

УДК: 619 : 084 / 615.371

DOI: 10.31073/vet_biotech41-03

ЖОВНІР О.М., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: anaerob12@ukr.net,

МІНЦЮК Є.П., e-mail: jeckmints@gmail.com,

ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

ЗАСТОСУВАННЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПЛР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТОКСИН-ПРОДУКУЮЧИХ CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Молекулярне типкування *C. perfringens* за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції є швидким і ефективним методом типкування токсин продукуючих ізолятів *C. perfringens*. В результаті проведених досліджень встановлено, що типи А та В були переважаючим серед всіх ізолятів (47,8% і 34,7% від всіх досліджених ізолятів відповідно). Усі досліджені ізоляти *C. perfringens* (100%) містили ген *sra*, що кодує альфа-токсин; 22 ізоляти *C. perfringens* (47,8%) містили *sra* та *etx* гени, 16 ізолятів (34,7%) містили *sra* та *spe* гени. Шість ізолятів (13,04%) характеризувались наявністю генів *sra*, *spe* та *netB*. Лише три ізоляти (6,5%) містили гени, що кодують альфа-, бета- та епсилон токсини. Один ізолят (2,17%) характеризувався наявністю генів *sra* та *spβ*.

Особливості цільових генів токсинопродукування, вивчених в цьому дослідженні, мають перспективу для подальших досліджень при створенні засобів діагностики та специфічної профілактики.

Ключові слова: *C. perfringens*, токсигенний тип, ПЛР, діагностика, ізолят.

Вступ. *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) є важливим патогеном і етіологічним агентом, що викликає ряд захворювань у людей і тварин. До них належать гангрена, раневі інфекції, харчові токсикоінфекції, некротичні ентероколіти [1–3]. Це облигатна анаеробна паличкоподібна бактерія, яка зазвичай зустрічається в шлунково-кишковому тракті як тварин, так і людей і значно поширена в ґрунті та стічних водах. Здатність *C. perfringens* викликати захворювання пов'язана з утворенням різноманітних позаклітинних токсинів (наразі повідомляється про 16 різних токсинів).

Збудник викликає у тварин та людей такі інфекційні захворювання, як некротичні ентерити, які супроводжуються ознаками гострої діареї, в яких важливу роль відіграють їх токсини [4–6]. Цей збудник може виробляти і виділяти до 16 різних токсинів у різних комбінаціях. Проте чотири основні токсини, а саме альфа, бета, епсилон та йота, які кодуються генами *sra*, *spβ*, *etx*, *ιAp*, *spe* та *spβ2*, виробляються та секретуються ізолятами *C. perfringens*, викликаючи кишкові захворювання [7]. Відповідно до профілю основного токсину, який виробляє *C. perfringens*, цей патоген класифікується на п'ять

різних токсинотипів, які зазначаються як А, В, С, D і Е. Більшість захворювань, спричинених штамми *C. perfringens*, опосередковуються комбінацією одного або кількох токсинів [8–11].

Класифікація ізолятів *C. perfringens* традиційно базується на серонейтралізації з використанням антисироватки мишей або морських свинок, яка потребує значних витрат часу. Сьогодні перевагу надають молекулярним методам діагностики, таким як полімеразна ланцюгова реакція, яка дозволяє швидко виявляти гени *spa*, *cpβ*, *etx*, *ιAp*, *cpε* та *cpβ2*, які кодують основні токсини [12, 13]. Молекулярна характеристика та токсикотипування вважаються швидкими інструментами для виявлення *C. perfringens* у біологічних матеріалах різного генезу [14].

Як безпосередньо *C. perfringens*, так і відповідні токсини вважаються достатньо небезпечними та внесені до списку потенційних біологічних агентів, які можуть використовуватись для розробки біологічної зброї (BTW), що заслуговує уваги на розробку стратегій, які стосуються виявлення та захисту від цих токсинів продуктивних тварин та людей [15–16].

Враховуючи вищезазначене, вивчення особливостей токсинопродукування та розробка нових діагностичних підходів щодо *C. perfringens* є важливим напрямком для розробки та удосконалення заходів з попередження клостридіозів серед поголів'я тварин та людей.

Мета роботи. Метою даного дослідження було молекулярне токсинотипування ізолятів *C. perfringens*, виділених зі зразків від тварин у 2019–2021 роках.

