

УДК 619:616.98:579.881.1

**Л. В. МАРУЩАК**

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Україна, Київ*

## **СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ КУ-ЛИХОМАНКИ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ПЛР)**

*Проведена робота по розробці праймерів для діагностичної тест системи для виявлення та ідентифікації збудника ку-лихоманки на основі полімеразної ланцюгової реакції.*

*Ключові слова: Ку-лихоманка, *Coxiella burnetii*, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)*

**Ку-лихоманка** характеризується як гостре інфекційне захворювання з природною осередковістю, різноманітними шляхами передачі збудника – коксіел Бернета (*Coxiella burnetii*), поліморфною клінічною картиною, наявністю безсимптомних форм, можливістю хронічного перебігання з фатальними наслідками [1,2,3].

Діагностика Ку-лихоманки базується на серологічних методах дослідження, але вони забезпечують лише непрямую очевидність інфікування і можуть діагностувати хворобу на пізніх стадіях зараження та при проявах клінічних ознак. Серонегативний результат у тварин не дає гарантії того, що тварина не інфікована [10].

Хоча метод імуноферментного аналізу (ІФА) дозволяє провести дослідження зразків від великої кількості тварин або стада, водночас як і інші серологічні тести він не дозволяє провести індивідуальну ідентифікацію тварин, які виділяють збудник *C. burnetii* в оточуєче довкілля з калом, молоком та вагінальними виділеннями. Більшість тварин, які виділяють *C. burnetii* з вагінальним слизом, калом чи молоком можуть бути як серопозитивними так і серонегативними. Деякі інфіковані тварини можуть бути серопозитивними без виділення збудника *C. burnetii*, або можуть виділяти збудник і залишатися серонегативними [5]. Врахування цих фактів є важливим для постановки правильного діагнозу і молекулярно-генетичні методи дослідження на сьогоднішній час є дуже ефективними в лабораторній діагностиці, для виявлення тварин, які виділяють збудник.

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) оптимально поєднує високу швидкість отримання результату аналізу, можливість діагностики не тільки гострого перебігу захворювання, але й латентної форми, характеризується високою специфічністю та чутливістю. Метод ПЛР для виявлення та ідентифікації збудника *C. burnetii* стає все більш поширеним в діагностичних лабораторіях [4].

Нещодавно було показано, що ПЛР широко використовуються для виявлення *C. burnetii* в країнах Євросоюзу (Duquesne et al., 2008, EFSA questionnaire). Крім того, порівняльні аналізи випробування, за участю 7 лабораторій країн Євросоюзу, які виявляли ДНК *C. burnetii* від різних видів біологічних матеріалів (плацента, молоко), показали, що рівень специфічності порівняльний з виділенням ДНК *C. burnetii* від зразків, узятих від абортваного плоду та від позитивних тварини на Ку-лихоманку. (Duquesne et al., 2008; Jones et al., 2009).

Потреба в розробці вітчизняного діагностичного набору пояснюється тим, що в Україні Ку-лихоманка поширена в 17 областях серед людей (за даними фахівців Львівського НДІЕГ), а за результатами дослідження 722 проб сироваток крові від тварин в ДНДІЛДВСЕ за період 2008-2011 рр. серопозитивними були 26,7 % проб [7]. Ці результати вказують на наявність Ку-лихоманки на території України і потребують більш глибоких епідеміологічних та епізоотологічних досліджень. Доцільно провести еколого-епідеміологічні дослідження для вивчення інфікованості носіїв за допомогою молекулярно-генетичних методів, які мають велике значення для оцінки поширення Ку-лихоманки.

**Мета роботи** - розробити тест систему для виявлення та ідентифікації ДНК *C. burnetii* - збудника Ку-лихоманки за допомогою полімеразної молекулярної реакції з електрофоретичним методом детекції.

