УДК 619:616.98:579.852.11
DOI: 10.31073/vet_biotech43-04

ЖОВНІР О.М.[1], канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: zhovnir73@ukr.net,
МІНЦЮК Є.П.[1], e-mail: jeckmints@gmail.com,
САВЧЕНЮК М.О.[2], e-mail: m.o.savcheniuk@gmail.com,
ТАРАСОВ О.А.[1], канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net

[1]*Інститут ветеринарної медицини НААН*
[2]*Білоцерківський національний аграрний університет*

РОЗРОБЛЕННЯ ТЕСТ-НАБОРУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ *C. SEPTICUM* ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Розроблений набір для проведення ПЛР-рч, який складався із праймерів та FAM зонду, дизайн якого розроблено авторами статті на основі послідовності гену csa референсного штаму C. septicum NCTC547 (GenBank D17668), має високу чутливість, 100% специфічність та дає можливість детектувати цільову ДНК у різнотипному біологічному матеріалі.

Загальна специфічність ПЛР-рч тесту для таргетного гену C. septicum склала 100% (95% довірчий інтервал Вільсона: 96,8 до 99,9%), а також чутливість для зразків з наявністю 100 копій геному та більше було 100% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 99,3 до 99,9%). Отриманий у результаті досліджень поріг узгодження ΔOD >+0,3 є достатнім показником для надійної детекції кількостей збудника від 100 копій геному в реакції та вище.

Ключові слова: *ПЛР-рч, діагностика, праймери, ДНК, C. septicum.*

Вступ. *Clostridium septicum (C. septicum)* є важливим патогеном, що викликає ряд захворювань у людей і тварин, переважно гангренозні ураження із газоутворенням. До них належать гангрена, раневі інфекції, харчові токсикоінфекції, некротичні ентероколіти [1–3]. Хворіють переважно жуйні та інші види тварин, а також птиця, що уражається меншою мірою [4].

Відповідно до опублікованих даних, захворювання, що спричиняє *C. septicum,* можуть перебігати як окремо, так і в асоціації з іншими збудниками групи клостридій (*Clostridium chauvoei, Clostridium sordellii, Clostridium novyi),* кокової групи та *P. aeruginosa* [5–8].

C. septicum виробляє чотири токсини: альфа (гемолітичний, некротичний і летальний), бета (ДНКаза), гамма (гіалуронідаза) і дельта, причому альфа-токсин є найбільш важливим для характеристики патогенності, а на думку деяких авторів, він також важливий для імуногенності за створення вакцин [9–12].

Ген альфа-токсина є високо консервативний та є основним таргентним геном для видового визначення і одночасного встановлення токсинопродукування [13–14].

Методи бактеріологічного виявлення *C. septicum* базуються на мікроскопії та виділенні чистої культури збудника, а також на серотипизації з використанням специфічних сироваток мурчаків, що потребує витрат часу, а також специфічних анаеробних умов культивування.

Застосування молекулярно-генетичних методів, таких як полімеразна ланцюгова реакція, дозволяє швидко детектувати наявність збудника в будь-яких зразках із надзвичайно високою специфічністю [15–16].

В Україні захворювання, що обумовлені *C. septicum* є досить поширеними, вони викликають значну втрату продуктивності у тварин та у випадках спалахів в птахогосподарствах – падіж птиці. Але основними групами ризику серед сільськогосподарських тварин є ВРХ та інші копитні [17].

Враховуючи вищезазначене, розробка та впровадження нових діагностичних підходів щодо швидкого виявлення *C. septicum* є важливим для вчасного вживання заходів, спрямованих на профілактику та недопущення поширення патогена на поголів'я чутливих тварин та птиці.

Мета роботи. Розробити тест-набір для виявлення *C. septicum* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі та дослідити її чутливість і специфічність.

Матеріали і методи досліджень. Робота виконувалась в лабораторії анаеробних інфекцій та науково-дослідному навчальному центрі діагностики хвороб тварин, відповідно до календарного плану наукових досліджень за темою завдання «Удосконалити систему діагностики та розробити сучасні засоби специфічної профілактики анаеробних інфекцій тварин».

Як референтні зразки у роботі були використані штам та патогенні польові ізоляти мікроорганізмів *C. septicum* та *C. perfringens, C. chauvoei, C. sordellii, C. novyi,* які зберігаються в музеї лабораторії анаеробних інфекцій Інституту ветеринарної медицини НААН.

Безпосередньо для проведення досліджень використано 6 нетипованих ізолятів, виділених із патологічного матеріалу від хворих та загиблих свиней в господарствах Київської та Полтавської областей України.

