Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet9220
<http://nvlvet.com.ua>

UDC 579.67

PCR-test system specific identification *Parachlamydia acanthamoebae*

V.K. Zezekalo¹, S.B. Peredera¹, T.V. Buslik², K.F. Pochernyaev²

¹Poltava State Agrarian Academy, Poltava, Ukraine

²Institute of pig breeding and agroindustrial production NAAS, Poltava, Ukraine

Article info

Received 18.10.2018
Received in revised form
21.11.2018
Accepted 22.11.2018

Poltava State Agrarian Academy,
Skovorody Str., 1/3, Poltava,
36003, Ukraine.
Tel.: +38-095-645-56-26
E-mail: v.zezekalo@gmail.com

Institute of pig breeding and
agroindustrial production
National Academy of Agricultural
Science of Ukraine,
Shvedska Mohyla 1, 36013,
Poltava, Ukraine.

Zezekalo, V.K., Peredera, S.B., Buslik, T.V., & Pochernyaev, K.F. (2018). PCR-test system specific identification *Parachlamydia acanthamoebae*. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, 20(92), 101–104. doi: 10.32718/nvlvet9220

Chlamydia-like bacteria *Parachlamydia acanthamoebae* belongs to the phylum *Chlamydiae*, class *Chlamydia*, order *Chlamydiales*, family *Parachlamydiaceae*, genus *Parachlamydia*. The following terms were introduced to designate *Chlamydia*-related bacteria that are not members of the *Chlamydia* genus: *Chlamydia*-related bacteria – CRB, *Chlamydia*-like bacteria and *Chlamydia*-like organisms – CLOs. *Parachlamydia acanthamoebae* is associated with respiratory diseases in humans and ruminants, as well as diseases of the reproductive organs leading to abortions, or the birth of weak or non-viable offspring. Unfortunately, there are no such test systems in the arsenal of humane and veterinary medicine of Ukraine, which could identify and differentiate *Chlamydia*-related organisms, *Parachlamydia acanthamoebae* in particular. In this regard, PCR test system has been developed for the identification and species differentiation of *Parachlamydia acanthamoebae*, the bacteria of the *Parachlamydiaceae* family, which is the causative agent of chlamydiosis in ruminants and humans. Conducted bioinformatics studies revealed species-specific regions of the *Parachlamydia acanthamoebae* genome, which were used to develop the nucleotide structure of oligonucleotide primers, which allow to amplify the DNA fragment of the 16S rRNA gene specific for the bacterium *Parachlamydia acanthamoebae*, the size of 88 base pairs. Verification of the analytical specificity of the PCR test system was confirmed by amplifying 9 control DNA of members of the order *Chlamydiales*: *Waddlia chondrophila*, *Clavochlamydia salmonicola*, *Piscichlamydia salmonis*, *Chlamydia avium*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia caviae*. The demand for such test systems is due not only to their use in scientific research to isolate and study individual strains, to conduct epizootic monitoring, but also for the purpose of effective treatment, since distinct species have diverse sensitivity or even insensitivity to different types of antibiotics and vary in the source of infection and mode of transmission.

Key words: *Parachlamydiaceae*, *Parachlamydia*, *Chlamydia*, amplification, primers, *Chlamydia*-like bacteria, *chlamydia*, zoonoses.

ПЛР-тест-система видової ідентифікації *Parachlamydia acanthamoebae*

В.К. Зезекало¹, С.Б. Передера¹, Т.В. Буслик², К.Ф. Почерняєв²

¹Полтавська державна аграрна академія, м. Полтава, Україна

²Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН, м. Полтава, Україна

Хламідієподібний організм *Parachlamydia acanthamoebae* належить до типу *Chlamydiae*, класу *Chlamydia*, порядку *Chlamydiales*, родини *Parachlamydiaceae*, роду *Parachlamydia*. Терміни: хламідієспоріднені бактерії (*Chlamydia*-related bacteria – CRBs), хламідіє-подібні бактерії (*Chlamydia*-like bacteria) та хламідієподібні організми (*Chlamydia*-like organisms – CLOs) ввели для позначення бактерій, що входять до порядку *Chlamydiales*, але не є представниками роду *Chlamydia*. *Parachlamydia acanthamoebae* пов'язують з респіраторними захворюваннями людини і жуйних, а також хворобами репродуктивних органів, що призводять до абортів або ж до народження кволого чи нежиттєздатного потомства. На жаль, в арсеналі гуманної та ветеринарної медицини України не існує таких тест-систем, які б могли виявити і диференціювати хламідіє-споріднені організми, зокрема *Parachlamydia acanthamoebae*. У зв'язку з цим, було розроблено ПЛР-тест-систему для ідентифікації та видової диференціації *Parachlamydia acanthamoebae*, бактерії родини *Parachlamydiaceae*, збудника хламідіозів жуйних та людини. Біоінформаційні дослідження виявили видоспецифічні ділянки геному *Parachlamydia acanthamoebae*, які було використано для розроблення нуклеотидної структури

