

УДК 636.09:[616.98+579.834.115]:636.1

УХОВСЬКИЙ В.В.¹, д-р вет. наук, e-mail: uhovskiy@ukr.net,
 МУЗИКІНА Л.М.¹, канд. вет. наук, e-mail: loramuzykina@i.ua,
 ГАЛКА І.В.¹, канд. вет. наук, e-mail: ptica2005@ukr.net,
 СПИРИДОНОВ В.Г.¹, д-р с.-г. наук, e-mail: spyrydonov@ukr.net,
 ПИСКУН А.В.¹, канд. вет. наук, e-mail: anton_piskun@ukr.net,
 ЦАРЕНКО Т.М.², канд. вет. наук, e-mail: taras.m.tsarenko@gmail.com,
 АНТОНІК І.І.¹, канд. с.-г. наук, e-mail: anton_piskun@ukr.net,
 ПИСКУН О.О.¹, e-mail: stepnahelen@mail.ru,
 ШЕВЧЕНКО Т.В.³, канд. с.-г. наук, e-mail: toma.agrovet@gmail.com

¹Інститут ветеринарної медицини НААН

²Білоцерківський національний аграрний університет

³ Національна академія аграрних наук України

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ПАТОГЕННИХ ЛЕПТОСПІР

У статті наведені результати розробки та валідації методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК патогенних лептоспір 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 лептоспір при діагностиці лептоспірозу в господарствах України.

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

Вступ. Лептоспіроз 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, псці, птиця, собаки, білі миші, комахоїдні, хижакі 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]. У світі спостерігається щонайменше 0,5 млн. випадків захворювання людей в рік, а рівень смертності від лептоспірозу у людей коливається від 5% до 15% [3]. збудником хвороби є спірохети, котрі виділені в самостійне сімейство *Leptospiraceae*, порядку *Spirochaetales*, в який включений рід *Leptospira*, об'єднуючий два види лептоспір: *L. interrogans* (патогенні лептоспіри) та *L. biflexa* (лептоспіри-сапрофіти).

В останній час проводяться активні досліді з розробки і використання ПЛР з метою визначення генетичних та патологічних характеристик лептоспір та діагностики лептоспірозу [4].

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

ПЛР, на думку багатьох авторів, зарекомендувала себе як сучасний метод діагностики лептоспірозу, що дозволяє 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 лептоспир із обліком результатів аналізу електрофорезом в агарозному гелі [7, 8].

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

Матеріали і методи досліджень. З метою аналізу нуклеотидних послідовностей з баз даних *GenBank* в режимі *on-line* були зібрані опубліковані ділянки геному патогенних лептоспир, котрий кодує синтез ліпопротеїну зовнішньої мембрани лептоспир *LipL 32* (основний білок зовнішньої мембрани, що демонструє високий ступінь експресії в організмі інфікованого господаря).

Підготовку дослідних зразків, виділення ДНК та ампліфікацію продуктів ПЛР проводили при використанні наступних приладів: система ампліфікації ДНК у реальному часі *Rotor-Gene 6000Q*, виробник «*QIAGEN Hilden*», Німеччина; центрифуги з охолодженням *Z 32 HK* та *Z 216-MK*, виробник «*Hermle Labortechnik*»; шафи біологічної безпеки (2 клас) *LA2-4L1* та *LA2-6L1*, камера для ПЛР *PCR-4A1* та бокс для приготування розчинів *AVC-4D1*, виробник *ESCO*; мішалка лабораторна магнітна *RH basik-2*, виробник «*Ika Werke*»; центрифуга-міні вортекс *FVL-2400N*, виробник «*BioSan*»; шейкер лабораторний *Vortex Genius-3*, виробник «*Ika Werke*»; холодильник побутовий з морозильною камерою Атлант ХМ-6023; джерело безперервного живлення *BNT-1000AP* та *KIN-3000 AP*, виробник «*Powercom*»; млин ножовий (блендер) лабораторний *Grindomix GM 200*, виробник «*Retsch*»; терези лабораторні механічні *OHAUS 1400/1500*, Польща; ваги електронні *AXIS A500*, Польща; дозатори піпеткові *Eppendorf Research plus*, одноканальні різного об'єму 100–1000, 20–200, 10–100, 2–20, 0,5–10 мкл, виробництва Німеччина; аспіратор з колбою-пасткою *FTA-1*, виробник «*Bio San*»; термостат шейкер (термоміксер) *Komfort 5355*, виробник «*Eppendorf*»; опромінювач бактерицидний (настінний) *ОБН-150М*, виробник ТзОВ «З-Уц «Медсервіс»; одноразові поліпропіленові мікроцентрифужні пробірки з кришками, об'ємом 1,5 см³, 0,6 см³; одноразові поліпропіленові пробірки для ампліфікації об'ємом 0,5 або 0,2 см³ (залежно від марки ампліфікатора); одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму з аерозольним бар'єром 10, 20, 100, 200, 1000 мкл; штативи для наконечників та мікропробірок об'ємом 1,5 см³, 0,5 см³ або 0,2 см³.

