

ГЛАВА 3.1.16.

КУ-ЛИХОРАДКА

РЕЗЮМЕ

Определение болезни: Ку-лихорадка или коксиеллёз является зоонозом, который регистрируют во многих странах. Людям болезнь обычно передается воздушно-капельным путем от животных, особенно от домашних жвачных, при этом источниками болезни могут выступить другие домашние и дикие животные (непродуктивные животные, кролики, птицы и прочие). Возбудителем заболевания является облигатная интрацеллюлярная бактерия *Coxiella burnetii*, демонстрирующая различные морфологические формы в ходе своего цикла развития. Некоторые формы могут выживать вне клетки и даже аккумулироваться в условиях внешней среды. Все манипуляции с потенциально зараженным и контаминированным материалом следует проводить в надлежащих условиях биобезопасности и с соблюдением мер предосторожности, определенных по результатам анализа биологического риска.

Описание болезни: У людей болезнь отличается большим полиморфизмом. Ку-лихорадка проявляется либо в острой форме или затяжной хронической форме, развивающейся в результате более раннего заражения, может при этом протекать незаметно. Острая форма довольно быстро проходит после надлежащего лечения антибиотиками, а хроническая требует продолжительного лечения антибиотиками (от двух лет и более) и сопутствующего серологического мониторинга. В Австралии проводится вакцинация среди тех групп населения, которые подвержены риску заражения в связи со своей профессиональной деятельностью.

У домашних жвачных ку-лихорадка в основном вызывает спорадические аборт, вспышки абортов, приводит к мертворождениям и появлению слабого потомства, затем следует период выздоровления без осложнений. Более того, имеются сведения, показывающие, что ку-лихорадка связана с бесплодием или метритом у КРС. *Coxiella burnetii* персистирует в течение нескольких лет, и, вероятно, на протяжении всей жизни. Овцы, козы и коровы являются в основном субклиническими переносчиками, но могут выделять в среду бактерии через различные секреты и выделения.

Идентификация возбудителя: Для лабораторной диагностики в случае серийных абортов и/или мертворождений можно брать пробы плаценты, вагинальных выделений и ткани от абортированного плода (селезенки, печени, легких или содержимого желудка). Для исследования случаев выделения бактериального материала во внешнюю среду, можно брать образцы вагинальных выделений, образцы молока и молозива.

Учитывая, что *Coxiella burnetii* является облигатной интрацеллюлярной бактерией, ее можно выделить путем прививания образцов в традиционные клеточные культуры, в желточный мешок куриного эмбриона или лабораторным животным. Прививание лабораторным животным (морским свинкам, мышам, хомякам) целесообразно в случаях выделения возбудителя из тканей, фекалий, молока или проб с предметов окружающей среды, контаминированных различными микроорганизмами.

Бактерии можно рассмотреть в образцах окрашенной ткани или вагинальных мазках с использованием микроскопа с масляно-иммерсионными линзами. Поскольку он является устойчивым к воздействию кислот, то бактерии можно окрашивать несколькими методами: штамповка, окрашивание по Циль-Нильсену, по методу Gimenez, Giemsa и по измененному методу Koster. Из-за недостатка специфичности положительное выявление является единственным применимым свидетельством наличия ку-лихорадки, поэтому необходимо проводить подтверждающие тесты.

Демонстрация возбудителя методом иммуногистохимического окрашивания, способом *in-situ* гибридизации или при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) является более специфичной и чувствительной по сравнению с классическими методами окрашивания. На рынке не представлены специфические антитела для иммуногистохимических исследований, но предлагаются наборы ПЦР для жвачных, которыми можно легко воспользоваться в условиях лаборатории, оборудованной надлежащим образом. ПЦР считается подходящим и надежным тестом для проведения скрининга большого количества различных образцов. В настоящее время, инструментом для диагностики ку-лихорадки стала ПЦР.

В настоящее время широко используются два метода типирования на основе ПЦР: мультилокусный анализ числа переменных тандемных повторов (MLVA) и мультиспейсер-типирование последовательностей (MST), позволяющие типировать *Coxiella burnetii* без необходимости выделения организма. Более того, недавно было описано генотипирование методом точечного нуклеотидного полиморфизма SNP.

Серологические тесты: Могут быть использованы следующие тесты: реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), реакция связывания комплемента (РСК). Наличие специфических IgG антител является свидетельством недавнего заражения *Coxiella burnetii* или более раннего воздействия вируса. Различные методы ИФА предпочтительней с практической точки зрения и по причине их большей чувствительности.

Серологические антигены базируются на двух основных антигенных формах *Coxiella burnetii*: фаза I, полученная из селезенок после прививания лабораторным животным и фаза II, полученная в результате повторных пассажей на эмбрионах кур или в культуре клеток. Имеющиеся в настоящее время коммерческие тесты позволяют выделить антитела к анти-*Coxiella burnetii* фазе II или обоим фазам I и II.

Требования к вакцинам: Было разработано несколько инактивированных вакцин против ку-лихорадки, но защитными свойствами обладают только вакцины, содержащие или изготовленные из *Coxiella burnetii* фазы I. На рынке имеется инактивированная вакцина фазы I. В зонах риска рекомендуется ежегодно проводить многократные вакцинации животных, в частности молодняка.

