

ВИЯВЛЕННЯ ДНК ЗБУДНИКІВ ХЛАМІДІОЗУ ТА ІРТ ВРХ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Н. М. ШКАВРО¹, О. В. ЩЕРБАК¹, І. М. КСЬОНЗ²

¹Інститут тваринництва УААН

²Полтавська філія Інституту ветеринарної медицини УААН

У статті наведені дані про використання методу ПЛР-аналізу для індикації ДНК збудників хламідіозу та інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби у біологічних зразках, одержаних від тварин із господарств Центрального та Східного регіонів України.

Ключові слова: ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ДНК, КОНТАМІНАЦІЯ, ХЛАМІДІОЗ, ІНФЕКЦІЙНИЙ РИНОТРАХЕЇТ.

Робота зі збереження і покращення генетичного потенціалу порід великої рогатої худоби неможлива без штучного осіменіння, але при цьому не виключається можливість передачі вірусної чи бактеріальної інфекції, зокрема збудника хламідіозу, від хворих самок потомству, а також через сперму інфікованих бугаїв-плідників [1]. Хламідійна інфекція має широке розповсюдження серед практично усіх видів ссавців, у тому числі сільськогосподарських тварин. У великої рогатої худоби хламідіофіли викликають різні за проявом форми захворювання, а саме: генітальну, при якій спостерігаються аборти, ендометрити, мастити і ембріональна смертність у самиць та орхіти, епідеміти, баланопостити, уретрити у бугаїв-плідників; респіраторну, яка проявляється ринітами, бронхітами, пневмоніями; нервову, при якій виявляються ознаки ураження центральної нервової системи; змішану, яка поєднує ті чи інші ознаки вищеназваних форм. Кожна з цих форм може супроводжуватись кон'юнктивітами, поліартритами, а у молодняку - розладами органів шлунково-кишкового тракту [2, 6-9].

Згідно нової класифікації, усі представники роду повинні мати 95 % гомологію у нуклеотидній послідовності генів 16S і 23S рРНК, представники родини – 90 %, порядку або класу мікроорганізмів – 80 %. Родина *Chlamydiaceae*, яка раніше включала лише один рід *Chlamydia*, розділена на два роди: *Chlamydia* та *Chlamydophila*. На основі гомології рРНК генів раніше не класифіковані мікроорганізми, що характеризуються подібним до хламідій циклом розвитку, були виділені у три додаткові родини: *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* та *Waddliaceae* у складі порядку *Chlamydiales*. До мікроорганізмів, які викликають захворювання худоби, належать *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila pneumoniae* та *Chlamydophila pecorum* [3].

Вважається, що 50-80 % випадків порушення репродуктивної функції у корів викликається змішаними інфекціями, серед яких, окрім бактерій порядку *Chlamydiales*, найчастіше зустрічаються вірусні інфекції, зокрема, інфекційний ринотрахеїт (ІРТ) або пустульозний вульвовагініт – контагіозне вірусне захворювання великої рогатої худоби, що протікає із ознаками ураження органів респіраторного та репродуктивного трактів. Вірус може викликати аборти, кон'юнктивіти, мастити, запалення слизової оболонки шлунково-кишкового тракту. Інфекційний ринотрахеїт часто протікає разом із вірусною діареєю, парагрипом-3, рота- та адено-вірусними інфекціями, а також хламідіозом. Змішані інфекції викликають тяжчі патології ніж моно інфекції [4, 5].

