

DEVELOPMENT AND TESTING OF MONITORING SYSTEM FOR DETECTION OF CONTAMINATED BIOLOGICAL OBJECTS BY SALMONELLA**Gerilovych A.P., Glebova K.V., Arefjev V.L.**

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkov

Development and practical studying of the test system based on the polymerase chain reaction for detection of any member from the Salmonella genus and the most common serological types under veterinary laboratory practice. Studying of biological objects concerning its contamination by the most common serological variants of Salmonella.

Materials and Methods. For the monitoring of biological samples manufacturing feeds for birds of different ages and feed additives ($n=240$) were analyzed. For development and testing of monitoring systems bacteriological and molecular diagnostic methods based on polymerase chain reaction were used.

Results. Proposed test system, based on PCR, includes genus-specific oligonucleotides as well as five pairs of species-specific primers to identify members of the genus Salmonella. The scheme of monitoring of presence of Salmonella genetic material in biological objects with the typing of the five most clinically important Salmonella was proposed. The approbation of the proposed system was done. The presence of genetic material of Salmonella was confirmed in five of the seven test material types. Four genotypes of Salmonella were detected and isolated. The studying of the samples by conventional bacteriological methods confirmed the results that were obtained using the PCR.

Conclusions. Scheme of monitoring studies using PCR test system that can simultaneously conduct genotyping major clinically relevant species of Salmonella was proposed and tested. It has been found that the sensitivity and specificity of this test system is equal to the results of bacteriological studies.

Keywords: Salmonella, contamination, monitoring, system.

УДК 619:616.98-07:636.4

ВИКОРИСТАННЯ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗБУДНИКІВ ТРАНСКОРДОННИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН**Спиридонов В. Г., Іщенко Л. М., Мельничук С. Д.**

Національний університет біоресурсів та природокористування України

Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК, м. Київ, e-mail: spyrydonov@ukr.net

Розроблено діагностичні тести на основі ПЛР у реальному часі для детекції нуклеїнових кислот збудників блутангу, африканської чуми свиней та хвороби Шмалленберга у біологічному матеріалі. Проведено оптимізацію умов ампліфікації. Досліджено аналітичну специфічність та чутливість запропонованих тестів.

Ключові слова: блутанг, африканська чума свиней, хвороба Шмалленберг, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі.

Транскордонні хвороби (Transboundary Animal Diseases) – це хвороби, які мають ключове значення для економіки, торгівлі та продовольчої безпеки багатьох країн світу, здатні до широкого транскордонного поширення в епідемічних масштабах, викликають високу летальність сприйнятливих тварин, а боротьба з ними вимагає спільних зусиль декількох країн [4].

Сьогодні важливе значення для нашої держави має африканська чума свиней (АЧС), оскільки випадки захворювання реєструються в Російській Федерації поблизу українсько-російського кордону. Африканська чума свиней (Pestis africana suum, хвороба Монтгомері) – висококонтагіозне захворювання свиней з летальністю 97–100 %. Викликається захворювання ДНК-вмісним вірусом родини *Asfarviridae*. Занесення збудника АЧС у благополучні країни розглядається як соціальна й економічна катастрофа. Це пов'язано з величезними економічними збитками, спричиненими епізоотією, які складаються із забою всіх свиней в епізоотичних вогнищах, проведенням ветеринарно-санітарних і карантинних заходів [1, 11].

Важливе значення має і таке захворювання як блутанг (Bluetongue, катаральна лихоманка овець, «синій язик», реовірусна інфекція овець), трансмісивна інфекція свійських і диких жуйних тварин, що характеризується лихоманкою, некрозом слизової оболонки травного каналу, дистрофією скелетних м'язів. Зазвичай блутанг проявляється у вигляді епізоотій із охопленням значної кількості поголів'я з летальністю до 90 %. Збудником захворювання є РНК-вмісний вірус родини *Reoviridae*, роду *Orbivirus*. Блутанг реєструють у ряді країн Європейського Союзу, зокрема, у Польщі, що становить потенційну небезпеку для нашої держави [2, 3, 9, 10].