Матеріали і методи досліджень. В якості референтних зразків в роботі були використані штами мікроорганізму *C. perfringens*, які зберігаються в музеї Інституту ветеринарної медицини НААН, перелік яких надано в таблиці 1. Безпосередньо для проведення досліджень використано 46 нетипованих ізолятів, виділених із патологічного матеріалу від хворих та загиблих свиней в господарствах Київської, Хмельницької та Полтавської областей України.

Таблиця 1

Штами та ізоляти *Cl. perfringens*, що використовувались в дослідях

№ п/п	Назва збудника	Тип	Вірулентність
1	<i>C. perfringens</i> «Хмельницький-97»	D	високо вірулентний
2	<i>C. perfringens</i> «Запорізький-96»	A	високо вірулентний
3	<i>C. perfringens</i> «Полонський»	B	високо вірулентний
4	<i>C. perfringens</i> «Славутський-97»	C	високо вірулентний
5	Ізоляти <i>C. perfringens</i>	Нетиповані	від слабо до високо-вірулентних

C. perfringens культивували у середовищі Кітта-Тароці (виготовлено в ІВМ НААН згідно класичної рецептури), середовищі Вільсон-Блера (BioRad, Індія), який готували згідно рекомендацій виробника.

Культивування в поживних середовищах проводили за температури $35,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, інкубували в анаеробному термостаті впродовж 24–48 годин.

Підтвердження типовості морфологічних та культуральних властивостей проводили із застосуванням загальноприйнятих бактеріологічних методів.

Для виділення бактеріальної ДНК геному ДНК *Clostridium perfringens* із ізолятів екстрагували за допомогою набору QIAamp® DNA Mini Kit (Кат. № 51304-Qiagen) відповідно до інструкцій виробника. Концентрацію ДНК визначали спектрофотометрично на приладі Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific Inc., США) за довжини хвилі $\lambda=260$ нм.

Олігонуклеотидні праймери для виявлення ділянок генів, що кодують токсини альфа (α), бета (β) та епсилон (ϵ), netB9 та ентеротоксину показано в таблиці 2.

Таблиця 2

Олігонуклеотидні праймери для детекції генів токсинуотворення *C.perfringens* (за Chukwu E. et al. 2016)

Назва гену	Послідовність праймерів 5'-3'	Розмір ампліфікованого фрагменту, нп
Альфатоксин – <i>cpa</i>	1. GCTAATGTTACTGCCGTTGA 2. CCTCTGATACATCGTGTAAG	324
Бетатоксин – <i>cpβ</i>	1. GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	196
Епсилонтоксин – <i>ctx</i>	1. GCGGTGATATCCATCTATTTC 2. CCACTTACTTGTCCCTACTAAC	655
netB токсин – <i>netB</i>	1. GCTGGTGCTGGAATAAATGC 2. TCGCCATTGAGTAGTTTCCC	383
Ентеротоксин – <i>cpe</i>	1. GGAGATGGTTGGATATTAGG 2. GGACCAGCAGTTGTAGATA	233

ПЛР проводили в термоциклері (Bio-Rad, S-1000, США) у загальному реакційному об'ємі 50 мкл, що містив 25 мкл суміші PCR master mix (Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) Fermentas, США), 5 мкл цільової ДНК, 2 мкл кожного праймера (що містить 10 пікомолей/мкл), вода для молекулярно-генетичних досліджень до 50 мкл. Ампліфікацію для виявлення цільових генів проводили протягом 35 циклів після денатурації при 95°C протягом 10 хвилин. Кожен цикл включав денатурацію при 94°C протягом 45 секунд, відпал при

56°C протягом 30 секунд і синтез при 72°C протягом 90 секунд та етап елонгації (72°C протягом 1 хвилини). Остання стадія подовження відбувалася при 72°C протягом 10 хвилин. Наявність ампліфікації специфічних ділянок ДНК виявляли методом електрофорезу в 1,5% агарозному гелі за допомогою броміду етидію за стандартним протоколом. Смуги візуалізували та фотографували під УФ-освітленням в трансільюмінаторі.

Результати досліджень були оброблені загальноприйнятими методами описової статистики із застосуванням пакету R-studio.

Результати досліджень та їх обговорення. За дослідження морфологічних властивостей ізолятів *C. perfringens* було встановлено, що всі дослідні штами культур збудника були представлені грампозитивними, однорідними паличками із дещо заокругленими краями, які характеризувались наявністю спор та капсул. За вивчення культуральних властивостей збудника *C. perfringens* різних типів, встановлено, що всі дослідні штами добре росли на спеціальному селективному середовищі Кітта-Тарроці із інтенсивним рівномірним помутнінням стовпчика середовища, формуванням незначного осаду на дні пробірки, інтенсивним газоутворенням і появою піни на поверхні вазелінової олії, яке проявлялося вже через 3 години від початку культивування (рис. 1А).