Виділення ДНК із зразків біологічного матеріалу проведено із використанням набору «IndiSpin Pathogen kit» (Indical Bioscience, Німеччина) згідно з інструкцією виробника.

Детектування специфічних фрагментів геному проведено з використанням полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-рч) за

допомогою ампліфікатора планшетного типу BioRad 1000 з модулем SFX96 із застосуванням вбудованого програмного забезпечення.

Для проведення досліджень були підібрані і синтезовані специфічні праймери для проведення ПЛР-рч. Специфічні олігонуклеотидні праймери розроблені авторським колективом на основі праймерів, рекомендованих Neumann, et al. [15], та FAM зонду, дизайн якого також розроблено виконавцями тематики на основі послідовності гену *csa* референсного штаму *C. septicum* NCTC547 (GenBank D17668).

Послідовності представлено в таблиці 1. Також був застосований набір праймерів до ділянки гену PRP, видоспецифічного для жуйних як внутрішнього ендогенного контролю.

Оптимальні умови проведення ампліфікації були підібрані експериментально, що описано в результатах досліджень.

Перелік використаних праймерів представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Перелік праймерів для виявлення збудника *C. septicum* методом ПЛР-рч

Мішень	Назва праймера	Послідовність нуклеотидів, 5’-3’
Ген альфа-токсина(csa)	КС_f	TAGGATTTGGATGGTGCGGTGGAA
	КС_r	TGCACGATACCCACTTGCATAAGG
	КС_зонд	FAM-CGGCTAATCCAAATGTTGGACAAGGT-BHQ1
Ендогенний контрольний зразок	PRF	ACGTGGGCCTCTGCAAGA
	PRR	GACTGCCCTGTCCTGGGTATC
	PRP_зонд	R6G-CGACCAAAACCTGGAGGAGGATGGA-BHQ2

ПЛР проводили в термоциклері (Bio-Rad, S-1000, США) у загальному реакційному об’ємі 25 мкл, що містив 17 мкл суміші PCR master mix (Taq 2X Master Mix, NEB, США), 5 мкл цільової ДНК, 3 мкл суміші праймерів (що містить 20 пмоль/мкл праймерів та 10 пмоль/мкл зонда).

Умови ампліфікації зазначені у таблиці 2.

Таблиця 2

Умови ампліфікації ДНК *C. septicum*

№ з/п	Етапи	Температура, °С	Час	Кількість циклів
1	Початкова денатурація ДНК	95	2 хв	1
2	Денатурація ДНК	95	20 с	45
	Відпалювання праймерів	60	15 с	
	Елонгація	72	15 с	

Флуоресценцію вимірювали за температури 60°С на каналах FAM (ДНК *C. septicum*) та JOE (ВКЗ).

Для виявлення продуктів ампліфікації використовували пороговий метод – визначали значення порогового циклу реакції Ct (Threshold cycle). Результати аналізу вважали достовірними, якщо значення Ct по каналу FAM менше або дорівнює 35 (Ct≤35), значення Ct НКЗ відсутнє, значення Ct по каналу JOE всіх досліджуваних зразків (ампліфікація ВКЗ) менше або дорівнює 35 (Ct≤35).

Результати оброблено методом описової статистики із використанням пакету R (www.rproject.org).

Результати досліджень та їх обговорення. Отримані результати дослідження свідчать про можливість ідентифікації розробленими праймерами генетичного матеріалу *C. septicum,* а ПЛР-рч може бути застосована для детекції патогена у зразках із кількістю геномів збудника – від 100 та більше.

Таблиця 3

Результати ампліфікації серії 10-кратних розведень ДНК, n=5

Кількість копій генома/реакція		**$1,0\times10^5$**	**$1,0\times10^4$**	**$1,0\times10^3$**	**$1,0\times10^2$**	**$1,0\times10^1$**	**$1,0\times10^0$**
Значення Ct за FAM (5 повторів)	1	12,77	18,41	22,19	28,13	–	–
	2	12,84	18,37	22,30	28,23	38,34	–
	3	14,01	18,16	21,61	28,22	40,62	–
	4	12,86	18,44	22,24	27,84	39,55	–
	5	13,43	17,81	22,19	28,17	–	–
$Ct_{середнє}$		13,18	18,24	22,10	28,11	–	–
SD		0,49	0,26	0,28	0,15	–	–
% CV		1,24	0,43	0,69	0,39	0,2	–
%CVv		3,72	1,43	1,28	0,53	2,96	–
Позитивно/негативно		5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/10
Довірчий інтервал аналітичної чутливості,%		100	100	100	100	60	–

Результати, представлені у таблиці 3, свідчать, що довірчий інтервал аналітичної чутливості методики щодо *C. septicum* становив 100% за концентрації $1,0\times10^5$ – $1,0\times10^2$ копій/реакція і 60% – за концентрації $1,0\times10^0$ копій/реакція. Таким чином, було встановлено, що LOD валідованої методики становить близько 100 копій геному/реакція ДНК патогена.