Одним з маловивчених захворювань, яке наразі зумовило введення запобіжних заходів практично по всій Європі, є хвороба Шмалленберг, вперше виявлена в Німеччині у молочних корів влітку 2011 року. Встановлено, що викликається захворювання РНК-вмісним вірусом родини *Bunyaviridae*, роду *Ortobunyavirus*, серогрупи *Simbu* [5, 6].

Для усіх транскордонних захворювань Міжнародним Епізоотичним Бюро розроблені протоколи лабораторної діагностики, які рекомендовані для практичного використання. Серед методів діагностики важливе місце належить молекулярно-генетичним методам, з яких найчастіше використовується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Наприклад, саме ПЛР використовується референсними лабораторіями для діагностики та підтвердження АЧС, оскільки метод дозволяє виявляти як гемадсорбуючі, так і гемнеадсорбуючі штами вірусу АЧС [7]. А для діагностики хвороби Шмалленберг ПЛР є єдиним на сьогодні методом ідентифікації вірусу в лабораторних умовах [5]. В Україні немає вітчизняних тестів для ідентифікації збудників транскордонних хвороб методом ПЛР, а враховуючи переваги методу для швидкої та точної діагностики необхідність їх очевидна.

Метою нашої роботи було розробити тести на основі ПЛР із детекцією в реальному часі для ідентифікації нуклеїнових кислот збудників АЧС, блутангу та хвороби Шмалленберг.

Матеріали та методи. Дослідження проводили у відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК. Матеріалом дослідження були зразки крові ВРХ, що містили вірус блутангу 6 та 8 серотипу, надані федеральним науково-дослідним інститутом здоров'я тварин ім. Фридриха Леффлера, (Німеччина); ДНК вірусу африканської чуми свиней, генотип I (VP72), надана Експериментальним інститутом Зоопротілактики (Перуджа, Італія), РНК вірусу Шмалленберг (ID Vet, Франція).

ДНК і РНК із клінічного матеріалу методом сорбції на SiO₂, згідно методики Boom et al. [8]. Нуклеотидну послідовність праймерів і флуоресцентних зондів було підібрано із використанням програми Primer Express (Applied Biosystems).

Ампліфікацію здійснювали в режимі реального часу на приладі *ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems)* і на приладі *CFX96 Real-Time System (BIO-RAD)*.

Температурний режим для детекції ДНК збудника АЧС включав: активацію ДНК полімерази – 5 хв за температури 94 °С, та 40 циклів ампліфікації, які включали денатурацію ДНК (20 сек. за t=95 °С), відпалювання праймерів (30 сек. за t=55 °С) та елонгацію ланцюгів ДНК (30 сек. за t=72 °С).

Для детекції збудника хвороби Шмалленберг проводили одностадійну РТ-ПЛР, температурний режим якої включав: зворотну транскрипцію 40 хв за t=37 °С, активацію ДНК полімерази – 10 хв за t=94 °С та 40 циклів ампліфікації, які включали денатурацію ДНК (20 сек. за t=95 °С), відпалювання праймерів (30 сек. за t=55 °С) та елонгацію ланцюгів ДНК (30 сек. за t=72 °С).

Для детекції збудника блутангу використовували двостадійну ПЛР з проведенням другої стадії в режимі реального часу. Температурний профіль для першої стадії включав: зворотну транскрипцію 40 хв за t=37 °С, активацію ДНК полімерази – 10 хв за t=94 °С і 40 циклів ампліфікації, які включали денатурацію ДНК (20 сек. за t=95 °С), відпалювання праймерів (20 сек. за t=58 °С) та елонгацію ланцюгів ДНК (20 сек. за t=72 °С). Для другої стадії ПЛР температурний режим включав: активацію ДНК полімерази – 5 хв за t=94 °С та 40 циклів ампліфікації, які включали денатурацію ДНК (20 сек. за t=95 °С), відпалювання праймерів (20 сек. за t=58 °С) та елонгацію ланцюгів ДНК (30 сек. за t=72 °С).