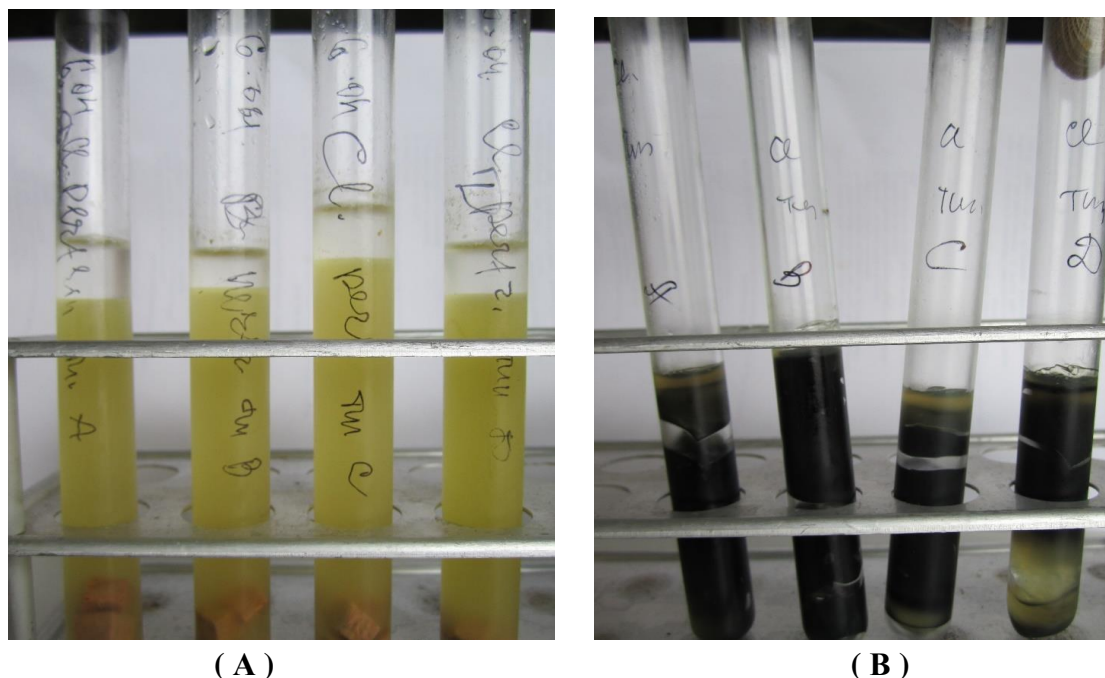


Рис. 1. Характер росту штамів *C. perfringens* на селективному середовищі Кітта-Тарроці (А) та диференційно-діагностичному середовищі Вільсон-Блера (В).

Ріст штамів збудника *C. perfringens*, незалежно від типу, на диференційно-діагностичному середовищі Вільсон-Блера проявлявся чорними вкрапленнями та плямами, завдяки відновленню сірчаноокислого заліза, яке є складовим компонентом середовища (рис. 1 В).

За досліджень з визначення наявності ферментування цукрів у *C. perfringens* було встановлено, що усім дослідним культурам були притаманні цукролітичні властивості, оскільки збудник активно ферментував значну кількість вуглеводів з утворенням кислоти і газу: глюкозу, галактозу, лактозу, мальтозу, сахарозу. За результатами досліджень було виявлено, що збудник не розщеплював маніт, дульцит, рамнозу. За вивчення протеолітичних властивостей *C. perfringens* було встановлено, що всі культури при посіві на желатинове середовище через 24 години культивування розплавляли желатин, що підтверджувало наявність протеолітичних ферментів у культурах збудника.

Отже, культури ізолятів *C. perfringens* відповідали основним типовим властивостям, характерним для збудника.

Відомо, що ген *spa* локалізований в хромосомі та є висококонсервативним. Інші гени токсинів, включаючи *cpβ*, *etx*, *netB*, мають плазмідну локалізацію, за винятком гена *spe*, який може бути розташований або в плазміді, або в хромосомі. Втрата плазмід із різних причин може слугувати причиною зміни токсинотипу, які можуть виявлятися в популяції збудника.