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

Склад реакційної суміші та температурні параметри ампліфікації визначали з використанням ДНК 7-ми референтних штамів патогенних лептоспір: 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*).

Вивчення чутливості методики проводили з використанням ДНК-екстракту референтного патогенного штаму лептоспір M 20 (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*).

Специфічність методики перевірялась на слідуючих штаммах мікроорганізмів: сапрофітний вид *Leptospira biflexa*, штам *Patoc 1* (серогрупа *Semaranga*); *Chlamydophila 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 лептоспір, таблиці 1.

Таблиця 1

Перелік штамів лептоспір та їх серогрупова і сероваріантна відповідність

№ п/п	Серогрупа	Серовар	Штами	Вид лептоспір
1.	<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>	<i>Veldrat Bataviae 46</i>	<i>L. interrogans</i>
2.	<i>Bataviae</i>	<i>djatzi</i>	<i>HS 26</i>	<i>L. interrogans</i>
3.	<i>Mini</i>	<i>szwajizak</i>	<i>Szwajizak</i>	<i>L. interrogans</i>
4.	<i>Sejroe</i>	<i>polonica</i>	<i>493 Poland</i>	<i>L. interrogans</i>
5.	<i>Hebdomadis</i>	<i>kabura</i>	<i>Kabura</i>	<i>L. interrogans</i>
6.	<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>	<i>Perepelicyni</i>	<i>L. interrogans</i>
7.	<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>	<i>Pomona</i>	<i>L. interrogans</i>
8.	<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	<i>Moskva V</i>	<i>L. interrogans</i>
9.	<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>	<i>Hond Utrecht IV</i>	<i>L. interrogans</i>
10.	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>	<i>M 20</i>	<i>L. interrogans</i>
11.	<i>Louisiana</i>	<i>louisiana</i>	<i>LSU</i>	<i>L. interrogans</i>
12.	<i>Shermani</i>	<i>shermani</i>	<i>LT 821</i>	<i>L. interrogans</i>
13.	<i>Panama</i>	<i>panama</i>	<i>CZ 214 K</i>	<i>L. interrogans</i>
14.	<i>Celledoni</i>	<i>whitcombi</i>	<i>Whitcomb</i>	<i>L. interrogans</i>
15.	<i>Australis</i>	<i>bratislava</i>	<i>Jez-bratislava</i>	<i>L. interrogans</i>
16.	<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>	<i>Akiyami A</i>	<i>L. interrogans</i>
17.	<i>Cynopteri</i>	<i>cynopteri</i>	<i>Vleermuis 3868</i>	<i>L. interrogans</i>
18.	<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	<i>Salinem</i>	<i>L. interrogans</i>
19.	<i>Ballum</i>	<i>ballum</i>	<i>Mus 127</i>	<i>L. interrogans</i>

Валідацію методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК патогенних лептоспир проводили відповідно до стандартів [9–13] у бактеріологічному секторі лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН, що має рівень біобезпеки BSL 2, та акредитованої за міжнародним стандартом ISO-17025.

Результати досліджень та їх обговорення. 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 лептоспир, котрий кодує синтез ліпопротеїдну *Lip L 32* – основного білку зовнішньої мембрани патогенних лептоспир. Даний ліпопротеїн, за даними ряду авторів [14–16], присутній лише у патогенних лептоспир і повністю відсутній у сапрофітних.

Проведено аналіз консервативних ділянок нуклеотидних послідовностей гену *Lip L 32* різних штамів патогенних лептоспир, шляхом множинного вирівнювання цільових послідовностей та 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).