#### **Матеріали та методи дослідження**

Для виявлення та ідентифікації *C. burnetii* були розраховані оригінальні вироджені олігонуклеотидні праймери, які комплементарні консервативній ділянці гену *com1*, який кодує висококонсервативний білок зовнішньої мембрани 27kDa збудника ку-лихоманки (АТСС АВ004712), згідно рекомендаціям МСБ.

Для розрахунку вищезазначених праймерів використовувались зареєстровані в GenBank наступні нуклеотидні послідовності геномів ізолятів та штамів для гену *com1* (АТСС: АВ004693, АВ004694, АВ004695; АВ004696, АВ004697, АВ004698, АВ004699, АВ004700; АВ004701, АВ004702, АВ004703, АВ004704, АВ004705; АВ004706, АВ004707, АВ004708, АВ004709, АВ004710; АВ004711, АВ004712 [9]; АF317646; АF317647; АF318145; АF318146; АF318147; АF318148; АF318149; М88613 [6].

Конструювання і підбір праймерів проводили з використанням пакету програм „Vector NTI Advanced v.11” (Invitrogen, США), провели вирівнювання відібраних послідовностей з метою визначення консервативних ділянок, придатних для розробки пари праймерів, які були створені у відповідності у відповідності до загальноприйнятих вимог, і мають 100% відповідність до матриці. Синтез праймерів було виконано в ЗАО «Синтол» (Росія). Оригінальні праймери мають наступну послідовність (табл. 1).

Таблиця 1

## Характеристика праймерів, розроблених у ДНДЛДВСЕ

№ п/п	Прай мер	Орієнтація	Послідовність праймерів (5'→3')	Специфічність
1.	CoxF2	прямий	ACYGCAGGCGTGGCGATAG	До гену Com1
2.	CoxR4	зворотній	TGAAGGTTTTGTTGTGAGGTGGC	До гену Com1

де, Y=C/T

Позиції праймерів **CoxF2** та **CoxR4**, які були використані для розробки діагностичного набору та специфічній консервативній ділянці гену Com 1 наведено на рис. 1. Праймери забезпечують синтез фрагменту ДНК розміром 689 н.з. Виродженість олігонуклеотидних праймерів враховує відмінності нуклеотидного складу гену Com 1 збудника ку-лихоманки *C.burnetii* різних генотипів.

