

УДК: 579. [844.12+852.13].083.18
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.2.48

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ АЛЬФА-ТОКСИНА CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Моисеева К. А. – аспирант 3 года обучения кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии (ORCID: 0000-0003-4526-7430)

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной
медицины»

*rozikova_karina@mail.ru

Ключевые слова: ПЦР, *Clostridium perfringens*, тест-система, диагностика, энтеротоксемия.

Keywords: PCR, *Clostridium perfringens*, test system, diagnostics, enterotoxemia

Поступила: 30.04.2023

Принята к публикации: 10.05.2023

Опубликована онлайн: 29.06.2023



РЕФЕРАТ

При распространении клостридиозов нарушается эпидемиологическая и эпизоотическая безопасность, степень которой зависит от иммунологического статуса животного, лечебных и профилактических мер в животноводческом комплексе, токсигенности бактерии и степени тяжести болезни. Бактерия *Clostridium perfringens* распространена повсеместно, продуцирует 20 различных токсинов и факторов патогенности, одним из которых является альфа-токсин, который обнаруживается в мясе и других биологических пробах, что угрожает биобезопасности животноводческих предприятий, рынков, магазинов и др. Статья посвящена разработке и апробации тест-системы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с целью обнаружения ДНК гена, кодирующего альфа-токсин штамма *Clostridium perfringens* CP322, широко распространенного на территории Российской Федерации. Синтез олигонуклеотидов, предложенный коллективом ученых из Кореи Chon J.W., Park J.S., Hyeon J.Y., Park C., Song K.Y., Hong K.W., Hwang I.G., Kwak H.S., Seo K.H. в 2012 году послужил основой для создания и апробации тест-системы [1].

Оптимизация методики диагностики, подбор верных концентраций реагентов и ДНК в образцах от крупного рогатого скота, синтез высокоспецифичных праймеров и модернизация молекулы зонда послужили основой для разработки тест-системы, апробация которой прошла на 319 образцах – биоматериале, полученном от крупного рогатого скота. Предложенный метод молекулярно-генетической диагностики позволит ветеринарным специалистам своевременно идентифицировать возбудителя энтеротоксемии в исследуемых пробах, комплексно поставить диагноз с учетом эпизоотических, клинических, патологоанатомических и лабораторных данных, назначить эффективное лечение и разработать план мероприятий по профилактике развития и распространения инфекции.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Экономический ущерб от энтеротоксемии обоснован летальным исходом продуктивных животных, распространяющих инфекцию, снижением количества и качества молочной и мясной продукции. По исследованиям Yang C.C., Hsu P.C., Chang H.J., Cheng C.W., Lee M.H. в 2013 году, смертность больных бактериемией, вызванной *Clostridium perfringens*, составляет 27-44%. Как правило, клинические характеристики этой инфекции неспецифичны, что приводит к значительным трудностям диагностики и раннего начала соответствующей терапии [2]. Вирулентность *Clostridium perfringens* в большей степени объясняется возможностью продуцировать более 20 различных токсинов и факторов патогенности, а именно протеиназы, лецитиназу, гиалуронидазу, коллагеназу и другие [3]. Альфа-токсин штамма *Clostridium perfringens* вызывает до 25% летальных исходов среди поголовья крупного рогатого скота, по исследованиям Козлова А. Д., Горбачева Н. С., Клименкова О. В. и др (2017) [4]. Кроме того, альфа-токсин *Clostridium perfringens* обнаруживается в мясе и других биологических пробах, что угрожает биобезопасности животноводческих предприятий, рынков, магазинов и др.

Молекулярно-генетический метод идентификации возбудителей, а именно полимерная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени является современным и эффективным способом для лабораторной диагностики кишечных инфекций крупного рогатого скота, чем обосновывается актуальность исследования [1,5,6,7]. Разработка и применение высокоспецифичных, чувствительных праймеров позволит ветеринарным специалистам своевременно обнаружить ген альфа-токсина *Clostridium perfringens* в исследуемых образцах с целью профилактики и лечения энтеротоксемии на животноводческих комплексах, сохраняя эпизоотическое и эпидемиологическое благополучие на этапах реализации продуктов и сырья животного происхождения.