У зв'язку із великою кількістю помилок у розпізнаванні латентної та слабовираженої хламідійної інфекції та інфекційного ринотрахеїту актуальною проблемою є впровадження нових ефективних методів лабораторної діагностики. На даний час найперспективнішим методом діагностики інфекцій вважається специфічна ампліфікація нуклеїнових кислот *in vitro*, перш за все – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Метою нашої роботи було дослідження зразків біологічного матеріалу, одержаних від великої рогатої худоби, в яких спостерігаються часті спонтанні аборти та безпліддя у господарствах різних областей

Центрального та Східного регіонів України, на контамінацію патогенними мікроорганізмами вірусної та бактеріальної природи на моделях хламідіозу і ІРТ.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували епітеліальні зскрібки із слизової вагіни корів, одержаних за допомогою одноразових мультизондів “Акцелон” і “Medscand” та зразки сперми бугаїв-плідників. Виділення ДНК проводилось за двома методами: 1) з використанням реагента “Chelex-100”; 2) за допомогою деградації білків гуанідинізоціонатом з наступним зв'язуванням нуклеїнових кислот із сорбентом (використовувався комерційний набір реагентів “GenePak™PCR DNA test” фірми “БіоКом”, Росія). Для проведення ампліфікації використовувались тест-системи фірми “GenePak™PCR DNA test”, програмований термостат (ампліфікатор) “Амплі-4” (“БіоКом”, Росія). Для детекції продуктів ПЛР застосовувався метод горизонтального електрофорезу у 2 % агарозному гелі. Перегляд гелів здійснювався за допомогою транслюмінатора ТУВ-2, який випромінює світло в ультрафіолетовому діапазоні 365 нм.

Результати й обговорення

На першому етапі роботи для постановки ампліфікації була використана ПЛР-тест-система “GenePak™PCR DNA test Ch1”, яка містить родоспецифічні олігонуклеотидні праймери, що обмежують ділянку геному *Chlamydophila*. Температурний режим проведення ПЛР: денатурація ДНК при 95 °С – 2 хв, потім 45 циклів за схемою: денатурація ДНК при 95 °С – 1 хв, відпал праймерів при 58 °С – 40 с, синтез ланцюгів ДНК при 74 °С – 1 хв (у останньому циклі впродовж 2 хв).

Детекція продуктів ампліфікації проводилась шляхом електрофоретичного розділення молекул ДНК у 2 % агарозному гелі, з напруженістю поля 200 V. Як барвник ДНК використовували розчин бромистого етідію у концентрації 1 мг/см³.

Для дослідження використовували епітеліальний зскрібок зі слизової вагіни корови інв. № 1372, що належить ТОВ “Агрофірма “Маяк” Котелевського району Полтавської обл., зразок сперми бугая-плідника “Алмаз”, що утримується у ВАТ “Лубенське племпідприємство” Полтавської обл., епітеліальний зскрібок зі слизової вагіни нетелі “Зозуля” СКВ “Міжгір'я” Чорнобаївського району Черкаської обл., та зскрібок зі слизової вагіни корови інв. № 590 “Фіалка” СТОВ “Нива” Бершадського району, Вінницької обл., зразки замороженої сперми бугаїв-плідників, яка отримана за Харківською технологією та зберігається у кріобанку ВБР Інституту тваринництва УААН, епітеліальний зскрібок зі слизової вагіни корови “Лаванда”, що належить СВК “Заповіт Леніна” Зачипилівського району, Харківської обл.

На електрофореграмі на рис. 1 показано, що 9 зразків ампліфікату, вихідними матеріалами яких були указані вище досліджувані зразки та негативний і позитивний контроль, мають смуги розміром 100 п. н., що за електрофоретичною рухливістю відповідає внутрішньому контролю реакції. На 5 доріжках, відповідних зразків 3, 4, 6, 7 та позитивному контролю (9), спостерігалась смуга розміром 560 п. н., що відповідає фрагменту ДНК збудника хламідіозу, на 4 доріжках - відповідних досліджуваних зразків 1, 2, 5 та негативному контролю (8), смуга розміром 560 п. н. відсутня, що свідчить про відсутність фрагменту ДНК збудника, а також про відсутність контамінації (негативний контроль).

