

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ РИКЕТСІЙ ГРУПИ КЛІЩОВИХ ПЛЯМИСТИХ ГАРЯЧОК

ДУ «Львівський НДІ епідеміології та гігієни МОЗ України»,

*ДУ «Одеський обласний лабораторний центр

Державної санітарно-епідеміологічної служби України»

Рикетсії належать до збудників «нових інфекцій» та «інфекцій, що повертаються». За даними ВООЗ, у різних країнах світу відзначається активізація природних осередків ендемічних рикетсіозів, що потребує впровадження ефективного епідеміологічного нагляду за ними. Значну частину природно-осередкових рикетсіозів становлять інфекції, викликані збудниками групи кліщових плямистих гарячок (ГКПП), які спричиняють у людей захворювання різної тяжкості, характеризуються поліморфною симптоматикою, розповсюджені на ендемічних для кожного виду територіях і поширені в усьому світі. Рикетсії ГКПП мають статус виду класичних патогенів, нових патогенів, рикетсій з недоведеною патогенністю для людини та кандидатів у нові види, кількість яких постійно збільшується.

З точністю до виду ідентифікувати рикетсійні інфекції можна тільки за допомогою лабораторних методів, проте незважаючи на їх різноманітність, залишається актуальною проблема швидкої та високочутливої діагностики. Сьогодні одним із перспективних, але недостатньо розроблених підходів до підвищення ефективності лабораторної діагностики рикетсій ГКПП та епідеміологічного нагляду за ними є використання технологій, що базуються на молекулярно-генетичних методах досліджень, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка ефективно доповнює спектр традиційних методів, що використовуються в діагностиці.

Найбільш раціональним та ефективним є застосування ПЛР для виявлення мікроорганізмів, які важко культивувати у лабораторних умовах, а також мікроорганізмів, яким властиві висока антигенна різноманітність, що характерно власне для рикетсій ГКПП. Застосування «золотого стандарту» ідентифікації збудника інфекційного захворювання, а саме виділення чистої культури патогену, в рикетсіології є складним і не завжди досяжним, оскільки мікроорганізми, що належать до порядку *Rickettsiales*, є облигатни-

ми внутрішньоклітинними паразитами, нездатними рости на штучних живильних середовищах. Інші способи встановлення етіологічного діагнозу в рикетсіології також не завжди достовірні. Серологічний метод не є досить точним, оскільки для рикетсій характерні численні та виражені перехресні серологічні реакції як між собою, так і з зовсім неспорідненими мікроорганізмами, наприклад *Proteus spp.* і *Legionella spp.* Клінічна картина захворювання найчастіше варіабельна і не має виражених диференційних критеріїв для кожного конкретного рикетсіозу.

Перевагами методу ПЛР є висока специфічність, яка ґрунтується на унікальності нуклеотидних послідовностей рикетсійних геномів, чутливість, універсальність процедури, простота і зручність проведення аналізу, можливість виявлення відразу кількох патогенів у одній пробі за умов наявності в реакційній суміші кількох пар відповідних праймерів (мультиплексна ПЛР). Застосування методу ПЛР в реальному часі (ПЛР-РЧ) дозволяє проводити виявлення продуктів ампліфікації в процесі реакції та вести кількісний облік нуклеїнових кислот. Подібний підхід дозволяє відмовитися від стадії електрофорезу, що призводить до різкого зменшення ймовірності контамінації досліджуваних проб продуктами ампліфікації, а також знизити вимоги до ПЛР-лабораторії.

Враховуючи наведене, сьогодні виникла нагальна необхідність застосування молекулярно-генетичних методів діагностики при дослідженні поширення рикетсій ГКПП в Україні з метою підтвердження раніше отриманих даних і визначення повного спектра видів рикетсій, їх резервуарів і переносників, і територій, де циркулюють певні збудники.

Мета роботи — визначити поширення рикетсій ГКПП і видовий склад їх потенційних переносників у південному регіоні України шляхом вивчення зараженості іксодових кліщів методом ПЛР-РЧ з використанням групо- та видоспецифічних праймерів.