Таблиця 2

Характеристика олігонуклеотидних праймерів для детекції ДНК патогенних лептоспир

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

Примітка: *GenBank: KC800990, *Leptospira interrogans serovar Canicola*.

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

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

З метою аналізу широти детекції був проведений пошук у програмному модулі BLAST on-line. Даний аналіз показав, що підібрані послідовності праймерів є специфічними лише до збудників лептоспірозу та надає можливість виключити ймовірність перехресного відпалу з матрицями нуклеїнових кислот інших бактерій, вірусів та ссавців.

Вивчення специфічності ампліфікації при різних температурах відпалу праймерів. Перший етап досліджень передбачав вивчення специфічності ампліфікації при різних температурах відпалу праймерів. При цьому були застосовані зразки ДНК референтних штамів патогенних лептоспир семи серогруп: *493 Poland* (серогрупа *Sejroe*), *Kabura* (серогрупа *Hebdomadis*), *Perepelicyuni* (серогрупа *Tarasovi*), *Pomona* (серогрупа *Pomona*), *Moskva V* (серогрупа *Grippotyphosa*), *Hond Utrecht IV* (серогрупа *Canicola*) та *M 20* (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*). Результати досліджень наведені в таблиці 3.

При випробуванні традиційних режимів відпалу праймерів від 45 до 60 °С встановлено, що олігонуклеотидна система *Lip L 32* специфічно реагує з ДНК патогенних лептоспир в градієнті температур від 45 до 60°С. Амплікон виявлено в усіх проаналізованих семи зразках ДНК патогенних лептоспир. Пониження робочої температури відпалу призводило до збільшення порогу чутливості появи специфічних ампліконів. У разі збільшення температури відпалу на кожні 5°С чутливість методики знижувалась. Так в зразках ДНК лептоспир при відпалі за 50°С амплікон вже детектували на значно нижчому рівні ніж при відпалі за 45°С. При підвищенні температури ще на 5°С чутливість системи індикації знижувалась у 1000 разів. Отже встановлено, що оптимальною температурою відпалу для індикації ДНК патогенних лептоспир можна вважати режими 45°С. Саме цей режим забезпечує специфічну детекцію без втрати чутливості методики.

Таблиця 3

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

№ п/п	Серогрупа лептоспир	Показники РТ ПЛР (Ctt) за різної температури відпалу (Threshold – 0,01)			
		45 °С	50 °С	55 °С	60 °С
1	<i>L. Sejroe</i>	22,76	22,60	23,92	24,04
2	<i>L. Hebdomadis</i>	23,77	24,17	25,00	25,68
3	<i>L. Tarasovi</i>	24,22	24,67	25,07	26,05
4	<i>L. Pomona</i>	20,69	20,90	22,35	22,84
5	<i>L. Grippotyphosa</i>	21,94	22,54	23,75	23,59
6	<i>L. Canicola</i>	23,51	24,63	25,61	24,82
7	<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	21,48	22,48	23,58	23,87
8	<i>K-</i>	–	–	–	–

Підбір оптимального вмісту іонів магнію у реакційній суміші. Наступним етапом розробки методики виявлення ДНК патогенних лептоспир, після обрання оптимальної температури відпалу праймерів, був підбір оптимального вмісту іонів магнію (оптимальна кількість $MgCl_2$) у реакційній суміші. Необхідність даного дослідження обумовлена тим, що синтез ланцюга ДНК можливий лише при наявності цих іонів. Від концентрації іонів $MgCl_2$ залежить ефективність синтезу специфічної ділянки ДНК (елонгація). В якості

матриці використовували ДНК-екстракти 7-ми референтних штамів патогенних лептоспир.

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.

Результати досліджень наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

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

№ п/п	Серогрупа лептоспир	Показники РТ ПЛР (<i>Ct</i>) за різної концентрації магнію хлориду ($MgCl_2$) (<i>Threshold</i> – 0,02)			
		1,5 мМ/мкл	2,0 мМ/мкл	2,5 мМ/мкл	3,0 мМ/мкл
1	<i>L. Sejroe</i>	23,16	24,35	24,17	24,80
2	<i>L. Hebdomadis</i>	24,70	25,31	25,16	25,84
3	<i>L. Tarasovi</i>	25,47	25,87	25,54	26,15
4	<i>L. Pomona</i>	21,83	22,62	22,26	22,05
5	<i>L. Grippityphosa</i>	24,66	23,79	23,36	23,26
6	<i>L. Canicola</i>	30,61	28,84	24,88	25,85
7	<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	24,50	23,79	22,95	22,81
8	К-	–	–	–	–

Оцінка результатів ампліфікації показала, що оптимальною концентрацією іонів $MgCl_2$, котра дозволяє отримати специфічну ділянку ДНК патогенних лептоспир 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 гену *Lip L 32*).