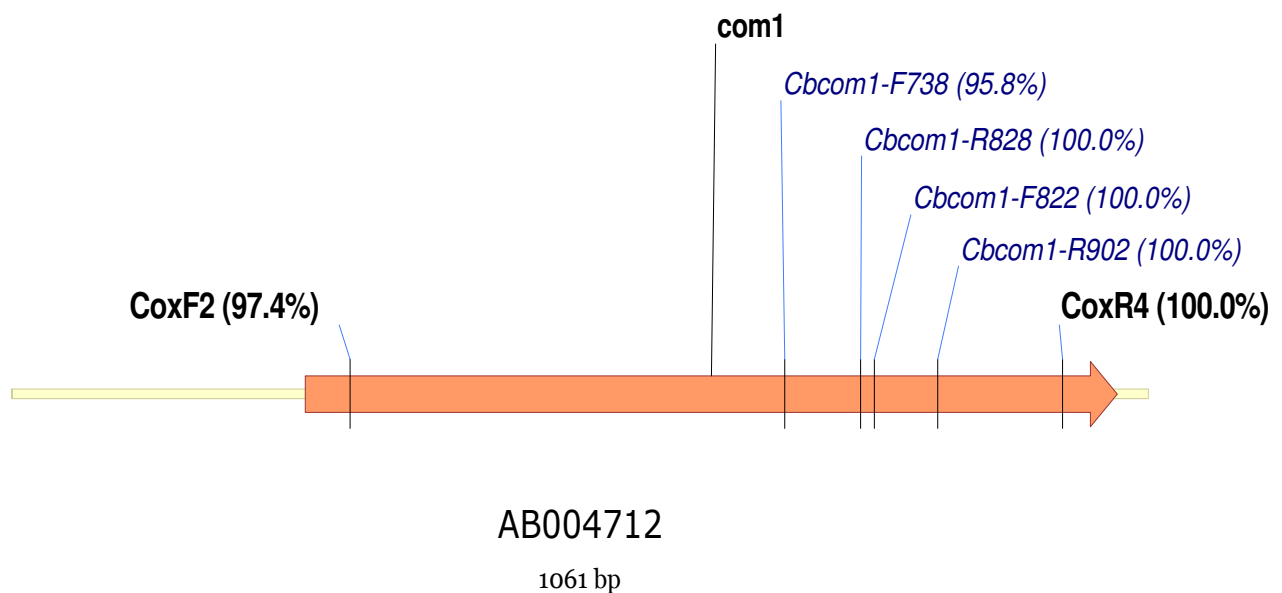


Рис.1. Гомологічність позицій праймерів на послідовності гену Com1 збудника ку-лихоманки *C.burnetii*.

В якості позитивного контролю, для перевірки специфічності тест-системи, був використаний ПЛР позитивний референс-контроль, який має сертифікат № 5131, розроблений компанією Genekam Biotechnology AG, Німеччина. ПЛР орієнтований на детекцію гену Com1, в змозі виявити 1 мікроорганізм збудника в зразку [8]. Як негативний контроль вико рис-товували деіонізовану воду.

Виділення ДНК виконували за допомогою комерційного набору: «High Pure PCR Template Preparation Kit» (Roche Diagnostics, Німеччина). Полімеразноланцюгову реакцію виконували за допомогою реактивів виробництва «АмпліСенс», Росія: «АмпліСенс – 200 - 1». ПЛР проводили на плащечному ампліфікаторі Mastercycler ergradients Eppendorf AG, виробництва Німеччина згідно настанови по його застосуванню.

Аналіз продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу в 1,5% агарозному гелі з інтеркалятором - бромідом етидію. Результати електрофорезу обліковували візуально на транслюмінаторі під УФ-світлом за наявністю або відсутністю фрагментів ДНК певного розміру. Специфічність амплікованого фрагменту визначали його розміром (положенням) по відношенню до маркеру «100 bp DNA Ladder» (Fermentas).

#### Результат дослідження

Перевірку праймерів, специфічних до виявлення збудника **ку-лихоманки** *C.burnetii* проводили на позитивному ПЛР референс-контролі виробництва Genekam Biotechnology AG, Німеччина.

При розробці діагностичної тест-системи була проведена оптимізація умов реакції ПЛР. Оптимізували умови проведення ПЛР за наступними показниками: температурним режимом відпалу праймерів (рис.2.), підборі оптимальної концентрації праймерів, іонів магнію та полімерази .