Плазмідну ДНК для оцінки чутливості запропонованих тестів отримували за допомогою клонування специфічних продуктів ПЛР у плазмідний вектор pJET1.2 із використанням набору CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) згідно інструкції виробника.

Аналіз результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення ABI Prism 7000 Vs. 1.2.3.

Результати дослідження. Для детекції нуклеїнових кислот збудників вказаних захворювань було обрано ділянку гену нуклеопротеїну кожного із них згідно з рекомендаціями Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ) [10, 11]. Щоб попередити отримання псевдонегативних результатів і контролю якості та кількості виділених нуклеїнових кислот було підібрано праймери для детекції специфічного для ссавців гену. Нуклеотидна послідовність праймерів і флуоресцентних зондів наведена у табл. 1.

Таблиця 1 – Нуклеотидна послідовність праймерів і флуоресцентних зондів для цільових послідовностей та референтних генів

Мішень	Нуклеотидна послідовність		
	For	Rev	Probe
вірус АЧС	gcagggcaagggataactga	ctctgatgagggctcttgcct	FAM-tcatcggaagcattcatga-BHQ1
вірус блутангу	aacatcagtgaggattaccg	cgatcgtagcttgcctcct	FAM-caccacaatggacttcagct-BHQ1
вірус хвороби Шмалленберг	gacccagaaaatcacccgaaa	ctttcgggctttgttagcag	FAM-ctgcagcagttcggtatcaa-BHQ1
Референтний ген	ggcttctggctctttaagc	ccactttctggctcacagca	JOE-aaaagccgctaagaagacc-BHQ1

Для оптимізації ПЛР визначали оптимальну температуру відпалювання праймерів, концентрацію праймерів і флуоресцентних зондів, оптимальну концентрацію хлориду магнію.

Для встановлення аналітичної специфічності розроблених тестів було проведено дослідження біологічного матеріалу, що містив збудників інших хвороб (табл. 2).

Таблица 2 – Визначення аналітичної специфічності запропонованих діагностичних тестів

№	Біологічний матеріал	Набір для ідентифікації ДНК вірусу АЧС	Набір для ідентифікації РНК вірусу блутангу	Набір для ідентифікації РНК вірусу хв. Шмалленберг
		Значення Ct (канал FAM)		
1	ДНК вірусу АЧС	21,45	н/д	н/д
2	Кров свині, хворої на репродуктивно-респіраторний синдром свиней (РРСС)	-	н/д	н/д
3	Кров свині хворої на хламідіоз	-	н/д	н/д
4	Кров свині хворої на КЧС	-	н/д	н/д
5	Кров ВРХ, що містить вірус блутангу 6 серотипу	н/д	16,3	-
6	Кров ВРХ, що містить вірус блутангу 8 серотипу	н/д	14,6	-
7	Кров ВРХ інфікованої вірусом лейкозу	н/д	-	-
8	Кров ВРХ хворої на хламідіоз	н/д	-	-
9	Змиви із ротової порожнини ВРХ хворої на інфекційний ринотрахеїт	н/д	-	-
10	РНК вірусу хвороби Шмалленберг	н/д	-	22,4

Примітка: н/д – не досліджували

Як видно із представлених у таблиці 2 даних, перехресних чи неспецифічних реакцій не відмічалось. Додатково специфічність аналізу для ідентифікації вірусу АЧС було підтверджено шляхом секвенування продуктів ампліфікації (дані не наведені) та порівняння отриманих нуклеотидних послідовностей із базою даних NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). У результаті підтверджено генотип I (VP72).

Оцінку чутливості запропонованих методик проводили шляхом постановки серії розведень плазмідних ДНК, які містили фрагменти нуклеїнових кислот збудника (рис. 1).