Цель работы – разработка и синтез

олигонуклеотидов с подбором оптимальной концентрации реагентов для выявления гена альфа-токсина *Clostridium perfringens* в исследуемых образцах методом ПЦР в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ / MATERIALS AND METHOD

В работе использованы такие методы исследований, как клинический, бактериологический, молекулярно-генетический, биоинформационный, аналитический и статистический.

В рамках разработки тест-системы для идентификации токсигенных *Clostridium perfringens* методом ПЦР-РТ был выбран участок гена CPA, кодирующий альфа-токсин - ген фосфолипазы C альфа-токсина (plc) штамма *Clostridium perfringens* CP322. Информацию об участке гена изучали с помощью GenBank – базы данных генетических последовательностей.

Основу составляла последовательность нуклеотидов, подобранная коллективом ученых из Кореи - Chon J.W., Park J.S., Hyeon J.Y., Park C., Song K.Y., Hong K.W., Hwang I.G., Kwak H.S., Seo K.H. в 2012 году [1].

Последовательность нуклеотидов, специфичность гена были подтверждены на веб-сайте <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22534301/> с помощью BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [8]. Выравненная последовательность нуклеотидов изучалась в программе SnapGene. Результаты статистического анализа считались значимыми при $p < 0,05$. Были синтезированы следующие последовательности: Прямой праймер - Forward (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3', обратный праймер – Reverse (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3' [1].

В экспериментальных целях для наибольшей эффективности реакции и учета результатов в программе гаситель флуоресценции, локализирующийся между праймерами, был заменен на более современный BHQ1. Получился зонд 5'-FAM TGC CGC GCT AGC AAC TAG

ССТ ATG G-3' ВНQ1. Олигонуклеотиды и все реагенты для реакции ПЦР, используемые в исследовании были синтезированы и приобретены у ООО «Бигль» (Санкт-Петербург, Россия).

Биопробы были отобраны от клинически здоровых, больных животных с такими клиническими признаками как диарея, эндометрит, мастит, поражения дистальных отделов конечностей. Содержимое кишечника нехарактерного цвета более суток с включениями слизи и крови, влагалища, молоко непосредственно из соска, некротизированные или гнойные участки копыт и пальцев, образцы из автоматизированного навозного стока в помещениях отбирались стерильным урогенитальным зондом в пробирку типа Эппендорф со стерильным физиологическим раствором.

С помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» была выделена ДНК из биологического материала согласно инструкции. Затем готовилась реакционная смесь. Смесь вносилась в пробирку объемом 0,2 мл белого цвета в стрипах в комплекте с плоскими оптически прозрачными крышками для проведения ПЦР в режиме реального времени. Соблюдался следующий температурный режим: 50°C – 2 минуты, 95°C – 10 минут, 40 циклов 95°C – 15 секунд, 60°C – 1 минуту [1].

Исследование проводилось на анализаторе ПЦР в реальном времени Roche LightCycler 96 (Швейцария). Обработку

данных проводилось в соответствующей лицензионной программе Roche LightCycler 96.

Методика была апробирована на 319 образцах. Животные условно были разделены на 3 группы в зависимости от возраста и физиологического состояния: I - телята (0-12 месяцев); II - нетели (12-20 месяцев); III - коровы дойного стада (от 20 месяцев); IV – навозный сток.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В результате апробации праймеров установлено, что праймеры (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3' и (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3' являются высокочувствительными и специфичными к гену фосфолипазы С альфа-токсина *Clostridium perfringens*. Праймеры сработали при реакции со всеми тремя экспериментальными испытуемыми концентрациями (Таблица 1, Таблица 2, Таблица 3).

По протоколу исследования в программе анализатора ПЦР в реальном времени Roche LightCycler 96 (Швейцария), положительной оказалась концентрация №3 в стрипе С6. Наблюдался экспоненциальный рост флуоресценции - пороговый цикл по каналу Fam наблюдался на 26,64 цикле амплификации, что говорит о содержании и обнаружении гена фосфолипазы С альфа-токсина (plc) штамма *Clostridium perfringens* в исследуемых образцах.

