

Улько Л.Г., Фотина Т.И. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В СИСТЕМЕ КОНТРОЛЯ АССОЦИИРОВАННЫХ БАКТЕРИОЗОВ КОНЕЧНОСТЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В статье рассмотрены вопросы возможности применения ассоциированной вакцины из эпизоотических штаммов *F. necrophorum*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* и *P. vulgaris* для профилактики ассоциированных бактериозов конечностей крупного рогатого скота. У кроликов привитых ассоциированной вакциной на 15-е сутки увеличивается количество лейкоцитов, Т- и В-лимфоцитов, повышается бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови и фагоцитарная активность нейтрофилов. Установлено, что применение ассоциированной вакцины в дозе 5 см³ обеспечивает защиту 95 % животных в течение 5-ти месяцев, а в комплексе с неспецифическими средствами надежно профилактирует ассоциированные бактериозы конечностей у крупного рогатого скота.

Ключевые слова: Ассоциированная вакцина, кролики, коровы, эпизоотическая штаммы *F. necrophorum*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, ассоциированные бактериозы.

Ulko L., Fotina T. EFFICIENT USE OF SPECIFIC FUNDS CONTROL SYSTEM ASSOCIATED BACTERIOSIS HOOF CATTLE

The article deals with the possibility of application of vaccine associated with epizootic strains of *F. necrophorum*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* and *P. vulgaris* for the prevention of associated bacteriosis hooves of cattle. In rabbits vaccinated associated vaccine on the 15th day increases the number of white blood cells, T- and B-lymphocytes and increased bactericidal and lysozyme activity blood serum and phagocytic activity of neutrophils. It was established that the use of associated vaccine dose of 5 cm³ provides protection 95 % of the animals within 5 months, and in combination with nonspecific agents reliable prevention associated bacteriosis hooves in cattle.

Keywords: associated vaccine, rabbits, cows, epizootic strains of *F. necrophorum*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, associated bacteriosis.

Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В.Ю.
Дата надходження до редакції: 13.12.2013 р.

УДК 619:636.4.082:575.1:577.2.

РОЗРОБЛЕННЯ ПЛР-ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ІНДИКАЦІЇ CHLAMYDIA FELIS У БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКАХ ВІД СВІЙСЬКИХ КОТІВ

І. М. Ксьонз, к.вет.н., ст.науковий співробітник,
Т. М. Цівенко, науковий співробітник,
К. Ф. Почерняєв, к.біол.н.,
С. М. Корінний, здобувач.

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

Розроблено ПЛР-тест-систему для діагностики хламідіозу свійських котів, до складу якої входять олігонуклеотидні праймери, що фланкують ділянку гена MOMP *Chlamydia felis*. Ідентичність продукту ампліфікації підтверджено шляхом рестрикційного аналізу з використанням ендонуклеази *Alu I*. Означена ПЛР-тест-система випробувана на 50 позитивних і 25 негативних зразках ДНК *Chlamydia felis*, а також успішно пройшла валідацію із комерційно доступними ПЛР-тест-системами для діагностики хламідійних інфекцій ссавців і птахів.

Ключові слова: хламідіоз, свійські коту, *Chlamydia felis*, полімеразна ланцюгова реакція, олігонуклеотидні праймери.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. Хламідіоз котів є досить розповсюдженим інфекційним захворюванням даного виду тварин. За нашими дослідженнями причиною кон'юнктивітів, уражень респіраторного та уrogenітального трактів даного виду тварин у 44 % є хламідійна інфекція [1].

Разом з тим, досить часто правильний діагноз не є встановленим, що призводить до неаде-

кватної терапії і, відповідно, до ускладнення захворювання. При цьому не слід забувати, що хламідіоз є зоонозною інфекцією і відомі випадки зараження людей від хворих на хламідіоз котів [2–4].

Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми і на які спирається автор. За повідомленнями різних авторів збудником хламідіозу свійських котів є виключно *Chlamydia felis* [2–4].

Ендемічність означеного виду бактерій роду *Chlamydia* для домашніх котів підтверджена й результатами власних досліджень, оскільки при диференціюванні за допомогою мультиплексної ПЛР-тест-системи 192 ізолятів збудника виділених від тварин цього виду – усі без винятку належали до *Chlamydia felis* [5]. Саме тому об'єктом для конструювання олігонуклеотидних праймерів у ПЛР-тест-системі для діагностики хламідіозу котів, що розроблялась, обрано ділянку гена, який кодує МОМР (головний білок зовнішньої мембрани) виключно бактерії роду *Chlamydia* виду *Chlamydia felis*.