Матеріали та методи дослідження

Методом ПЛР-РЧ досліджено 3352 екземпляри (155 проб) іксодових кліщів 6 видів: *Ixodes ricinus* Linn., *Dermacentor reticulatus* Fabr., *Dermacentor marginatus* Sulz., *Hyalomma plumbeum* Pan., *Rhipicephalus sanguineus* Lat., *Rhipicephalus rossicus* Jak., — зібраних на території 76 населених пунктів 19 адміністративних районів Одеської області в період 2010–2012 рр. Для виділення ДНК-зразків використовували комерційні набори реактивів Ultra Clean™ Tissue & Cells DNA Isolation Kit та Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., USA). Виділену ДНК використовували для проведення ПЛР-РЧ з наборами групоспецифічних праймерів — для детекції рикетсії ГКПГ: прямий RR1595F (5'-GCCGGGGAGTTGTCCAAATTATCA-3') та зворотний RR1722R (5'-CCGCCGACAAGAGCAGTTT-3'), з наборами видоспецифічних праймерів — для детекції *Rickettsia conorii*: прямий For (5'-ACACATGCTGCCGAGTTACG-3') та зворотний Rev (5'-AATTGTAGCACTACCGTCTAAGGT-3 (Sigma-Aldrich, Germany), що ампліфікують фрагмент гена *ompB*. Проводили ПЛР-РЧ в об'ємі реакційної суміші 20 мкл, що містила 0,25 мкМ кожного праймера, SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (1X), 3 мкл виділеної ДНК. Ампліфікацію проводили на циклері Rotor-Gene™ 6000 у такому режимі послідовно зв'язаних програм: 94 °C — 3 хв, 94 °C — 5 с (50 циклів), 60 °C — 30 с [1]. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення Thermal Cycler System. Статистичну обробку результатів досліджень, внесених до бази даних, проводили з використанням комп'ютерного програмного забезпечення EpiInfo™ для Windows (Version 3.5.1) та Excel [2], карти створені з застосуванням програмного забезпечення Quantum GIS/1.6.0/.

Результати дослідження та їх обговорення

Сьогодні відомості про розповсюдження патогенів ГКПГ в Україні не є повними. На території південного регіону України виявлялися інфікованість переносників рикетсіями ГКПГ і формування імунного прошарку серед населення, що свідчить про циркуляцію збудників на цих територіях [3]. Поширення середземноморської або марсельської плямистої гарячки, викликаной *R. conorii*, досліджували на Кримському півострові у зв'язку зі спалахом цієї інфекції серед людей у 1996–2001 рр. Внаслідок виявлення інфікованих рикетсіями кліщів-переносників і серопозитивних випадків серед здорового населення, станом на 2011 р. в Одеській області зареєстровано 12 ензоотичних територій з марсельської гарячки [4]. Видовий склад іксодових кліщів на території Причорномор'я налічує 16 представників, з яких високу чисельність нині зберігають 3 види: *I. ricinus*

(44,8%), *D. marginatus* (19,9%), *R. rossicus* (10,2%). Інші види, такі як *D. reticulatus*, *H. plumbeum*, *I. crenulatus*, *I. hexagonus*, *Rh. sanguineus*, *I. apro-nophorus*, *I. redicorzevi*, *I. lividus*, *I. frontalis*, трапляються з різною частотою [5].

Вперше в Україні методом ПЛР-РЧ досліджено 155 проб (3352 екз.) іксодових кліщів 6 видів: *I. ricinus* — 42 проби (685 екз.), *D. reticulatus* — 28 проб (1273 екз.), *D. marginatus* — 46 проб (633 екз.), *H. plumbeum* — 15 проб (380 екз.), *Rh. sanguineus* — 9 проб (209 екз.), *Rp. rossicus* — 13 проб (172 екз.), зібраних фахівцями Одеської обласної СЕС у період 2010–2012 рр. у трьох ландшафтно-епідеміологічних зонах: Придністерській (північна та північно-західна частини), центральній та Дунайсько-Дністерському межиріччі Причорноморської низовини.