Визначення чутливості методики РТ ПЛР. Для визначення чутливості створеної тест-системи ми проводили 10-ти кратні розведення культури референтного патогенного штаму лептоспир М 20 (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*). В дослідженні використовувались наступні концентрації: 4×10^6 кл/см³, 4×10^5 кл/см³, 4×10^4 кл/см³, 4×10^3 кл/см³, 4×10^2 кл/см³, 4×10^1 кл/см³. Після отримання різних розведень культури лептоспир, відбирали по 0,1 см³ з кожного розведення та проводили виділення ДНК.

Результати досліджень отриманих екстрактів ДНК наведені в таблиці 5.

За результатами проведених досліджень було встановлено: чутливість тест системи складає 4×10^2 клітин, що відповідає 4×10^3 клітин/см³.

Ампліфікація ДНК патогенних лептоспир при різних концентраціях мікробних клітин

№ п/п	Концентрація лептоспир, мікробних клітин/мл	Кількість мікробних клітин взята для виділення ДНК	Значення Ct по каналу FAM/Green	Результати аналізу щодо виявлення ДНК патогенних лептоспир
1	4×10^6	4×10^5	20,56	позитивний
2	4×10^5	4×10^4	22,76	позитивний
3	4×10^4	4×10^3	26,81	позитивний
4	4×10^3	4×10^2	30,26	позитивний
5	4×10^2	4×10^1	0	негативний
6	4×10^1	4	0	негативний
7	К-		0	негативний

Визначення специфічності методики РТ ПЛР. Одним з показників придатності того чи іншого методу діагностики хвороби є його специфічність. Тому нами було вивчено специфічність створеної методики для виявлення ДНК патогенних лептоспир виду *Leptospira interrogans*. 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 та ін.).

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 таблиці 6 та рисунках 1, 2.

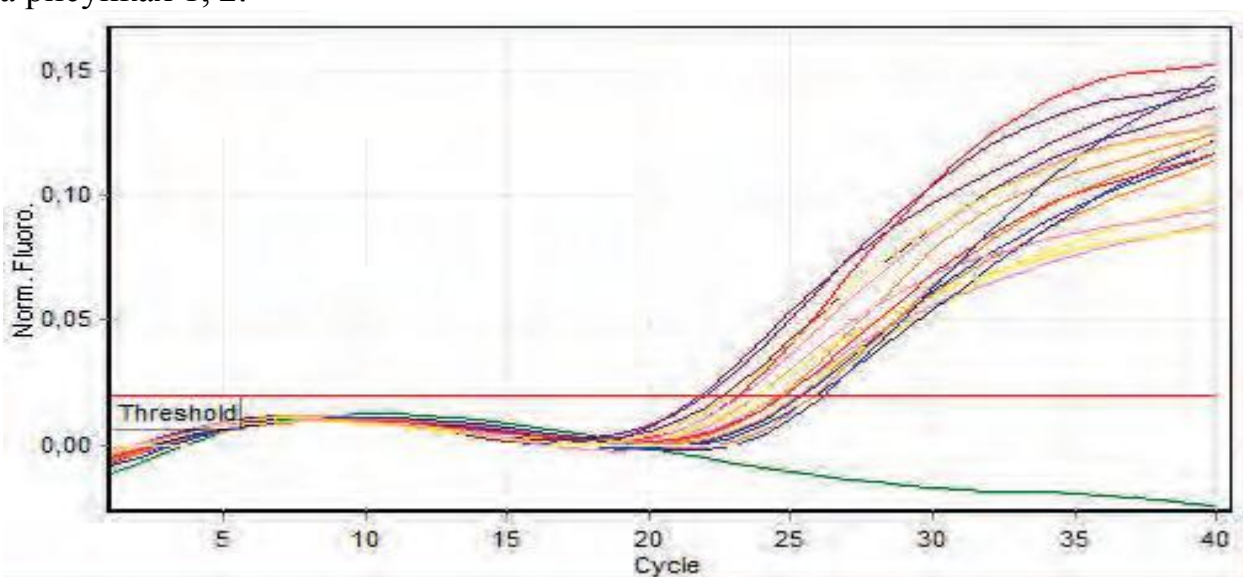


Рис. 1. Результати ампліфікації ДНК 19-ти патогенних серогруп лептоспир щодо визначення специфічності.