За результатами, наведеними у таблицях, обраховане значення стандартного відхилення (SD) для п’яти повторів ампліфікації кожного з шести розведень плазмід було нижчим від максимально допустимого рівня

прийнятного значення SD для методу (SDv≤0,5). Значення коефіцієнтів варіації (% CV) під час постановки досліду також були нижчими від прийнятного значення коефіцієнту варіації для методу (CVv). Отримані дані свідчать про високу збіжність результатів виявлення ДНК патогена.

Отриманий в результаті досліджень поріг узгодження ΔOD >+0,3 є достатнім показником для надійної детекції навіть малих кількостей збудника.

Аналітичну специфічність визначали як здатність відрізняти цільову ділянку ДНК від нуклеїнових кислот інших патогенних клостридій. Для визначення специфічності було використано патологічний матеріал від ВРХ, що містив *C. septicum* (позитивний біологічний матеріал), суспензії культур бактерій. Результати викладено в таблиці 4.

Таблиця 4

Результати оцінювання специфічності методики, n=3, M±m

№.	Біологічний матеріал	Кількість повторів	Ct за FAM ДНК *C. septicum*	Ct за JOE *ендогенний контроль*
1.	Патологічний матеріал від ВРХ, що містить *C. septicum*	3	22,36±0,45	19,28±0,21
2.	пат. матеріал ВРХ, що не містить *C.septicum*	3	–	19,28±0,2
3.	Патологічний матеріал від ВРХ, що містить *C. perfringens*	3	–	19,28±0,2
4.	Патологічний матеріал від ВРХ, що містить *C. chauvoei*	3	–	19,28±0,2
5.	Патологічний матеріал від ВРХ, що містить *C. sordellii*	3	–	19,28±0,2
6.	Патологічний матеріал від ВРХ, що містить *C. novyi*	3	–	18,77±0,11
7.	Патологічний матеріал від ВРХ, що містить, *C. perfringens , C. septicum, C. sordellii, C. novyi*	3	23,45±0,3	18,77±0,11
8.	Патологічний матеріал від ВРХ, що містить, *C. perfringens, C. septicum*	3	19,11±0,17	17,89±0,23
9.	Бактеріальна культура, що містить *C. perfringens, C. sordellii, C. novyi*	3	15,06±0,39	18,22±0,24
10.	Бактеріальна культура, що містить *C. septicum*	3	15,06±0,39	18,32±0,24
11.	Бактеріальна культура, що містить *C. perfringens, C. septicum, C. sordellii, C. novyi*	3	16,29±0,54	17,43±0,31
10.	Стерильне поживне середовище	3	–	–

Аналіз даних, представлених у таблиці 4, свідчить про відсутність хибних результатів і неспецифічних реакцій зі сторонніми патогенами, що відносяться до групи клостридій. Під час дослідження матеріалу, що містив *C. perfringens,*

C. sordellii, C. novyi, значення по Ct за барвником FAM виявлено не було, при цьому, як очікувалось, спрацював внутрішній контрольний зразок за барвником JOE, що підтверджує правильність проходження реакції.

Таким чином, загальна специфічність ПЛР-рт тесту для таргетного гену *C. septicum* склала 100% (95% довірчий інтервал Вільсона: 96,8 до 99,9%), а також чутливість для зразків з наявністю 100 копій генома та більше було 100% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 99,3 до 99,9%).

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. Розроблено тест-набір для виявлення *C. septicum* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, який складався із праймерів та FAM зонду, який має високу чутливість, 100% специфічність та дає можливість детектувати цільову ДНК у різнотипному біологічному матеріалі.

2. Загальна специфічність ПЛР-рт тесту для таргетного гену *C. septicum* склала 100% (95% довірчий інтервал Вільсона: 96,8 до 99,9%), а також чутливість для зразків з наявністю 100 копій геному та більше складала 100% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 99,3 до 99,9%). Отриманий в результаті досліджень поріг узгодження ΔOD >+0,3 є достатнім показником для надійної детекції кількостей збудника в пороговому значенні 100 копій геному в реакції.