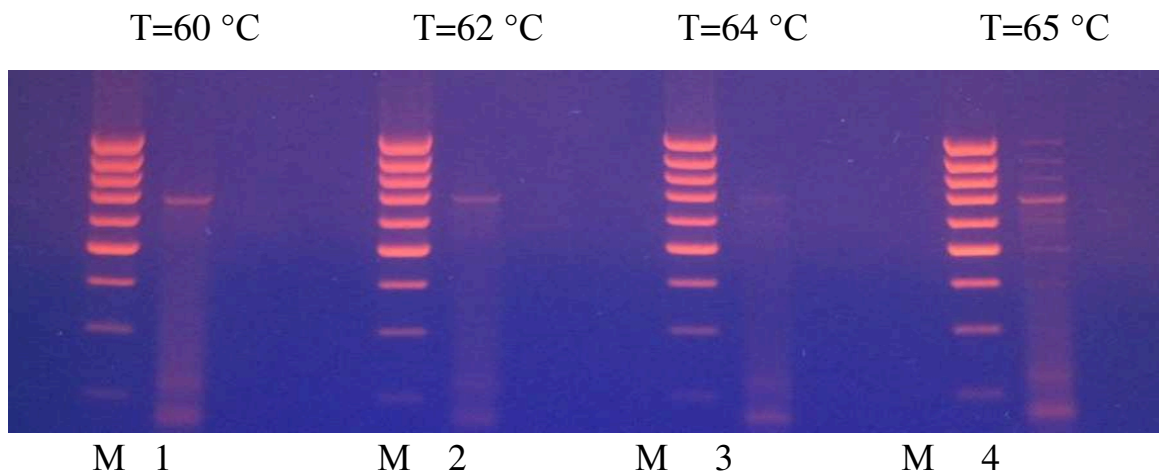


Рис.2. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ПЛР  
М – маркер „100 bp DNA Ladder” (Fermentas);

1 - температура віджигу праймерів 60°C, концентрація іонів магнію 1,5 мМ; 2 - температура віджигу праймерів 62°C, концентрація іонів магнію 1,5 мМ; 3 - температура віджигу праймерів 64°C, концентрація іонів магнію 1,5 мМ; 4 - температура віджигу праймерів 65°C, концентрація іонів магнію 1,5 мМ.

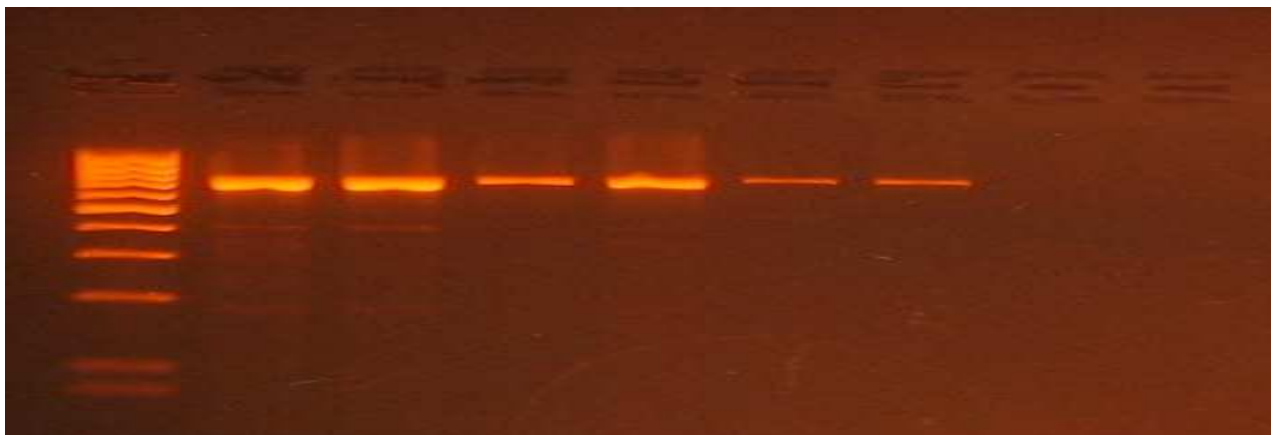
Термопрофіль реакції ампліфікації для пари праймерів SoxF2/SoxR4 представлений в таблиці 2.

Таблиця 2

**Температурний режим для ампліфікації специфічних ділянок ДНК  
збудника ку-лихоманки *C.burnetii*, із застосуванням праймерів  
CoxF2/CoxR4**

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95° С	4 хв	1
2	94° С	0,3 хв	35
	60° С	0,3 хв	
	72° С	0,3 хв	
3	72° С	4 хв	1
4	10° С	Зберігання	

Чутливість даної тест-системи визначали за аналізом зразків ДНК, що містять різну кількість генетичного матеріалу збудника. Спочатку визначали концентрацію вихідної ДНК на спектрофотометрі BioPhotometr Eppendorf, Німеччина. Вона становила 34 нг/мкл. Далі готували серію послідовних десятикратних розведень (рис. 3). Було визначено, що тест-система дозволяє гарантовано виявляти до 1,8 нг ДНК *C.burnetii*. Оптимальний діапазон для внесення 3-10 нг.