Гени, що кодують токсини, включаючи гени *spa*, *cpβ*, *etx*, *netB* та *spe*, були виявлені та ідентифіковані в ізолятах *C. perfringens* із зразків, отриманих із патологічного матеріалу від хворих та загиблих тварин за допомогою мультиплексного ПЛР-аналізу з використанням набору специфічних праймерів (рис. 2).

Усі ізоляти *C. perfringens* (100%) містили ген *spa*, що кодує альфа-токсин; 22 ізоляти *C. perfringens* (47,8%) містили *spa* та *etx* гени, 16 ізолятів (34,7%) містили *spa* та *spe* гени. Шість ізолятів (13,04%) характеризувались наявністю генів *spa*, *spe* та *netB*. Лише три ізоляти (6,5%) містили гени, що кодують альфа-, бета- та епсилон токсини. Один ізолят (2,17%) характеризувався наявністю генів альфа та бета токсинів (табл. 3).

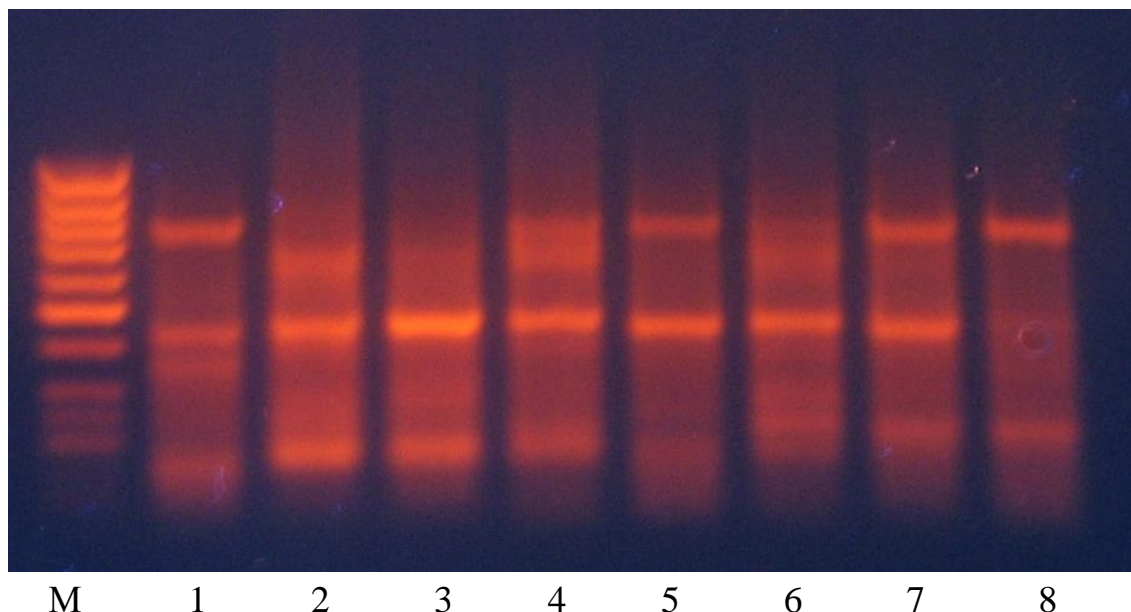


Рис. 2. Агарозний гель, що містить типові амплікони для виявлення токсинів *C. Perfringens*: М – білковий маркер 100bp ladder (BioRad); доріжки 1 та 8 – *C. perfringens* тип А; доріжки 2, 3, 6 – *C. perfringens* тип В; доріжки 4, 5 та 7 – *C. perfringens* тип D.

Таким чином, у цьому дослідженні 47,8% і 34,7% ізолятів *C. perfringens* були ідентифіковані як токсинотипи А і В відповідно, що складало переважну кількість серед всіх досліджених ізолятів (табл. 3).

Таблиця 3

Результати виявлення генів токсиноутворення серед ізолятів *C. perfringens* за допомогою мультиплексної ПЛР, n=46

№	Кількість позитивних, шт (%)	Альфа-токсин	Бета-токсин	Епсилон-токсин	netВ токсин	Ентеро-токсин	Токсिनотип
1	22 (47,8%)	+		+			А
2	16 (34,7%)	+	-	-	-	+	В
3	6 (13,04%)	+	-	-	+	+	С
4	3 (6,5%)	+	+	+	-	-	Д
5	1(2,17%)	+	+	-	-	-	Е

У результаті всі 46 ізолятів були типізовані як токсиноутворюючі.