олігонуклеотидних праймерів, що дозволяють ампліфікувати фрагмент ДНК гену 16S рРНК, специфічний для бактерії *Parachlamydia acanthamoebae*, розміром 88 пар нуклеотидів. Перевірка аналітичної специфічності ПЛР-тест-системи підтверджена шляхом ампліфікації контрольної ДНК 9 видів бактерій, що входять до порядку *Chlamydiales*: *Waddlia chondrophila*, *Clavochlamydia salmonicola*, *Piscichlamydia salmonis*, *Chlamydia avium*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia caviae*. Необхідність таких тест-систем обумовлена не тільки можливістю їх використання в наукових дослідженнях з метою виділення і вивчення окремих штамів, проведення епізоотичного моніторингу, а й з метою ефективного лікування, оскільки різні види мають різну чутливість або навіть нечутливість до різних видів антибіотиків та різняться джерелом інфекції і шляхами передачі.

Ключові слова: *Parachlamydiaceae*, *Parachlamydia*, *Chlamydia*, ампліфікація, праймери, хламідієподібні бактерії, хламідіози, зоонози

Вступ

Хламідіози – група інфекційних захворювань, що завдає значних економічних збитків вітчизняному тваринництву. Збитки полягають у недоотриманні приплоду, високій летальності серед новонароджених, а також втраті репродуктивної здатності племінних тварин у неблагополучних щодо цієї інфекції господарствах. Також важливою проблемою є зооантропонозний характер хламідіозу (Ksonz and Yukhno, 2009; Ksonz, 2011).

Серед видів порядку *Chlamydiales* найбільш детально охарактеризована родина *Chlamydiaceae*, до якої належить єдиний рід – *Chlamydia*. Систематика роду до останнього часу складалася з 9 добре відомих, чітко визначених таксономічно видів: *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. pneumoniae* і *C. pecorum* (Sachse et al., 2015). Сьогодні до роду приєдналися два нових види *Chlamydia*: *C. avium*, *C. gallinacea* та два нові кандидати: *Ca.C. ibidis* (Vorimore et al., 2013; Sachse et al., 2014), виділений від ібісів *Threskiornis aethiopicus* та *Ca.C. sanzania*, виділений від змії, що утримувались в серпентаріях (Taylor-Brown et al., 2016).

Крім цієї родини, до порядку *Chlamydiales*, входять такі родини, як *Ca. Clavochlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Ca. Rhabdochlamydiaceae*, *Ca. Piscichlamydia*, *Ca. Parilichlamydiaceae* (Taylor-Brown et al., 2015; Taylor-Brown and Polkinghorne, 2017). Для позначення бактерій, що входять до порядку *Chlamydiales*, але не є представниками роду *Chlamydia* ввели такі терміни: хламідієспоріднені бактерії (*Chlamydia-related bacteria* – CRBs) хламідієподібні бактерії, *Chlamydia-like bacteria*, та хламідієподібні організми (*Chlamydia-like organisms* – CLOs) (Horn, 2011). Також для позначення цього ж поняття іноді використовують термін “екологічні хламідії”, або “хламідії довкілля” (*environmental chlamydiae*), на противагу “патогенним бактеріям”, тобто таким, що викликають захворювання (Taylor-Brown et al., 2015). Слід зазначити, що терміни: “патогенні хламідії” для *Chlamydia* і “екологічні хламідії” для решти хламідій не зовсім відповідають дійсності (Horn, 2008). Деякі з хламідій, які вважались “екологічними хламідіями” викликають хламідіози тварин і людини (Ammerdorffer et al., 2017). М. Barkallah et al. (Barkallah et al., 2014) знайшли *Waddlia chondrophila* серед дослідженого абортівного патматеріалу від великої рогатої худоби в Африці, а (Wheelhouse, et al., 2014) пов’язують *Waddlia chondrophila* з абортами у овець. Pawlikowska-Warych

та Deptuła W. (Pawlikowska-Warych and Deptuła, 2015) виділяють 11 видів хламідієподібних організмів, що є причиною захворювання більш ніж з 90 видів прісноводних і морських риб у всьому світі (Taylor-Brown et al., 2015), включаючи як дикі види, так і ті, що є об’єктом аквакультури.