**Рис.3 Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ПЛР:**

**М** - маркер „100 bp DNA Ladder” (Fermentas); 1 – ДНК *C.burnetii* з концентрацією 34 нг; 2 – ДНК *C.burnetii* з концентрацією 3,4 нг; 3 – ДНК *C.burnetii* з концентрацією 0,34 нг; 4 – ДНК *C.burnetii* з концентрацією 0,034 нг.

**Висновки.** Розроблені олігонуклеотидні праймери для виявлення та ідентифікації ДНК *C.burnetii* - збудника Ку-лихоманки є високо специфічними та чутливими.

### Список використаної літератури

1. *Дайтер А. Б.* Эпидемиология лихорадки Ку / Дайтер А. Б., Тарасевич И. В., Ржегачек И. // Риккетсиозы. Сб. научн. трудов (Труды ин-та им. Пастера). – Л., 1989. – Т. 66. – С. 5 – 36.
2. *Здродовский П. Ф.* Учение о риккетсиях и риккетсиозах/ Здродовский П. Ф., Голиневич Е. М. // М., 1972. – Изд. 3-е. – С. 496.
3. *Лобан К. М.* Риккетсиозы человека /К.М., Лобзин Ю. В., Лукин Е.П.// Руководство для врачей. – Москва – Санкт-Петербург, 2002. – С. 475.
4. *Berri M.* The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction / *Berri M, Laroucau K and Rodolakis A.* //Veterinary Microbiology, – 2000. – N72(3-4) – P. 285– 293.
5. *Berri M.* Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep / *Berri M., Souriau A., Crosby M., Crochet D., Lechopier P., Rodolakis A.* // Vet. Rec. – 2001. – N148. – P. 502–505.
6. *Hendrix L.R* Cloning and sequencing of *Coxiella burnetii* outer membrane protein gene com1/ *Hendrix L.R, Mallavia L.P, Samuel J.E.* // Infect. Immun. – 1993. – N61 – P. 470.
7. *Marushchak L.* Q-fever: epizootic situation and laboratory diagnostics. / *Marushchak L, Nevolko O, Volosianko O, Drozhzhe Z.*//The 93 rd Annual Meeting of the CRWAD, Emerging and Re-Emerging Zoonotic Pathogens, Chicago, Illinois. – 2012.
8. *Zhang G. Q.* Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples./ *Zhang G. Q., Nguyen, S. V., To, H., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Kim, H. J., Fukushi, H., and Hirai, K J.* //Clin Microbiol. – 1998 – N 36– P.77-80.
9. *Zhang G.Q,* Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (com1) encoding a 27-kDa outer membrane protein / *Zhang G.Q, To H, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K.* // Microbiol Immunol. – 1997. – N41. – P.871
10. Scientific Opinion on Q fever. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (АНАВ), EFSA Panel on Biological Hazards (БИОHAZ), Chapter on Food Safety, European Food Safety Authority (EFSA) //EFSA Journal. – Parma, Italy. – 2010. – N.8 (5):1595. –P – 13.

### СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ КУ-ЛИХОРАДКИ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)/ Л. Марущак

*Проведена работа по разработке праймеров для диагностической тест-системы для выявления и идентификации возбудителя ку-лихорадки на основе полимеразной цепной реакции.*

*Ключевые слова: Ку-лихорадка, Coxiella burnetii, полимеразная цепная реакция (ПЦР).*

**METHOD FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF THE Q-FEVER BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)/ L. Maruchak**

*The work on development primers for diagnostic test kit for the detection and identification of the Q-fever by polymerase chain reaction.*

*Keywords: Q-fever, Coxiella burnetii, polymerase chain reaction (PCR).*

**Рецензент** – кандидат ветеринарних наук **О. М. Неволько**

Рукопис надійшов 07. 08. 2013р.