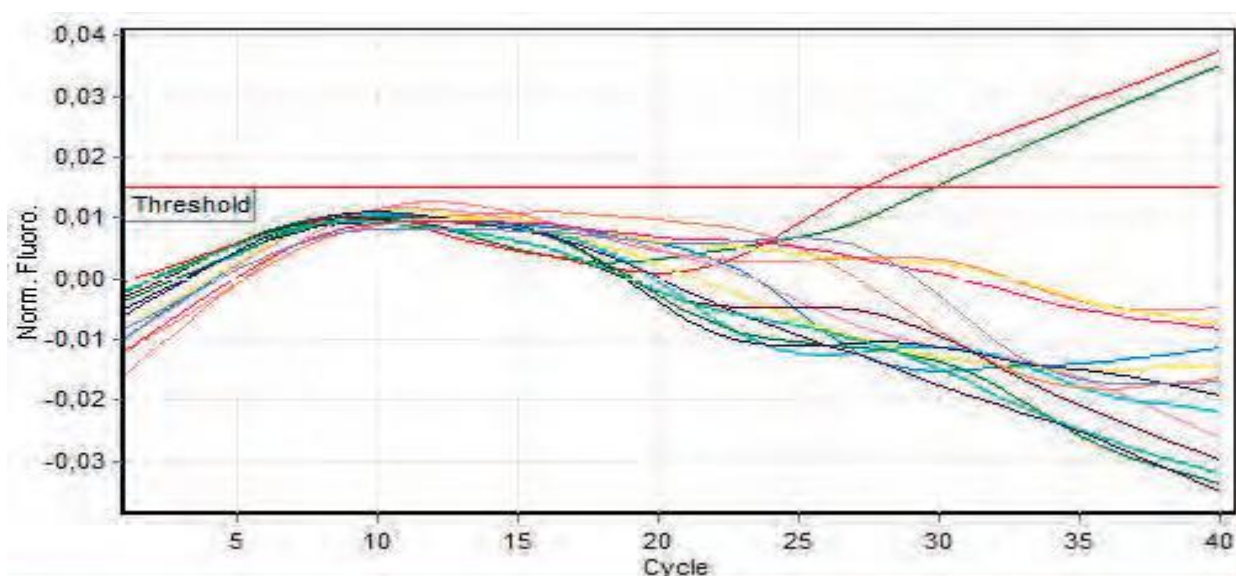


Рис. 2. Результати ампліфікації ДНК патогенних лептоспір, сапрофітних лептоспір та інших мікроорганізмів (хламідій, мікоплазм, сальмонел та ін.) щодо визначення специфічності.