Parachlamydia acanthamoebae належить до типу *Chlamydiae*, класу *Chlamydia*, порядку *Chlamydiales*, родини *Parachlamydiaceae*, роду *Parachlamydia*. *Parachlamydia acanthamoebae*, викликає респіраторні захворювання людини і жуйних, а також хвороби репродуктивних органів, що призводять до втрати приплоду або ж народження кволого чи нежиттєздатного потомства (Baud et al., 2007; 2014). *Parachlamydia acanthamoebae* була виявлена у більш ніж 20% випадків досліджень, пов’язаних з абортами великої рогатої худоби, за іншими даними – у більш ніж 60% випадків (Borel et al., 2007; Wheelhouse et al., 2012). Також було підтверджено наявність *Parachlamydia acanthamoebae* у вигляді змішаних інфекцій з бактеріями родини *Chlamydiaceae* або з іншими хламідієспорідненими організмами у жуйних. *Parachlamydia acanthamoebae* були виявлені в питній воді, що вказує на можливе джерело інфекції і спосіб передачі цього патогенна як тваринам, так і людині (Maurin et al., 2002; Blumer et al., 2011; Wheelhouse et al., 2012).

На жаль, в арсеналі гуманної і ветеринарної медицини України не існує таких тест-систем, які б могли виявити і диференціювати хламідієспоріднені організми, зокрема *Parachlamydia acanthamoebae*. Необхідність таких тест-систем обумовлена не тільки можливістю їх використання в наукових дослідженнях з метою виділення і вивчення окремих штамів, проведення епізоотичного моніторингу, а й з метою ефективного лікування, оскільки різні види мають різну чутливість або навіть нечутливість до різних видів антибіотиків (Maurin et al., 2002) та різняться джерелом збудника інфекції і шляхами його передачі. Метою нашої роботи було розробити ПЛР-тест-систему для індикації і видової диференціації *Parachlamydia acanthamoebae*.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводились в умовах лабораторій здоров’я тварин та генетики Інституту свинарства та АПВ НААН, що сертифікована для проведення генетичного аналізу на рівні ДНК (Свідоцтво про атестацію № 168-15 від 30.11.2015 р.).

Ампліфікацію ДНК за допомогою ПЛР проводили з використанням рекомбінантної *Taq* DNA Polymerase

(Thermo Fisher Scientific), відповідно до рекомендацій виробника. Олігонуклеотидні праймери прямий – PCHAF:CAAGGTAGCCSTATCGGAAG, та зворотний – PCHAR:CTTGCCCAACCTCGGAAGAT було синтезовано (Metabion international AG, ФРН). Зразки контрольних ДНК *Parachlamydia acanthamoebae* штами – “Berg17” та “Bn9” люб’язно надані Dr. Michel Rolf, (Central Military Hospital Koblenz, Germany, Dept. Pathology), ДНК *Parachlamydia acanthamoebae* штам Hall одержані від Prof. Gilbert GREUB (l'Institut de Microbiologie Médecin chef des laboratoires de microbiologie diagnostique Institut de microbiologie de l'Université de Lausanne), зразки ДНК *Waddlia chondrophila*, *Chlamydia avium*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia caviae* були отримані від Dr. Christiane Schnee (Institut für molekulare Pathogenese, Jena, Germany), 2 види хламідієподібних бактерій: *Clavochlamydia salmonicola* та *Piscichlamydia salmonis*, отримано від PD, Dr med vet, Dipl. ECVP, Heike Schmidt-Posthaus, (Centre for Fish and Wildlife Health Bern). Ампліфікацію проводили на програмованому термостаті TEP-ЦИК-2 (ДНК-Технологии, РФ) за умов синтезу 70 °C 60 сек.

Продукти ПЛР розділяли за допомогою 2% агарозного гель-електрофорезу у 1× Трис-боратному електродному буфері (ТБЕ) упродовж 2 год за сили струму 50 мА в електрофоретичній камері (Cleaver Scientific Ltd. UK). Як маркер молекулярної маси використовували ДНК плазмиди *pUC19*, гідролізованої ендонуклеазою *Msp I*. Після закінчення електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидію (10 мг/см³) та документували результати електрофорезу цифровою камерою на транслюмінаторі.

