

УДК 636.09: [616.98+579.834]636.028

ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В ЛАБОРАТОРНІЙ ДІАГНОСТИЦІ ЛЕПТОСПІРОЗУ

АНТОНІК І. І., к. с.-г. н., провід. н. с.
КУЧЕРЯВЕНКО О. О., канд. вет. наук
УХОВСЬКИЙ В. В., д. вет. наук
ПІСКУН А. В., аспірант
МИШАСТИЙ В. М., аспірант
СТЕПНА О. О., аспірант
ДЯЧЕНКО Г. В.
МЕЛЬНИЧЕНКО О. М.

Інститут ветеринарної медицини НААН
м. Київ, Україна
leptospiros2016@mail.ru
uhovskiy@ukr.net

Наведено аналіз сучасних інформаційних даних наукової літератури, щодо одного з найсучасніших ефективних методів молекулярної ПЛР діагностики (полімеразна ланцюгова реакція) лептоспірозу. Представлено можливості підвищення ефективності лабораторної діагностики та лікування лептоспірозу за допомогою сучасних молекулярно-генетичних методів, зокрема використання методу ПЛР у тваринництві. Обговорені напрямки збільшення ефективності методу, зокрема, шляхом виявлення геномних елементів.

Даний метод діагностики дозволяє специфічно концентрувати в сотні разів ділянку ДНК збудника захворювання в досліджуваному зразку, що дає можливість своєчасно встановити діагноз, спрощує лабораторну діагностику виявлення лептоспірозу в перші дні виникнення захворювання. Встановлено необхідність удосконалення ефективного методу лабораторних методів з подальшим їх використанням на практиці.

Ключові слова: лабораторна діагностика, лептоспірози, полімеразно-ланцюгова реакція.

Вступ. Лептоспірози є однією з найбільш розповсюджених природно-вогнищевих зооантропонозних інфекцій диких, домашніх тварин та людини, що характеризується поліморфізмом клінічних проявів. Він значно поширений в світі і дотепер продовжує залишатися актуальною епізоотологічною, епідеміологічною та екологічною проблемою.

Лептоспірози, згідно з прийнятою Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) в 2003 р. програмою боротьби з зоонозами, відносяться до найбільш поширених та небезпечних хвороб, так як завдає значного економічного і соціального збитку у багатьох країнах світу [2–4, 8, 26]. Економічні збитки від лептоспірозів в сільському господарстві пов'язані зі зменшенням продуктивності, загибеллю приплоду при абортах, загибеллю молодняку в перші дні його життя та масовими перегулами маточного поголів'я, що негативно впливає на відтворення стада.

Нині значне зростання захворюваності на лептоспіроз не лише серед тварин різних видів, а й серед людей потребує розроблення комплексних науково обґрунтованих планів загально профілактичних, діагностичних, протиепізоотичних і протиепідемічних заходів.

Встановлено, що лептоспірози представляють єдину нозологічну форму, важкість захворювання яких, обумовлена лептоспірами різних серогруп, що істотно відрізняються [6–8, 10]. Нині кількість серологічних груп і сероварів лептоспір збільшується у зв'язку з виявленням нових ізолятів, виділених від тварин, людей та з навколишнього середовища. Відомо, що деякі серологічні групи лептоспір виявляють у певних видів господарів і носіїв. Реєструються випадки захворювання тварин лептоспірозом, спричинені екзотичними патогенними штамми лептоспір, які набувають форми епізоотії [2, 5, 7, 9].

Незважаючи на численні дослідження, деякі

питання патогенезу, імуногенезу, механізми формування важких форм і ускладнень досі залишаються невивченими [7, 8, 14]. Поліморфізм клінічних проявів, схожість симптомів при інших бактеріальних і вірусних інфекціях, часті прояви хвороби в атиповій формі нерідко ведуть до пізньої діагностики та несвоєчасного етіотропного лікування, що не задовольняє клінічну практику [2, 7, 8, 13, 19].

Діагностика лептоспірозів у людей, сільськогосподарських і диких тварин ґрунтується на сукупності епізоотолого-епідеміологічних, клінічних та патологоанатомічних даних із обов'язковим підтвердженням діагнозу лабораторними дослідженнями [6, 9, 10, 21].