А. ВВЕДЕНИЕ

1. Определение болезни и способы ее передачи

Ку-лихорадка (коксиеллёз) широко распространена по всему миру за исключением Новой Зеландии. Возбудитель *Coxiella burnetii* присутствует буквально во всех животных царствах, включая членистоногих, но болезнь поражает в основном людей, КРС, овец и коз (EFSA, 2010; Lang, 1990). Домашних жвачных считают основным резервуаром *Coxiella burnetii*, но есть также свидетельства того, что кошки, собаки, кролики и птицы и

пр. участвуют в заражении человека. Имеются эпизоотологические и экспериментальные доказательства того, что инфекция в основном распространяется при вдыхании сухих аэрозольных частиц и при близком контакте с зараженными животными, с их тканями репродуктивной системы или другими продуктами животного происхождения, например, шерсти (ECDC, 2010). Довольно часто выдвигалось предположение, что заражение может возникать в результате употребления в пищу молочных продуктов, произведенных из контаминированного сырого молока, однако убедительных доказательств передачи возбудителя через пищевые продукты предоставлено не было. Ку-лихорадка довольно редко передается от человека к человеку, хотя возможно заражение во время родов, при половом контакте или переливании крови. У животных можно наблюдать вертикальную передачу вируса и заражение при половом контакте, но актуальность этих путей передачи неизвестна. Кроме того, в передаче ку-лихорадки могут участвовать членистоногие, в основном клещи. По всей видимости, риск передачи связан с дикими животными. Передача может быть вызвана укусами и контактами с контаминированными частицами пыли от высохших экскрементов.

2. Описание патогена

Этиологический агент, *Coxiella burnetii*, является грам-отрицательной, облигатной внутриклеточной бактерией, приспособившейся к выживанию в фаголизосоме фагоцита. Исторически возбудитель был отнесен к семейству *Rickettsiaceae*. Однако филогенетические исследования, основанные большей частью на анализе последовательностей генов 16S рРНК, показали, что род *Coxiella* далек от рода *Rickettsia*, отнесенного к альфа-подразделению протеобактерий (Drancourt and Raoult, 2005). *Coxiella burnetii* отнесли к семейству *Coxiellaceae*, отряду *Legionellales* подразделения гамма протеобактерий. Проведенное полное секвенирование генома *Coxiella burnetii*, подтвердило положение возбудителя в системе (Seshadri et al., 2003).

В общем, геномы изолятов *Coxiella burnetii* из широкого спектра биологически и географически разнообразных источников отличаются высокой консервативностью, а заметный полиморфизм проявляется в виде перестановки блоков синтении (Beare et al., 2009). Данная геномная пластичность может стать причиной различных фенотипов и представляет особый интерес для методов генотипирования (Massung et al., 2012; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). В отличие от риккетсии *Coxiella burnetii* образует небольшую, плотную, высоко-устойчивую споро-подобную форму (Heinzen et al., 1999; Minnick and Raghavan, 2012).

Данная способность объясняется существованием вариантов цикла развития *Coxiella burnetii*, описанных в исследованиях *in-vitro*: крупноклеточные варианты (LCV), мелкоклеточные варианты (SCV) и низкоплотные клетки (SDC) шириной 0,2 мкм, длиной от 0,5-2 мкм, или диаметром 0,4 -0,7 мкм (Heinzen et al., 1999; Minnick and Raghavan, 2012).

SCV и SDC представляют собой небольшие морфологические варианты бактерий, которые с большой долей вероятности способны выживать вне клеток в виде инфекционных частиц, данная черта важна для выживания в окружающей среде и дальнейшей передачи (ECDC, 2010; EFSA, 2010; Kersh et al., 2010).

Другой важной отличительной чертой *Coxiella burnetii* является наличие двух антигенных форм: патогенная фаза I, выделенная у зараженных животных или людей, аттенуированная фаза II, полученная при повторных *in-ovo* и *in-vitro* пассажах. Во время серийных пассажей отмечают изменение липополисахаридов (ЛПС): клетки первой фазы

с полноразмерными О-цепями ЛСП, изменяются в промежуточные фазы с сокращающейся длиной О-цепи ЛСП и затем в фазу II с сокращенными ЛСП. Таким образом, длинная фаза I ЛСП содержит часть фазы II. Вторую фазу описали как ключевой иммуногенный детерминант. Имеющиеся в настоящее время коммерческие тесты позволяют выявить, по крайней мере, антитела к *anti-Coxiella burnetii* фазе II, которые появляются независимо от стадии и формы заражения. Однако для вакцинации эффективна вакцина с содержанием антигенов из косиелл первой фазы, а не второй (EFSA, 2010; O'Neil et al., 2013).