Результати досліджень

Для дизайну праймерів ПЛР-тест-системи було проаналізовано 111 первинних послідовностей гена 16S рРНК, 36 видів бактерій порядку *Chlamydiales*. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК з використанням програми MEGA7 дозволило знайти специфічні ділянки нуклеотидних послідовностей виду *Parachlamydia acanthamoebae* та розробити олігонуклеотидні праймери, що фланкують фрагмент ДНК гена 16S рРНК, розміром 88 пар нуклеотидів (п. н.). Ампліфікація контрольної ДНК *Parachlamydia acanthamoebae* за допомогою ПЛР та наступний гель-електрофорез продуктів ПЛР визначив розмір ампліфікованого фрагменту ДНК у 88 п. н., що відповідав очікуваному розміру фрагменту ДНК гена 16S рРНК *Parachlamydia acanthamoebae*.

Перевірка аналітичної специфічності виконана шляхом ампліфікації контрольної ДНК 9 видів, що входять до порядку *Chlamydiales* показала відсутність ПЛР продуктів.

До цього часу в Україні не існувало таких тест-систем, які б могли виявити і диференціювати хламідіє-споріднені організми, зокрема *Parachlamydia acanthamoebae*, відомого збудника хламідіозів жуйних та людини. Такий стан ускладнював контроль та пе-

решкоджав максимальному викоріненню хламідіозу сільськогосподарських тварин в Україні.

Обговорення

Останнім часом почастишало виявлення нових видів патогенних мікроорганізмів, зростає і кількість інфекційних захворювань загалом. Причинами цього, з одного боку, були: поява тварин-компаньонів, інтенсифікація сільськогосподарського виробництва, збільшення площі орних земель, популяризація широкого використання антибіотиків, збільшення густоти населення, з іншого ж – розвиток діагностичних методик і розширення епідеміологічного нагляду та моніторингом за епізоотичною ситуацією.

Стосовно хламідіє-споріднених організмів, які нещодавно вважалися “екологічними”, тобто такими, які не спричиняють захворювань, на сьогодні існує ряд переконливих доказів того, що вони відіграють значну роль у виникненні хвороб тварин та людини.

Висновки

В результаті наших досліджень була отримана ПЛР-тест-система, для ідентифікації та видової диференціації *Parachlamydia acanthamoebae*. Олігонуклеотидні праймери, що входять до складу ПЛР-тест-системи, дозволяють ампліфікувати фрагмент ДНК гена 16S рРНК, розміром 88 пар нуклеотидів специфічним для бактерії *Parachlamydia acanthamoebae*.

Перспективи подальших досліджень. Розроблена ПЛР тест-система після апробації на клінічному матеріалі може бути впроваджена у лабораторну практику, використана у наукових дослідженнях, а також з метою поліпшення лікування та профілактики хламідіозів тварин і людини.

Подяки

Хочемо висловити свою найщирішу вдячність тим, без котрих дані дослідження були б неможливими:

Ксьонзу Ігорю Миколайовичу, доктору ветеринарних наук Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН, що не шкодував сил і часу, надихав і завжди спрямовував свій талант на досягнення успіху в нашій спільній справі. Щиро дякуємо вчепним, які відгукнулися: Dr. Michel Rolf, (Central Military Hospital Koblenz, Germany, Dept. Pathology, Professeur); Gilbert GREUB - MD-PhD (Chef de Service et Directeur de l'Institut de Microbiologie Médecin chef des laboratoires de microbiologie diagnostique Institut de microbiologie de l'Université de Lausanne, Switzerland); Dr. Christiane Schnee, (Arbeitsgruppenleiterin, Institut für molekulare Pathogenese, Jena, Germany); Heike Schmidt-Posthaus, PD, Dr med vet, Dipl. ECVP, (Centre for Fish and Wildlife Health Bern) – за ту неоціненну допомогу, яку Ви нам надали, в вигляді зразків контрольних ДНК, завдяки чому стало можливим виконання поставлених перед нами задач.

