УДК 619:616.98-078:579.882.11:577.2.08:636 **DOI 10.36016/VM-2022-108-13**

ВИПРОБУВАННЯ ДІАГНОСТИЧНОГО НАБОРУ «CHLAMYDIA-DNA-TEST» ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ ХЛАМІДІЙ НА ОСНОВІ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ

Павлов С. Л.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: psl600@i.ua

Запропоновано діагностичний набір «Chlamydia-DNA-test» для виявлення генетичного матеріалу хламідій в зразках клінічного матеріалу тварин на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу. Мета роботи полягала у встановлені валідаційних характеристик створеного набору за показниками діагностична чутливість, специфічність і відтворюваність. За результатами оцінювання тест-системи підтверджено високу чутливість, специфічність та відтворюваність. Межа детекції розробленої методики складала 12,5 копій ДНК на одну реакцію. Випробування експериментальної серії тест-системи у трьох повторах показало відтвореність запропонованого протоколу ампліфікації. Відсутність утворення продукту ампліфікації в негативних зразках доводить специфічність зазначеного діагностикуму. Тест-система «Chlamydia-DNA-test» за показниками специфічності, чутливості, відтворюваності відповідає рекомендаціям, які викладені в мануалі МЕБ, та після проведення державної реєстрації може бути запропонована до широкого впровадження у практику ветеринарної медицини, що значно підвищить ефективність лабораторної діагностики хламідіозів в Україні

Ключові слова: *діагностика, ДНК, специфічність*

Бактерії, що належать до родини Chlamydiaceae, є внутрішньоклітинними патогенами та спричиняють широкий спектр клінічних ознак у великої кількості видів тварин, а також людини. Захворювання реєструється в багатьох країнах світу та завдає значних економічних збитків тваринництву [1]. Серед важливих видів збудників хламідіозів сільськогосподарських тварин є наступні: для жуйних — *C. abortus, C. pecorum*; для птиці — *C. psittaci*; для свиней — *C. suis*; для кішок — *C. felis*; для мурчаків — *C. caviae*. Хламідіоз може клінічно проявлятися декількома формами: генітальна у самиць — аборти, ендометрити, мастити, мертвонародження, а у самців — орхіти, епідидиміти, уретрити, баланопостити; респіраторна — риніт, кон'юнктивіт, бронхіт, пневмонію або змішана [2, 3]. За асоційованого перебігу хламідіоз є ускладнюючим фактором, який пригнічує імунну систему інфікованих тварин. З огляду на стаціонарність і природну осередковість хламідіозу необхідно проводити аналіз з метою своєчасного встановлення шляхів заносу інфекції та швидко встановлювати патогенний потенціал відповідних збудників [4].

Труднощі, пов'язані з виділенням збудника, значно ускладнюють діагностику хламідіозу, тому на цей час існує низка тестів, здатних виявляти хламідії, або їхній генетичний матеріал в клінічному матеріалі. До таких тестів відносять полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), за допомогою якої можна виявити декілька молекул ДНК у досліджуваному зразку [5, 6]. Чутливість і специфічність такої реакції наближається до 100 %, а за швидкістю отримання результату її відносять до експрес-тестів. З часу відкриття ПЛР було запропоновано велику кількість варіантів ампліфікації шуканої ділянки таргентного гена. Так, ПЛР у режимі реального часу значно пришвидшує отримання результатів і дозволяє визначати кількість копій геному того чи іншого збудника. Наші попередні дослідження були спрямовані на пошук специфічних олігонуклеотидних послідовностей та зонду для проведення ПЛР у реальному часі для виявлення ДНК хламідій, розробленню протоколу ампліфікації з наступними визначеннями чутливості та специфічності запропонованої методики [7, 8]. Метою даної роботи було формування діагностичного набору «Chlamydia-DNA-test» для детекції генетичного матеріалу хламідій на основі ПЛР у режимі реального часу та визначення його валідаційних параметрів.

Матеріали та методи. Створення експериментальної серії тест-системи «Chlamydia-DNA-test» здійснювали з використанням реактивів виробництва фірми Applied Biosystems (AmpliTaq Gold). Постановка реакції відбувалася на обладнані Fast 7500 Real-time PCR system (Thermo Scientific) за модифікованим протоколом, що був розроблений раніше [7]. Режим ампліфікації подано у табл. 1.

