



УДК 619:616-07:616.98

Л.В. МАРУЩАК, мол. наук. співробітник

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

## ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА КУ-ЛИХОМАНКИ: СУЧАСНИЙ СТАН І ПЕРСПЕКТИВИ

*Висвітлено методи лабораторної діагностики, які використовуються для виявлення збудника Ку-лихоманки в сучасній лабораторній практиці й наукових дослідженнях, та перспективи впровадження молекулярно-генетичних методів. Проаналізовано лабораторні методи дослідження й визначено проблеми в галузі лабораторного діагностування рикетсіозів.*

**К**у-лихоманка (Q fever, Query fever, Ку-рикетсіоз, коксієльоз) – природно-вогнищеве інфекційне захворювання домашніх, промислових, диких тварин і птиці, що характеризується поліморфізмом клінічної картини, часто підгострим і хронічним перебігом. На Ку-лихоманку хворіє також людина.

Діагноз встановлюють на основі комплексу епізоотичних та епідемічних даних, клінічних ознак, патолого-анатомічних і патолого-гістологічних змін в органах і тканинах організму, а також результатів лабораторного дослідження [5].

**Мета роботи** – огляд літературних даних з методів діагностики Ку-лихоманки у ветеринарії, їх порівняльний аналіз і висвітлення досвіду застосування цих методів на базі науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень та науково-дослідного відділу вірусологічних досліджень ДНДЛДВСЕ.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для серологічної діагностики Ку-лихоманки методом імуноферментного аналізу (ІФА) використовували тест «СНЕКІТ Q-Fever (*Coxiella burnetii*) Antibody Test Kit» фірми IDEXX Laboratories (США), методом РТЗК – «Набор (антиген и сыворотка) для серологической диагностики лихорадки Ку животных», виготовлений Всеросійським науково-дослідним ветеринарним інститутом (ВНДВІ), Казань. Для молекулярно-генетичних досліджень застосовували тест-систему «*Coxiella burnetii*-ПЛР-Тест».

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Лабораторні дослідження на Ку-лихоманку тварин включають:

– виділення *Coxiella burnetii* на курячих ембріонах, лабораторних тваринах або на культурі клітин;

– виявлення *C. burnetii* методом світлової та люмінесцентної мікроскопії;

– серологічні методи за допомогою реакції зв'язування комплементу (РЗК), реакції тривалого зв'язування комплементу (РТЗК) або імуноферментного аналізу (ІФА);

– молекулярно-генетичні методи виявлення ДНК *C. burnetii*;

– методи аналізу геному *C. burnetii*.

Діагноз на Ку-лихоманку вважають встановленим при одержанні позитивних результатів в одному з нижчезазначених випадків:

– виділення *C. burnetii* з патматеріалу на курячих ембріонах, лабораторних тваринах, у культурах клітин із подальшою ідентифікацією в НРІФ, ПЛР;

– виявлення ДНК *C. burnetii* за допомогою ПЛР;

– виявлення антитіл у сироватках крові в титрах 1:10 (три-чотири хрести) і вище.

Одночасно проводять диференційну діагностику на наявність інших інфекційних захворювань – бруцельозу, пастерельозу, лістеріозу, хламідіозу, токсоплазмозу, сальмонельозу тощо [7].

Зразки біоматеріалу досліджують державні лабораторії ветеринарної медицини, які мають дозвіл на роботу зі збудниками II групи патогенності [3, 4].

Для дослідження на Ку-лихоманку



© Л.В. Марущак, 2015



до лабораторії направляють зразки біоматеріалу (легені, печінка, вміст сичуга) від абортіваних плодів, плаценту, змиви з піхви відразу після абортів або родів. Можна відібрати проби молока або молозива, фекалії, а також іксодових кліщів – *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Ixodes*.

Патологічний матеріал відбирають не пізніше ніж через 2 год після загибелі чи забою тварини у стерильні флакони або пластикові контейнери, поліетиленові мішки, які герметично закриваються.

Для ізоляції й ідентифікації бактерій *S. burnetii* використовують перещеплювані лінії культур клітин, зокрема клітини фібробластів легенів ембріона людини (HEL) або курячі ембріони [3]. Наявність *S. burnetii* перевіряють шляхом мікроскопії пофарбованих за Гіменсом відцентрифугованих клітин, а супернатант досліджують методом ПЛР [3].