References

- Ammerdorffer, A., Stojanov, M., Greub, G., & Baud, D. (2017). Chlamydia trachomatis and chlamydia-like bacteria. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(3), 289–296. doi: 10.1097/qco.0000000000000369.
- Barkallah, M., Gharbi, Y., Hassena, A. B., Slima, A. B., Mallek, Z., Gautier, M., et al. (2014). Survey of Infectious Etiologies of Bovine Abortion during Mid-to Late Gestation in Dairy Herds. *PLoS ONE*, 9(3), e91549. doi: 10.1371/journal.pone.0091549.
- Baud, D., Goy, G., Osterheld, M.-C., Croxatto, A., Borel, N., Vial, Y., Pospischil, A., & Greub, G. (2014). Role of Waddlia chondrophila Placental Infection in Miscarriage. *Emerging Infectious Diseases*, 20(3), 460–464. doi: 10.3201/eid2003.131019.
- Baud, D., Thomas, V., Arafa, A., Regan, L., & Greub, G. (2007). Waddlia chondrophila, a Potential Agent of Human Fetal Death. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), 1239–1243. doi: 10.3201/eid1308.070315.
- Blumer, S., Greub, G., Waldvogel, A., Hässig, M., Thoma, R., Tschuor, A., et al. (2011). Waddlia, Parachlamydia and Chlamydiaceae in bovine abortion. *Veterinary Microbiology*, 152(3-4), 385–393. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.05.024.
- Borel, N., Ruhl, S., Casson, N., Kaiser, C., Pospischil, A., & Greub, G. (2007). Parachlamydiaspp. and Related Chlamydia-like Organisms and Bovine Abortion. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), 1904–1907. doi: 10.3201/eid1312.070655.
- Horn, M. (2011). Phylum XXIV. Chlamydiae Garrity and Holt 2001. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, et al editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Bergey's Manual Trust, 843–844.
- Horn, M. (2008). Chlamydiae as Symbionts in Eukaryotes. *Annual Review of Microbiology*, 62(1), 113–131. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.1628.
- Ksonz, I.M. (2011). Ozdorovchi zakhody vid khlamidiozu svyney. *Veterynarna biotekhnolohiya*, 19, 108–113. (in Ukrainian).
- Ksonz, I.M., & Yukhno, V.M. (2009). Diahnostyka ta zakhody profilaktyky i borotby z khlamidiozamy silskohospodarskykh tvaryn. [posibnyk] PDAA (in Ukrainian).
- Maurin, M., Bryskier, A., & Raoult, D. (2002). Antibiotic Susceptibilities of Parachlamydia acanthamoeba in Amoebae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 3065–3067. doi: 10.1128/aac.46.9.3065-3067.2002.
- Pawlikowska-Warych, M., & Deptuła, W. (2015). Characteristics of chlamydia-like organisms pathogenic to fish. *Journal of Applied Genetics*, 57(1), 135–141. doi: 10.1007/s13353-015-0303-8.
- Sachse, K., Bavoi, P. M., Kaltenboeck, B., Stephens, R. S., Kuo, C.-C., Rosselló-Móra, R., & Horn, M. (2015). Emendation of the family Chlamydiaceae: Proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(2), 99–103. doi: 10.1016/j.syapm.2014.12.004.
- Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M., Creasy, H. H. et al. (2014). Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of Chlamydia avium sp. nov. and Chlamydia gallinacea sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(2), 79–88. doi: 10.1016/j.syapm.2013.12.004.
- Taylor-Brown, A., Bachmann, N. L., Borel, N., & Polkinghorne, A. (2016). Culture-independent genomic characterisation of Candidatus Chlamydia sanzina, a novel uncultivated bacterium infecting snakes. *BMC Genomics*, 17(1), 710. doi: 10.1186/s12864-016-3055-x.
- Taylor-Brown, A., & Polkinghorne, A. (2017). New and emerging chlamydial infections of creatures great and small. *New Microbes and New Infections*, 18, 28–33. doi: 10.1016/j.nmni.2017.04.004.
- Taylor-Brown, A., Vaughan, L., Greub, G., Timms, P., & Polkinghorne, A. (2015). Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum Chlamydiae. *Pathogens and Disease*, 73(1), 1–15. doi: 10.1093/femspd/ftu009.
- Vorimore, F., Hsia, R., Huot-Creasy, H., Bastian, S., Deruyter, L., Passet, A., et al. (2013). Isolation of a New Chlamydia species from the Feral Sacred Ibis (Threskiornis aethiopicus): Chlamydia ibidis. *PLoS ONE*, 8(9), e74823. doi: 10.1371/journal.pone.0074823.
- Wheelhouse, N., Coyle, C., & Barlow, P.G. (2014). Waddlia chondrophila infects and multiplies in ovine trophoblast cells stimulating an inflammatory immune response. *PLoS One*. 2014;9:e102386. doi: 10.1371/journal.pone.0102386.
- Wheelhouse, N., Howie, F., Gidlow, J., Greub, G., Dagleish, M., & Longbottom, D. (2012). Involvement of Parachlamydia in bovine abortions in Scotland. *The Veterinary Journal*, 193(2), 586–588. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.01.008.