Формулювання цілей статті. Таким чином, ми поставили перед собою мету створити надійний високочутливий і високоспецифічний засіб діагностики хламідіозу свійських котів. За нашим переконанням, наразі найбільш виправданим методом діагностики за хламідійних інфекцій є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Виклад основного матеріалу дослідження.

Матеріали і методи Створення дизайну олігонуклеотидних праймерів для визначення хламідійних інфекцій свійських котів у полімеразної ланцюгової реакції передбачало пошук специфічних ділянок гена МОМР бактерії *Chlamydia felis*, що не зустрічаються у будь-яких інших бактерій роду *Chlamydia*, та зручних для електрофоретичної детекції.

Для аналізу з бази даних «GenBank» (версія 00.2000 року), були обрані первинні послідовності геномів родини *Chlamydia*: AF272945 та AF269256 *Chlamydia abortus*, X56980 *Chlamydia psittaci*, X61096 *Chlamydia felis*, AF269282 *Chlamydia caviae*, AF269280, AY055109 та AF269279 *Chlamydia pecorum*, L04982, AF131889 та M64064 *Chlamydia pneumoniae*, AF269278 *Chlamydia suis*, AY380118 *Chlamydia trachomatis*.

За допомогою комп'ютерних програм «Virtual Genome Center» (<http://alsec/med/umn/edu/VGC.html>) та «Fast PCR» було проаналізовано секвеновані послідовності гена МОМР, вищезазначених представників роду *Chlamydia* та одержано пару олігонуклеотидних праймерів: прямий – CHFMF: 5'-GCAGCTTCTGGAACGCAAGC-3' та зворотний – CHFMR: 5'-GGCGAAATCAGTTCCTGCAAGA-3'.

Означена пара олігонуклеотидних праймерів, що фланкує фрагмент гена МОМР *Chlamydia felis* синтезована за нашим замовленням у компанії «Thermo Electron Corporation» (Germany).

Полімеразну ланцюгову реакцію із застосуванням розроблених нами олігонуклеотидних праймерів, що фланкують гена МОМР хламідій проводили в поліпропіленових мікроцентрифужних пробірках об'ємом 0,6 см³ на термоциклері «Терцик-2» виробництва «ДНК-технологии» (Россия) в 25 мкл ПЛР-суміші.

Оптимізація умов ПЛР передбачала підбір

складу реакційної суміші та температурний режим ампліфікації. Оптимальним складом реакційної суміші є наступні: 2,5 мкл 10 кратного буфера (670 мМ Тріс-НСІ, рН 8,8 за температури 25°C, 20 мМ БСА, 166 мМ амонію сірчанокислого (NH₄)₂SO₄, 100 мМ 2-β-меркаптоетанол), 1 мкл 2,5 мМ dNTP, по 0,5 мкл (0,1 опт. один.) кожного з праймерів, 1,5 мкл 50 мМ MgCl₂, зразок ДНК – до кінцевої концентрації в суміші. 1 мкг/мл, 2–3 од. Таq ДНК-полімерази (*Thermus aquaticus*) (Державний Науковий Центр Російської Федерації «ГосНИИгенетика, Россия, г. Москва). На ампліфікаційну суміш нашаровували 25 мкл мінеральної олії.

Оптимальні параметри ампліфікації становили:

94°C	180 сек.	
94°C	60 сек.	
55°C	60 сек.	} 35 циклів
72°C	60 сек.	
72°C	300 сек.	

Продуктом ПЛР є фрагмент гена МОМР, що має розмір – 221 пару нуклеотидів характерний для бактерії *Chlamydia felis*. Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР у поліакріламідному або агарозному гелі дозволяє чітко визначити наявність ДНК збудника хламідіозу свійських котів за відповідним розміром ампліфікованого фрагмента.

Ідентичність продукту ПЛР підтверджено шляхом рестрикційного аналізу з використанням ендонуклеази *Alu I*, в результаті якого утворилися два фрагменти ДНК з розміром 94 та 127 пар нуклеотидів.

Крім того, розроблену нами ПЛР-тест-систему для індикації *Chlamydia felis* було успішно випробувано на 50 завідомо позитивних і 25 завідомо негативних щодо хламідіозу зразках ДНК виділених із біологічного матеріалу від свійських котів.