Специфічні ділянки ДНК рикетсії ГКПГ виявлено у 51 пробі — (32,9±3,7) % шести видів кліщів: *I. ricinus* — 14 проб — (27,5±3,5) % від загальної кількості позитивних проб на ГКПГ і (33,3±3,7) % від кількості досліджених проб кліщів даного виду; *D. reticulatus* — 9 проб — відповідно (17,6±3,0) та (32,1±3,7) %; *D. marginatus* — 21 проба — (41,2±3,9) та (45,7±4,0) %; *Rp. rossicus* — 4 проби — (7,8±2,1) та (30,8±3,6) %; *H. plumbeum* — 2 проби — (3,9±1,5) та (13,3±2,7) %; *Rh. sanguineus* — 1 проба — (2,0±1,1) та (11,1±2,5) %, зібраних на території 15 районів області (рис. 1).

Окрім найвищих ($p < 0,05$) показників спонтанної зараженості кліщів *D. marginatus* рикетсіями ГКПГ, встановлено також і найширший їх територіальний розподіл. Інфіковані кліщі цього виду виявлені у 9 районах, розташованих у Придністерській зоні та Дунайсько-Дністерському межиріччі. Не менш поширені на території області й інфіковані рикетсіями ГКПГ кліщі виду *I. ricinus* — у 5 районах, що знаходяться

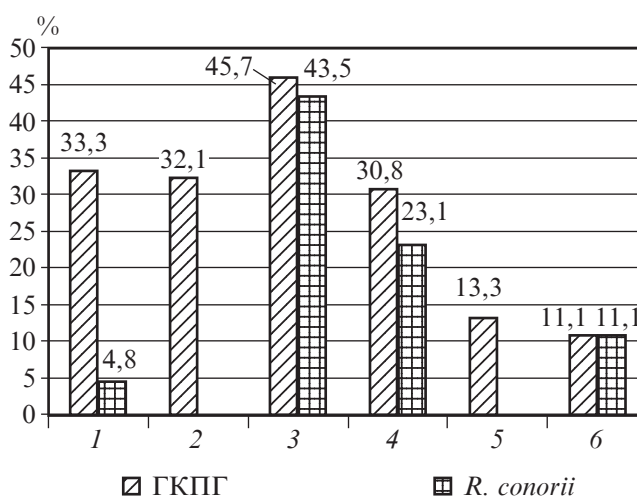


Рис. 1. Виявлення в іксодових кліщах ДНК рикетсій групи кліщових плямистих гарячок та *R. conorii* методом полімеразної ланцюгової реакції (відсоток від кількості досліджених проб кліщів): 1 — *I. ricinus*; 2 — *D. reticulatus*; 3 — *D. marginatus*; 4 — *Rp. rossicus*; 5 — *H. plumbeum*; 6 — *Rh. sanguineus*

у Придністерській і центральній ландшафтно-епідеміологічних зонах та у Дунайсько-Дністерському межиріччі. Специфічні ділянки ДНК рикетсій ГКПГ у кліщах виду *D. reticulatus* виявлено на території чотирьох районів у Придністерській зоні та Дунайсько-Дністерському межиріччі. Значно менше територіальне поширення інфікованих кліщів родів *Rp. rossicus* — у двох районах, *H. plumbeum* — у двох районах, *Rh. sanguineus* — в одному районі, що територіально знаходяться у центральній зоні та Дунайсько-Дністерському межиріччі (рис. 2).

Таким чином, у трьох видів іксодових кліщів групоспецифічні ділянки ДНК рикетсій ГКПГ виявлено в усіх ландшафтно-епідеміологічних зонах Одеської області. Важливо, що на території деяких районів зараженість рикетсіями ГКПГ зареєстрована відразу у двох видів кліщів — *D. marginatus* та *I. ricinus*, а також *D. reticulatus* і *I. ricinus*, що вказує на існування тут полівекторних осередків кліщових рикетсіозів. Підтверджені

но результати досліджень попередніх років [3] про значне розповсюдження рикетсій ГКПГ на території Одеської області.