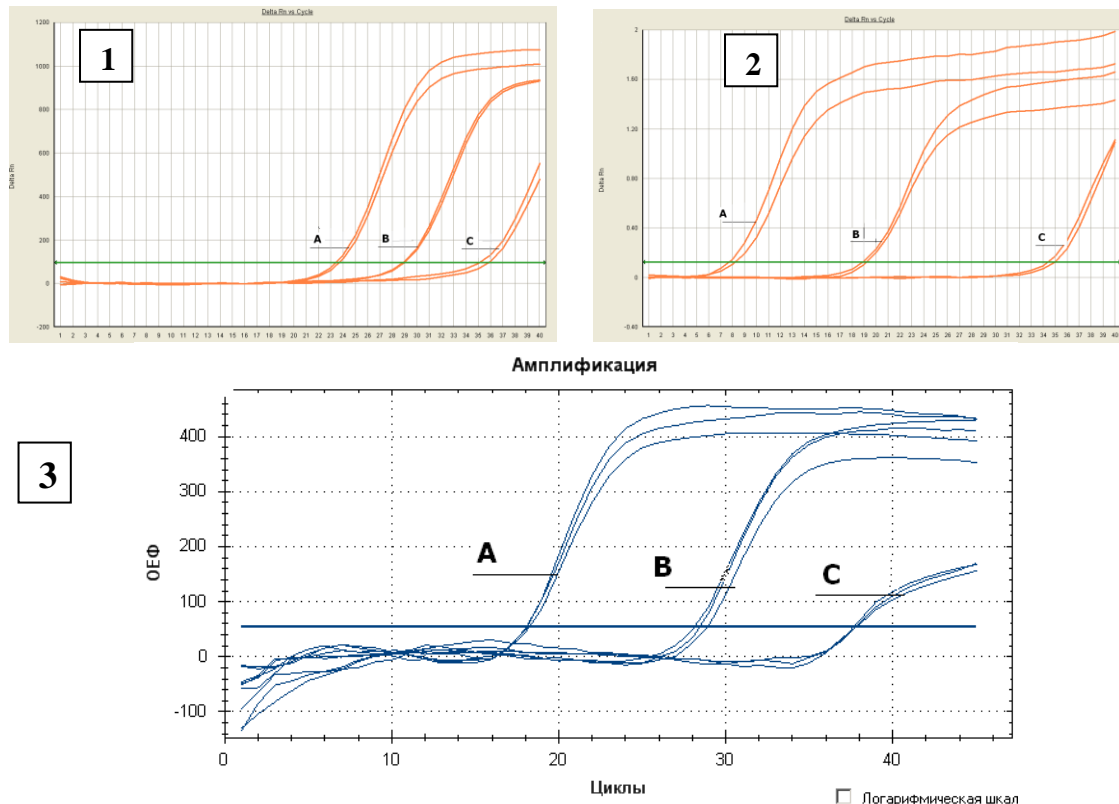


Рис 1. Криві ампліфікації отримані при постановці розведень плазмідної ДНК (А – 1000 копій, В – 100 копій, С – 10 копій); 1. Тест для ідентифікації вірусу АЧС. 2. Тест для ідентифікації вірусу блутангу. 3. Тест для ідентифікації вірусу хвороби Шмалленберг.

Встановлено, що за допомогою запропонованих тестів можна виявити збудника на рівні 10 копій геномних еквівалентів.

Висновки. Запропоновані тести на основі ПЛР у реальному часі для ідентифікації вірусу АЧС, блутангу та хвороби Шмалленберг є специфічними та високочутливими, що дозволяє рекомендувати їх у практику ветеринарних лабораторій для швидкої та точної діагностики транскордонних захворювань, спричинених вказаними збудниками.