Таблиця 1 — Режим проведення реакції ампліфікації для детекції генетичного матеріалу *Chlamydia* spp.

Назва етапу	Режим	Кількість циклів
Початкова денатурація	95 °С – 5 хв	1
Денатурація	95 °С – 15 с	45
Відпал	60 °С – 20 с	
Елонгація	72 °С – 40 с	

З метою визначення валідаційних характеристик (специфічність, аналітичну чутливість, відтворюваність) розробленої методики проведення ПЛР досліджували панелі зразків ДНК з наступним аналізом отриманих результатів. Якість проведених досліджень визначали за коефіцієнтом варіації (CV) в межах одного і декількох послідовних експериментів. При цьому він мав бути не більше 5 %.

Аналітичну чутливість визначали за допомогою проведення 20 повторних ПЛР з використанням позитивного плазмідного контролю з послідовними розведеннями з визначенням такої концентрації, за якої всі позитивні зразки показували чіткий флуоресцентний сигнал.

Внутрішньолабораторну відтворюваність оцінювали на основі результатів реальних проб, отриманих в умовах відтворюваності, тобто в умовах, які характеризують тривалу варіацію всіх факторів, що можуть вплинути на результат вимірювання в лабораторії на кожному з етапів.

Для визначення специфічності розробленого методу, проводили ПЛР з використанням панелей зразків ДНК, виділених із різних видів хламідій (гомологічні зразки), а також інших видів бактерій, або клінічного матеріалу (гетерологічні зразки) (табл. 2).

Таблиця 2 — Перелік зразків ДНК, що були використані для визначення специфічності методу

№ з/п	Матеріал, з якого виділено зразок ДНК
гомологічна панель	
1	*Chlamydia abortus*
2	*Chlamydia pecorum*
3	*Chlamydia muridarum*
4	*Chlamydia psittaci*
5	*Chlamydia suis*
6	вагінальний зіскрібок з інфікованої *Chlamydia abortus* вівці
7	кон'юнктивальний мазок від інфікованого *Chlamydia pecorum* теляти
гетерологічна панель	
6	*Listeria monocytogenes*
7	*Brucella ovis*
8	*Brucella abortus*
9	*Campylobacter fetus* subsp *fetus*
10	*Coxiella burnetti*
11	*Leptospira icterohaemorrhagiae*
12	*Mycoplasma agalactiae*
13	*Corynebacterium pseudotuberculosis*
14	вагінальний зіскрібок від інтактної вівці
15	кон'юнктивальний мазок від здорового теляти

Як внутрішній контрольний зразок ампліфікації (ВКЗ) нами було використано плазміду pcDNA3-EGFP, яка містить ділянку гена *EGFP* медузи *Aequorea victoria* довжиною 177 п. н. Для апліфікації зазначеної ділянки використовували праймерні послідовності EGFP-1-F (GACCACTACCAGCAGAACAC), EGFP-10-R (CTTGTACAGCTCGTCCATGC) та зонд EGFP-HEX (HEX-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ1), мічений флуоресцентним барвником HEX і гасником флюоресценції BHQ1.

Достовірність отриманих результатів підтверджувалася, якщо Ct позитивного контролю ≤ 35 (за FAM-барвником), негативного контролю — відсутність сигналу, а також значення Ct усіх досліджуваних зразків ≤ 35 (за HEX-барвником). Досліджуваний зразок вважався позитивним щодо наявності ДНК хламідій при значенні Ct ≤ 40.

Аналіз результатів проводили з використанням програмного забезпечення HID Real-Time PCR Analysis Software v.1.1. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програм пакету Microsoft Office (Microsoft Excel).

Результати досліджень. З метою перевірки ефективності розробленого протоколу проведення ПЛР у реальному часі та створення на її основі тест-системи, визначали показники чутливості, специфічності, відтворюваності, повторюваності.

Для визначення аналітичної чутливості або межи детектування (LOD — limit of detection, мінімальна кількість копій специфічної ДНК, яку реакція виявляє в 100 % тестувань) проводили ПЛР з підготовленими зразками позитивного плазмідного контролю, розведеного до концентрації від 1,5625 до 100 копій ДНК на одну реакцію (табл. 3).