Отримані результати участі вищевказаних видів іксодових кліщів у циркуляції рикетсій ГКПГ узгоджуються з гіпотезою про те, що в міжепізоотичний період збудники КППГ можуть перебувати в кліщах родів *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Ixodes*, які слугують їх природними резервуарами та переносниками, а також з даними російських дослідників, які виявляли ДНК рикетсій ГКПГ та виділяли культури патогенних для людини збудників від кліщів трьох родів (*Dermacentor*, *Haemaphysalis* та *Ixodes*) у природних осередках цих інфекцій [6].

З метою ідентифікації патогенних для людини видів рикетсій з ГКПГ, насамперед *R. conorii* — збудника марсельської плямистої гарячки, методом ПЛР-РЧ проведено поглиблене дослідження позитивних проб кліщів. Специфічні ділянки ДНК *R. conorii* виявлено у 26 пробах іксодових кліщів (що становить $(51,0 \pm 4,0)\%$ від кількості позитивних проб на ГКПГ і $(16,8 \pm 3,0)\%$ — від загальної кількості досліджених проб) трьох видів: *I. ricinus* — 2 проби (відповідно $(3,9 \pm 1,6)\%$ від кількості позитивних проб на ГКПГ і $(4,8 \pm 1,7)\%$ — від кількості досліджених проб кліщів даного виду), *D. marginatus* — 20 проб (відповідно $(39,2 \pm 3,9)\%$ та $(43,5 \pm 4,0)\%$), *Rp. rossicus* — 3 проби (відповідно $(5,9 \pm 1,8)\%$ та $(23,1 \pm 3,4)\%$), *Rh. sanguineus* — 1 проба (відповідно $(2,0 \pm 1,1)\%$ та $(11,1 \pm 2,5)\%$), зібраних на території 10 районів області (див. рис. 1).

Видова структура природно заражених *R. conorii* кліщів, а також їх територіальний розподіл дещо відрізнялися від таких при виявленні рикетсій ГКПГ. Найчастіше ($p < 0,05$) специфічні ділянки ДНК *R. conorii* виявлялись у пробах кліщів *D. marginatus* — у восьми районах Придністерської зони та Дунайсько-Дністерського межиріччя. Інфікованість збудником марсельської гарячки кліщів інших видів (*I. ricinus*, *Rp. rossicus*, *Rh. sanguineus*) встановлена лише у поодиноких районах (рис. 3). На території Придністерської зони специфічні ділянки ДНК *R. conorii* виявлено у двох видах кліщів — *D. marginatus* та *I. ricinus*, що підтверджує полівекторність природних осередків на цій території та вказує на зростання ризику інфікування людей.

Важливо відмітити, що саме завдяки використанню методу ПЛР-РЧ вдалося вперше у ландшафтах Причорноморської низовини ідентифікувати *R. conorii* у південного собачого кліща *Rh. sanguineus*, якого прийнято вважати основним переносником збудника марсельської гарячки у Середземноморському басейні [7]. Роль кліщів *D. marginatus* у трансмісії цього патогену вже доведена у подібних природно-кліматичних умовах Європи [7; 8]. Щодо інших видів іксодових кліщів, у яких виявлено ДНК збудника марсельської гарячки



Рис. 2. Поширення рикетсій групи кліщових плямистих гарячок на території Одеської області

ки, то можна припустити, що вони в умовах при- морського клімату є другорядними переносниками.

Зважаючи на отримані з використанням су- часних молекулярно-генетичних методів (ПЛР- РЧ) нові дані про поширення рикетсій ГКПГ та участь в їх трансмісії, крім *Rh. sanguineus*, іксо- дових кліщів інших видів, можна прогнозувати поширення на території України й інших видів рикетсій цієї групи, наприклад *R. slovaca*, *R. helve- tica*, *R. raoultii*, переносниками яких на європей- ському континенті є саме кліщі *D. reticulatus*, *D. marginatus* та *I. ricinus* [9; 10]. Ця гіпотеза по- требує детального вивчення та продовження до- сліджень із застосуванням сучасних високоспеци- фічних молекулярно-генетичних технологій.

Висновки

1. Застосування молекулярно-генетичних ме- тодів при вивченні поширення рикетсіозів підви- щує ефективність їх виявлення та дає можливість ідентифікувати окремі види рикетсій.