Недоліком цього методу є те, що ізоляція *S. burnetii* у культурі клітин є трудомістким, тривалим і небезпечним для персоналу процесом і може дати помилково негативні результати [14].

Для встановлення діагнозу на Ку-лихоманку методом мікроскопії у лабораторіях використовують різні методи фарбування (за Стемпом, Гіменсом, Маккіавелло, Романовським – Гімзою) [9]. Цей метод не втрачає актуальності, оскільки не потребує спеціального обладнання, доступний і його можна використовувати в польових умовах. Але облік результатів світлової мікроскопії *S. burnetii* ускладнюється, оскільки їх можна сплутати з *Chlamydomydia abortus* або *Brucella spp.* [8]. Для порівняння потрібно використовувати контрольні позитивні препарати *S. burnetii*, *Chlamydomydia abortus* і *Brucella spp.* [3].

Метод флуоресціюючих антитіл (МФА) належить до експресних методів діагностики. Він поєднує в собі високу специфічність імунологічного та високу чутливість люмінесцентного методів. Стосовно рикетсійних інфекцій МФА використовують при дослідженні невеликої кількості зразків для ідентифікації специфічних антигенів і антитіл [3].

Для серологічної діагностики Ку-

лихоманки сьогодні застосовують імуноферментний аналіз (ІФА), реакцію зв'язування комплементу (РЗК), реакцію тривалого зв'язування комплементу (РТЗК) [3]. У ветеринарній практиці серологічні реакції найчастіше є єдиним методом для діагностики жуйних тварин. Серологічні тести показують лише наявність антитіл до збудника і не підтверджують наявність збудника *S. burnetii*.

Реакція імуноферментного аналізу широко застосовується для діагностики Ку-лихоманки [7, 9]. Метод ІФА дозволяє провести дослідження великої кількості тварин, але ні один серологічний тест не дає змоги виявити особин, які виділяють збудника *S. burnetii* в навколишнє середовище з фекаліями, молоком або вагінальними виділеннями [10]. Деякі тварини можуть бути серопозитивними без виділення збудника *S. burnetii* в навколишнє середовище або ж виділяють його, але залишаються серонегативними [6].

Реакція тривалого зв'язування комплементу (РТЗК) відбувається у два етапи: змішування антигену, сироватки й комплементу та внесення гемолітичної системи. Якщо дослідна сироватка містить антитіла до збудника Ку-лихоманки, утворюється комплекс антиген+антитіло, який адсорбує комплемент, і після додавання гемолітичної системи спостерігається затримка гемолізу. У разі відсутності специфічних антитіл у дослідній сироватці комплемент залучається в реакцію з гемолітичною системою, в результаті чого виникає гемоліз еритроцитів [3].

Недоліком РТЗК є те, що на чутливість реакції впливає безліч факторів: бактеріальне забруднення досліджених зразків, підвищення імуноглобулінів і ферментів (трипсину) в сироватці крові [14]. За повідомленням Howe та ін. (2009), серологічна діагностика Ку-лихоманки на ранній стадії інфекції може бути невдалою через термін сероконверсії, що охоплює 3–4 тижні після інфікування [12].

Метод РНІФ (Indirect fluorescent antibody (IFA) staining method) для діагностики Ку-лихоманки у тварин не ви-

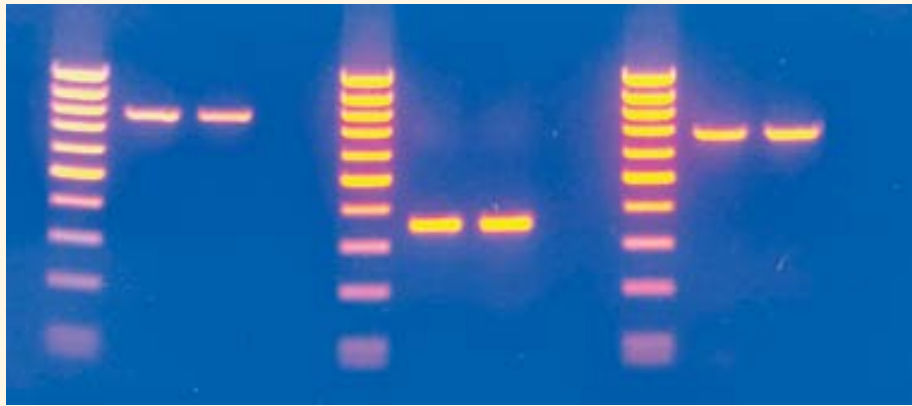
користовують, оскільки це незручно для відбору великої кількості зразків. Немає комерційних наборів для РНІФ, призначених саме для ветеринарії. Метод застосовують для діагностики захворювання в людини на різних етапах розвитку хвороби, при вивченні імуноструктури населення для визначення територій поширення інфекції [1].

