

## МОНІТОРИНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ВИЯВЛЕННЯ КУ-ЛИХОМАНКИ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Проведено дослідження епізоотичного стану господарств ВРХ та ДРХ на території України щодо Ку - лихоманки з використанням молекулярно-біологічних (ПЛР та ПЛР в режимі реального часу) і серологічних (ІФА, РТЗК) методів діагностики.

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

Ку – лихоманка відноситься до групи В (група збудників помірного впливу) згідно класифікації Центру контролю та профілактики хвороб (Center for Disease Control and Prevention — CDC) в Атланти, США [7].

В Україні існують 257 ензоотичних з Ку – лихоманки територій у 18 адміністративних областях країни, АР Крим та м. Севастополі. Очікуваний розвиток тваринництва та розширення природокористування в останні роки, а також наявність ландшафтних парків та заповідників з відповідною фауною – резервуарів та переносників *Coxiella burnetii* сприяють збереженню природних, природно-господарських та господарських осередків Ку - лихоманки [1].

За даними Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) в Україні триває міжепідемічний період захворювання на Ку-лихоманку, з реєстрацією спорадичних випадків у людей на ензоотичних територіях. Впродовж 2000-2013 Ку - лихоманка реєструвалась в Одеській, Донецькій областях та м.Севастополь [2]. До 2009 року територія Київської області вважалась вільною від Ку-лихоманки, та за повідомленнями результатів моніторингових досліджень ДУ «Київського обласного лабораторного центру Держсанепідслужби України» на сьогоднішній день виявлено природні осередки в 15 населених пунктах 11 районів області [3]. За даними Українського Центру з рикетсійних інфекцій (Львівський НДІ епідеміології та гігієни) збудник Ку-лихоманки - *Coxiella burnetii* виявляють в кровосисних клітках у Львівській, Тернопільській, Івано-Франківській, Черкаській, Чернігівській, Сумській, Донецькій, Запорізькій, Херсонській, Одеській областях, м. Севастополі та АР Крим. При цьому спостерігається іррадіація збудника з ензоотичних територій в суміжні з формуванням нових природних осередків та їх відповідною епідемічною активністю [3]. За результатами серологічних дослідження, проведених в ДНДЛДВСЕ за період 2008-2011 рр., з 722 дослідних проб сироваток крові від сільськогосподарських тварин Одеської області серопозитивними виявлено 26,7 % [4, 9].

**Мета роботи** дослідження епізоотичного стану господарств ВРХ та ДРХ на території України щодо Ку-лихоманки з використанням молекулярно-біологічних (ПЛР та ПЛР-РЧ) і серологічних (ІФА, РТЗК) методів діагностики.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили на базі науково-дослідного вірусологічного відділу та науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДЛДВСЕ), м. Київ. Зразки надходили до ДНДЛДВСЕ згідно Плану проведення діагностичних досліджень по профілактиці заразних хвороб тварин.

Матеріалом для дослідження слугували сироватки крові та стабілізована кров з ЕДТА від домашніх та сільськогосподарських тварин. Для серологічної діагностики методом ІФА використовували комерційний набір «СНЕКІТ Q-Fever (*Coxiella burnetii*) Antibody Test Kit» фірми IDEXX Laboratories (США). Для реакції тривалого зв'язування комплементу (РТЗК) використовували набір виробництва ВНДВІ, м. Казань. Дослідження проводили згідно настанови до наборів.