Таблица 1
Испытуемая концентрация №1 для ПЦР – РТ

№	Компонент	Количество (мкл)
1	ДНК	2
2	Forward -праймер	2,5
3	Reverse -праймер	2,5
4	Зонд FAM	2,5
5	ПЦР - смесь	10
6	Вода деионизованная высокой степени очистки	5
7	Taq-полимераза	0,5
Итого:		25

Таблица 2

Испытуемая концентрация №2 для ПЦР – РТ

№	Компонент	Количество (мкл)
1	ДНК	5
2	Forward -праймер	2,5
3	Reverse -праймер	2,5
4	Зонд FAM	2,5
5	ПЦР - смесь	7
6	Вода деионизованная высокой степени очистки	5
7	Taq-полимераза	0,5
Итого:		25

Таблица 3

Испытуемая концентрация №3 для ПЦР – РТ

№	Компонент	Количество (мкл)
1	ДНК	2
2	Forward -праймер	1
3	Reverse -праймер	1
4	Зонд FAM	1
5	ПЦР - смесь	10
6	Вода деионизованная высокой степени очистки	4,5
7	Taq-полимераза	0,5
Итого:		20

По результатам ПЦР в режиме реального времени установлено, что из 319 образцов 47 имели экспоненциальный рост флуоресценции - пороговый цикл по каналу по FAM каналу на $26,24 \pm 3,9$ цикле амплификации, что говорит о содержании гена фосфолипазы С альфа-токсина *Clostridium perfringens* в исследуемых образцах. Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастал пропорционально количеству продукта амплификации.

В результате апробации праймеров с совершенствованной тест-системой ПЦР установлено, что в I исследуемой группе (телята 0-12 месяцев), где материалом исследования являлось содержимое прямой кишки 13,1% исследуемых проб оказались положительными.

Во II группе (нетели 12-20 месяцев), где материалом исследования являлось содержимое прямой кишки 15,4% исследуемых проб оказались положительными. Во II группе (нетели 12-20 месяцев), где

материалом исследования являлось содержимое ран дистальных конечностей 22,2% исследуемых проб оказались положительными. В III (исследуемой коровы дойного стада от 20 месяцев), где материалом исследования являлось содержимое прямой кишки 18,7% исследуемых проб оказались положительными, как и в группе, где предметом исследования являлось содержимое шейки матки, матки. В III группе (исследуемой коровы дойного стада от 20 месяцев), где материалом исследования являлось содержимое влагалища 3,1% исследуемых проб оказались положительными. В группе коров дойного стада, где предметом исследования служило молоко, 10% исследуемых проб оказались положительными. Гена фосфолипазы С альфа-токсина *Clostridium perfringens* методом ПЦР в режиме реального времени в исследованных 15 пробах молозива обнаружено не было. Из исследованных проб содержимого ран дисталь-

ных конечностей у коров дойного стада 17,6% проб оказались положительными, из проб с содержимым абсцессов на передних задних конечностях 10%. Кроме того, на территории 3 хозяйств исследовался материал из навозного стока – 2 из 3 исследованных проб содержали ген фосфолипазы С альфа-токсина *Clostridium perfringens*.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В результате разработки и апробации тест-системы установлено, что из 319 образцов 47 имели экспоненциальный рост флуоресценции - пороговый цикл по каналу по FAM каналу на 26,24±3,9 цикле амплификации, что говорит о содержании гена фосфолипазы С альфа-токсина *Clostridium perfringens* в исследуемых образцах. Подобранные праймеры обладают высокой чувствительностью и специфичностью.

Chon J.W., Park J.S., Hyeon J.Y. и др. предложили концентрацию, близкую к концентрации №2, где в реакционную смесь вносится 5 мкл ДНК [1]. В данном исследовании, реакционная смесь с ДНК в количестве 2 мкл имела наибольший рост флуоресценции и положительный результат в автоматическом протоколе исследования ПЦР в режиме реального времени. Кроме того, авторы исследовали чистую культуру, в наших исследованиях использовалась выделенные образцы с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В», была выделена ДНК из биологического материала – содержимого кишечника, влагалища, молоко непосредственно из соска, некротизированные или гнойные участки копыт и пальцев, образцы из автоматизированного навозного стока. Данный метод позволяет в существенно более короткий срок провести лабораторную диагностику. Данные исследований, проводимых Erol I., Goncuoglu M., Ayaz N.D. в 2008 году с помощью мультиплексной ПЦР, соответствуют актуальности наших исследований – авторы обнаружили в пробах мяса индейки альфа-токсин *Clostridium perfringens*, в то время как бета (cpb), бета 2 (cpb2), эпсилон (etx), йота (iA) и энтеро- (cpe) ток-

сины ни в одном из изолятов не были обнаружены, что подтверждает повсеместное распространение бактерий и необходимость ранней идентификации [8,9,10].

