносчиками возбудителя хламидиоза и выделять его с секретами и экскретами организма.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция в реальном времени, хламидиоз, ДНК возбудителя, синантропные голуби.

THE USE OF REAL-TIME PCR FOR EPIZOOLOGICAL MONITORING OF CHLAMYDIOSIS IN BIRDS / Іu. R. Romanyshyna

The present article provides the data about prevalence of the chlamydial infection among feral pigeons. The diagnosis was confirmed in 15.6% of all cases. It was found that agent of chlamydiosis was detected among the clinically healthy pigeons in 17,1 % of cases. Thus, it was confirmed that most infected pigeons are asymptomatic and latent carriers of chlamydia.

The use of Real Time PCR for the detection of chlamydia, the causative agent of psittacosis in animals and humans was proposed.

Keywords: Real-time PCR, chlamydiosis, DNA, feral pigeon.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук **О. В. Мачуський**

Рукопис надійшов 20.02.2014 року.