Таблиця 3 — Визначення аналітичної чутливості ПЛР

Кількість копій ДНК на одну реакцію	Коефіцієнт детекції (кількість виявлених/кількість повторень)
100	(20/20)
50	(20/20)
25	(20/20)
12,5	**(20/20)**
6,250	(12/20)
3,125	(3/20)
1,5625	(0/20)

Таким чином, було встановлено, що межа детекції розробленої методики складає 12,5 копій ДНК на одну реакцію.

Діагностичну специфічність встановлювали за наявністю флуоресцентного сигналу за FAM у позитивних зразках (гомологічна панель) і відсутності такого у негативних зразках (гетерологічна панель зразків ДНК) (табл. 4). Отримані результати свідчать про утворення чітких сигналів флюоресценції при дослідженні усіх зразків з гомологічної панелі зразків ДНК з показниками Ct від 19,49 ± 0,42 до 30,31 ± 0,55, при чому жоден зразок з гетерологічної панелі не визначено, як позитивний. Також значення CV позитивних зразків складало від 1,3 до 3,9 %, що підтверджую високу достовірність отриманих результатів.

На додаток було проведено випробування розробленої ПЛР на панелі з 12 зразків ДНК, що була надіслана для професійного тестування з референс-лабораторії МЕБ з ензоотичного аборту овець. Результати цих випробувань відображено в табл. 5. Проведені дослідження запропонованої панелі зразків у трьох повторах дозволили визначили статус кожного зразка, що у підсумку збіглося з результатами, які були отримані в іншій лабораторії. Ці результати свідчать про пряму залежність сигналу флуоресценції від ступеня розведення ДНК, тобто дана методика є високоефективною, а отриманий результат — прямо пропорційним концентрації зразка.

Таким чином, створено протокол проведення реакції ампліфікації у форматі реального часу, чутливість якої визначена як 12,5 копій ДНК хламідій в одному зразку. Отримані параметри валідації відповідають загальним вимогам щодо проведення ПЛР аналізу та дозволяють застосовувати дану методику в лабораторній практиці, повністю задовольняє діагностичні потреби. З огляду на вищезазначене необхідним вбачалося розробити діагностичний набір, який можна було б рекомендувати для широкого впровадження лабораторіям ветеринарної медицини для ефективної діагностики хламідіозу тварин.

Таблиця 4 — Визначення специфічності розробленої ПЛР

№ з/п	Матеріал, з якого виділено зразок ДНК	Ct (M ± m)	Коеф. варіації CV, %	Діагностична оцінка
гомологічна панель				
1	*Chlamydia abortus* ±	23,68 ± 0,38	1,6	позитивно
2	*Chlamydia pecorum*	21,57 ± 0,33	1,5	позитивно
3	*Chlamydia muridarum*	23,13 ± 0,51	2,2	позитивно
4	*Chlamydia psittaci*	19,49 ± 0,42	2,2	позитивно
5	*Chlamydia suis*	21,62 ± 0,84	3,9	позитивно
6	вагінальний зіскрібок з інфікованої *Chlamydia abortus* вівці	28,69 ± 0,38	1,3	позитивно
7	кон'юнктивальний мазок від інфікованого *Chlamydia pecorum* теляти	30,31 ± 0,55	1,8	позитивно
гетерологічна панель				
6	*Listeria monocytogenes*	відсутнє	-	негативно
7	*Brucella ovis*	відсутнє	-	негативно
8	*Brucella abortus*	відсутнє	-	негативно
9	*Campylobacter fetus* subsp *fetus*	відсутнє	-	негативно
10	*Coxiella burnetti*	відсутнє	-	негативно
11	*Leptospira icterohaemorrhagiae*	відсутнє	-	негативно
12	*Mycoplasma agalactiae*	відсутнє	-	негативно
13	*Corynebacterium pseudotuberculosis*	відсутнє	-	негативно
14	вагінальний зіскрібок від інтактної вівці	відсутнє	-	негативно
15	кон'юнктивальний мазок від здорового теляти	відсутнє	-	негативно

Таблиця 5 — Дослідження панелі зразків ДНК, отриманої для професійного тестування з референс-лабораторії МЕБ з ензоотичного аборту овець