Діагноз на лептоспірози ставиться комплексно, але вирішальне значення має лабораторна діагностика. Для лептоспірозу характерний "феномен айсберга". Надводна, видима частина – це клінічно хворі та тварини що абортували, яких легко виявити і вжити відповідних заходів. Підводна, невидима, але значно більша частина це – лептоспіроносії, які виділяють лептоспіри із сечею та інфіковані тварини, що мають антитіла до лептоспір у сироватці крові. Ця група тварин не має зовнішніх ознак захворювання, але слугує основним джерелом лептоспірозу, та несе основну загрозу зараження для здорових тварин і людини.

Переважання випадків безсимптомного перебігу хвороби, складність диференціальної діагностики, відсутність виражених клінічних проявів інфекції у тварин-лептоспіроносіїв висувають лабораторні методи досліджень на перше місце в діагностиці лептоспірозу. До теперішнього часу актуальним залишається питання пошуку нових методів діагностики лептоспірозу та ідентифікації лептоспір, які базуються на застосуванні більш специфічних методів молекулярної біології і геносистематики. До числа таких методів належать: рестрикційний аналіз ДНК, метод гібридаційних зондів, моноклональних антитіл, імунодисперсійний аналіз, ДНК-гібридації, полімеразної ланцюгової реакції блотгібридації та ін.

Найбільшу увагу нині привертає метод полімеразної ланцюгової реакції заснований на виявленні специфічного фрагмента ДНК досліджуваного збудника в досліджуваному матеріалі шляхом ампліфікації її копій в реакції полімеризації із спеціально підібраними прай-

мерами. Висока чутливість методу і порівняно нетривалий час, витрачений на проведення реакції ампліфікації, відкриває широкі можливості для використання його в діагностиці інфекційних хвороб, в тому числі і лептоспірозу та ідентифікацію збудників.

Таким чином, лише добре організована лабораторна діагностика дозволяє своєчасно діагностувати лептоспірозу інфекцію, планувати і проводити ефективні протиепізоотичні та протиепідемічні заходи [9, 10].

Мета роботи – проаналізувати сучасні інформаційні дані, літературні джерела, огляди щодо сучасних аспектів застосування полімеразно-ланцюгової реакції, як одного з найбільш ефективних методів лабораторної діагностики лептоспірозу.

Матеріал і методи досліджень. Метааналіз проведено на основі опублікованих даних щодо досліджень лептоспірозу, авторефератів дисертаційних робіт, наукових статей, монографій. Використано пошукові електронні ресурси мережі Internet.

Результати та їх обговорення. Сучасна лабораторна діагностика лептоспірозу базується на використанні комплексу мікробіологічних, імунологічних та молекулярно-біологічних методів [5, 8, 10, 18, 21]. Їх використовують в комбінаціях залежно від фази захворювання та діагностичних можливостей лабораторій (таблиця).

Оскільки лептоспірозна інфекція характеризується поліморфізмом клінічних проявів та постійними змінами в етіологічній структурі, лабораторні методи досліджень залишаються чільним засобом постановки діагнозу на лептоспіроз.

До основних методів лабораторної діагностики лептоспірозу належать: бактеріологічні; серологічні: РМА, реакція макроаглоутинації, реакція зв'язування комплементу, реакція гемаглоутинації, реакція латексної аглоутинації, реакція імуноадсорбції, імуноферментний аналіз; молекулярно-генетичні, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Полімеразна-ланцюгова реакція вважається одним з найбільш точних і швидких методів діагностики багатьох інфекційних захворювань.

У 1983 р. американський біохімік корпорації "Cetus" Кері Мюлліс із співробітниками

Таблиця. Методи лабораторної діагностики лептоспірозу *

Метод досліджень	Мишень	Період хвороби	Специфічність методу
Бактеріологічний метод	Збудник	Перший тиждень (лептоспиремія)	Патогенні лептоспіри
РМА	АТ	Другий тиждень – до декількох місяців	Серогрупа
Перехресна РМА	Збудник	При виділенні культури	Серогрупа
ІФА, ІХА	АТ (Lg G)	Кінець другого тижня – до декількох місяців	Патогенні лептоспіри
ІФА, ІХА	АТ (Lg M)	Гострий період	Патогенні лептоспіри
ПЦР у реальному часі	16 S рRНК	Перший тиждень	Патогенні лептоспіри
Гніздова ПЦР	LipL 32	Перший тиждень	Патогенні лептоспіри
МФА, ІФА, ІХА Магнімоносорбція Латекс-аглютинація	АГ	Перший тиждень (лептоспиремія)	Залежно від задач
РМА з панеллю моноклональних антитіл	АГ	Ідентифікація культури	Сероваріант; Нідерланди, Референс-центр ВООЗ по лептоспірам
Мультилокусне секвенування (MLST)	Геномна ДНК	Ідентифікація культури	Видова (геномний вид); Міжнародний ресурс mist.net
Пряме білкове профілювання на маспектрометрі Microflex LT	Білки клітини	Ідентифікація культури	Видова (геномний вид)
Мультиплексна лігасна реакція з гібридизацією	Геномна ДНК (SNP)	Ідентифікація культури	Видова (геномний вид);

* За даними Кисельової Е.Ю., Бренсвої Н.В., Носкова А.К., та ін. [4].