Порівняльний аналіз серологічних методів дослідження Ку-лихоманки в рамках фінансованого проекту ЄС (MedVetNet: <http://www.medvetnet.org>) засвідчив, що методи РНІФ та ІФА однакові за чутливістю й мають мінімальну розбіжність порівняно з РТЗК.

Російські вчені дослідили вакциноване поголів'я на Ку-лихоманку й на 60-ту добу після вакцинації методом РТЗК виявили антитіла до *S. burnetii* у 40 % досліджених тварин, РНІФ – у 55 %, ІФА – у 80 %. Чутливість методу РТЗК була меншою порівняно з ІФА або РНІФ (Ruiz-Fons et al., 2010; Kittelberger et al., 2009; Rousset et al., 2007). Rousset et al. (2007) повідомляє, що більшість результатів РТЗК були негативними або слабопозитивними в тварин, які абортували через Ку-лихоманку, та в тих, які виділяли збудника в навколишнє середовище (Rousset et al., 2007). Крім того, деякі антитіла не були виявлені за допомогою РТЗК через відмінності у здатності окремих підкласів імуноглобулінів G (IgG) активувати комплемент. У жуйних за допомогою методу РТЗК визначаються лише антитіла IgG<sub>1</sub>. Крім того, титри в РТЗК можуть знижуватися через присутність IgG<sub>2</sub> і IgM антитіл, які можуть пригнічувати фіксацію IgG<sub>1</sub> антитіл (Rousset et al., 2009).

На цей час надзвичайно популярні методи ПЛР і ПЛР у режимі реального часу [10], які використовуються для моніторингу поширення *S. burnetii* в організмі тварини й контролю курсу лікування [11], санітарно-гігієнічної перевірки харчових продуктів і водних джерел [14], виявлення носіїв *S. burnetii* і природних резервуарів, підтвердження захворювання [9, 10]. ПЛР є найбільш поширеним і об'єктивним методом діагностики Ку-лихоманки [14].





**Рис. 1.** Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагмента гена *Com1* *Coxiella burnetii* з використанням різних пар праймерів: М – маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1, 2 – ПЛР-позитивний референс-контроль, Gelekat Biotechnology AG, Німеччина; 3 – негативний зразок.

А – comtrg\_f та comtrg\_r – довжина ампліфікованого специфічного фрагмента – 775 п. н.;  
 В – com1ts1 та com1ts2 – довжина ампліфікованого специфічного фрагмента – 355 п. н.;  
 С – SoxF2 та SoxR4 – довжина ампліфікованого специфічного фрагмента – 689 п. н.

Метод ПЛР широко використовується для детекції геномного матеріалу патогенів *in vitro* в біологічному матеріалі та об'єктах довкілля. За чутливістю й специфічністю він не поступається культуральному, до того ж його постановка займає значно менше часу [1, 7, 11].

Для ПЛР і ПЛР у режимі реального часу використовують праймери, які розраховані з рекомендованих консервативних ділянок геному *C. burnetii*: ген IS 1111, що кодує транспортазу; ген пероксид-дисмутази (*sodB*) [7]; зовнішній мембранний білок *com1*, який

кодує 27 kDa [5]; хітшовий оперон, що кодує два хітшових білки (*htrA* і *htrB*); ізоцитрат дегідрогенази (*icd*); макрофаг інфекційний, який потенціє білок (*cbmp*); фрагмент гена білка теплового шоку *dnaJ* (N. Tokarevich, E. Mosienko, 2001) (рис. 1, 2.)

Метод ПЛР оптимально поєднує високу швидкість отримання результату аналізу, можливість діагностики не тільки гострого перебігу захворювання, але й латентного, характеризується високою специфічністю та чутливістю [2]. Крім того, метод ПЛР у реальному часі кращий, ніж метод ПЛР з електрофо-

резним типом детекції. За його допомогою можна оцінити кількість бактерій у біологічному зразку (Duquesne et al., 2008; Jones et al., 2009).