Молекулярне типування *C. perfringens* за допомогою мультиплексної ПЛР є швидким і ефективним методом типування токсин продукуючих ізолятів *C. perfringens*. В результаті проведених досліджень встановлено, що типи А та В були переважачим серед всіх ізолятів.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Молекулярне типкування *C. perfringens* за допомогою мультиплексної ПЛР є швидким і ефективним методом типкування токсин продукуючих ізолятів *C. perfringens*. В результаті проведених досліджень встановлено, що типи А та В були переважаючим серед всіх ізолятів (47,8% і 34,7% від всіх досліджених ізолятів відповідно).

Усі досліджені ізоляти *C. perfringens* (100%) містили ген *cpa*, що кодує альфа-токсин; 22 ізоляти *C. perfringens* (47,8%) містили *cpa* та *etx* гени, 16 ізолятів (34,7%) містили *cpa* та *cpe* гени. Шість ізолятів (13,04%) характеризувались наявністю генів *cpa*, *cpe* та *netB*. Лише три ізоляти (6,5%) містили гени, що кодують альфа-, бета- та епсилон токсини. Один ізолят (2,17%) характеризувався наявністю генів *cpa* та *cpβ*.

Особливості цільових генів токсинопродукування, вивчених в цьому дослідженні, мають перспективу для подальших досліджень при створенні засобів діагностики та специфічної профілактики. Подальші дослідження будуть зосереджені на вивченні механізмів експресії токсинів та впливу на вірулентність штамів та ізолятів *C. perfringens*.

APPLICATION OF MULTIPLEX PCR FOR THE DETECTION OF TOXIN-PRODUCING CL. PERFRINGENS IN BIOLOGICAL SAMPLES / Zhovnir A.M., Mintciuk E.P., Tarasov O.A.

Introduction. *C. perfringens* causes toxico-infectious diseases such as gastroenteritis and acute diarrhea in humans, and their toxins play an important role. This pathogen can produce and release up to 16 various toxins in different combinations. However, four major toxins, namely alpha, beta, epsilon and iota, which are encoded as *cpa*, *cpb*, *etx* and *iot* genes, respectively, are produced and secreted by *C. perfringens* isolates, causing intestinal diseases. According to the main toxin profile produced by *C. perfringens*, this pathogen is classified into five distinct toxinotypes consisting of A, B, C, D and E. Most diseases caused by *C. perfringens* strains are mediated by the combination of one or more of these toxins

The goal of this study was to determine the molecular toxinotype of *C. perfringens* isolates, collected in 2019-2021.

Materials and methods. It was used strains and isolates of *C. perfringens*, stored and maintained at the Institute of Veterinary Medicine. *C. perfringens* was cultured in Kitta-Tarozzi medium (manufactured at IVM NAAS according to the classical recipe), Wilson-Blair medium (BioRad, India), which was prepared according to the manufacturer's instructions. DNA was extracted from bacterial cells using a DNA Purification Kit QIAamp® DNA Mini Kit (Cat. No. 51304-Qiagen). Extracted DNA was tested for concentration and purity with a Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. The obtained concentration was 50µg/ml.

Toxin-encoding genes – *cpa*, *cpe*, *cpb*, *etx* and *netB* genes were detected and identified using a conventional multiplex PCR assay. Specific primers set, which have previously been described by

Chukwu et al. (2016) was used in this study. The PCR products were revealed using electrophoresis in agarose gel at 120 V for 40 min and photographed in transilluminator under UV.

Results of research and discussion. Molecular typing of *C. perfringens* using multiplex PCR is a fast and effective method of typing toxin-producing isolates of *C. perfringens*. As a result of the conducted studies, it was established that types A and B were predominant among all isolates (47.8 and 34.7% of all tested isolates, respectively).

All tested isolates of *C. perfringens* (100%) contained the *cpa* gene encoding alpha-toxin; 22 isolates of *C. perfringens* (47.8%) contained *cpa* and *etx* genes, 16 isolates (34.7%) contained *cpa* and *cpe* genes. Six isolates (13.04%) were characterized by the presence of *cpa*, *cpe* and *netB* genes. Only three isolates (6.5%) contained genes encoding alpha-, beta- and epsilon toxins. One isolate (2.17%) was characterized by the presence of *cpa* and *cpβ* genes.