розробили метод ампліфікації (збільшення копій) фрагментів ДНК, який дістав назву полімеразна ланцюгова реакція – ПЛР (PCR – polymerase chain reaction). К. Мюлліс у 1993 р. був удостоєний Нобелівської премії.

Метод ПЛР чи специфічної ампліфікації ДНК дає можливість вибірково синтезувати *in vitro* відносно невеликі ділянки ДНК довжиною від декількох десятків до декількох сотень пар нуклеотидів, зрідка – до 1000–2000 пн, використовуючи як матрицю будь-які проби ДНК – геномну ДНК окремих індивідуумів, різних видів про- та еукаріот, ДНК, виділену із культур клітин, бактеріальних клонів, бібліотек генів чи інших джерел. Кількість копій обраної ділянки ДНК у ході ПЛР може бути збільшена у 10⁸–10⁹ разів, що уможлиблює її візуалізацію.

Головним завданням, що стоїть при використанні методів молекулярно-генетичної діагностики, є рання і своєчасна постановка діагнозу, так як методи серологічної діагностики не володіють достатньою чутливістю до антитіл на початкових стадіях захворювання і ви-

магають занадто багато часу для отримання достовірних результатів. Численні спроби адаптації різних молекулярно-генетичних методів показали, що ключовою вимогою для використання методу при ранній діагностиці лептоспірозу є висока чутливість. Тому основну масу методів молекулярно-генетичної діагностики лептоспірозу складають різні модифікації полімеразної ланцюгової реакції, що дозволяють швидко виявляти в пробах специфічні для патогенних лептоспір послідовності ДНК.

Існують два основні методи полімеразно-ланцюгової реакції:

1. Класичний метод – виділення генетичного матеріалу збудника методом електрофорезу;
2. ПЛР в режимі “реального часу”.

В основі цього методу лежить багаторазове циклічне повторення трьох процесів:

- Денатурація ДНК в зразку що досліджується.
- Гібридизація (“відпал”) ДНК що досліджується зі специфічними зондами (праймерами).
- Синтез комплементарних ланцюгів ДНК за

допомогою ДНК-полімерази.

За допомогою ПЛР можливо виявляти навіть одиничні ДНК лептоспір в більшості зразків, в культурі, в навколишньому середовищі. Рання діагностика лептоспірозу має велике значення оскільки, тяжка форма лептоспірозу може перебігати блискавично.

Для детекції та аналізу ДНК лептоспір на даний час і застосовується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ), мультилокусне секвенування. З розробкою сучасних молекулярно-генетичних технологій в даний час з'явилася і генетична класифікація, яка не збігається з серологічною, штами одного серовару можуть належати до різних серогруп лептоспір.

Метод ПЛР використовують як для індикації, так і ідентифікації лептоспір і для експрес-діагностики лептоспірозу [2–4, 5, 7, 9, 12, 16, 19]. В якості досліджуваного клінічного матеріалу використовують проби крові, сечі, спинномозкової рідини, шматочки паренхіматозних органів, ґрунт, вода, мул, контаміновані лептоспірозом [4, 5, 10]. Найбільш специфічними ділянками ДНК для лептоспір є гени, що кодують ліпопротеїн зовнішньої мембрани лептоспір Lip L32 і 16S РНК патогенних генотипів збудника [4, 9, 21, 23, 25]. В даний час можна констатувати заміщення стандартної ПЛР з електрофоретичною детекцією, модифікаціями з флуоресцентною рестрацією накопичення ДНК, перевага якої полягає у високій чутливості і специфічній детекції продуктів реакції в реальному часі з кількісною оцінкою. Однак ПЛР з електрофоретичною детекцією все ж необхідна для напрацювання фрагментів ДНК з метою їх подальшого детального дослідження: клонування, визначення нуклеотидної послідовності [12, 23].