№ з/п	Зразок ДНК	Ct (M ± m)	Коеф. варіації CV (%)	Діагностична оцінка
1	*C. abortus* 10^4	27,88 ± 0,73	2,6	позитивно
2	*C. avium* 10^4	28,86 ± 0,54	1,9	позитивно
3	*C. psittaci* 10^5	27,91 ± 0,88	3,2	позитивно
4	Вагінальний мазок від інтактної вівці	відсутнє	-	*негативно*
5	Гомогенат легень ВРХ	відсутнє	-	*негативно*
6	Гомогенат легень ВРХ + *C. psittaci* 10^5	33,07 ± 0,93	2,8	позитивно
7	Гомогенат легень ВРХ + *C. abortus* 10^5	26,27 ± 0,28	1,1	позитивно
8	Гомогенат легень ВРХ	відсутнє	-	*негативно*
9	Качиний послід + *C. gallinacea* 10^4	28,05 ± 0,51	1,8	позитивно
10	Качиний послід + *C. psittaci* 10^3	35,60 ± 0,41	1,2	позитивно
11	Качиний послід	відсутнє	-	*негативно*
12	Качиний послід + *C. psittaci* 10^5	29,48 ± 0,98	3,3	позитивно

Для впровадження розроблених нами праймерів і методики виявлення бактерій роду *Chlamydia* нами було сформовано діагностичну тест-систему «Chlamydia-DNA-test». Це було обумовлено відсутністю аналогів на ринку України. Склад експериментальної серії тест-системи подано у табл. 6. Реакційна суміш була оптимізована та складалася з розчинів праймерів у концентрації 10 пмоль/мкл, зондів, 10×буфер з $(NH_4)_2SO_4$, 2,0 мМ $MgCl_2$, 4 мМ кожного із dNTP, 1 МО Taq-полімерази. При її приготуванні враховували також оптимізовані концентрації $MgCl_2$ та *Taq*-полімерази, які були отримані на попередньому етапі. Також, до складу набору увійшли позитивний плазмідний контрольний зразок та внутрішній контрольний зразок. Кожен з компонентів розфасовано у пробірки у кількості, необхідній для проведення 50 або 100 аналізів. Наявність ВЗК забезпечувала правильність екстракції ДНК, запобігання хибно-негативних результатів та контроль відсутності інгібіторів у досліджуваних зразках.

Таблиця 6 — Склад тест-системи для детекції генетичного матеріалу бактерій роду *Chlamydia* на основі ПЛР у форматі реального часу

№ з/п	Назва компоненту	Фасування
1	Реакційна суміш RT-PCR MasterMix	Пробірка – 1 або 2 мл
2	Позитивний контрольний зразок	Пробірка – 0,03 або 0,06 мл
3	Внутрішній позитивний контроль	Пробірка – 0,1 або 0,2 мл
4	Вода деіонізована	Пробірка – 0,5 або 1 мл

Установлено, що тест-система здатна виявляти ДНК збудників хламідіозу в зразках клінічного матеріалу за відсутності відповідно сигналу в негативних пробах. Правильність постановки реакції підтверджувалася ампліфікацією ВЗК (табл. 7).

Таблиця 7 — Результати випробувань тест-системи «Chlamydia-DNA-test» (n = 3)

№ зразку	Опис зразку	Ct (M ± m) за FAM	Ct (M ± m) за HEX	Результат
1	ДНК Chlamydia abortus S26/3	24,36 ± 0,18	28,54 ± 0,22	позитивний
2	Позитивний плазмідний контроль 1:10	21,96 ± 0,09	27,76 ± 0,28	позитивний
3	Позитивний плазмідний контроль 1:100	23,19 ± 0,36	30,11 ± 0,15	позитивний
4	Позитивний плазмідний контроль 1:1000	27,01 ± 0,24	26,91 ± 0,41	позитивний
5	Змив з кон'юнктиви теляти, хворого на хламідіоз	30,22 ± 0,15	29,42 ± 0,66	позитивний
6	Плацента абортованого плоду вівці	31,13 ± 0,23	28,17 ± 0,36	позитивний
7	Вагінальний мазок корови, що абортувала	n	28,88 ± 0,49	негативний
8	Вагінальний мазок здорової корови	n	26,23 ± 0,57	негативний
9	Сперма бугая-плідника з благополучного щодо хламідіозу господарства	n	29,04 ± 0,38	негативний
10	Змив з кон'юнктиви здорового теляти	n	27,16 ± 0,23	негативний
11	Негативний контроль	n	29,08 ± 0,17	негативний

Примітка: n — сигнал відсутній.

