

Список літератури

1. Андросик, Н.Н. Биологические свойства возбудителя актинобациллярной (гемофилезной) плевропневмонии свиней [Текст] / Н.Н. Андросик, А.В. Букин // Вет. наука производству. - Минск, 1998. - Вып. 33. -С. 91-94.
2. Букин, А.В. Этиология, клинко-эпизоотологическое проявление и профилактика плевропневмонии свиней: автореф. дис.канд. вет. наук [Текст] / Букин Александр Валентинович. Минск, 1996. - 13 с.
3. Грисслер А. Болезни свиней [Текст] / А. Грисслер Киев: ООО «Аграр Медиен Украина», 2010. – 235 с.
4. Зверьков, Д. А. Изучение вирулентных свойств возбудителя *A.pleuropneumoniae* на белых мышах[Текст] / Д.А. Зверьков, Д.А. Девришов // Вopr. ветеринарии и вет. биологии: сб. науч. тр. молодых ученых. М., 2000. -Вып. 1.-С. 4-5.
5. Пейсак З. Болезни свиней [Текст] / З. Пейсак, Брест, -2008. — 406 с.
6. Профилактика экспериментальной актинобациллезной плевропневмонии свиней с помощью иммуномодуляторов и экспериментальной вакцины [Текст] / И.Е. Воронин, А.Н. Панин, А.В. Кибирев и др. // Сб. науч. тр. ВГНКИ. М., 1995.-Т. 57.-С. 243-249.
7. Inzana, T.J. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [Text] / T.J. Inzana // Microb. Pathog. 1991. - Vol. 11. - P. 305-316.

THE STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF EPIZOOTIC ISOLATES *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIA*

Kolchuk O.V., Prokhoryatova O.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

*The aim of the research was the study of biological properties 3 epizootic isolates of bacteria *Actinobacillus pleuropneumonia* that were allocated dead pigs*

*For selection, cultivation and studying of culture, morphological properties of bacterial infections, used the nutrient medium: whey-yeast (as ABOVE - V-growth factor) broth with addition of 5 % of the blood serum of cattle; serum and blood agar with baccarelli (*Pasteurella haemolytica*), agar-based meat hydrolyzed by Hottinger with addition of 10 % of red blood cells horse.*

*Pathogenicity 3 selected isolates *Actinobacillus pleuropneumonia* tested on white mice (mass 16-18 g) and Guinea pigs (weight 250–300 g) by intranasal, intraperitoneal introduction.*

*The research results were studied biological properties of 3 epizootic isolates *Actinobacillus pleuropneumonia*. Cultural and haemolytic properties was determined by means of re-sowing on the solid and liquid nutrient medium with the addition of yeast extract (as ABOVE - V-growth factor) and 5 % of the blood serum of cattle. Were studied biochemical properties and defined minimum lethal dose in the experiments on white mice and Guinea pigs when intraperitoneal infection.*

*According to the results of laboratory researches it is established that 3 epizootic isolate belonged to the genus *Actinobacillus* (type *Actinobacillus pleuropneumonia*) by on the biological properties.*

Keywords: *actinobacillus pleuropneumonia, epizootic isolates, biological properties, cultivation of bacteria, pathogenic isolates, bioassays.*

УДК 619:616.98:579.881.1

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА КУ-ЛИХОМАНКИ

Марущак Л.В., Неволько О.М.

Державний Науково-Дослідний Інститут з Лабораторної Діагностики та Ветеринарно-Санітарної Експертизи (ДНДІЛДВСЕ), м. Київ, e-mail: maruschak@yandex.ru

Дерябін О.М.