ПЛР-аналіз характеризується високою специфічністю, чутливістю і високою діагностичною ефективністю на першому тижні захворювання (починаючи з 1-х діб), навіть на фоні антибіотикотерапії [17]. У зв'язку з цим його можна рекомендувати як метод ранньої експрес-діагностики лептоспірозу [4, 5, 12, 25]. Діагностична ефективність лабораторних досліджень при лептоспірозі може бути значно підвищена за рахунок паралельного використання серологічного тесту (РМА) і ПЛР неза-

лежно від фази захворювання [4, 5].

Нині Всесвітньою організацією охорони Здоров'я запропоновано наступні молекулярно – генетичні методи для характеристики лептоспір [26, 27]:

- ПЛР з довільним праймером (AP-PCR) або дактилоскопія довільно ампліфікованого поліморфною ДНК (RAPD);
- аналіз з використанням ендонуклеаз рестрикції (REA);
- аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (RFLP);
- аналіз поліморфізму довжини ампліфікованого фрагмента (AFLP);
- гель-електрофорез в пульсуючому полі (PFGE);
- аналіз секвенування ДНК.

На даний час застосовується мультилокусне секвенування для визначення видової належності та внутрішньовидового типування *Leptospira spp.* [4, 12, 23]. Суть якого полягає в молекулярному аналізі попередньо відібраного, клонованого і протестованого простими методами фрагмента ДНК. В процесі секвенування отримують формальний опис первинної структури лінійної макромолекули у вигляді послідовності мономерів в текстовому форматі. Отже, в результаті отримані послідовності ділянок генів, цілих генів, тотальної м-РНК і навіть повних геномів мікроорганізмів порівнюють з даними, що зберігаються в базах NCBI та *Leptospira.mlst.net* [4, 12, 23].

В повсякденній практиці для швидкої і надійної ідентифікації мікроорганізмів також може бути використана перспективна методика видової ідентифікації представників роду *Leptospira* – MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption (Ionization Time Of Flight – часопролітної з матрично-активованою лазерною десорбцією) іонізацією) маспектрометрія [12, 23]. Звичайно цей метод також є високочутливим, швидким із низькою вартістю витратних матеріалів. Що стосується саме діагностики лептоспірозів цей метод до кінця не розроблено, перш за все, тому що лептоспіри ростуть тільки на спеціальних рідких поживних середовищах, виділення культури займає тривалий час та потребує великої кількості часу, та зусиль для виконання цієї роботи.

Мультиплексна лігазна реакція гібридизацією (Multiplex Ligase Probe Amplification –

MLPA), базується на технологіях контрольних точок (check-points) з визначенням до 25 нуклеотидних замін (SNP) в форматі ДНК-мікрочіпа запропонована нині для видової ідентифікації лептоспир [4, 12, 23]. На сьогоднішній день існує більш простий варіант MLPA в форматі ПЛР в реальному часі (CHECK-MDR REAL-TIME PCR), де кілька фрагментованих лігазними ферментами ділянок генів бактерій напрацьовуються одночасно в полімеразній реакції і детектуються.

Аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) використовують для молекулярного типування лептоспірозних ізолятів з метою аналізу географічного розповсюдження. Суть цього методу полягає в порівнянні різних патернів сегментації (смуг), отриманих в процесі обробки ферментами ДНК збудників. ПДРФ включає екстракцію ДНК з однорідної популяції мікроорганізмів, розщеплення ДНК рестриктазами і електрофорез розщепленої ДНК в агарозному гелі, для більш повного аналізу проводять Southern blotting на нітроцелюлозних мембранах та гібридизацію з використанням специфічного зонду.

Переваги ПЛР-діагностики:

- Дослідження займає всього кілька годин, на відміну від тривалих класичних мікробіологічних методів;

- Висока специфічність від 95% до 100%, тому що фрагмент ДНК що досліджується є унікальним для кожного конкретного мікроорганізму;

- Висока чутливість методу, виявити збудника можна, навіть якщо в досліджуваному зразку він представлений всього однією клітиною;

- Ідентифікувати збудника можна як якісним, так і кількісним методом. Це дуже важливо при виділенні умовно-патогенних мікроорганізмів, які в невеликій кількості не викликають захворювання;

- Можливість визначити генотип збудника.

Це є необхідною умовою для раціонального лікування і прогнозу можливих ускладнень.

Недоліки:

- Можливість отримання як невірно позитивного, так і помилково негативного зразка при недотриманні правил забору зразка, помилок при проведенні дослідження;

- Значна вартість проведення дослідження.