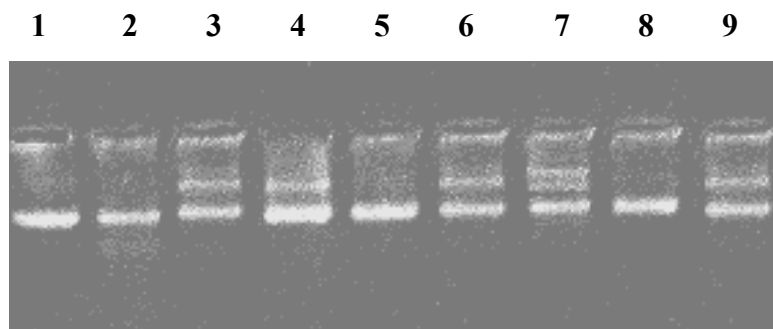


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР з виявлення *Clamychia spp.*:
доріжки 1, 3, 4, 7 – зразки епітеліальних зскрібків зі слизових оболонок статевих шляхів корів; 2, 5, 6 – зразки сперми бугаїв-плідників; 8 – негативний контроль, 9 – позитивний контроль

На другому етапі роботи з метою первинної родової диференціації *Clamychia* та *Chlamydomphila* була проведена ампліфікація дослідних зразків ДНК з використанням ПЛР-тест-системи “GenePak™PCR DNA test Ctr” (Росія), яка містить видоспецифічні олігонуклеотидні праймери, що обмежують ділянку геному *Chlamychia trachomatis*.

Температурний режим реакції: денатурація при 95 °С – 120 с, відпал праймерів при 62 °С – 60 с, синтез при 74 °С – 120 с, далі 43 цикли за наступною схемою: денатурація при 95 °С – 60 с, відпал при 58 °С – 40 с, синтез при 74 °С – 60 с. Синтез в останньому циклі при 74 °С впродовж 2 хв. У результаті електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації в агарозному гелі нами не виявлений інфекційний агент у жодному із досліджуваних зразків (рис. 2), про що свідчить відсутність смуг у дослідних зразках 1-7 навпроти смуги позитивного контролю 284 п. н. (8).

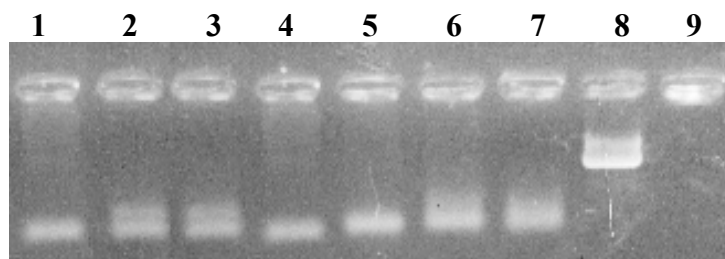


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР з виявлення *Clamychia trachomatis*:
доріжки 1, 3, 4, 7 – зразки епітеліальних зскрібків зі слизових оболонок статевих шляхів корів; 2, 5, 6 – зразки сперми бугаїв-плідників; 8 – негативний контроль, 9 – позитивний контроль

На етапі відбору зразків дослідження нашу увагу привернула до себе корова інвентарний № 590 “Фіалка” у СТОВ “Нива” Бершадського району, Вінницької обл. (номер 4 на електрофореграмах), яка мала ураження респіраторного тракту і кон’юнктивіт, що характерне для інфекційного ринотрахеїту. Тому ми провели ампліфікацію досліджуваних ДНК з метою виявлення збудника ІРТ ВРХ – герпес вірусу великої рогатої худоби 1-го типу (BHV-1), з використанням ПЛР-тест-системи “GenePak™PCR DNA test BHV-1”. Температурний режим проведення ПЛР: денатурація ДНК при 95 °С – 2 хв, потім 45 циклів за схемою: денатурація ДНК при 95 °С – 1 хв, відпал праймерів при 58 °С – 40 с, синтез ланцюгів ДНК при 74 °С – 1 хв (у останньому циклі впродовж 2 хв).