DEVELOPMENT OF A PCR TEST SYSTEM FOR THE DETECTION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS DNA

Moiseeva K. A., 3rd year postgraduate student of the Department of Microbiology, Virology and Immunology (ORCID: 0000-0003-4526-7430)

St. Petersburg state academy of veterinary medicine

ABSTRACT

With the spread of clostridiosis, epidemiological and epizootic safety is violated, the degree of which depends on the immunological status of the animal, therapeutic and preventive measures in the livestock complex, the toxigenicity of the bacterium and the severity of the disease. The *Clostridium perfringens* bacterium is ubiquitous, produces 20 different toxins and pathogenicity factors, one of which is alpha-toxin, which is found in meat and other biological samples, which threatens the biosafety of livestock enterprises, markets, shops, etc. The article is devoted to the development and testing of test- systems for real-time polymerase chain reaction (PCR) to detect the DNA of the gene encoding the alpha-toxin of the *Clostridium perfringens* CP322 strain, which is widespread in the Russian Federation. The synthesis of oligonucleotides proposed by a team of scientists from Korea Chon J.W., Park J.S., Hyeon J.Y., Park C., Song K.Y., Hong K.W., Hwang I.G., Kwak H.S., Seo K.H. in 2012 served as the basis for the creation and testing of the test system [1].

Optimization of the diagnostic technique, selection of the correct concentrations of reagents and DNA in samples from cattle, synthesis of highly specific primers and modernization of the probe molecule formed the basis for the development of a test system, which was tested on 319 samples - biomaterial obtained from cattle. The proposed method of molecular genetic diagnostics will allow veterinarians to timely identify the

causative agent of enterotoxemia in the test samples, make a comprehensive diagnosis based on epizootic, clinical, pathoanatomical and laboratory data, prescribe effective treatment and develop an action plan to prevent the development and spread of infection.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Chon, J.W. Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. / J. W. Chon, J. S. Park, J. Y. Hyeon [и др.] // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 22, Is. 4. – P. 530-534. DOI: 10.4014/jmb.1107.07064.
2. Yang, C. C. Clinical significance and outcomes of *Clostridium perfringens* bacteremia --a 10-year experience at a tertiary care hospital. / C. C. Yang, P. C. Hsu, H. J. Chang [и др.]. // *Int J Infect Dis*. – 2013. – Vol. 17, Is. 11. – e955-60. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.03.001.
3. Лобзин, Ю. В. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens* / А. С. Кветная, Н. В. Скрипченко, Л. И. Железова – DOI 10.36233/0372-9311-37. – Текст : электронный // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. – 2021. – Т. 98. – № 1. – С. 91-97. – URL: <https://microbiol.crie.ru/jour/article/view/1304> (дата обращения: 12.10.2022)
4. Козлова, А. Д. Использование молекулярно-генетических методов для типирования *Clostridium perfringens* / А. Д. Козлова, Н. С. Горбачева, О. В. Клименкова [и др.] // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. – Вып. 63. – № 3. – 2017. – С. 188-194.
5. Микробиологическая безопасность мяса, мясных продуктов и пищевых яиц : Учебно-методическое пособие по направлению подготовки 36.04.01 "Ветеринарно-санитарная экспертиза", уровень высшего образования магистратура / Л. И. Смирнова, А. А. Сухинин, Е. И. Приходько [и др.]. – Санкт-Петербург : Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, 2018. – 52 с. – EDN MSDYPY.