Отже, враховуючи проаналізовані наукові

джерела, можна підсумувати, що лептоспіроз – зооантропоноз, який є небезпечним як для тварини, так і для людини, який завдає значних соціальних та економічних збитків, за невчасної та некваліфікованої допомоги стає смертельним захворюванням. Тому важливим завданням постає швидка постановка заключного діагнозу. Особливу увагу слід звернути на те, що проведення своєчасної лабораторної діагностики з використанням сучасних молекулярно-генетичних досліджень повинно буди невід'ємною частиною сучасної лабораторної діагностики лептоспірозу.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Проведений аналіз наукової літератури свідчить про різноманітність розроблених класичних та сучасних методів лабораторної діагностики лептоспірозу.

Нині найбільш ефективним методом для діагностики лептоспірозів є застосування полімеразно-ланцюгової реакції, завдяки таким особливостям, як простота постановки, висока чутливість і відтворюваність, ПЛР набула великого поширення в лабораторній діагностиці ветеринарної медицини.

Для досягнення найкращих результатів у діагностуванні лептоспірозу необхідно удосконалити наявні на сьогоднішній день лабораторні методи.

Особливу увагу слід приділити тому, що ПЛР дає змогу проводити широкомасштабний аналіз сотень і тисяч зразків за короткий проміжок часу. При цьому кількість досліджуваного матеріалу може бути мізерною.

ПЛР-аналіз характеризується високою специфічністю чутливістю і високою діагностичною ефективністю на перших днях захворювання (починаючи з 1-х діб), навіть на тлі антибіотикотерапії. У зв'язку з цим, метод ПЛР можна рекомендувати як метод ранньої експрес-діагностики лептоспірозу. Діагностична ефективність лабораторних досліджень при лептоспірозах може бути значно підвищена за рахунок паралельного використання серологічного тесту (РМА) і ПЛР незалежно від фази захворювання.