Метод ПЛР адаптований для широкого кола зразків і набуває чимраз більшої поширеності в діагностичних лабораторіях (Berri et al., 2000; Nicollet and Valognes, 2007). Дехто з учених (Frazier et al., 1990; Willems et al., 1994; Muramatsu et al., 1996; Yuasa et al., 1996; Lorenz et al., 1998) рекомендує використовувати ПЛР для виявлення *C. burnetii* в біологічних зразках. Метод ПЛР застосовують для виявлення ДНК *C. burnetii* у культурі клітин і клінічних зразках, у матеріалі від тварин і продукції тваринного походження (H. Willems, D. Thiele, 1994; H. Tissot-Dupont et al., 1999; M. Beaman, J. Hung, 1989; T. Rowbotham, 1999).

Японські вчені розробили протокол для виявлення ДНК *C. burnetii* методом LAMP, який є ізотермічною ампліфікацією з формуванням петель, створений з використанням праймерів для детекції послідовності гена IS1111 та білка *htrAB* *C. burnetii*, має 100% чутливість і специфічність [13]. Метод LAMP дозволяє проводити ампліфікацію без використання дорогого обладнання. Його принцип полягає в ампліфікації специфічного зв'язування двох внутрішніх і двох зовнішніх праймерів з цільовою послідовністю. LAMP-аналіз є потенційним інструментом для підтвердження діагнозу на Ку-лихоманку в людини і тварин.

Переваги молекулярно-генетичних методів (ПЛР, ПЛР у режимі реального часу) – пряме виявлення наявності збудника Ку-лихоманки, високі специфічність, чутливість, швидкість одержання результатів, невибагливість до умов при транспортуванні зразків клінічного матеріалу. Недоліком методу є те, що він потребує дорогого обладнання, тест-систем, а також можливість контамінації.

За 2011–2014 рр. методом ІФА було досліджено 1374 сироватки крові сільськогосподарських тварин (ДРХ – 645, ВРХ – 729). Результати серологічних досліджень засвідчили, що сироватки



**Рис. 2.** Результат ПЛР у режимі реального часу на ампліфікаторі Applied Biosystems 7500. Використовували тест-систему «Real-time PCR kit LSI VetMAX Screening Pack – Ruminant Abortion». Як позитивний контроль було використано ПЛР референс-контроль ДНК *C. burnetii* № D0010 виробництва Gelekat Biotechnology AG, Німеччина

УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПЛАТА НА ЖУРНАЛ НА 2015 РІКІ!



крові, відібрані в сільськогосподарських тварин із господарств Сумської, Харківської, Донецької, Київської, Луганської, Чернівецької, Херсонської, Дніпропетровської та Івано-Франківської областей, не містять антитіл до *C. burnetii*. В Одеській області (Арцизький, Татарбунарський, Кілійський райони) із 83 проб сироваток крові сільськогосподарських і домашніх тварин серопозитивними виявилися 18 %.

За 2011–2015 рр. методом РТЗК було досліджено 142 сироватки крові сільськогосподарських і домашніх тварин (коти – 9, собаки – 30, свині – 3, коні – 4, ДРХ – 85, ВРХ – 11). Результати серологічних досліджень засвідчили, що відсоток серопозитивних проб у котів дорівнював 0,09 %, у собак – 2,1 %. Серопозитивними виявилися результати домашніх тварин Одеської області.

За 2011–2014 рр. фахівцями НДВ молекулярно-генетичних досліджень методом ПЛР перевірено 1160 сироваток крові домашніх і сільськогосподарських тварин (ДРХ – 425, ВРХ – 716, собаки – 14, коти – 3, коні – 2) із господарств Сумської, Харківської, Донецької, Київської, Луганської, Чернівецької, Херсонської та Івано-Франківської областей. За результатами лабораторних досліджень з використанням тест-системи «*Coxiella burnetii*-ПЛР-Тест» для виявлення ДНК бактерій *Coxiella burnetii* збудника Ку-лихоманки методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) генетичного матеріалу бактерії *C. burnetii* не виявлено.

## ВИСНОВКИ

1. Для серологічної діагностики Ку-лихоманки рекомендовано використовувати саме імуноферментний аналіз (ІФА), а не реакцію тривалого зв'язування комплементу (РТЗК), оскільки метод ІФА більш чутливий і специфічний.

2. Для остаточного підтвердження діагнозу на Ку-лихоманку необхідно провести ідентифікацію збудника за допомогою ПЛР або культуральних методів.