3. Описание болезни у людей

Ку-лихорадка является зоонозом. У людей инфекция проявляется в острой, клинической и субклинической форме (Anderson et al., 2013; ECDC, 2010). Диагностика и лечение часто запаздывают из-за различных и неспецифических клинических проявлений. Острые формы могут ограничиться симптоматикой гриппа, а могут проявляться как пневмония или гранулематозный гепатит, требующие госпитализации. Хроническая форма ку-лихорадки в основном характеризуется эндокардитом, вальвулярными, васкулярными или аневризматическими инфекциями, гепатитом, пневмонией или синдромом хронической усталости. Острая форма проходит довольно быстро после надлежащего лечения антибиотиками, а хроническая форма требует длительного лечения антибиотиками (в течение двух или более лет), в сочетании с серологическим мониторингом. При отсутствии надлежащего лечения осложнения, вызванные хронической формой, могут быть тяжелыми и даже смертельными. Более того, заражение беременных женщин *Coxiella burnetii* может спровоцировать воспаление плаценты и привести к преждевременным родам, ограничениям в росте, спонтанным выкидышам или гибели плода.

В целом, болезнь с большей долей вероятности поражает тех, кто находится в группе повышенного риска (например, ослабленный иммунитет или вальвулопатия). Данная инфекция эндемична для многих регионов, вызывая, таким образом, спорадические случаи заболевания или стремительные эпидемии. Инцидентность заболевания, вероятно, выше, чем заявлена. Ку-лихорадка поражает людей всех возрастов, но чаще всего регистрируется у людей в возрасте от 30-60 лет. В настоящее время растет информированность населения о ку-лихорадке во время вспышек среди людей. Данные вспышки носят временный характер и часто не включают более 300 острых случаев. Однако в 2007 г. в Нидерландах была отмечена самая масштабная из когда-либо зарегистрированных вспышек. В последующие годы пик инцидентности увеличился с февраля по сентябрь, а географическая зона существенно расширилась. В стране было зарегистрировано более 4000 случаев болезни среди людей, уровень госпитализации составил 20% и ожидается, что в ближайшее время увеличится количество хронических случаев ку-лихорадки в группах рисках (EVDC, 2010; EFSA, 2010). Потери, вызванные эпидемией, составили по проведенным расчетам приблизительно 307 миллионов евро (van Assendonk et al., 2013).

4. Описание болезни у животных

У коров, овец и коз ку-лихорадка в основном связана с выкидышами на поздних сроках, проблемами с репродуктивной системой, такими как преждевременные роды, мертворожденное или слабое потомство (EFSA, 2010; Lang, 1990). Более того, *Coxiella burnetii* может быть связана с метритом и бесплодием у КРС. Учитывая недостаточную специфичность последних симптомов, рекомендуется проводить клиническую диагностику ку-лихорадки (EFSA, 2010), прежде чем связывать их с ку-лихорадкой.

Домашние жвачные являются основными субклиническими переносчиками, но они могут выделять бактерии во внешнюю среду с различными секретами и экскретами. Во внешней среде *Coxiella burnetii* может выживать в течение разных периодов времени, когда она и распространяется. Уровни бактериальной контаминации во внешней среде можно снизить, используя количественную ПЦР (полимеразная цепная реакция) для выявления ДНК *Coxiella burnetii*, но необходим экспресс-тест для оценки жизнеспособности возбудителя, позволяющий оценить риск распространения инфекции в окружающей среде (EFSA, 2010; Kersh, 2010). В настоящее время недостаток знаний о способах выделения вируса в окружающую среду среди жвачных затрудняет определение статуса ку-лихорадки. Довольно редки случаи выделения возбудителя с молоком, фекалиями и вагинальным секретом (Guatteo et al., 2007, Rousset et al., 2009 a). С наибольшей вероятностью вирус выделяется с вагинальным секретом в момент ягнения (Arricau-Bouvery et al., 2005). В стадах, где отмечены случаи выкидышей, вызванных *Coxiella burnetii*, большая часть животных может выделять большие объемы бактерий, независимо от того был выкидыш или нет. Суммарные количества заметно выше, чем в стадах с субклинической формой инфекции. Во время родов, зарегистрированных после всплеска числа выкидышей, рожаящие самки выделяли больше бактерий в окружающую среду по сравнению с другими самками (de Cremoux et al., 2012; Guatteo et al., 2008; Rousset et al., 2009 b). Кроме того, выделение возбудителя в окружающую среду может продолжаться в течение нескольких месяцев, либо с перерывами, либо непрерывно. Наиболее интенсивно выделяют вирус те животные, у которых наблюдают непрерывную модель выделения. Эти животные в большей степени демонстрируют высоко сероположительный серологический профиль (Guatteo et al., 2007). Важно то, что выделение и серологический ответ связаны на уровне группы, а не на уровне отдельных особей.

5. Дифференциальная диагностика у жвачных

Диагноз ку-лихорадки у жвачных, включая его дифференциацию от прочих других причин выкидышей, традиционно ставят на основе микроскопических исследований клинических образцов в сочетании с положительными серологическими результатами (Lang, 1990).

В настоящее время отсутствует общепринятая методика (золотой стандарт), но для клинической диагностики можно воспользоваться ПЦР и серологическим вариантом ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ) для непосредственного клинического диагноза (Niernczuk et al., 2014; Sidi-Boumedine et al., 2010). Был выдвинут ряд предложений о разработке гармонизированных схем мониторинга и отчетности по ку-лихорадке, которые позволили бы проводить сравнительный анализ во времени и между странами (EFSA, 2010; Sidi-Boumedine et al., 2010).