Таблиця 6

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

№ п/п	Культура	Значення <i>Ct</i> по каналу <i>FAM/Green</i>	Результати аналізу щодо виявлення ДНК патогенних лептоспір
1	2	3	4
1.	<i>Leptospira Javanica</i> «Veldrat Bataviae 46»	24,57	ПОЗИТИВНИЙ
2.	<i>Leptospira Bataviae</i> «HS 26»	21,57	ПОЗИТИВНИЙ
3.	<i>Leptospira Mini</i> «Szwajizak»	23,62	ПОЗИТИВНИЙ
4.	<i>Leptospira Sejroe</i> «493 Poland»	23,16	ПОЗИТИВНИЙ
5.	<i>Leptospira Hebdomadis</i> «Kabura»	24,70	ПОЗИТИВНИЙ
6.	<i>Leptospira Tarassovi</i> «Perepelicyni»	25,47	ПОЗИТИВНИЙ
7.	<i>Leptospira Pomona</i> «Pomona»	21,83	ПОЗИТИВНИЙ
8.	<i>Leptospira Grippytyphosa</i> «Moskva V»	24,66	ПОЗИТИВНИЙ
9.	<i>Leptospira Canicola</i> «Hond Utrecht IV»	30,61	ПОЗИТИВНИЙ
10.	<i>Leptospira Icterohaemorrhagiae</i> «M 20»	24,50	ПОЗИТИВНИЙ
11.	<i>Leptospira Louisiana</i> «LSU»	23,71	ПОЗИТИВНИЙ
12.	<i>Leptospira Shermani</i> «LT 821»	24,57	ПОЗИТИВНИЙ
13.	<i>Leptospira Panama</i> «CZ 214 K»	23,87	ПОЗИТИВНИЙ
14.	<i>Leptospira Celledoni</i> «Whitcomb»	25,43	ПОЗИТИВНИЙ
15.	<i>Leptospira Australis</i> «Jez-bratislava»	28,37	ПОЗИТИВНИЙ
16.	<i>Leptospira Autumnalis</i> «Akiyami A»	24,63	ПОЗИТИВНИЙ
17.	<i>Leptospira Cynopteri</i> «Vleermuis 3868»	25,18	ПОЗИТИВНИЙ
18.	<i>Leptospira Pyrogenes</i> «Salinem»	22,95	ПОЗИТИВНИЙ
19.	<i>Leptospira Ballum</i> «Mus 127»	23,47	ПОЗИТИВНИЙ
20.	<i>Leptospira Semarang</i> «Patoc 1» (сапрофітний)	0	НЕГАТИВНИЙ
21.	<i>Actinobacillus lignieresii</i> «Малинівський»	0	НЕГАТИВНИЙ
22.	<i>Salmonella cholerae suis</i> «Запорізький 32»	0	НЕГАТИВНИЙ

Продовження таблиці 6

1	2	3	4
23.	<i>Salmonella dublin</i> «Донецький-515»	0	негативний
24.	<i>Escherichia coli</i> «Миргородський 1»	0	негативний
25.	<i>Staphylococcus aureus</i> «Шахтарський-1»	0	негативний
26.	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	0	негативний
27.	<i>Pasteurella multocida</i> «Полонський»	0	негативний
28.	<i>Fusobacterium necrophorum</i> «Чернігівський»	0	негативний
29.	<i>Clostridium perfringens</i> тип А «Запорізький»	0	негативний
30.	<i>Clostridium septicum</i> «Черкаський-97»	0	негативний
31.	<i>Chlamydophila psittaci</i>	0	негативний
32.	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	0	негативний
33.	<i>Brucella abortus bovis</i>	0	негативний
34.	К-	0	негативний

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

Висновки та перспективи подальших досліджень:

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

2. На основі цих праймерів був створений протокол виявлення ДНК патогенних лептоспір при 40-циклічній 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 лептоспір в зразках з кількістю 400 клітин в пробі, що відповідає 4000 клітин/см³.

Запропонована методика буде рекомендована тваринницьким господарствам для проведення моніторингу і контролю за розповсюдженням лептоспірозу та з метою контролю санації нирок тварин після проведення антибіотикотерапії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Малахов Ю.А. Лептоспироз животных / Ю.А. Малахов, А.Н. Панин, Г.Л. Соболева. – Ярославль: ДИА-пресс, 2000. – 584 с.
2. Leptospirosis worldwide// Weekly Epidemiological Record. – 1999. – Vol. 74. – P. 237–242.
3. Наконечна Т. Епізоотологічна та епідеміологічна ситуація з лептоспірозу на півдні України / Т. Наконечна // Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 7. – С. 27–29.
4. Bomfim M.R. 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 // Veterinary Microbiology. – 2006. – Vol. 118(3–4). – P. 278–288.
5. *Leptospira* and leptospirosis / S. Faine, B. Adler, C. Bolin, P. Perolat // Melbourne, Australia: MediSci. – 1999. – 154 p.