Державний науковий-контрольний інститут біотехнологій і штамів мікроорганізмів, м. Київ

*Ку-лихоманка відноситься до трансмісивних інфекційних хвороб. Молекулярно-біологічні методи виявлення *S. Burnetii* мають ряд переваг перед серологічними: більша чутливість і специфічність, короткий час отримання результатів, можливість діагностики Ку-лихоманки на ранніх строках захворювання.*

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

Ку-лихоманка відноситься до трансмісивних інфекційних хвороб, якій в Україні надане особливе епідемічне значення через наявність переносників збудника та сприятливих клімато-географічних умов для його розвитку в організмі членистоногих [1, 3, 4]. Необхідність досліджень та розробки вітчизняного діагностичного набору пояснюється тим, що в Україні на Ку-лихоманку у 2011 році зареєстровано 15 захворювань у людей і становить 0,03 на 100 тис. населення. Захворювання реєструється в 2007–2010 р. серед дорослого населення Одеської та Донецької областей. В Одеській області зареєстровано 13 випадків на Ку-лихоманку, а частка серопозитивних осіб, серед 865 обстежених, становила 4,05±0,67 %. Зареєстровано 20 випадків захворювання людей на Ку-лихоманку у 2-х областях (Одеська – 16, Донецька – 4). У 2013 р. зареєстровано 1 випадок у Одеській області проти 4-х у 2012 р.

[<http://www.vnmu.edu.ua>]. До 2009 року територія Київської області вважалась вільною від Ку-лихоманки, але за повідомленнями ДУ «Київський обласний лабораторний центр Держсанепідслужби України» про результати моніторингових досліджень щодо виявлення антигену збудника в кліщах, на сьогоднішній день встановлено ендемічність десяти населених пунктів у Київській області з даного захворювання [2]. Спостерігається виявлення коксіел Бернета у кровосисних кліщах у Львівській, Тернопільській, Івано-Франківській, Черкаській, Чернігівській, Сумській, Донецькій, Запорізькій, Херсонській, Одеській областях, м. Севастополі та АР Крим. [<http://medvisnyk.org.ua>]. За результатами досліджень, проведених у ДНДІЛДВСЕ за період 2008–2011 рр., із 722 дослідних проб сироваток крові від сільськогосподарських тварин серопозитивними було 26,7 % [5, 8].

Ці результати вказують на наявність Ку-лихоманки на території України та потребують більш глибоких епідеміологічних і 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 – провести дослідження зразків від тварин, які були відібрані для дослідження на Ку-лихоманку.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження слугували сироватки від різних видів тварин, які були серопозитивними на Ку-лихоманку після проведення серологічних досліджень.

Для проведення молекулярної діагностики Ку-лихоманки були використані видоспецифічні праймери *CoxF2* та *CoxR4*, які комплементарні консервативній ділянці гену *com1*, що кодує висококонсервативний білок зовнішньої мембрани 27kDa *Coxiella burnetii*. Праймери використовуються для виявлення *C. burnetii* методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Конструювання та підбір праймерів проводили з використанням пакету програм «Vector NTI Advanced v.11» (Invitrogen, США). Для проведення ПЛР були використані олігонуклеотидні праймери з наступною послідовністю – *CoxF2* 5'-ACYGCAGGCGTGGCGATAG-3' та *CoxR4* 5'-TGAAGGTTTTGTTGTGAGGTGGC-3'. Умови проведення реакції складали: 1 цикл за 95 °C – 4 хв; 2 цикл – денатурація за 95 °C – 30 с, «віджиг» праймерів за 60 °C – 30 с, елонгація за 72 °C – 30 с, цикл 2 повторюють 35 разів; 3 цикл – за 72 °C – 4 хв. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК – 689 н.з. [6, 7].

Виділення ДНК виконували за допомогою комерційного набору: «High Pure PCR Template Preparation Kit» (Roche Diagnostics, Німеччина). Полімеразно-ланцюгову реакцію виконували за допомогою реактивів «AmpliTaq Gold 360 Master Mix» (Part № 4398881, Lot № 1302041, США, Applied Biosystems) згідно з інструкцією до набору. ПЛР проводили на плащечному ампліфікаторі Mastercycler epgradient Eppendorf AG (виробництва Німеччина) згідно настанови до застосування.