Conclusions and prospects for further research. Studies have shown that multiplex PCR is rapid and effective approach for *C. perfringens* typing correlated with traditional methods. Alpha toxin and *netB* toxin both have critical role in pathogenesis of clostridia-mediated infections. The peculiarities of toxine-production genes composition have the potential to be further investigated for the sensitivity and specificity increasing of diagnostic tests.

Keywords: *C. perfringens*, toxigenic type, PCR, diagnostics, isolate.

REFERENCES

1. Hailegebreal, G. (2017). A review on Clostridium perfringens food poisoning. *Glob. Res. J. Public Health Epidemiol.*, 4, 10-109.
2. Carey, J., Cole, J., Venkata, S.L.G., Hoyt, H., Mingle, L., Nicholas, D., Musser, K.A., & Wolfgang, W.J. (2021). Determination of Genomic Epidemiology of Historical Clostridium perfringens Outbreaks in New York State by Use of Two Web-Based Platforms: National Center for Biotechnology Information Pathogen Detection and FDA GalaxyTrakr. *J. Clin. Microbiol.*, 59:e02200-20. doi: 10.1128/JCM.02200-20.
3. Navarro, M.A., McClane, B.A., & Uzal, F.A. (2018). Mechanisms of Action and Cell Death Associated with Clostridium Perfringens Toxins. *Toxins*, 10, 212. doi: 10.3390/toxins10050212.
4. Rood, J.I., Adams, V., Lacey, J., et al. (2018). Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. *Anaerobe*, 53, 5-10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011.
5. Uzal, F.A., Freedman, J.C., Shrestha, A., et al. (2014). Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.*, 9, 361-377. doi: 10.2217/fmb.13.168.
6. Feng, Y., Fan, X., Zhu, L., et al. (2020). Phylogenetic and genomic analysis reveals high genomic openness and genetic diversity of Clostridium perfringens. *Microb. Genom.*, 6, e000441. doi: 10.1099/mgen.0.000441.
7. Xiu, L., Liu, Y., & Wu, W. (2020). Prevalence and multilocus sequence typing of Clostridium perfringens isolated from 4 duck farms in Shandong province, China. *Poult. Sci.*, 99, 5105-5117. doi: 10.1016/j.psj.2020.06.046.
8. Chukwu, E., Nwaokorie, F., Coker, A.O., et al. (2016). Detection of toxigenic Clostridium perfringens and Clostridium botulinum from food sold in Lagos, Nigeria. *Anaerobe*, 42, 176-181. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.10.009.
9. Chukwu, E.E., Nwaokorie, F.O., Coker, A.O., Avila-Campos, M.J., & Ogunsola, F.T. (2017). Genetic variation among Clostridium perfringens isolated from food and faecal specimens in Lagos. *Microb. Pathog.*, 111, 232-237. doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.031.

10. Ghoneim, N., & Hamza, D. (2017). Epidemiological studies on *Clostridium perfringens* food poisoning in retail foods. *Rev. Sci. Tech.*, 36, 1025-1032. doi: 10.20506/rst.36.3.2734.
11. Lee, C.-A., & Labbé, R. (2018). Distribution of Enterotoxin- and Epsilon-Positive *Clostridium perfringens* Spores in U.S. Retail Spices. *J. Food Prot.*, 81, 394-399. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-352.
12. Aras, Z., & Hadimli, H.H. (2014). Detection and molecular typing of *Clostridium perfringens* isolates from beef, chicken and turkey meats. *Anaerobe*, 32, 15-17. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.11.004.
13. Choi, Y., Kang, J., Lee, Y., et al. (2020). Quantitative microbial risk assessment for *Clostridium perfringens* foodborne illness following consumption of kimchi in South Korea. *Food Sci. Biotechnol.*, 29, 1131-1139. doi: 10.1007/s10068-020-00754-2.
14. Anju, K., Karthik, K., Divya, V., et al (2020). Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolated from different sources of livestock and poultry. *Anaerobe*, 6, 102298. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102298.
15. Park, M., & Rafii, F. (2019). The prevalence of plasmid-coded cpe enterotoxin, β 2 toxin, tpeL toxin, and tetracycline resistance in *Clostridium perfringens* strains isolated from different sources. *Anaerobe*, 56, 124-129. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.02.007.
16. Hu, W.-S., Kim, H., & Koo, O.K. (2018). Molecular genotyping, biofilm formation and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolated from meat supplied to school cafeterias in South Korea. *Anaerobe*, 52, 115-121. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.06.011.