Результати досліджень будуть використані під час оформлення нормативної документації з реєстрації діагностичної тест-системи для детекції *C. septicum* в патологічному матеріалі.

DEVELOPMENT OF A TEST KIT FOR THE DETECTION OF C. SEPTICUM BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION / Zhovnir O., Mintsiuk E., Savcheniuk M., Tarasov O.

Introduction. *According to published data, the disease caused by C. septicum can occur both alone and in association with other pathogens of the Clostridium group (Clostridium chauvoei, Clostridium sordellii, Clostridium novyi type A), the coccus group and P. aeruginosa. The alpha-toxin gene is highly conserved and is the main target gene for species identification and simultaneous determination of toxin production. The use of molecular genetic methods, such as polymerase chain reaction, allows conducting rapid detection of the pathogen in any sample with high specificity.*

The goal of the work. *To study the sensitivity and specificity of a set of primers for the detection of C. septicum by real-time polymerase chain reaction.*

Materials and methods. *As reference samples, the strain and pathogenic field isolates of C. septicum and C. perfringens, C. chauvoei, C. sordellii, C. novyi microorganisms stored in the museum of the Institute of Veterinary Medicine of the National Academy of Sciences of Ukraine were used.*

For the study, we used a set of primers for PCR-rt, which consisted of primers and a FAM probe, the design of which was developed by the authors of the article based on the sequence of the csa gene of the reference strain of C. septicum NCTC547 (GenBank D17668).

PCR was performed in a thermocycler (Bio-Rad, S-1000, USA) in a total reaction volume of 25 µL. Reaction volume of 25 µL, containing 17 µL of PCR master mix (Taq 2X Master Mix, NEB, USA), 5 µL of target DNA, 3 µL of primer mixture (containing 20 pmol/mL of primers and 10 pmol/mL of probe).

To detect amplification products, the threshold method was used – the value of the threshold cycle of the reaction Ct (Threshold cycle) was determined. The results of the analysis were considered reliable if the Ct value of the FAM channel was less than or equal to 35 (Ct≤35), the Ct value of the negative control channel was absent, the Ct value of the JOE channel of all tested samples (amplification of target gene fragment) was less than or equal to 35 (Ct≤35).

The results were processed by descriptive statistics using the R package (www.rproject.org)

Results of research and discussion. *The limit of detection of the validated method was found to be about 100 genome copies/pathogen DNA reaction.*

According to the results shown, the calculated validated standard deviation (SD) for five amplification replicates of each of the six plasmid dilutions was lower than the maximum acceptable level of acceptable SD for the method (SDv≤0.5). The values of the coefficients of variation (% CV) during the experiment were also lower than the acceptable value of the coefficient of variation for the method (CVv). The data obtained indicate a high convergence of the results of pathogen DNA detection.

The detection threshold ΔOD >+0.3 obtained as a result of the study is sufficient for reliable detection of even small amounts of the pathogen.

The analytical specificity was defined as the ability to distinguish the target DNA site from the nucleic acids of other pathogenic Clostridia. Pathological material from cattle containing C. septicum (positive biological material) and bacterial culture suspensions were used to determine the specificity.

Thus, the overall specificity of the PCR-RT test for the target gene of C. septicum was 100% (95% Wilson's confidence interval: 96.8 to 99.9%), and the sensitivity for samples with 100 genome copies or more was 100% (95% Wilson's confidence interval: 99.3 to 99.9%).

Conclusions and prospects for further research. *The primer set used for PCR-rt, consisting of primers and a FAM probe, the design of which was developed by the authors, based on the sequence of the csa gene of the reference strain of C. septicum NCTC547 (GenBank D17668), has high sensitivity, 100% specificity and allows detection of target DNA in various types of biological material.*

2. The overall specificity of the PCR-RT test for the target gene of C. septicum was 100% (95% Wilson's confidence interval: 96.8 to 99.9%), and the sensitivity for samples with 100 copies of the genome or more was 100% (95% Wilson's confidence interval: 99.3 to 99.9%). The detection threshold ΔOD >+0.3 obtained in the study is sufficient for reliable detection of pathogen amounts of 100 genome copies and above in the reaction.

The research results will be used to create a diagnostic test system for the detection of clostridia in pathological material.

Keywords: *qPCR, diagnostics, primers, DNA, C. septicum.*

REFERENCES

1. Uzal, F.A., Songer, J.G., Prescott, J.F., & Popoff, M.R. (2016). *Clostridial Diseases of Animals.* Wiley and Blackwell.