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. Для перевірки специфічності розроблених праймерів було досліджено ДНК і РНК різних мікроорганізмів. У процесі визначення специфічності у порівняльному аспекті було проаналізовано у ПЛР референс-контроль ДНК *C. burnetii* № D0010 виробництва Genekam Biotechnology AG, Німеччина з ДНК, виділеною з культури клітин *Salmonella Typhimurium*, *Leptospirosis*, *Brucella abortus*, *Chlamydia*, *Listeria monocytogenes*, *Rhinotracheitis infectiosa bovis* (рис. 1).

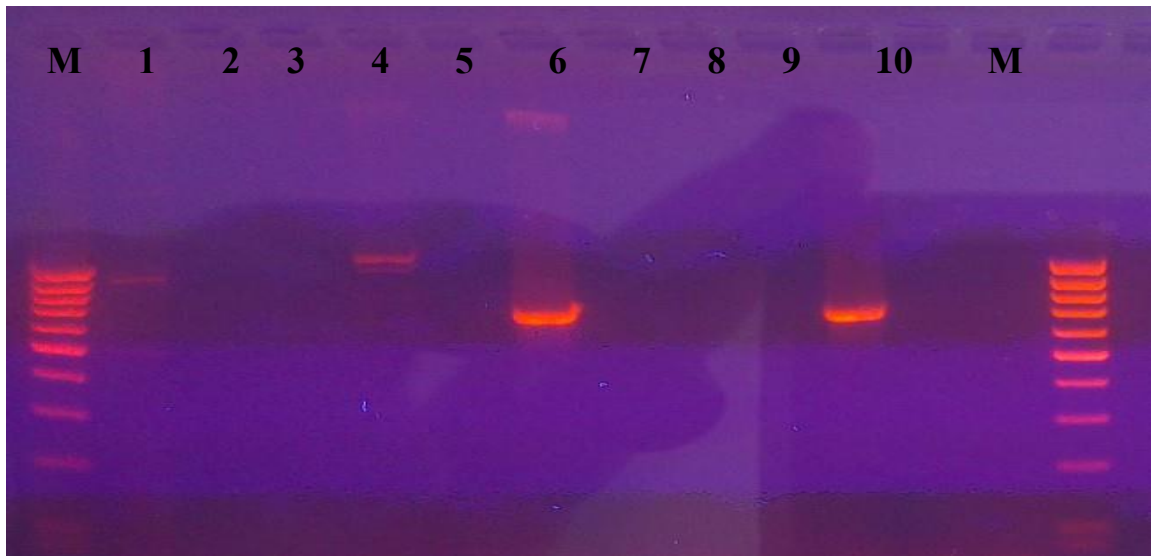


Рис.1. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР у 1,5 %-му гелі агарози з використанням праймерів CoxF2 та CoxR4, AmpliTaq Gold 360 Master Mix та 360 GC Enhancer: М – маркер «100 bp Plus DNA Ladder» (Fermentas); 1 – *Salmonella Typhimurium*; 2 – *Leptospira*; 3 – *Listeria monocytogenes*; 4 – *Brucella abortus*; 5 – *Chlamydia*; 6 – ПЛР референс-контроль ДНК *C.burnetii* № D0010; 7 – *Rhinotracheitis infectiosa bovis*; 8, 9 – негативний контрольний зразок ампліфікації; 10 – антиген до *C.burnetii*.

Після дослідження зразків біоматеріалу від різних видів тварин серологічними методами (ІФА, РТЗК) їх тестування проводили з використанням розроблених праймерів CoxF2 та CoxR4. Результат молекулярно-біологічного аналізу наведений на рис. 2.