6. Pinne M., Naake D.A. LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies / M. Pinne, D. A. Naake // 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. Розробка протоколу виявлення патогенних лептоспир методом полімеразної ланцюгової реакції / В. В. Уховський, А. П. Герілович, О. С. Солодянкін, В. В. Куликова // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – 2014. – № 201. – Ч. 1. – С. 185–191.
9. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics [Electronic resource] / EURACHEM Working Group. – Mode of access: <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>. – Title from the screen.
10. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies: (Technical Report) / W. Horwitz; International Union of Pure and Applied Chemistry// Pure and Applied Chemistry. – 1995. – Vol. 67, N 2. – P. 331-343.
11. Костюк С.А. Критерии внутрилабораторного контроля качества молекулярно-биологических исследований [Электронный ресурс] / С.А. Костюк. – Режим доступа : <http://urobel.uroweb.ru/article/id-20>. – Заглавие с экрана.
12. Валидация биоаналитического метода: методические рекомендации / Министерство здравоохранения Украины, ГП «Государственный экспертный центр». – Киев, 2013. – 35 С.
13. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та комплектувальних лабораторій (ISO 17025:2005, IDT): ДСТУ ISO 17025:2005. – [Чинний від 2007-07-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2007. – VI, 25 с.; 29 см. – (Національний стандарт України).
14. 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» – Москва, 2009. – 24 с.
15. Gel purified LipL32: a prospective antigen for detection of leptospirosis / P. Tahiliani [et al.] // Journal of Postgraduate Medicine. – 2005. – Vol. 51(3). – P. 164–168.
16. Calcium binds to LipL32, a lipoprotein from pathogenic *Leptospira*, and modulates fibronectin binding / Tung J.Y. [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285. – P. 3245–3252.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПАТОГЕННЫХ ЛЕПТОСПИР / Уховский В.В., Музыкаина Л.М., Галка И.В., Спиридонов В.Г., Пискун А.В., Царенко Т.М., Антоник И.И., Пискун Е.А., Шевченко Т.В.

В статье приведены результаты разработки и валидации методики полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для обнаружения ДНК патогенных лептоспир по международным требованиям. Установлено, что разработанная праймерная система проявляет выраженную гибридизационную активность по отношению к ДНК-матрице при 45°C с концентрацией ионов магния в реакционной смеси 1,5 ммоль/мл. Представленные показатели определения чувствительности, предела обнаружения и специфичности методики, которые свидетельствуют о возможности ее применения с целью выявления ДНК патогенных лептоспир при диагностике лептоспироза в хозяйствах Украины.

Ключевые слова: лептоспира, ДНК, ПЦР в режиме реального времени, протокол амплификации, оптимизация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION DNA OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA / Ukhovskiy V.V., Muzykina L.M., Galka I.V., Spyrudonov V.G., Pyskun A.V., Tsarenko T.M., Antonik I.I., Pyskun O.O., Shevchenko T.V.

Introduction. Currently the polymerase chain reaction (PCR) development and use are conducted for the detection of the genetical and pathological characteristics of *Leptospira* and leptospirosis diagnostics. Due to this method, it is possible to detect small amounts of *Leptospira*'s DNA in clinical and environment samples, and for identification of *Leptospira* cultures as well.

The goal of the work was to develop and validate the DNA protocol for detection of pathogenic *Leptospira* by the PCR in real time and to optimize the conditions for the amplification reaction.

Materials and methods. To analyze the nucleotide sequences, which encodes the outer membrane lipoprotein LipL 32 synthesis, the sites of pathogenic *Leptospira* genome were collected from the GenBank on-line database.

The composition of the reaction mixture and the temperature parameters of amplification were determined by using DNA from 7 reference strains of pathogenic *Leptospira*: 493 Poland, Kabura, Perepelicyni, Pomona, Moskva V, Hond Utrecht IV, M 20.

The sensitivity of this protocol was studied using DNA-extract from reference pathogenic strain of *Leptospira* M 20 (serogroup Icterohaemorrhagiae).

The specificity of this method was tested on the strains of microorganisms as follow: saprophytic species *Leptospira biflexa*, strain Patoc 1; *Chlamydomyxa 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*.

Results of research and discussion. The results of the development and validation of the method of PCR real-time for the detection of pathogenic *Leptospira* DNA by international guidelines were revealed. It was established that the developed primer hybridization system showed pronounced activity against DNA template at 45°C and the concentration of magnesium ions in the reaction mixture of 1,5 mM/microliter. Presented parameters confirmed the sensitivity, specificity and limits of detection techniques.