Для стад с подозрением на наличие болезни и стад, подвергающихся риску заражения, или при обмене между стадами необходимо применять диагностические тесты на ку-лихорадку в рамках эпизоотологических наблюдений (по итогам недавних вспышек среди людей или животных). Таким образом, всячески поощряется валидация методов, применяемых для указанных целей (см. Таблицу 1), и для разработки эталонных материалов для контроля качества, повышения квалификации и гармонизации (см. Главу 1.1.6. *Принципы и методы валидации диагностических тестов инфекционных болезней*).

6. Риск зооноза и требования к биобезопасности

Опасения относительно рисков, связанных с ку-лихорадкой, возникли в Европе, когда Европейская Комиссия запросила научные рекомендации и проведение оценки риска для людей и животных (ECDC, 2010; EFSA, 2010). Основные выводы состояли в том, что

необходимые меры для остановки вспышки должны быть приняты совместно службами здравоохранения и ветеринарными службами на национальном и местном уровнях. Общее воздействие *Coxiella burnetii* на здоровье людей ограничено, но все равно необходима более надежная система надзора. В случае эпидемий среди людей лучшей стратегией недопущения хронических случаев является применение стратегии активного надзора за ку-лихорадкой. Необходимы меры контроля ку-лихорадки особенно в отношении домашних жвачных. Эффективным является только совместное применение мер. Среди возможных вариантов можно воспользоваться методами профилактической вакцинации, системой контроля навоза, можно изменить рабочие характеристики хозяйства, скорректировать систему стрижки шерсти, обозначить отдельную зону для молодняка, удалять материалы риска, ввести запрет на посещения посторонними лицами, контролировать другие естественные резервуары и клещей. Кроме того, свою роль при вспышке болезни среди людей могут сыграть и отбраковка беременных животных, введение временного запрета на разведение, идентификация и отбраковка стад, выделяющих вирус во внешнюю среду, контроль передвижения животных.

Способность вызывать заболевание, ведущее к потере трудоспособности среди больших групп людей, устойчивость во внешней среде в виде псевдо спор и распространение воздушно-капельным путем, делает *Coxiella burnetii* потенциальным риском с точки зрения биотерроризма. Центры по контролю и профилактике заболеваний характеризуют этого возбудителя, как биологический агент группы В (Drancourt and Raoult, 2005; Kersh et al., 2010). Что касается биозащиты и биобезопасности, то *Coxiella burnetii* становится чрезвычайно опасным для людей. Таким образом, ку-лихорадка является признанным зоонозом, связанным с профессиональной деятельностью. Все работы в лаборатории с культурами или потенциально зараженными/контаминированными материалами следует проводить при условии наличия надлежащих мер биобезопасности и при надлежащем уровне защиты, установленном по результатам анализа биорисков (см. Глава 1.1.4. *Биобезопасность и биозащита: стандарт для управления биорисками в ветеринарных лабораториях и вивариях*). Меры предосторожности следует принимать в отношении *Coxiella burnetii* фазы I и фазы II.

Даже если бактерии фазы II признают авирулентными, бактерии фазы I могут присутствовать в препаратах фазы II. В частности рекомендуется надевать полную защиту и фильтрующие маски 3 класса защиты (FFP3 респиратор) и работать с инфекционными или потенциально инфекционными материалами в двух парах перчаток внутри ламинарного бокса (BSC). Центрифугирование зараженного материала следует проводить в закрытых контейнерах, расположенных в герметичных чашах или в роторах, перегружаемых в ламинарный бокс. Следует строго ограничить использование игл, шприцов и других острых предметов. После всех видов работ, сопровождающихся потенциальным риском воздействия *Coxiella burnetii*, обязательно нужно принять душ при выходе из лаборатории. Рекомендуется применить спорицидные дезинфектанты. Надлежащий серологический надзор поможет отследить иммунный статус лабораторного персонала. В некоторых странах применяют вакцинацию для людей, работа которых сопряжена с профессиональным риском заражения, а именно для работников боен, ветеринаров и работников лабораторий. Вакцины фазы I эффективны, но вакцинация противопоказана тем, у кого наблюдаются признаки сероконверсии или было воздействие *Coxiella burnetii* до иммунизации.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Таблица 1. Методы тестирования, доступные для диагностики ку-лихорадки и цели их использования

Метод	Цель					
	Свобода популяции от болезни	Свобода конкретных животных от болезни до передвижения	Вклад в стратегии искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя						
ПЦР	+++	Нет данных	+++	+++	++	+ ¹
Культура	+	Нет данных	+	-	+	-
Окрашивание	+	Нет данных	+	+	+	-
Генотипирование	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	++	Нет данных
Выявление иммунного ответа						
ИФА	+++	Нет данных	+++	++	+++	+++
Реакция иммунофлюоресценции	++	Нет данных	++	++	++	++
РСК	-	Нет данных	-	++	+	+

¹ Подтверждение иммунного статуса должно сопровождаться тестами на отсутствие возбудителя в вагинальных выделениях.