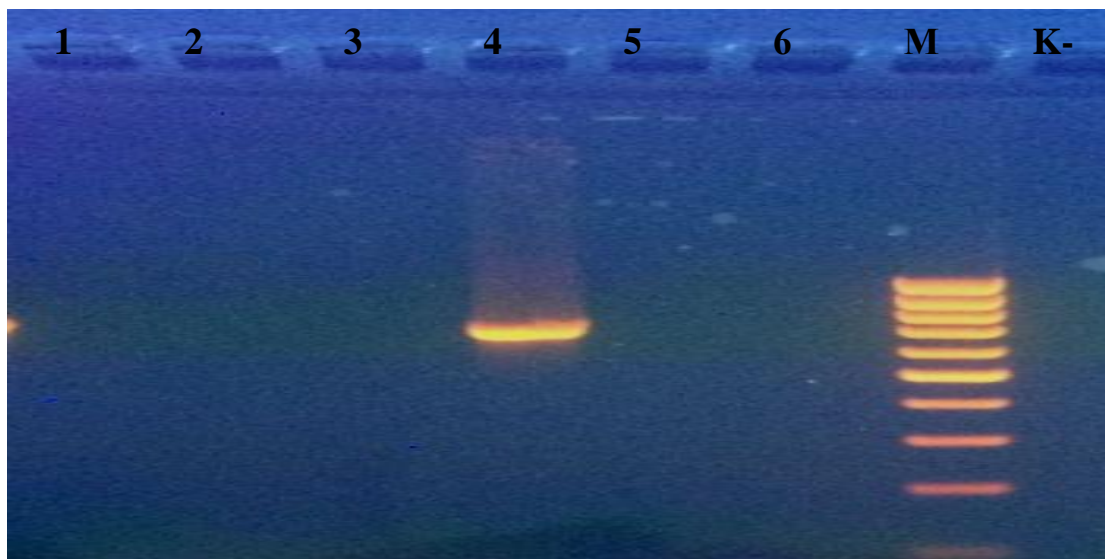


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР у 1,5 %-му гелі агарози з використанням праймерів CoxF2 та CoxR4, AmpliTaq Gold 360 Master Mix та 360 GC Enhancer: М – маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 – ДНК, виділена із сироватки крові від ВРХ (Івано-Франківська обл.); 2 – ДНК, виділена із стабілізованої крові від ВРХ (Волинська обл.); 3 – ДНК, виділена із сироватки крові від ВРХ (Одеська область, с. Вознесенка); 4 – ДНК *C. burnetii* (позитивний контроль); 5 – ДНК, виділена із сироватки крові від собаки, при позитивному результаті в РТЗК 1:10 (Одеська область, с. Делени); 6 – ДНК, виділена із сироватки від собаки, при позитивному результаті в РТЗК 1:10 (Одеська область, м. Арциз); К- – негативний контроль.

Як видно за результатами електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації – генетичного матеріалу *C. burnetii*, у досліджених зразках сироватки крові від тварин не виявлено.

Висновки. За результатами проведених молекулярно-генетичних досліджень серопозитивних зразків на Ку-лихоманку від різних видів тварин ДНК *C. burnetii* не виявлено. Необхідно проводити подальші еколого-епідеміологічні дослідження для виявлення очагів Ку-лихоманки на території України.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати буде використано у наступних дослідженнях для створення чутливої та специфічної тест-системи для виявлення ДНК *C. burnetii* збудника Ку-лихоманки методом полімеразної ланцюгової реакції.