2. Rood, J.I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B.A., Melville, S.B., et al. (2018). Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. *Anaerobe,* 53, 5-10. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011.

3. Forti, K., Ferroni, L., Pellegrini, M., Cruciani, D., Giuseppe, A.D., Crotti, S., et al. (2020). Molecular characterization of Clostridium perfringens strains isolated in Italy. *Toxins,* 12, 1-20. https://doi.org/10.3390/toxins12100650.

4. Sacco, S.C., Ortega, J., Navarro, M.A., Fresneda, K.C., Anderson, M., Woods, L.W., et al. (2020). Associated gas gangrene in 8 horses, 1998–2019. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 32(3), 246-251. https://doi.org/10.1177/1040638719877844.

5. Nyaoke, A.C., Navarro, M.A., Fresneda, K., Diab, S.S., Moore, J., Lyras, D., et al. (2020). Paeniclostridium (Clostridium) sordellii-associated enterocolitis in 7 horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 32, 239-245. https://doi.org/10.1177/1040638720903738.

6. Vidor, C., Awad, M., & Lyras, D. (2015). Antibiotic resistance, virulence factors and genetics of Clostridium sordellii. *Research in Microbiology,* 166, 368-374. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.09.003.

7. Gazioğlu, A., Karagülle, B., Yüksel, H., Açık, M.N., Keçeci, H., Dörtbudak, M.B., et al. (2018). Sudden death due to gas gangrene caused by Clostridium septicum in goats. *BMC Veterinary Research,* 14, 1-6. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1747-y.

8. Mohiuddin, M., Iqbal, Z., Siddique, A., Liao, S., Salamat, M.K.F., Qi, N., et al. (2020). Prevalence, genotypic and phenotypic characterization and antibiotic resistance profile of Clostridium perfringens type A and D isolated from feces of sheep (Ovis aries) and goats (Capra hircus) in Punjab, Pakistan. *Toxins,* 12, 1-14. https://doi.org/10.3390/toxins12100657.

9. Omer, S.A., Al-Olayan, E.M., Babiker, S.E.H., Aljulaifi, M.Z., Alagaili, A.N., & Mohammed, O.B. (2020). Genotyping of Clostridium perfringens isolates from domestic livestock in Saudi Arabia. *Biomed Research International,* 9035341. https://doi.org/10.1155/2020/9035341.

10. Goossens, E., Valgaeren, B. R., Pardon, B., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Deprez, P. R., et al. (2017). Rethinking the role of alpha toxin in bovine necro-haemorrhagic enteritis. *Veterinary Research,* 48, 1-17. https://doi.org/10.1186/s13567-017-0413-x.

11. Uzal, F.A., Hostetter, J., & Plattner, B. (2016). *The alimentary system.* In M.G. Maxie (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals (Vol. 2, 6th ed., pp. 1–260). Elsevier.

12. Jabbari, A.R., Tekyei, F., Esmaelizad, M., & Pilehchian Langroudi, R. (2012). Occurrence of Beta2 toxigenic Clostridium perfringens isolates with different toxin types in Iran. Archives of Razi Institute, 67, 133-137.

13. Busch, K., Suchodolski, J.S., Kühner, K.A., Minamoto, Y., Steiner, J.M., Mueller, R.S., et al. (2015). Clostridium perfringens enterotoxin and Clostridium difficile toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Veterinary Record,* 176, 253. https://doi.org/10.1136/vr.102738.

14. Miyawaka, M.E.F., Saputo, J., St Leger, J., Puschner, B., Fisher, D.J., McClane, B.A., et al. (2007). Necrotizing enterocolitis and death in a goat kid associated with enterotoxin (CPE)-producing Clostridium perfringens type A. *Canadian Veterinary Journal,* 48 (12), 1266-1269.

15. Anju, K., Karthik, K., Divya, V., Priyadharshini, M.L.M., Sharma, R.K., & Manoharan, S. (2021). Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in Clostridium perfringens isolated from different sources of livestock and poultry. *Anaerobe,* 67, 102298. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102298.

16. Wu, K., & Feng, H. (2022). Prevalence, toxin-typing and antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens in sheep with different feeding modes from Gansu and Qinghai provinces, China. *Anaerobe*, 73, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102516.

17. Ryzhenko, V.P., Ryzhenko, G.F., Gorbatyuk, O.I., et al. (2014). Obgruntuvannia biotekhnolohii stvorennia asotsiiovanykh vaktsyn [Substantiation of biotechnology for the creation of associated vaccines]. *Veterynarna biotekhnolohiia – Veterinary Biotechnology*, 24, 198-203 [in Ukrainian].