6. Смирнова, Л. И. Клиническая ветеринарная микробиология: учебное пособие. / Л. И. Смирнова, С. А. Макавчик. – СПб.: ВВМ, 2022. – С. 228.
7. Макавчик, С.А. Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рационального применения антимикробных препаратов: монография / С. А. Макавчик, А. А. Сухинин, С. В. Енгашев [и др.] // СПб.: Изд-во ВВМ, 2021. – 152 с.
8. Erol I. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. / M. Goncuoglu, N.D. Ayaz, F.S. Bilir Ormanci, G. Hildebrandt // *Lett Appl Microbiol*. 2008 Jul;47(1):31-4. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02379.x. Epub 2008 Jun 12.
9. Rood, J. I. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. / J. I. Rood, V. Adams, J. Lacey // *Anaerobe*. – 2018. – P. 5-10. DOI: 10.1016/J.anaerobe.2018.04.011.
10. Моисеева, К. А. ПЦР-диагностика штаммов *Clostridium perfringens* в исследуемом материале крупного рогатого скота / К. А. Моисеева, А. А. Сухинин // *Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны : материалы XI международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Санкт-Петербург, 24–25 ноября 2022 года.* – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2022. – С. 275-276.

REFERENCES

1. Chon, J.W. Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. / J. W. Chon, J. S. Park, J. Y. Hyeon [и др.] // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 22, Is. 4. – P. 530-534. DOI: 10.4014/jmb.1107.07064.
2. Yang, C. C. Clinical significance and outcomes of *Clostridium perfringens* bacteremia --a 10-year experience at a tertiary care hospital. / C. C. Yang, P. C. Hsu, H. J. Chang [и др.]. // *Int J Infect Dis*. – 2013. – Vol. 17, Is. 11. – e955-60. DOI: 10.1016/

j.ijid.2013.03.001.

3. Lobzin, Yu. V. Modern ideas about the etiopathogenetic and genetic features of *Clostridium perfringens* toxins / A. S. Kvetnaya, N. V. Skripchenko, L. I. Zhelezova - DOI 10.36233/0372-9311-37. – Text: electronic // Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology. - 2021. - T. 98. - No. 1. - S. 91-97. – URL: <https://microbiol.cric.ru/jour/article/view/1304> (date of access: 10/12/2022)
4. Kozlova, A. D. The use of molecular genetic methods for typing *Clostridium perfringens* / A. D. Kozlova, N. S. Gorbacheva, O. V. Klimenkova [et al.] // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. - Issue. 63. - No. 3. - 2017. - C. 188-194.
5. Microbiological safety of meat, meat products and food eggs: Educational and methodological manual for the direction of preparation 36.04.01 "Veterinary and sanitary examination", the level of higher education magistracy / L. I. Smirnova, A. A. Sukhinin, E. I. Prikhodko [i dr.]. - St. Petersburg: St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, 2018. - 52 p. - EDNMSDYPY.
6. Smirnova, L. I. Clinical veterinary microbiology: textbook. / L. I. Smirnova, S. A. Makavchik. - St. Petersburg: VVM, 2022. - S. 228.
7. Makavchik, S.A. Laboratory methods for the control of multiresistant pathogens of bacterial animal diseases and the rational use of antimicrobial drugs: monograph / S. A. Makavchik, A. A. Sukhinin, S. V. Engashev [et al.] // St. Petersburg: Publishing House of VVM, 2021. - 152 p.
8. Erol I. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. / M. Goncuoglu, N.D. Ayaz, F.S. Bilir Ormanci, G. Hildebrandt // Lett Appl Microbiol. 2008 Jul;47(1):31-4. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02379.x. Epub 2008 Jun 12.
9. Rood, J. I. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. / J. I. Rood, V. Adams, J. Lacey // Anaerobe. - 2018. - P. 5-10. DOI: 10.1016/J.anaerobe.2018.04.011.
10. Moiseeva, K. A. PCR diagnostics of *Clostridium perfringens* strains in the studied material of cattle / K. A. Moiseeva, A. A. Sukhinin // Knowledge of the young for the development of veterinary medicine and agro-industrial complex of the country: materials of the XI international scientific conference of students, graduate students and young scientists, St. Petersburg, November 24–25, 2022. - St. Petersburg: St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, 2022. - S. 275-276.