3. За результатами серологічних і молекулярно-генетичних досліджень серопозитивних зразків на Ку-лихоманку

від різних видів тварин ДНК *C. burnetii* не виявлено. Для виявлення вогнищ Ку-лихоманки на території України необхідно проводити подальші еколого-епідеміологічні дослідження.

## СПИСОК

### ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білецька Г.В. Лабораторна діагностика гранулоцитарного анаплазмозу людини / Г.В. Білецька, І.І. Бень // Лабораторна діагностика. – 2013. – № 4 (66). – С. 31–33.
2. Головки А.Н. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине: Справочное пособие / А.Н. Головки, В.А. Ушкалов, В.Г. Скрыпник, Б.Т. Стегний и др.; под ред. А.Н. Головки. – Х.: НТМТ, 2007. – 512 с.
3. Дедок Л.А. Методичні рекомендації щодо методів лабораторної діагностики Ку-лихоманки / [Л.А. Дедок, Л.В. Марущак, Ж.М. Дрожже, М.І. Сушко, О.В. Литвинчук, А.Л. Кравченко, М.А. Сапачова, О.В. Волосянко, В.Г. Скибіцький]. – К.: ДНДЛДВСЕ, 2013. – 25 с.
4. Марущак Л.В. Методичні рекомендації щодо виявлення ДНК *C. burnetii* збудника Ку-лихоманки за допомогою полімеразної ланцюгової реакції: метод. рекомендації / [Л.В. Марущак, О.М. Неволько, О.М. Дерябін, М.А. Сапачова, М.І. Сушко, В.Г. Скибіцький, О.В. Волосянко]. – К.: ДНДЛДВСЕ, 2014. – 26 с.
5. Марущак Л.В. Молекулярно-біологічна діагностика Ку-лихоманки / Л.В. Марущак, О.М. Неволько, О.М. Дерябін // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Харків, 2014. – Вип. 98. – С. 56–60.
6. Berri M. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep / M. Berri // Veterinary Record. – 2001. – Vol. 148. – P. 502–505.
7. 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 / M. Berri, K. Laroucan, A. Rodolakis // Veterinary Microbiology. – 2000. – Vol. 72. – P. 285–293.
8. Guatteo R. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control / R. Guatteo [et al.] // Veterinary Research. – 2006. – Vol. 37. – № 6. – P. 827–833.

9. Horigan M.W. Q fever diagnosis in domestic ruminant comparisons between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays / Mark W. Horigan [et al.] // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2011. – Vol. 23. – № 5. – P. 924–931.
10. Jones R.M. Detection of *Coxiella burnetii* in placenta and abortion samples from British ruminants using real-time PCR / R.M. Jones [et al.] // Veterinary Record. – 2010. – Vol. 167. – P. 965–967.
11. Murdoch D.R. Nucleic acid amplification test for the diagnosis of pneumonia / D.R. Murdoch // Clinical Infection Diseases. – 2003. – Vol. 36. – P. 1162–1170.
12. Niemczuk K. Diagnostic methods for detection of q fever in ruminants / Krzysztof Niemczuk, Monika Szymańska-Czerwińska / Ветеринарная медицина: межвед. темат. науч. сб. – Харьков, 2014. – Вып. 99. – С. 13–17.
13. Pan L. Rapid, simple and sensitive detection of Q fever by loop-mediated isothermal amplification of the htpAB gene / L. Pan [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases Immunology. – 2013. – May. – Vol. 7. – № 5. – e 2231.
14. Willems H. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR) / H. Willems [et al.] // Zentralbl Veterinaermed B. – 1994. – Vol. 41. – № 9. – P. 580–587.

Одержано 8.06.2015

**Лабораторная диагностика Ку-лихорадки: современное состояние и перспективы.**  
Л.В. Марущак

В обзорной статье рассмотрены методы лабораторной диагностики, используемые для выявления возбудителя Ку-лихорадки и применяемые в современной лабораторной практике и научных исследованиях. Проанализированы лабораторные методы исследования и выявлены проблемы в области лабораторного диагностирования риккетсиозов.

**The laboratory diagnosis of Q-fever: current state and prospects.** L.V. Marushchak

In the review article that examined laboratory diagnostic methods used to detect the pathogen Q-fever, used in modern laboratory practice and research. Analysis of laboratory methods and any issues that stand in the field of laboratory diagnosis of Rickettsiosis. ◉