Методики, основані на ПЛР необхідно удосконалювати, а діапазон їх застосування розширювати.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ананьина Ю.В. Эпидемиологические принципы профилактики лептоспирозов / Ю.В. Ананьина // Дезинфекционное дело. – 2007. – № 3. – С. 39–42.
2. Ваганова А.Н. Адаптация ПЦР для диагностики лептоспироза и эпидемиологического надзора за лептоспирозной инфекцией / А.Н. Ваганова [и др.] // Национальные приоритеты России. – 2011. – № 2 (5). – С. 162–164.
3. Дранкин Д.И. Лептоспироз / Д.И. Дранкин, М.В. Годлевская. – Саратов.: Изд-во Саратов. ун-та, 1988. – 272 с.
4. Киселева Е.Ю. Методы лабораторной диагностики лептоспирозов: особенности постановки, преимущества и недостатки / Е.Ю. Киселева. [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН – 2015. – Вып. 3.(103) – С. 85–93.
5. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство; изд. 2-е, перераб. и доп. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: ЗАО “Шико”, 2013. – С. 360.
6. Лебедев В.В. Иктерогеморрагический лептоспироз / В.В. Лебедев [и др.]. Под ред. В.В. Лебедева. – Краснодар: Советская Кубань, 2001. – 208 с.
7. Малахов Ю.А. Лептоспирозы животных / Ю.А. Малахов [и др.]– М.: Медгиз, 2000. – 621 с.
8. Павленко А.Л. Особенности эпидемиологии лептоспироза на современном этапе / А.Л. Павленко // Запорожский медицинский журнал. – 2013. – № 6. – С. 69.
9. Першина М.Ю. Анализ геномного полиморфизма лептоспир в полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами/ М.Ю. Першина [и др.] // МГМВ. – 1998. – №1. – С. 29–32.
10. Покровский В.И. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник / В.И. Покровский [и др.]. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2007. – 816 с.
11. Практичний посібник по роботі з імуноферментною тест-системою для визначення антитіл проти лептоспир “ІФА-лептоспироз-ВРХ” / Н. В. Іванська [та ін.]. – Київ: Науково-виробнича компанія Діапроф-Мед, 2003. – 28 с.
12. ПЦР в реальном времени / Д. В. Ребриков [и др.]. – Москва: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
13. Самсонова А.П. Применение ПЦР-анализа при исследовании лептоспирозов в Европейской части России / А.П. Самсонова [и др.] // Национальные приоритеты России. – 2009. – № 2. – С.166–167.
14. Случай повторного лептоспироза / С.О. Майорова [и др.] // Клиническая медицина – 2007. – № 3. – С. 71–72.
15. Сокол А.М. Особливості клініки і діагностики безжовтяничних форм лептоспирозу на сучасному етапі / А.М. Сокол [та ін.] // Буковинський медичний вісник. – 2008. – Т. 12. – № 3. – С. 30–32.
16. Ahmed A. A simple and rapid molecular method for *Leptospira* species identification. *Infection* / A. Ahmed, R.M. Anthony, R.A. Hartskeerl // *Genetics and Evolution*. – 2010. – 10. – P. 955–962.
17. Kamath S.A. Re-emergence of infections in urban India / S.A. Kamath, S.R. Joshi // *Focus Leptospirosis. J Assoc Phys India*. – 2003. – № 51. – P. 247–248.
18. Kingsote B. Leptospirosis in Livestock / B. Kingsote // *The Canadian Veterinary Journal*. – 1985. – Vol. 26. – P. 235–236.
19. Ozgur A. Leptospirosis; Diagnosis, Treatment and Prevention: A Review / A. Ozgur // *British Microbiology Research Journal* – 2016. – 13 (6). – P. 1 – 5. RMA
20. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends/ [G. Pappasa, Ph. Papadimitrioua, V. Siozopouloua, L. Christoub, N. Akritidisc] // *International J. of Inf. Diseases*. – 2008. – Vol. 12. – Issue 4. – P. 351–357.
21. A review on leptospirosis / Ningal P. Suvarna, Manoj B. Kothule, Nilesh Y. Jadhav // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – Vol 4. – Issue 9. – P. 1531– 1543.
22. Vivek K.N. Neuroleptospirosis / K.N. Vivek, B. Padmakumar // *JK Science*. – 2004. – Vol. 6. – № 4. – P. 218–219.
23. Verma R. Evaluation and comparison of native and recombinant LipL21 protein-based ELISAs for diagnosis of bovine leptospirosis / R. Verma, S.K. Srivastava // *Journal of Veterinary Science*. – 2012. – V. 13. – N.1. – P. 99–101.
24. Vijayachari P Leptospirosis: an emerging global public health problem / P. Vijayachari, A.P. Sugunan, A.N. Shriram // *J Biosci*. – 2008. – №. – 33. – P. 557–569.
25. Waleed Alorry. Leptospirosis: Transmission, Diagnosis and Prevention / Waleed Alorry, M. Arahou, R. Hassikou // *Innovative Space of Scientific Research Journals*. – 2016. – Vol. 15, No. 3. P. 457–467.
26. World Health Organization Human Leptospirosis audience for diagnosis, Surveillance and control (7th ed.). – 2003. – WHO, USA. – № 20. – P. 61–69.
27. World Health Organization (2007). *Leptospirosis: laboratory manual*. – 69 p. 28. Zavitsanou A. Leptospirosis: epidemiology and preventive measures / A. Zavitsanou, F. Babatsikou // *Health Science Journal*. – 2008. – Vol. 2. – Issue 2. – P. 75–82.

REFERENCES

Ananjina, Y.V (2007). Epidemiologicheskie principy profilaktiki leptospirozov. [Epidemiological principles of leptospiroses prophylaxis]. *Dezinfekcionnoe delo – Disinfection*, 3, 39–42 [in Russian].

Vaganova, A.N., Stoyanova, N.A., & Tokarevich, N.K. (2011). Adaptatsia PCR dlja diagnostiki leptospiroza i epidemiologitseskogo nadzora za leptospirosnoi infektsiej [PCR adaptation for leptospirosis diagnostics and epidemiological surveillance of leptospirosis infection]. *Nacional'nye prioritety Rossii – National priorities in Russia*, 2 (5), 162–164 [in Russian].

Drankin, D.I., & Godlevskaya M.V.(1988). *Leptospiroz [Leptospirosis]*. Saratov: Sarat. universitet [in Russian].

Kiseleva, Ye., Breneva.N., & Noskov A.K. (2015). Metody laboratornoy diagnostyky leptospiroza: osobennosti postanovki, preimushstva i nedostatki [Methods For leptospirosis laboratory diagnostics features of experimentation, advantages and limitations]. *Bulletin*

VCNTSKK SO RAMN – Bulletin VCNTSKK SO RAMN, 3(103), 85–93 [in Russian].