Випробування експериментальної серії тест-системи у трьох повторах показало відтвореність запропонованого протоколу ампліфікації. Відсутність утворення продукту ампліфікації в негативних зразках доводить специфічність зазначеного діагностикуму.

Таким чином, розроблена тест-система «Chlamydia-DNA-test» за показниками специфічності, чутливості, відтворюваності відповідає рекомендаціям, які викладені в мануалі МЕБ [9].

Висновки. Створено протокол проведення реакції ампліфікації у форматі реального часу, чутливість якої визначена як 12,5 копій ДНК хламідій в одному зразку. Отримані параметри валідації відповідають загальним вимогам щодо проведення ПЛР аналізу та дозволяють застосовувати дану методику в лабораторній практиці, повністю задовольняє діагностичні потреби. На основі зазначеної методики створено тест-систему «Chlamydia-DNA-test», яка за показниками специфічності, чутливості та відтворюваності відповідає існуючим вимогам та може бути запропонована до широкого впровадження у практику ветеринарної медицини, що значно підвищить ефективність лабораторної діагностики хламідіозів в Україні.

Список літератури

1. Elwell C., Mirrashidi K., Enge J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*. 2016. Vol. 14, No 6. P. 385–400. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.30.
2. Wheelhouse N., Longbottom D. Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications. *Transboundary and emerging diseases*. 2012. Vol. 5, No 4. P. 283–291. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01274.x.
3. Reinhold P., Sachse K., Kaltenboeck B. Chlamydiaceae in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens? *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 2011. Vol. 189, No 3. P. 257–267. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.003.

4. Cheong H. C. et al. *Chlamydiaceae* : Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. *Microorganisms*. 2019. Vol. 7, No 5. P. 146. DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146.
5. Vidal S. et al. Neglected zoonotic agents in cattle abortion: tackling the difficult to grow bacteria. *BMC veterinary research*. 2017. Vol. 13, No 1. P. 373. DOI: https://doi.org/10.1186/s12917-017-1294-y.
6. Lienard J. et al. Development of a new chlamydiales-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *Journal of clinical microbiology*. 2011. Vol. 49, No 7. P. 2637–2642. DOI: https://doi.org/10.1128/JCM.00114-11.
7. Павлов С. Л., Стегній Б. Т. Підбір олігонуклеотидних послідовностей з метою детекції генетичного матеріалу *Chlamydia* spp. за допомогою реакції ампліфікації. *Ветеринарна медицина :* міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2020. Вип. 106. С. 73–77. DOI: https://doi.org/10.36016/VM-2020-106-13.
8. Павлов С. Л. Розроблення та валідація позитивного плазмідного контролю для виявлення генетичного матеріалу хламідій у полімеразній ланцюговій реакції у форматі реального часу. *Ветеринарна медицина :* міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2021. Вип. 107. С. 74–78. DOI: https://doi.org/10.36016/VM-2021-107-13.
9. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2022. URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm.

TESTING OF "CHLAMYDIA-DNA-TEST" DIAGNOSTIC KIT FOR THE DETECTION OF CHLAMYDIAL GENETIC MATERIAL BASED ON THE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Pavlov S. L.
National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

A diagnostic kit "Chlamydia-DNA-test" is proposed for the detection of chlamydial genetic material in samples of clinical animal material based on polymerase chain reaction (PCR) in real time. The purpose of the work was to establish the validation characteristics of the created set according to indicators of diagnostic sensitivity, specificity and reproducibility. According to the results of the evaluation of the test system, high sensitivity, specificity and reproducibility were confirmed. The detection limit of the developed technique was 12.5 DNA copies per reaction. The test of the experimental series of the test system in three repetitions showed the reproducibility of the proposed amplification protocol. The absence of amplification product formation in negative samples proves the specificity of the indicated diagnostic kit. "Chlamydia-DNA-test" regarding of its specificity, sensitivity, and reproducibility corresponds to the recommendations set forth in the OIE manual, and after state registration can be proposed for wide implementation in the practice of veterinary medicine, which will significantly increase the efficiency of laboratory diagnostics of chlamydiosis in Ukraine

Keywords: *diagnostics, DNA, specificity*