Пояснения: +++ рекомендованный метод; ++ можно использовать в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или прочие факторы сильно ограничивают применимость; - = не подходит для этой цели; n/a – не применяется.

Хотя не все эти тесты, отмеченные статусом +++ или ++, прошли официальную валидацию, их особенности и то обстоятельство, что при их повсеместном использовании получают точные результаты, делают эти методы приемлемыми.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; ИФА- твердофазный иммуноферментный анализ; РНИФ = реакция непрямой иммунофлюоресценции; РСК = реакция связывания комплимента.

Очевидно, что подтверждение положительной идентификации *Coxiella burnetii* у конкретного животного является еще одним методом для обоснования диагноза. Вместе с тем, как правило, методы диагностики ку-лихорадки позволяют интерпретировать диагноз только на уровне популяции, а не на уровне отдельного животного. Более того, результаты лабораторных тестов следует интерпретировать в контексте истории стада (выкидыши, вакцинация, передвижения и заносы болезней и пр.).

Coxiella burnetii может проявляться разными способами в зависимости от типа образца и цели исследований (Samuel and Hendrix, 2009; Sidi-Boumedine et al., 2010). Способность направлять и определять количество ДНК *Coxiella burnetii* с помощью ПЦР в реальном времени в значительной степени усиливает диагностические и научно-исследовательские подходы. Чтобы выявить, выделяются ли бактерий в окружающую среду, можно взять пробы влагалищных секретов, молока или молозива у отдельных животных или пробы сборного молока.

Однако выявить животных, выделяющих бактерии в окружающую среду, довольно сложно, поскольку динамика выделения бактерий изучена не в полной мере (de Cremonx et al., 2012 EFSA 2010; Guatteo et al., 2007; Rousset et al., 2009a). Вариабельность в процессе выделения возбудителя в окружающую среду животными (различные способы выделения, периодическое выделение) не позволяет рассчитывать на ПЦР в плане

определения инфекционного статуса. Можно провести серологические анализы с использованием ИФА, реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ), реакции связывания комплимента (РСК).

В нескольких публикациях показано, что относительная чувствительность у РСК наиболее низка, но у теста отмечают высокую специфичность для высоких уровней антител против *Coxiella burnetii*, выработанных в стадах, где отмечены случаи выкидыша на фоне заражения ку-лихорадкой (Emery et al., 2014; Horigan et al., 2011; Kittelberger et al., 2009; Niemczuk et al., 2014; Rousset et al., 2007; 2009a). Недостаток РНИФ заключается в его меньшей воспроизводимости между операторами, между лабораториями. Хотя методы ИФА не в полной мере валидированы и гармонизированы, они являются надежными и их можно автоматизировать и рекомендовать для рутинного серологического тестирования животных на ку-лихорадку.

Серологический надзор является хорошим способом оценки превалентности. Наличие специфических антител против *Coxiella burnetii* является доказательством недавнего заражения, равно как и воздействия возбудителя в прошлом. Для проведения скрининга в стадах подходят серологические анализы, но на уровне отдельных животных интерпретировать результаты не представляется возможным. В действительности, значительная доля животных, выделяющих *Coxiella burnetii*, и даже некоторые животные, у которых наблюдали выкидыши, вызванные ку-лихорадкой, оказывались сероотрицательными (de Cremoux et al., 2012; Guatteo et al., 2007; Rousset et al., 2007, 2009a).

Отбор проб нацелен на репрезентативное количество животных (а именно, из различных возрастных категорий). Стратегия отбора проб должна учитывать возможность низкой превалентности, если нет сведений по превалентности в изучаемой области. В ином случае тестирование сборного молока (ВТМ) или собранных в пул образцов отдельных животных (вагинальные смывы или пробы молока) можно использовать для оценки превалентности, но их необходимо оценить относительно внутростадной превалентности выделения возбудителя. Например, в Нидерландах проводят анализы сборного молока в ПЦР каждые два месяца с 2009 г., чтобы осуществлять мониторинг в стадах с подтвержденным клиническим статусом.

Статус стада можно оценить серологически, исследовав всех животных в стаде (или значительную выборку) с помощью ИФА. Однако возможно получение противоречивых результатов при использовании различных наборов ИФА (Horigan et al., 2011). Одним из вариантов может быть использование минимум трех наборов для определения статуса сыворотки. Имеющиеся в наличии серологические методы, к сожалению, не позволяют отличить зараженных животных от вакцинированных. Необходим анализ сборного молока или отдельных проб (вагинальные смывы, предпочтительно во время родов) в ПЦР и может появиться необходимость его повторить, если целью является определение статуса свободы. Отдельных животных можно признать свободными от возбудителя, если стадо свободно и не имеет серологической или клинической истории ку-лихорадки. Сложно гарантировать, чтобы статус животного со временем не менялся из-за передачи возбудителя по воздуху.