Onishchenko, GG, & Kutryov, VV (eds.) (2013). Laboratornaya diagnostica opasnih infekzionnih bolezney [Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases: Practical guidance]. Moscow: ZAO “Shyko” [in Russian].

Lebedev, V.V Avdeev, M.G, & Shubich, M.G. (2001). Iktogemorrhagichesky Leptospirosis [Icterohemorrhagic leptospirosis]. Krasnodar: Sovetskaya Kuban [in Russian].

Malakhov, Y.A, Panin ,A.N, & Soboleva, G.L. (2000). Leptospiroz zhiivotnyh [Leptospirosis in animals]. Moscow: Medgyz [in Russian].

Pavlenko, A.L. (2013). Osobennosti Epidemiologii Leptospiroza na sovremennom etape [Features of leptospirosis epidemiology in current stage]. *Zaporozhye medicinskie zhurnal – Zaporozhye Medical Journal*, 6, 69 [in Russian].

Pershina, M.Y., Shaginyan, I.A., Ananjina, Y.V., & Prozorovsky. S.V. (1998). Analiz genomnogo polimorfizma leptospir v polimeraznoj cepnoj reakcii s proizvol'nymi prajmerami [Analysis of Leptospira genome polymorphism in polymerase chain reaction with random primers]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, 1, 29–32 [in Russian].

Pokrovsky, V.I., Pak, S.G., Briko, N.I., & Danilkin, B.K. (2007). Infekzionnie bolezni i epidemiologiya [Infectious diseases and epidemiology]. Moskva: GETAR Media [in Russian].

Iwanski, N.V. et al. (2003). Praktychnyi posibnik po roboti z imunofermentnoyu testsystemoyu dlya vyznachennya antytil protyu leptospir “IFA-leptospiroz-VRH” [Practical Guide to work with the ELISA test system for the detection of antibodies against leptospira “ELISA–bovine leptospirosis”]. Kyiv: Naukovo-vyrobnycha kompaniya Diaprof-Med [in Ukrainian].

Rebrikov, D.V. (2009). PCR “v realnom vremeni” [Real time PCR]. Moskva: Binom, laboratoriya znaniy [in Russian].

Samsonova, A.P., Petrov, E.M., & Ananjina, Y.V. (2009). Primenenie PCR-analiza pri issledovanii leptospirozov v Evropejskoj chasti Rossii [Using PCR-analysis in leptospiroses examination in the European part of Russia]. *Nacional'nye priority Rossii – National priorities in Russia*, 2, 166-167 [in Russian].

Mayorov, S.O. et al (2007). Sluchay povtornogo leptospiroza [Recurrent case of leptospirosis]. *Klinicheskaya medicina – Clinical Medicine*, 3, 71–72 [in

Russian].

Socol, A.M. (2008). Osoblyvosti kliniku i diagnostyky bezzhovtanyuchnyuh form leptospirozu na suchasnomy etapi [Features of clinics and diagnostics anicteric leptospirosis forms at the present stage]. *Bukovyunskyi medychnyi visnyk – Bukovina medical messengers*, 12, No. 3, 30–32 [in Ukrainian].

Ahmed, A., Anthony, R.M., & Hartskeerl, R.A. (2010). A simple and rapid molecular method for Leptospira species identification. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 955–962.

Kamath, S.A., & Joshi, S.R. (2003). Re-emerging of infections in urban India – Focus Leptospirosis. *J Assoc Phys*, 51, 247–248.

Kingsote, B. (1985). Leptospirosis in Livestok. *The Canadian Veterinary Journal*, 26, 235–236.

Ozgun, A. (2016). Leptospirosis; Diagnosis, Treatment and Prevention: a Review. *British Microbiology Research Journal*, 13 (6), 1–5.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., & Akritidis, N. (2008). The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends (review). *Int. J. Infect. Dis.*, 12, 351–357.

Suvarna, P. Ningal, & Manoj, B. Kothule (2015). A review on leptospirosis. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, Is. 9, 1531–1543.

Vivek, K.N., & Padmakumar, B. (2004). Neuroleptospirosis. *JK Science*, Vol. 6, 4, 218–219.

Verma, R., & Srivastava, S. (2012). Evaluation and comparison of native and recombinant LipL21 protein-based ELISA for diagnosis of bovine leptospirosis. *Journal of Veterinary Science*, 13, N.1, 99–101.

Vijayachari, P, Sugunan, A.P., & Shriram, A.N. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.*, 33, 557–569.