Список літератури

1. Африканская чума свиней / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьёв, [и др.] // Вирусные болезни животных. – М. : ВНИТИБП, 1998. – С. 770-787.
2. Епізоотична ситуація щодо блутангу в суміжних з Україною країнах / В. С. Білоконь, Б. Т. Стегній, В. І. Стеценко [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2009. – № 8. – С. 11–13.
3. Потоцький, М.К. Блутанг (Febris Catarrhalis) / М. К. Потоцький, А. І. Тютюн // Ветеринарна медицина України. – 2013. – № 3. – С. 22–25.
4. Список МЭБ и трансграничные инфекции животных [монография] / В. В. Макаров, В. А. Грубый, К. Н. Груздев, О. И. Сухарев. – Владимир : ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2012. – 162 с.
5. New Orthobunyavirus detected in cattle in Germany : [Information of the Friedrich-Loeffler-Institut]. – Greifswald, 2011 (11). – 3 p.
6. Hoffmann, B. Novel Orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011 / B. Hoffmann, M. Scheuch, D. Hoper // Emerging Infectious Diseases. – 2012. – V. 18 (3). – P. 469-471.
7. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay / L. Zsak, M.V. Borca, G.R. Risatti, [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2005 (1). – V. 43. – P. 112-119.
8. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids / R. Boom, C. Sol, M. Salimans [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 1990 (3). – V. 28. – P. 495-503.
9. Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1 / A. E. Shawa, P. Monaghana, H. O. Alparb [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2007 (11). – V. 145 (2). – P. 115–126.
10. World Organization for Animal Health [OIE] : Manual of diagnostic tests and vaccines : Chapter 2.1.3. Bluetongue (NB : Version adopted in May 2009). [Electronic Resource]. – Paris : OIE, 2013. Режим доступу : <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
11. World Organization for Animal Health [OIE] : Manual of diagnostic tests and vaccines : Chapter 2.8.1. African swine fever (NB : Version adopted in May 2012). [Electronic Resource]. – Paris : OIE, 2013. Режим доступу : <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION TO IDENTIFY A PATHOGEN OF TRANSBOUNDARY DISEASES

Spyrydonov V.G., Ishchenko L.M., Melnychuk S.D.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products, Kiev.

The aim of our work was to develop a diagnostic system based on real-time PCR to identify nucleic acids of pathogens of African swine fever (ASF), Bluetongue and Schmallenberg disease.

Material studies were cattle blood samples containing bluetongue virus serotype 6 and 8, DNA of ASF virus genotype I. (VP72) and RNA virus Schmallenberg. DNA and RNA from clinical material was isolated by sorption on SiO₂, according to the procedure of Boom et al. Amplifications were performed on a 7000 ABI PRISM SDS (Applied Biosystems).

Results. For the detection of nucleic acids of pathogens of these diseases was designed primer pars and fluorogenic probes to the region of their nucleoprotein genes. To prevent false negative results, as well as for monitoring the quality and quantity allocated nucleic acids was selected primer pars and fluorogenic probes for detecting a specific gene for pigs (identification of the causative agent of ASF) and specific for ruminants (identification of pathogens and disease Bluetongue Schmallenberg). The optimization of amplification conditions for each disease was carried out. The sensitivity of each test was about 10 copies of genome equivalents (minimum dilution of the plasmid DNA fragment containing the viral nucleic acid to which the amplification curves obtained with a satisfactory confidence level). Non-specific or cross- amplification in the evaluation of analytical specificity of the diagnostic system for identification of ASF virus we used pathogens of porcine respiratory and reproductive syndrome virus, classical swine fever, and chlamydia. As well as for identification of Bluetongue virus we utilize pathogens of bovine enzootic leukosis, chlamydia and infectious bovine rhinotracheitis. No cross specificity was found.

Conclusion. Developed diagnostic kits, based on real-time PCR for identification of ASF virus, Bluetongue and Schmallenberg disease are specific and highly sensitive, which makes them effective in the practice of veterinary laboratories for rapid and accurate diagnosis of diseases caused by these pathogens.

Keywords: Bluetongue, African swine fever, Schmallenberg disease, real time polymerase chain reaction.