Для проведення ПЛР були використані олігонуклеотидні праймери, які комплементарні консервативній ділянці гену *com1*, який кодує висококонсервативний білок зовнішньої мембрани 27kDa *Coxiella burnetii*, згідно протоколу розробленого та валідованого в ДНДЛДВСЕ з наступною послідовністю **CoxF2** 5'-ACYGCAGGCGTGGCGATAG-3' та **CoxR4** 5'-TGAAGGTTTGTGTGTGAGGTGGC-3'. Умови проведення реакції склали: 1-й цикл за 95° С – 4 хв.; 2-й цикл – денатурація за 95° С – 30 с, «віджиг» праймерів за 60° С – 30 с, елонгація за 72° С – 30 с, цикл 2-й повторюють 35 разів; 3-й цикл - при 72° С – 4 хв. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК – 689 н.з. [5, 6]. Додатково були використані олігонуклеотидні праймери, рекомендовані Національним інститутом суспільної охорони здоров'я і навколишнього середовища, Центром за контролю за інфекційними захворюваннями, лабораторією Зоонозої та екологічної мікробіології, Нідерланди (National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Centre for Infectious Disease Control, Laboratory for Zoonoses and Environmental Microbiology, The Netherlands), з наступною послідовністю **comtrg f** 5'-CCCTGCAATTGGAACGAAG-3' та **comtrg r** 5'-GTTCTGATAATTGGCCGTCGACA-3'. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК – 775 н.з. [8]. Тест-система «Real-time PCR kit “LSI VetMAX Screening Pack – Ruminant Abortion”», США.

Як позитивний контроль був використаний ПЛР референс-контроль ДНК *C.burnetii* № D0010 виробництва Genekam Biotechnology AG, Німеччина.

**Результати досліджень.** Серологічними та молекулярно-генетичними методами досліджено 1160 сироваток крові від домашніх та сільськогосподарських тварин (ДРХ – 425, ВРХ – 716, собаки – 14, коти – 3, коні – 2) за період 2011-2014.

Результати проведених серологічних досліджень показали, що сироватки крові, відібрані у сільськогосподарських тварин (ВРХ, ДРХ) з господарств Сумської, Харківської, Донецької, Київської, Луганської, Чернівецької, Херсонської, Дніпропетровської та Івано-Франківської областей не містять антитіл до *Coxiella burnetii*. В Одеській області серопозитивними виявлено 18 % з 83 досліджених проб сироваток крові від сільськогосподарських та домашніх тварин (Арцизький р-н, Татарбунарський р-н, Кілійський р-н).

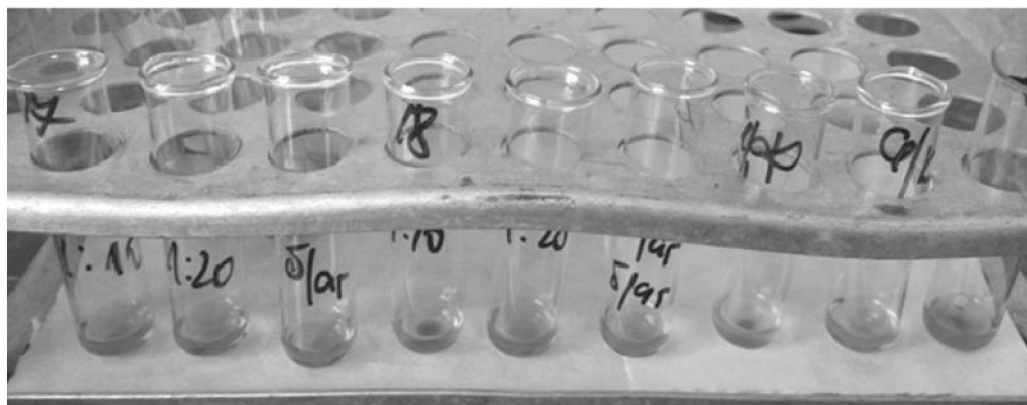


Рис. 1. Дослідження проб сироватки крові в реакція тривалого зв'язування комплементу (РТЗК): №17 – сироватки крові від собаки, при негативному результаті на РТЗК; №18 – сироватки крові від собаки, при позитивному результаті на РТЗК 1:10 (Одеська область, с. Делени)

Після дослідження зразків біоматеріалу від різних видів тварин серологічними методами (ІФА, РТЗК), у подальшому їх тестування проводили з використанням розроблених в ДНДЛІДВСЕ праймерів *CoxF2* та *CoxR4*, рекомендованих праймерів *comtrg\_f* та *comtrg\_r* та тест-системою «Real-time PCR kit “LSI VetMAX Screening Pack – Ruminant Abortion”».