На електрофореграмі на рис. 3 в одному зразку ДНК (4) та в позитивному контролі (9) спостерігалась смуга розміром 355 п. н., що відповідає фрагменту ДНК збудника герпес вірусу великої рогатої худоби 1-го типу; на інших доріжках, відповідних досліджуваних зразків 1, 2, 3, 5, 6, 7 та негативному контролю (8) смуга розміром 355 п. н. відсутня, що свідчить про відсутність фрагменту ДНК збудника.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації з виявлення ДНК ВВН-1:
доріжки 1, 3, 4, 7 – зразки епітеліальних зскрібків зі слизових оболонок статевих шляхів корів; 2, 5, 6 – зразки сперми бугаїв-плідників, 8 – позитивний контроль, 9 – негативний контроль

Висновки

1. Використання ПЛР-методу дозволяє виявляти присутність геному збудників хламідійної та герпес-вірусної інфекції у біологічних зразках великої рогатої худоби.
2. Результати ПЛР, які одержані при використанні тест-системи “GenePak™PCR DNA test Ch1”, що містить родоспецифічні олігонуклеотидні праймери до геному *Chlamydophila*, та тест-системи “GenePak™PCR DNA test Ctr”, що містить видоспецифічні олігонуклеотидні праймери до геному *Chlamydia trachomatis*, свідчать про специфічність обох тест систем, а отже про можливість їх застосування для диференціації збудника хламідіозу.
3. Наявність у одному із зразків ДНК збудників як хламідіозу, так і ІРТ, свідчать про актуальність створення мультиплексної ПЛР-тест-системи для одночасної детекції декількох ДНК збудників інфекційних захворювань у великій рогатій худоби, що можуть виступати в асоціації.

N. Shkavro, O. Shcherbak, I. Ksyonz

DETECTING THE CHLAMYDIOSIS AND INFECTIOUS RHINOTRACHEITIS AGENTS' DNA IN CATTLE BY MEANS OF PCR

Summary

The article presents the experimental results on applying the PCR-analysis method for indicating cattle Chlamydiosis and Infectious Rhinotracheitis agents' DNA in biological samples collected from animals at farm holdings of the Central and the Eastern regions of Ukraine.

The Institute of Animal Husbandry of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
The Institute of Veterinary Medicine

1. *Косенко М. В., Авдос'єва І. К.* Лікування хламідіозу великої рогатої худоби. Вісник аграрної науки. 2001, № 8. - С. 28-29.
2. *Бортнічук В. А., Любецький В. І.* Хламідіоз тварин // Ветеринарна медицина України. - 2003. - № 5. - С. 13–15.
3. *Everett, K D E.* Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. Veterinary Microbiology, 2000, 75, 109–126.
4. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота, Петрянкин Ф. П., в кн. Инфекционные болезни молодняка животных, г. Чебоксары, 2005, С. 90-99.
5. *F A van Engelenburg, R K Maes, J T van Oirschot, and F A Rijsewijk.* Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen, J Clin Microbiol. 1993 December; 31(12): 3129–3135.
6. *Домейка М. А.* Биологическая характеристика хламидий – возбудителя энтерита телят: Автореф. дисс. ... канд. вет. наук: 16.00.03 // Тарту, 1986. - 25 с.
7. *Караваев Ю. Д., Калугина И. А., Дьяконов Л. П. и др.* Диагностика, профилактика и меры борьбы с хламидиозами животных // Ветеринария. - 1999. - № 2. - С. 28-30.
8. *Ксьонз І. М.* Лабораторна діагностика хламідіозу великої рогатої худоби за методом полімеразної ланцюгової реакції // Вісник СНАУ- 2003. - Вип. 9 - С. 57-60.
9. *Малохатько Л.* Хламідіоз // Ветеринарна медицина України. - 1998. - № 3. - С. 13.

10. Павленко М. С. Хламідійний енцефаломієліт великої рогатої худоби (епізоотологія, клініка, етіологія, діагностика): Автореф. дисс. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Націон. аграрн. ун-т. - К., 1996. - 24 с.
11. Хламидиозы сельскохозяйственных животных / Хазипов Н. З., Гафаров Х. З., Шафикова Р. А. и др. - М.: Колос, 1984. - 223 с.