Conclusion and prospects further research. Specific primers LipL 32 F/R were designed on the base of conservative sites analysis of the outer membrane lipoprotein gene Lip L 32 nucleotide sequences of the pathogenic *Leptospira*. The developed protocol for the detection of pathogenic *Leptospira* DNA is specific, accurate and provides detection of pathogenic *Leptospira* DNA in samples with 4000 cells/ml. This protocol will propose for livestock farms to monitoring and control of the spread of leptospirosis.

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

REFERENCES

1. Malahov, Yu.A., Panin, A.N. & Soboleva, G.L. (2001). *Leptospiroz zhyvotnyh [Leptospirosis in animals]*. Yaroslavl: DIA-press [in Russian].
2. Smythe, L.D. (1999). Leptospirosis worldwide. *Weekly Epidemiological Record*, 74, 237-242.
3. Nakonechna, T. (2002). Epizootologichna ta epidemiologichna situacija z leptospirozu na pivdni Ukrainy [Epizootological and epidemiological situation at leptospirosis in the south of Ukraine]. *Veterynarna medicina Ukrainy – Veterinary medicine of Ukraine*, 7, 27-29 [in Ukrainian].
4. Bomfim, M.R. & Koury, M.C. (2006). Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira* spp. In urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 118(3-4), 278-288.
5. Faine, S., Adler, B., Bolin, C. & Perolat, P. (1999). *Leptospira and leptospirosis*. Australia: MediSci.

6. Pinne, M., Haake, D.A. (2013). LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PLoSOne*, 8(1), 302-310.
7. Ukhovskiy, V.V., Kucherjavenko, O.O. & Kulikova V.V. (2014). *Metodichni rekomendacii shhodo indikacii DNK patogennih leptospir za dopomogoju polimeraznoi lancjugovoi reakcii [Methodical recommendations for DNA indication of pathogenic Leptospira by the polymerase chain reaction]*. Nizhyn: PP Lysenko [in Ukrainian].
8. Ukhovskiy, V.V., Gerilovych, A.P., Solodyankin, O.S. & Kulikova V.V. (2014). Rozrobka protokolu vijavlennja patogennih leptospir metodom polimeraznoi lancjugovoi reakcii [Development of protocol for detecting pathogenic *Leptospira* by the polymerase chain reaction]. *Naukovij visnik Nacional'nogo universitetu bioresursiv i prirodokoristuvannja Ukrainy – Scientific herald of the National University of Bioresources and Nature Management of Ukraine*, 201(1), 185-191 [in Ukrainian].
9. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. *eurachem.org*. Retrieved from <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>.
10. Horwitz, W. (1995). Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies: (Technical Report). International Union of Pure and Applied Chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 67(2), 331-343.
11. Kostiuk, S.A. Kriterii vnutilaboratornogo kontrolja kachestva molekulyarno-biologicheskikh issledovanij [Criteria for Intralaboratory Quality Control for Molecular Biological Research]. *urobel.uroweb.ru*. Retrieved from <http://urobel.uroweb.ru/article/id-20> [in Ukrainian].
12. Validacija bioanaliticheskogo metoda: metodicheskie rekomendacii [The validation of bioanalytical metod]. (2013). *Guidelines*. Kyiv: Ministerstvo zdavoohranenija Ukrainy, GP «Gosudarstvennyj ekspertnyj centr» – Ministry of Health in Ukraine, «State Expert Center» [in Ukrainian].
13. Zagal'ni vimogi do kompetentnosti viprobuval'nih ta komplektuval'nih laboratorij [General requirements for the competence of testing and complex laboratories]. (2007). *ISO 17025:2005*. Kyiv: Derzhspozhivstandart Ukrainy [in Ukrainian].
14. Zemskaya, M.S. (2009). Differenciacija leptospir razlichnyh ekologicheskikh grupp na osnove gena, kodirujushhego lipoprotein naruzhnoj membrany LipL32 [Differentiation of *Leptospira* in different ecological groups on the basis of the gene that encoding the lipoprotein of the outer membrane LipL32]. *Extended abstract of candidate's thesis*. Moskva [in Russian].
15. Tahiliani, P., Kumar, M.M.& Chandu, D. (2005). Gel purified LipL32: a prospective antigen for detection of leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51(3), 164-168.
16. Tung, J.Y., Yang, C.W.& Chou, S.W. (2010). Calcium binds to LipL32, a lipoprotein from pathogenic *Leptospira*, and modulates fibronectin binding. *Journal of biological chemistry*, 285, 3245-3252.