Waleed, Alorry, Arahou, M., & Hassikou R. (2016). Leptospirosis: Transmission, Diagnosis and Prevention. *Innovative Space of Scientific Research Journals*, 15, No. 3, 457–467.

WHO (2003). World Health Organization Human Leptospirosis audience for diagnosis, Surveillance and control. (7th ed.). USA, 20, 61–69.

World Health Organization (2007). Leptospirosis: laboratory manual.

Zavitsanou, A., & Babatsikou F. (2008). Leptospirosis: epidemiology and preventive measures. *Health Science Journal*, 2, Is. 2, 75–82.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНО ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЛЕПТОСПИРОЗА

Антоник И. И., Кучерявенко О. О., Уховский В. В., Пискун А. В., Мышастий В. М.,
Степна О. О., Дяченко А. В., Мельниченко О. М.

Институт ветеринарной медицины НААН, г. Киев

Приведен анализ современных информационных данных научной литературы, одного из самых современных эффективных методов молекулярной ПЦР диагностики (полимеразная цепная реакция) лептоспироза. Представлены возможности повышения эффективности и лабораторной диагностики лечения лептоспироза с помощью современных молекулярно-генетических методов, в частности использование

метода ПЦР аналізу в ветеринарній медицині. Обсуждаются направления повышения эффективности метода, в частности, путем выявления геномных элементов.

Данный метод диагностики позволяет специфично увеличивать в сотни раз участок ДНК возбудителя заболевания в исследуемом образце, что позволяет своевременно установить диагноз, упрощает лабораторную диагностику выявления лептоспироза в первые дни возникновения заболевания. Установлена необходимость совершенствования эффективного метода лабораторных методов с последующим их использованием на практике.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, лептоспироз, метод, полимеразная цепная реакция.

THEORETICAL ASPECTS OF THE USING PCR ANALYSIS FOR LABORATORY DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS (REVIEW)

I. Antonik, O. Kucheryavenko, V. Uhovskiy, A. Pyskun, V. Myshastyi,
O. Stepna, A. Dyachenko, O. Melnychenko

Institute of Veterinary Medicine, The National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

Introduction. *Leptospirosis is one of the most widespread natural focal zoonotological infections of wild, domestic animals and humans, which characterized by polymorphism of clinical manifestations. This is widespread in the world and remains up to date a topical epizootiological, epidemiological, ecological challenge. The diagnostics of leptospirosis should be comprehensive but decisive importance has laboratory diagnostics. Thus, the only well-organized laboratory diagnostics enables timely diagnosis Leptospira infection, planning and take effective anti-epizootiological and anti-epidemiological measures.*

The goal of the work. *To analyze current data of literature sources, reviews of aspects about using polymerase chain reaction as one of the most effective methods for laboratory diagnosis of leptospirosis.*

Materials and methods. *Meta-analysis was performed on the basis of published data on leptospirosis research, dissertation abstracts, scientific articles and monographs and electronic resources.*

Results of research and discussion. *Modern leptospirosis laboratory diagnosis is based on complex of microbiological, immunological and molecular biological methods.*

They used in combinations depending on the phase of disease and diagnostic capabilities of laboratories.

The main challenge facing using methods of molecular genetic diagnosis is early and timely diagnosis. Polymerase chain reaction is one of the most accurate and rapid methods of molecular genetic diagnosis of many infectious diseases.

Conclusions and prospects for further research. *The analysis of scientific literature showed a variety of developed classical and modern methods of leptospirosis laboratory diagnosis.*

Currently, the most effective method for the diagnosis of leptospirosis is the using polymerase chain reaction, thanks to features such as ease of setting, high sensitivity and reproducibility, the PCR became widespread in laboratory diagnosis of veterinary medicine.

For best results necessary to improve the diagnosis of leptospirosis laboratory techniques currently available.

Special attention should be paid to the PCR method, because it allows for large-scale analysis of hundreds or thousands samples in a short period of time. The quantity of the test material can be meager.

PCR analysis is characterized by high sensitivity and specificity for high diagnostic efficacy in the first week of the disease (beginning with the 1st day), even against the background of antibiotic therapy. In connection with this method of PCR can be recommended as a method of early rapid diagnosis of leptospirosis. The diagnostic efficiency of laboratory tests with leptospirosis can be greatly enhanced through the parallel use of the serological test (PMA) and PCR regardless of the phase of the disease.

Methods based on PCR is necessary to improve and expand their range of application.

Key word: *leptospirosis, leptospira, laboratory diagnostics, method*