ПЦР - наиболее надежный инструмент диагностики инфекционных выкидышей (EFSA, 2010, Sidi-Boumedine et al., 2010). Для диагностики в лабораторных условиях с учетом серий выкидышей и мертворождений, необходимо брать пробы от абортированных плодов, плаценты и вагинальных выделений вскоре после выкидыша или родов. Своевременное выявление череды выкидышей в стаде, связанных с ку-лихорадкой, и

применение соответствующих корректирующих мер, необходимо для контроля передачи инфекции, как в рамках фермы, так и в условиях внешней среды. Подтверждение клинических случаев всегда должно включать дифференциальное расследование в отношении основных возбудителей, вызывающих выкидыши, и должно быть проведено на как минимум на двух абортированных животных. Интерпретировать результаты можно только на уровне группы. Положительным случаем считают стадо с клиническими признаками болезни (выкидыши и/или мертворождение), в котором подтверждено наличие возбудителя. При возможности следует собрать пробы вагинальных мазков сразу после или не позднее 8 дней после выкидыша, чтобы ограничить количество ложноотрицательных результатов ПЦР.

Фактически бактериальная нагрузка в вагинальных выделениях может значительно снизиться после выкидыша или родов. Минимум три котеледона из плаценты следует протестировать на *Coxiella burnetii*, поскольку колонизация может быть гетерогенной. Полезным может быть и процесс количественного определения бактерий в вагинальных и плацентарных мазках, поскольку высокие уровни, вероятнее всего, ассоциированы с клиническими случаями. Полезными могут быть и образцы органов плода, но отрицательные результаты могут вызвать сомнения. С большой долей вероятности бактерии распространяются на различные органы (селезенку, легкие, печень, желудок и пр.) в зависимости от течения инфекции, таким образом, отсутствие бактерий в одном органе не исключает наличия возбудителя в другом.

Если возникли сложности с интерпретацией результатов диагностических тестов, то на уровне стада полезна ассоциация с положительным серологическим результатом. Для тестирования клинических случаев можно пользоваться методами ИФА, РНИФ и РСК, но важно определить характеристики теста в конкретных условиях местности (чувствительность, специфичность, точность относительно точки разделения, воспроизводимость). Серологические пороговые показатели, используемые для диагностики ку-лихорадки, указывают поставщики наборов. Интерпретация результатов требует наличия проб минимум от 6 овцематок или коз и десяти коров (в приоритете те из них, у кого наблюдали выкидыши).

Определять иммунный статус популяций после вакцинации следует более чувствительными методами (ИФА и РНИФ). При возможности они должны быть привязаны к ПЦР тестированию вагинальных смывов, собранных во время родов. Если давление инфекции высоко, то вакцинация может только ограничить масштабы инфекции и выделения вируса в окружающую среду, не вызывая при этом устойчивую защиту. Сероконверсия и отсутствие выделения возбудителя через вагинальный секрет при последующих родах указывает на наличие иммунного статуса.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Выделение возбудителя

Для специальных лабораторных исследований может понадобиться выделение возбудителя. Если микроскопическое исследование выявляет большое количество *Coxiella burnetii* в сочетании с низким показателем контаминации другими бактериями, то возможно прямое выделение возбудителя путем прививания куриных эмбрионов или культуры клеток (Sameul and Hendrix, 2009). Для выделения рекомендуется концентрация выше 10^5 бактерий на мл.

Куриные яйца с эмбрионами: Порцию плаценты гомогенизируют в фосфатно-буферном растворе (ФБР), который содержит антибиотики (стрептомицин 100-200 мкг/мл и пенициллин или гентамицин 50-100 мкг/мл). После низкоскоростного центрифугирования, разведения супернатанта вводят 6- и 7-дневным куриным эмбрионам через желточный мешок. Предпочтительно брать яйца от СПФ-кур. Эмбрионов, которые погибают в течение первых 5 дней после инокуляции, отбраковывают. Содержимое желточных мешков собирают через 10-15 дней после инкубации. Окрашенные мазки со стенки желточного мешка проверяют на отсутствие бактериальной контаминации и для установления наличия *Coxiella burnetii*, так и с целью мониторинга процесса выделения возбудителя. Дальнейшие пассажи могут потребоваться для получения изолята в чистой культуре.