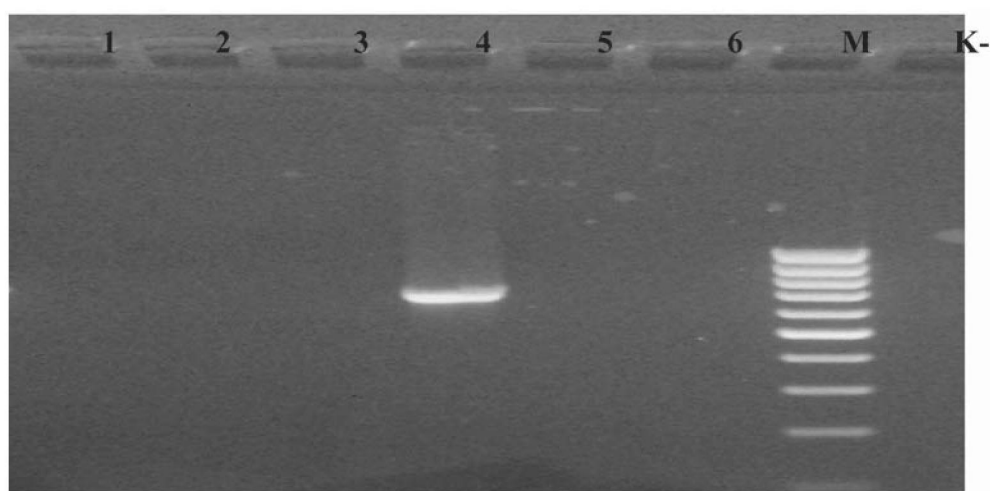


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР у 1,5 %-му гелі агарози з використанням праймерів *CoxF2* та *CoxR4*:

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 на РТЗК 1:10 (Одеська область, с. Делени); 6 — ДНК, виділена із сироватки від собаки, при позитивному результаті на РТЗК 1:10 (Одеська область, м. Арциз); К- — негативний контроль.

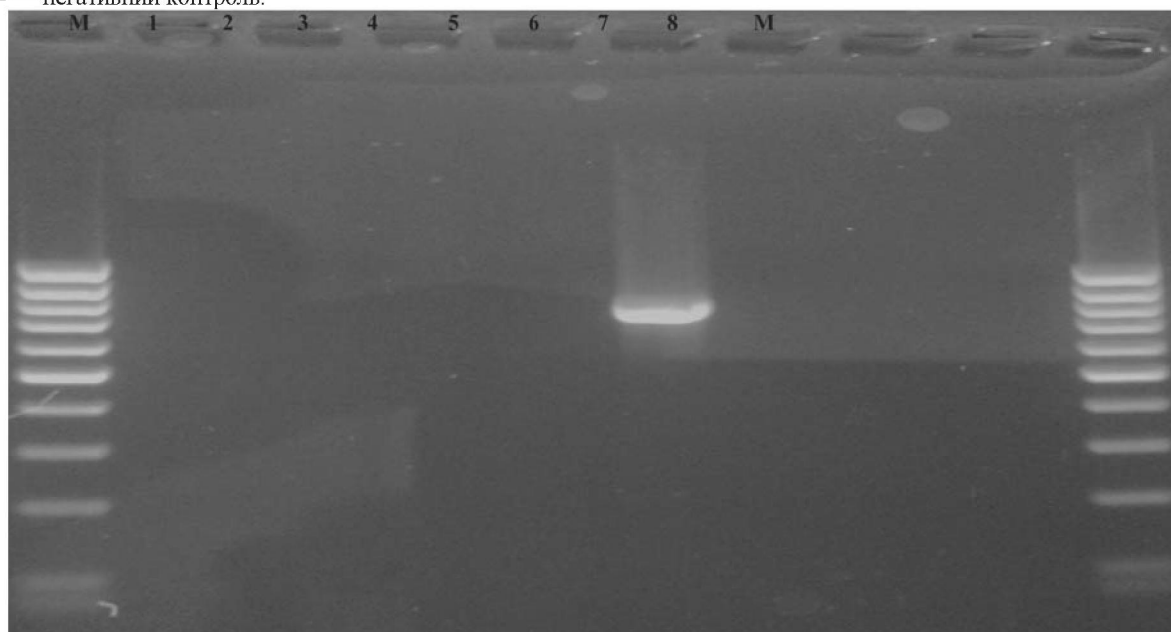


Рис.3. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР у 1,5 %-му гелі агарози з використанням праймерів *comtrg\_f* та *comtrg\_r* :

М — маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 — ДНК, виділена із сироватки від ВРХ (Івано-Франківська обл.); 2 — ДНК, виділена із стабілізованої крові від ВРХ (Волинська обл.); 3 — ДНК, виділена із сперми від ВРХ (Київська область); 4 — ДНК, виділена із сироватки від ВРХ (Одеська область, с.Вознесенка); 5 — ДНК *C.burnetii* (позитивний контроль); 6 — ДНК, виділена із сироватки від собаки, при позитивному результаті на РТЗК 1:10 (Одеська область, с.Делени); 7 — ДНК, виділена із сироватки від собаки, при позитивному результаті на РТЗК 1:10 (Одеська область, м.Арциз); 8 — ДНК, виділена із сироватки від собаки, (Одеська область, м.Вознесенск).

За результатами електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації — генетичного матеріалу *C.burnetii* в досліджених зразках біологічного матеріалу від тварин не виявлено.

### Висновки.

1. За результатами проведеного моніторингу на виявлення Ку-лихоманки на території України (Сумської, Харківської, Донецької, Київської, Луганської, Чернівецької, Херсонської та Івано-Франківської областей) з використанням молекулярно-біологічних та серологічних методів діагностики, встановлено, що господарства вищеперерахованих областей благополучні щодо Ку-лихоманки.

2. За результатами дослідження, проведених за період 2001-2014 рр., з 83 дослідних проб сироваток крові від сільськогосподарських тварин з Одеської області серопозитивними виявлено 18 %, але за результатами проведених молекулярно - генетичних досліджень ДНК *C.burnetii* не виявлено.

3. Відсутність кореляції між відносно високим рівнем серопозитивності і низьким рівнем офіційно зареєстрованих випадків Ку-лихоманки зумовлено недостатньою діагностикою інфекції. Для виявлення спалахів Ку-лихоманки на території України необхідно проводити подальші еколого-епідеміологічні дослідження.

### Список використаної літератури

1. В Україні продовжують реєструватись зооантропонозні інфекції — хвороби спільні для тварин і людей [Електронний ресурс] : Київська міська державна адміністрація. — Режим доступу: <http://svyat.kievcity.gov.ua/news/7829.html> — Назва з екрану.
2. Ку-гарячка: особливо небезпечна? [Електронний ресурс] : Рівненський обласний науково-практичний тижневик. — Режим доступу: <http://medvisnyk.org.ua/content/view/2266/32/> — Назва з екрану.
3. Ку-гарячка. [Електронний ресурс] : Державна санітарно-епідеміологічна служба Київської області — Режим доступу: <http://www.oblses-kiev.com.ua/clients/kievoblses.nsf/0/0EFB2E9902F03101C2257CC3002485DB?OpenDocument&/> — Назва з екрану.
4. 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.
5. Марущак Л. В. Розробка праймерів та оптимізація полімеразної ланцюгової реакції для діагностики Ку-лихоманки / Л. В. Марущак, О. М. Неволько // «Основные направления развития ветеринарной науки»: матеріали міжнародної науково-практичної конф., яка присвячена 90-літтю РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.С. Н. Вышеселского», 24 — 25 жовт. 2013 р., м. Минск. — М., 2013. — С. 140 — 146
6. 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.
7. Роль моніторингу за інфекціями, спільними для людей і тварин, у забезпеченні біобезпеки населення України / О. Й Гриневич [та ін.] //Український медичний часопис — Режим доступу: <http://www.umj.com.ua/article/41093/rol-monitoringu-za-infekciyami-spilnimi-dlya-lyudej-i-tvarin-u-zabezpechenni-biobezpeki-naseleण्या-ukraini> — Назва з екрану.
8. Bruin A. de . Detection of Coxiella burnetii in Complex Matrices by Using Multiplex Quantitative PCR during a Major Q Fever Outbreak in The Netherlands/ A. de Bruin, A. At. all // Journal Applied and Environmental Microbiology . — 2011 — Vol. 77 (18) — P. 6516 — 6523.
9. 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.

### МОНИТОРИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ОБНАРУЖЕНИЕ КУ-ЛИХОРАДКИ НА ТЕРИТОРИИ УКРАИНЫ / Л. В.Марущак, О. М. Неволько, Л. А.Дедок, В. Г.Скибицкий, Е. В.Волосьянко

Проведено исследование эпизоотического состояния хозяйств КРС и МРС на территории Украины по выявлению Ку-лихорадки с использованием молекулярно-биологических (ПЦР и ПЦР в режиме реального времени) и серологических (ИФА, РДСК) методов диагностики.

Ключевые слова: Ку - лихорадка, *Coxiella burnetii*, мониторинг, ИФА, ПЦР.

### MONITORING STUDIES OF Q-FEVER IN UKRAINE / L. V. Marusychak, O. M. Nevolko, L. A. Dedok, V. G. Skibitskiy, E. V. Volosyanko

**The aim of research** epizootic situation in the territory of Ukraine for Q-fever using PCR and ELISA, CFT diagnostic methods.

**Methods.** Animals were tested serologically by complement fixation test (CFT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A total of 1160 sera from domestic animals were examined (sheep - 435, cattle - 716, horses - 2, dogs - 14, cats - 3) from 10 regions of Ukraine during 2011-2014. For ELISA using «CHEKIT Q-Fever (*C.burnetii*) Antibody Test Kit», IDEXX (USA). For CFT using commercial kit of Russia. For PCR used primers CoxF2 5'-ACYGCAGGCGTGGCGATAG-3' and CoxR4 5'-TGAAGGTTTGTGTGAGGTGGC-3', which developed in SSRILDVSE. The amplicon produced by this PCR is 689 bp long. Also used primers **constrg\_f5'**-CCCTGCAATTGGAACGAAG-3' **macomtrg\_r** 5'-GTTCTGATAATTGGCCGTCGACA-3', which recommended National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Centre for Infectious Disease Control, Laboratory for Zoonoses and Environmental Microbiology, The Netherlands. The amplicon produced by this PCR is 775 bp long. Positive DNA control № D0010 manufactured by Genekam Biotechnology AG, Germany was used as control of PCR amplification.

**Results.** The results of serological studies have shown that serum taken from farm animals from farms Sumy, Kharkiv, Donetsk, Kyiv, Luhansk, Chernivtsi, Kherson, Dnipropetrovsk, Ivano-Frankivsk regions do not contain antibodies to *C.burnetii*. In the Odessa region seropositive found 18 % of 83 investigated samples. Geographic distribution analysis showed that in the Odessa region the existence of natural foci Q fever was established in five southern districts (Artsizsky, Kiliyskiy, Tatarbunarsky districts). All the samples, which tested by PCR, were negative results.

**Conclusions.** 1. The results of the monitoring to detect Q-fever in Ukraine (Sumy, Kharkiv, Donetsk, Kyiv, Luhansk, Chernivtsi, Kherson, Dnipropetrovsk, Ivano-Frankivsk regions) using molecular and serological diagnostic methods, found that the above-mentioned areas prosperous economy for Q-fever.

2. According to a survey conducted for the period 20011-2014 of 83 experimental samples of blood serum from farm animals from the Odessa region revealed 18% seropositive, but DNA of *C. burnetii* by conventional PCR in serum samples were not detected.

3. Absence of correlation between relatively high and low number seropositive results registered cases of *Q*-fever due to lack of diagnosis of infection. To detect outbreaks *Q*-fever in Ukraine need to conduct further ecological and epidemiological studies.

Keywords: *Q* fever, *Coxiella burnetii*, monitoring, ELISA, PCR.

**Рецензент-** доктор ветеринарних наук **Прискока В. А.**

Рукопис надійшов 18.08.2014 року.