Рис. 3. Поширення *R. conorii* на території Одеської області

2. Результати виявлення ДНК рикетсій ГКПГ в іксових кліщах, зібраних на територіях пів- денного регіону України, показали значне роз- ширення ареалу розповсюдження цих збудників на територіях, раніше для них не притаманних, залучення в їх екологічні цикли іксових кліщів 6 видів, у тому числі таких, як *D. marginatus*, *D. re- ticulatus*, *I. ricinus*, *H. plumbeum*, *Rp. rossicus*, *Rh. san- guineus*, та наявність полівекторних природних осередків цих інфекцій.

3. Вперше завдяки використанню методу ПЛР- РЧ проведено ідентифікацію збудника марсель- ської гарячки в іксових кліщах чотирьох ви- дів — *Rh. sanguineus*, *D. marginatus*, *I. ricinus* та *Rp. rossicus* — і показано розширення ареалу цьо- го збудника на нові території Півдня України, що вказує на зростання їх епідемічного ризику та дозволяє прогнозувати активізацію епіпроцесу марсельської гарячки на цих теренах.

4. Отримані результати вказують на необхід- ність подальшого проведення комплексних еко- лого-епідеміологічних досліджень з використан- ням методу ПЛР-РЧ з метою одержання кількіс- них та якісних характеристик поширення рикет- сійних інфекцій на території України для вдос- коналення протиепідемічних заходів і зниження ризику інфікування населення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Richards A. L. Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for Rickettsial Diseases / A. L. Richards // NATO Medical Surveillance and Response, Research and Technology Opportunities and Options : RTO HFM Symposium. Budapest, Hungary, 19–21 April 2004. – RTO-MP-HFM-108.
2. EpiInfo, a database and statistics program for public health professionals [Electronic resource] / A. G. Dean, T. G. Arner, G. G. Sunki [et al.] // Series EpiInfo, a database and statistics program for public health professionals. – Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2002. – Access mode : <http://www.cdc.gov/epiinfo>.
3. Курганова І. І. Характеристика епідемічного проце- су марсельської гарячки в Україні у 1996–2010 роках / І. І. Курганова, Ю. О. Логінов, М. Т. Гафарова // Матеріали всеукраїнського семінару-наради з актуальних питань епіда- нагляду за вірусними та особливо небезпечними інфекція- ми. – Суми, 2011. – С. 65–67.
4. Ензоотичні території з особливо небезпечних природно- вогнищевих інфекційних хвороб в Україні та заходи їх про- філактики : інформ. лист. – К., 2011. – С. 51–58.
5. Русев І. Т. Іксові кліщі северо-западного При- черномор'я і їх роль в циркуляції возбудителів природно- очагових арбовірусних інфекцій / І. Т. Русев // Вісник Сумського державного університету. Серія Медицина. – 2008. – № 2. – С. 82–100.
6. Ecology and molecular epidemiology of tick-borne rick- ettsioses and anaplasmosis with natural foci in Russia and Kaz- akhstan / N. Rudakov, S. Shpynov, P. E. Fournier [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 1078, N 10. – P. 299–304.
7. Sexton D. J. Spotted Fever Group Rickettsioses [Elec- tronic resource] / D. J. Sexton, D. H. Walker // Tropical In- fectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice ; ed. by R. L. Guerrant, D. H. Walker, P. F. Weller. – Elsevier Health Sciences, 2011. – P. 539–547. – Access mode : <http://www.else- vier.com>.

8. *Basic Biology and Geographical Distribution of Tick Species Involved in the Transmission of Animals Pathogens, Including Zoonoses* [Electronic resource] / R. Farkas, A. Estrada-Pena, G. T. Jaenson [et al.] // *Ticks and Tick-Borne Diseases: Geographical Distribution and Control Strategies in the Euro-Asia Region*; ed. by Mowafak Dauod Salman. CAB International, 2013. – P. 6–26. – Access mode: <http://www.cabi.org>

9. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in Tick-borne Rickettsioses / Ph. Parola, C. Rovery, J. M. Rolain [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 15, N 7. – P. 1105–1108.