Клеточная культура: Система клеточной микрокультуры из коммерческого набора, использованного для культуры вируса, однослойная клеточная культура в цилиндрическом флаконе, была адаптирована для выделения строгих или факультативных внутриклеточных бактерий, включая *Coxiella burnetii*. Такой метод был описан для *Coxiella burnetii* в 1990 (Raoult et al., 1990). Суспензии проб вводят в фибробласты легкого эмбриона человека (HEL), выращенные на покровном стекле толщиной 1 см² в цилиндрическом флаконе. Можно использовать различные клеточные линии для наблюдения за размножением типичных вакуолей *Coxiella burnetii*. Центрифугирование в течение 1 часа при 700 g стимулирует прикрепление бактерий к клеткам и облегчает их проникновение в клетки. Три цилиндрических флакона используют для одной пробы, и на 3, 10, 21 дни с помощью инверсионного микроскопа проверяют ЦПД (цитопатогенное действие) типичных вакуолей *Coxiella burnetii* в клетках. Через 10 дней обнаружение роста *Coxiella burnetii* в клетках осуществляют непосредственно на предметном стекле внутри цилиндрического флакона с помощью реакции прямой иммуофлюоресценции с поликлональными антителами против *Coxiella burnetii* и соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцинизоцианатом (ФИТЦ). Клетки из оставшегося цилиндрического флакона собирают и переносят в 25 см² колбу с культурой. Инкубацию можно проводить в течение 3 месяцев с заменой культуральной среды раз в неделю (трипсинизацию не используют). Заражение можно проверять с помощью микроскопии цитоцентрифугированных клеток, окрашенных по методу Gimenez, из культурального супернатанта и с помощью ПЦР культурального супернатанта. Если наблюдения за ЦПД и окрашивание по методу Gimenez или результаты ПЦР положительны, то в 75 см² культуральном флаконе проводят пассаж. Культуральный супернатант затем вводят на непрерывные слои клеток Vero или фибробласты мышей линии L929 в 150 см² культуральном флаконе, чтобы установить изолят *Coxiella burnetii*. Данный метод был разработан для людей, но может быть адаптирован и для животных.

Лабораторные животные:

В случае с сильно контаминированными пробами плаценты, вагинальных выделений фекалий, молока может потребоваться прививание лабораторных животных в качестве системы фильтрации. Экспериментально зараженных грызунов необходимо содержать в надлежащих условиях, гарантирующих биологическую безопасность и условия для сдерживания возбудителей, определенные в рамках анализа на биологические риски (см. Глава 1.1.4). Мыши и морские свинки – наиболее подходящие лабораторные животные для этих целей (Scott et al., 1987). После внутрибрюшного введения дозы в объеме 0,5 мл на животное можно контролировать температуру тела и статус антител. Этим методом можно пользоваться совместно с серологическими тестами на других морских свинках или мышах, которым ввели такие же образцы. Сыворотки собирают через 21 день после введения. Положительный результат подтверждает диагноз – заражение *Coxiella burnetii*.

Если развивается пирексия, то животное убивают, удаляют селезенку для выделения возбудителя путем введения в куриный эмбрион или в культуры клеток. Микроскопические исследования *Coxiella burnetii* можно проводить с использованием отпечатков и окрашивания собранных образцов селезенки. В качестве альтернативы процесс можно упростить путем ПЦР для выявления ДНК *Coxiella burnetii* (см. ниже) на селезенке.

1.2. Окрашивание

Если есть основания подозревать, что причиной выкидыша является инфекционное заболевание, готовят мазки котиледонов плаценты на предметных стеклах для микроскопического исследования. Для этих целей можно использовать селезенку, легкие, печень и содержимое сычуга абортрованного плода или вагинальные выделения. Указанные материалы можно окрасить несколькими методами: Stamp, Gimenez, Macchiavello, Giemsa и измененный вариант Koster (Gimenez, 1964; Quinn et al., 1994; Samuel and Hendrix, 2009). Наилучшие результаты получают при использовании первых трех методик. Эти методы близки к модифицированному методу Zhiel-Neelsen, для которого используют основной фуксин для окрашивания бактерий. Например, окрашивание по методу Stamp выполняют с 0.4% раствором основного фуксина, за которым следует быстрое обесцвечивание 0.5% раствором уксусной кислоты и контрокрашивание 1% раствором метиленового синего или малахитового зеленого. Мазки проверяют под микроскопом с масляно-иммерсионными линзами (x 500 или более).

Метод Stamp предпочтительней в условиях ветеринарных диагностических лабораторий, в то время как метод Gimenez более распространен для мониторинга инфицированных клеток в научно-исследовательских лабораториях. Gimenez наиболее быстрый метод, так как кислый раствор не включают для дифференциации. *Coxiella burnetii* проявляется в виде большого количества тонких, розовых коккобактерий на синем или зеленом фоне. Порой их сложно выявить из-за небольшого размера, но эта сложность компенсируется большим количеством бактерий; часто включения в клетки хозяина проявляются в виде скоплений красного цвета на синем или зеленом фоне. Данный способ окрашивания является экспресс-методом. Предел обнаружения довольно высок ($>10^5$ бактерий/мл) и подходит для клинической диагностики, поскольку в положительных пробах присутствуют высокие уровни бактерий. Необходимо с особым вниманием интерпретировать результаты, поскольку микроскопически *Coxiella burnetii* можно перепутать с *Chlamydia abortus* или *Brucella spp.* Однако при использовании этой же процедуры окрашивания *Chlamydia* демонстрирует более четкие границы, бактерия имеет округлую форму, небольшие размеры. *Brucella spp.* отличается более крупными размерами (0,6-1,5 мкм в длину x 0,5-0,7 мкм в ширину), более четкими границами и окрашивается более интенсивно. Для сравнения следует использовать положительные контрольные предметные стекла с *Coxiella burnetii*, *Chlamydia* и *Brucella spp.* Диагностика клинических случаев на основе микроскопии в сочетании с положительными серологическими результатами обычно подходит для рутинных целей. Когда результаты биологического окрашивания не убедительны, то можно пользоваться другим специальным методом для подтверждения. Предпочтительно использовать ПЦР.