Список літератури

1. Дайтер А.Б. Эпидемиология лихорадки Ку / А.Б.Дайтер, И.В. Тарасевич., И.Ржегачек // Риккетсиозы. Сб. научн. трудов (Труды ин-та им. Пастера). – Л., 1989. – Т. 66. – С. 5 – 36.
2. Виноград Н.О. Проблеми клінічної та лабораторної діагностики Ку-гарячки./ Н.О.Виноград, Н.С. Комаренко // Питання експериментальної та клінічної медицини. – 2011. – вип.15, т.3-4. – С. 50-55.
3. Здродовский П.Ф. Учение о риккетсиях и риккетсиозах/ П.Ф. Здродовский, Е.М. Голиневич // – М., 1972. – Изд. 3-е. – С. 496.
4. Лобан К.М. Риккетсиозы человека /К.М. Лобан, Ю.В.Лобзин, Е.П.Лукин// Руководство для врачей. – Москва – Санкт-Петербург, 2002. – С. 475.
5. Марущак Л.В. Изучение распространения ку-лихорадки на территории Одесской области/ Л.В.Марущак// Ветеринарная медицина. Межведомственный тематический научный сборник. – Харьков, 2012 – Выпуск № 96 – С.32.
6. Марущак Л.В. Розробка праймерів та оптимізація полімеразної цепної реакції для діагностики Ку-лихоманки/ Марущак Л.В., Неволько О.М. // «Основные направления развития ветеринарной науки»: матеріали міжнародної науково-практичної конф., яка присвячена 90-літтю РУП «Інститут експериментальної ветеринарії ім.С.Н.Вышеселеского». 24-25 жовт. 2013р., м. Мінск., 2013 - С. 140 – 146
7. Марущак Л.В. Спосіб виявлення та ідентифікації ку-лихоманки за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)/Л.В. Марущак// Вет. Біотехнологія: бюл. – 2013. – №23 – С. 141-146.
8. Marushchak L. Q-fever: epizootic situation and laboratory diagnostics. / L.Marushchak, O. Nevolko, O. Volosianko, Z.Drozhzhe./The 93 rd Annual Meeting of the CRWAD, Emerging and Re-Emerging Zoonotic Pathogens, Chicago, Illinois. – 2012.

MOLECULAR DIAGNOSIS OF Q FEVER

Marushchsk L.V., Nevolko O.M.

State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary
and Sanitary Expertise (SSRILDVSE), Kyiv

Deriabin O.M.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains, Ukraine

The aim of study was to conduct a study of samples from animals that were selected for the study on Q fever. Check the specificity of the primers and CoxF2 CoxR4.

Object of study were sera from different animal species, which were seropositive for Q fever after serological methods.

For convention PCR used primers CoxF2 and CoxR4, which are were designed from the nucleotide sequence of the com 1 gene which encoding a 27 kDa outer membrane protein for detection of *C. burnetii* and the identification of shedders. Sequence of the primers: CoxF2 5'-ACYGCAGGCGTGGCGATAG-3' and CoxR4 5'-TGAAGGTTTTGTTGTGAGGTGGC-3'. Cycling conditions consisted of an initial step to denature the DNA at 95°C for 10 min followed by 35 amplification cycles of 95 °C for 30s, 60 °C for 30s, and 72 °C for 60s, followed by final step 72°C for 4 min and hold step 4 °C. The amplicon produced by this PCR is 689 bp long.

DNA extraction was performed using a set of «High Pure PCR Template Preparation Kit» (Roche Diagnostics, Germany). PCR was performed using reagents «AmpliTaq Gold 360 Master Mix» (Part № 4398881, Lot № 1302041, USA, Applied Biosystems). PCR was performed on the spot thermocycler Mastercycler epgradients Eppendorf AG, made in Germany. Analysis of amplification products was performed by electrophoresis in 1.5 % agarose gel with the intercalator - ethidium bromide. Specificity was determined by its size (position) against the marker "100 bp DNA Ladder» (Fermentas).

Results. In determining the specificity of the comparative aspect was analyzed PCR reference control DNA *C.burnetii* № D0010 with DNA extracted from the cell culture *Salmonella Typhimurium*, *Leptospiriosis*, *Brucella abortus*, *Chlamydia*, *Listeria monocytogenes*, *Rhinotracheitis infectiosa bovim*. After the examination of samples of blood from serum of different species serological methods, their further testing was performed by molecular genetic methods using designed primers and CoxF2 CoxR4. Results for detecting DNA of *C. burnetii* conventional PCR in samples of serum have this for yielded negative results.

Conclusions. The results of the molecular genetic studies seropositive samples of Q fever from different species DNA has been detected *C. burnetii*. Need to conduct further environmental epidemiological studies to identify pockets of Q fever in the territory of Ukraine.

Prospects for further research. The results will be used in future studies to create a sensitive and specific test system for detection of pathogen DNA *C. burnetii* Q fever by polymerase chain reaction.

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