10. *Detection of Rickettsia helvetica in Ixodes ricinus ticks collected from Pyrenean chamois in France* [Electronic resource] / B. Davoust, C. Socolovschi, P. Revelli [et al.] // *Ticks and Tick-borne Diseases*. – Available online, 7 November 2012. – Access mode: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.009>

УДК 579.881.11:576.895.421:577.213

О. Б. Семенишин, О. З. Зарічна, В. А. Дацюк

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ РИКЕТСІЙ ГРУПИ КЛІЩОВИХ ПЛЯМИСТИХ ГАРЯЧОК

Представлено результати вивчення поширеності рикетсій ГКПГ на території Одеської області з використанням методу ПЛР-РЧ. Для детекції рикетсій ГКПГ, у тому числі *R. conorii*, досліджено 3352 екземпляри іксодових кліщів 6 видів — *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *H. plumbeum*, *Rh. sanguineus*, *Rp. rossicus*, зібраних на території південного регіону України в період 2010–2012 рр. Виявлено значне розповсюдження рикетсій ГКПГ на нові території, розширення видового спектра їх переносників і наявність полівекторних осередків. Отримані результати вказують на необхідність подальшого проведення комплексних еколого-епідеміологічних досліджень з метою одержання кількісних та якісних характеристик природних осередків рикетсійних інфекцій на території України для вдосконалення протиепідемічних заходів і зниження ризику інфікування населення.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, рикетсії, збудники групи кліщових плямистих гарячок, іксодові кліщі.

UDC 579.881.11:576.895.421:577.213

O. B. Semenishyn, O. Z. Zarichna, V. A. Datsuk

PERSPECTIVES OF REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION FOR STUDY OF SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIAE

The results of the study of the prevalence of SFG rickettsiae in the Odessa region using PCR-RT are presented. For detection of SFG rickettsiae, including *R. conorii*, there were investigated 3352 specimens ixodes ticks of 6 species — *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *H. plumbeum*, *Rh. sanguineus*, *Rp. rossicus*, collected in the South region during the 2010–2012. A significant spread of SFG rickettsiae into new territory, expansion of the species range of carriers and availability of polyvector foci are revealed. The results indicate the need for further implementation of comprehensive ecological and epidemiological research in order to obtain qualitative and quantitative characteristics of natural foci rickettsiae infections in Ukraine to improve epidemic measures and reduce risk population.

Key words: polymerase chain reaction, rickettsiae, causative agents of spotted fever group, ixodes ticks.

УДК 577.115.3:636.92:616.37-036

О. О. Гопаненко

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД МОНОАЦИЛГЛІЦЕРОЛІВ І ДІАЦИЛГЛІЦЕРОЛІВ ПЛАЗМИ КРОВІ КРОЛІВ ЗА ГОСТРОГО АРГІНІНОВОГО ПАНКРЕАТИТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ

*Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН України,
с. Оброшино, Пустомитівський р-н, Львівська обл.*

В обміні ліпідів і жирних кислот в організмі людини та тварин велику роль відіграє підшлункова залоза [1]. На функціонування підшлункової залози та секрецію нею ензимів і гормонів впливають аліментарні та хімічні фактори [2]. Зокрема, за гострого аргінінового панкреатиту в плазмі крові щурів змінюється вміст окремих класів ліпідів [3].

Разом із тим, такі класи ліпідів, як моноацилгліцероли і діацилгліцероли, та їх жирнокис-

лотні складні відіграють важливу роль у синтезі фосфоліпідів і тріацилгліцеролів тканин людини та тварин [4]. Від вмісту моноацилгліцеролів і діацилгліцеролів та їх жирнокислотних складів залежить функціональна активність синтезованих фосфоліпідів у клітинних мембранах [5].

Метою нашої роботи було встановити рівень і жирнокислотний склад суміші моноацилгліцеролів із діацилгліцерами у плазмі крові кролів за гостро-

го аргінінового панкреатиту та його корекції згодовуваною лляною олією.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проведено в умовах віварію Львівського національного медичного університету ім. Д. Галицького на трьох групах (по 5 тварин у кожній) кролів-самців породи Сирій велетень живою масою 3,8–4,0 кг. Кролі контрольної, I та II дослідних груп протягом одного