Нами також проведено валідацію ПЛР-тест-системи для індикації *Chlamydia felis* із двома комерційно доступними ПЛР-тест-системами для індикації ДНК бактерій роду *Chlamydia* «ПОЛИМИК» (НПФ «Литех», Россия) та «Амплиценс-50R» («ХЛА-КОМ», Россия), в результаті чого підтверджена повна ідентичність отриманих результатів.

Таким чином, вважаємо, що розроблена ПЛР-тест-система може бути впроваджена у лабораторну практику для діагностики хламідійних інфекцій свійських котів.

Висновки.

1. Оскільки диференціюванням за видом ізолятів виділених від 192 свійських котів хворих на хламідіоз за допомогою мультиплексної ПЛР-тест-системи власного розроблення встановлено, що усі вони є бактеріями порядку *Chlamydiales*, роду *Chlamydia*, виду *Chlamydia felis*, дизайн

олігонуклеотидних праймерів ПЛР-тест-системи для діагностики хламідіозу даного виду тварин підібрано на консервативну ділянку ДНК, що кодує ген MOMP *Chlamydia felis*.

2. Ідентичність продукту ПЛР підтверджено шляхом рестрикційного аналізу з використанням ендонуклеази *Alu I*, в результаті якого утворилися два фрагменти ДНК з розміром 94 та 127 пар нуклеотидів.

3. Розроблена ПЛР-тест-система для індикації *Chlamydia felis* пройшла успішні випробування на 75 зразках ДНК виділених із біологічного матеріалу від свійських котів, а також валідацію із комерційно доступними ПЛР-тест-системами для індикації ДНК бактерій роду *Chlamydia*, і, відповідно, може використовуватись для діагностики хламідіозу цього виду домашніх м'ясоїдів.

Список використаної літератури:

1. Клінічні ознаки хламідіозу домашніх м'ясоїдних / В. В. Недосеков, О. Г. Мартинюк, І. М. Ксьонз, Т. М. Цівенко // Ветеринарна медицина України. — 2010. — № 6. — С. 10 — 12.
2. Обухов И. Л. Хламидиоз кошек / И. Л. Обухов // Приложение к журналу «Новости звероводства». — М., 1994. — 94 с.
3. Равилов Р. Х. Хламидиоз собак и кошек / Р. Х. Равилов. — М. : ООО «Аквариум-Принт», — 2006. — 128 с.
4. Browning G. F. Is *Chlamydia felis* a significant zoonotic pathogen? / G. F. Browning // Aust Vet. J. — 2004. — Nov. — Vol. 82 (11). — P. 695–696.
5. Ксьонз І. М. Хламідіози тварин : [монографія] / Ксьонз Ігор Миколайович. — Полтава : Оріяна. — 2012. — 318 с.

Ксьонз І. Н., Цівенко Т. М., Почерняев К. Ф., Коренной С. Н. РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ CHLAMYDIA FELIS В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБАХ ОТ ДОМАШНИХ КОШЕК

Разработана ПЦР-тест-система для диагностики хламидиоза домашних кошек, в состав которой входят олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие участок гена MOMP *Chlamydia felis*. Идентичность продукта амплификации подтверждена путем рестрикционного анализа с использованием эндонуклеазы *Alu I*. Указанная ПЦР-тест-система испытана на 50 положительных и 25 отрицательных образцах ДНК *Chlamydia felis*, а также прошла успешную валидацию с коммерчески доступными ПЦР-тест-системами для диагностики хламидийных инфекций млекопитающих и птиц.

Ключевые слова: хламидиоз, домашние кошки, *Chlamydia felis*, полимеразная цепная реакция, олигонуклеотидные праймеры.

Ksyonz I., Tsivenko T., Pochernyayev K., Korinniy S. DEVELOPMENT OF THE PCR TEST SYSTEM FOR INDICATING CHLAMYDIA FELIS IN BIOLOGICAL SAMPLES OF DOMESTIC CATS

A PCR test system for diagnosing chlamydial infection of domestic cats has been developed, including oligonucleotide primers, flanking the MOMP gene area of *Chlamydia felis*. The identity of the amplification product has been confirmed by the restriction analysis using the endonuclease *Alu I*. The mentioned PCR test system has been tested on 50 positive and 25 negative samples of *Chlamydia felis* DNA and has successfully passed the validation with commercially available PCR test systems for diagnosing chlamydial infections in mammals and birds.

Key words: Chlamydiosis, domestic cats, *Chlamydia felis*, polymerase chain reaction, oligonucleotide primers.

Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В.Ю.

Дата надходження до редакції: 3.12.2013 р.