1.3. Специфические методы обнаружения

Обнаружить *Coxiella burnetii* в пробах можно с помощью специфической иммунодетекции (ИФА с захватом, иммуногистохимия), in-situ гибридизации или амплификации ДНК (Jensen et al., 2007; Samuel and Hendrix, 2009; Thiele et al., 1992). Иммуногистологические исследования можно проводить с тканями, погруженными в парафин, или на мазках,

зафиксированных в ацетоне (Raoult et al., 1994). В качестве метода используют непрямую иммунофлуоресценцию или иммунопероксидазный анализ со специфическими поликлональными антителами против *Coxiella burnetii*, выработанными лабораторными животными (кролики и морские свинки). Антивидовой конъюгат против IgG (кролик или морская свинка), меченный ФИТЦ или пероксидазой, используют для визуализации бактерий. Контрольные положительные предметные стекла с антигеном *Coxiella burnetii* необходимы для сравнения. Специфических антител для иммуногистохимии в продаже нет.

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) с использованием специфических олигонуклеотидных зондов, нацеленных на 16s рРНК, можно использовать на тканях, погруженных в парафин, особенно на образцах плаценты (Jensen et al., 2007).

Методы ПЦР успешно применялись для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в культурах клеток и биологических пробах. Чтобы гарантировать безопасность лабораторного персонала, пробы биологического материала можно инактивировать до ПЦР путем нагревания до 90°C в течение 30-60 минут в зависимости от вида пробы, размера или веса. Процесс инактивации необходимо проверять и валидировать до использования в соответствии с условиями местности. ПЦР проводят в лабораториях, оборудованных должным образом, с использованием праймеров, полученных от различных мишеней, таких как многоэкземплярная инсерционная последовательность IS1111 (учетный номер M80806), используется наиболее широко (Berry et al., 2000). Использование указанных праймеров для амплификации данной последовательности позволяет увеличить чувствительность теста благодаря наличию нескольких копий геномов *Coxiella burnetii*. Другие гены-мишени, используемые в ПЦР для специфической идентификации *Coxiella burnetii*: ген супероксид-дисмутаза (SodB) (учетный номер M74242); com1, кодирующий 27kDA белок внешней мембраны (учетный номер AV 004712); оперон теплового шока, кодирующий два белка теплового шока (htrA и htrB) (учетный номер M20482); изоцитратдегидрогеназа (icd) (учетный номер AF069035); белок, усиливающий инфективность макрофагов (cbmp) (учетный номер U14170). Некоторые последовательности праймеров и зондов можно получить на сайте Французского национального референтного центра по ку-лихорадке у человека.

ПЦР в реальном времени дает дополнительные средства для выявления и количественного определения (Klee et al., 2006; Stemmler and Meyer, 2002). Что касается традиционной ПЦР, то используют различные гены-мишени: например, IS1111; IS30; com1; icd. Для количественного определения бактерий в биологических образцах с использованием ПЦР в реальном времени рекомендуется амплифицировать уникальную и специфическую последовательность. Недавние сведения показывают, что количество инсерционных последовательностей (IS 1111) может довольно серьезно варьироваться (от 7 до 110), в зависимости от изолята (Klee et al., 2006). Несмотря на то, что использование этой последовательности может увеличить чувствительность теста, он может быть и не достаточно точен для количественного определения при использовании различных штаммов. Тем не менее, он вполне информативен и точен для больших количеств бактерий (т.е. $>10^4$ для вагинальных смывов) при диагностике выкидышей (Sidi-Boumedine et al., 2010). Что касается комплексных матриц, необходимо оценить элюаты ДНК на способность ингибировать ПЦР путем добавления внутреннего ДНК контроля (такого как последовательность гена-мишени GAPDH) или внешнего контроля.

В продаже имеются готовые к использованию наборы, которые могут выявить бактерии в различных видах проб. Специфические количественные методы на основе ПЦР наборов были валидированы для диагностики выкидышей в соответствии с французским

стандартом валидации ПЦР в реальном времени (Rousset et al., 2012). Внешний эталонный материал бактерий предоставляется французской референтной лабораторией для валидации или контрольного графика рутинного мониторинга качества анализов.

1.4. Методы генотипирования

Судя по широкому кругу хозяев, способности возбудителя длительно сохраняться в окружающей среде, и многочисленным вариантам воздушно-капельного распространения, становится очевидно, что эпидемиология ку-лихорадки довольно сложна. Хотя для понимания эпидемиологии ку-лихорадки в различных географических регионах необходима характеристика изолятов, в настоящее время проводится оценка дискриминационных методов типирования для молекулярной эпидемиологии (Massung et al., 2012, Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). Эти инструменты могут быть очень полезны для эпизоотологического расследования, которое позволит, в частности, выявить источники инфекции, и поможет выявить эпизоотологические факторы, вызывающие вспышки среди людей и уменьшить масштабы применения контрольных мер.

Для характеристики штаммов *Coxiella burnetii* использовали несколько методов типирования. Например, рестрикционная эндонуклеаза в геномной ДНК, гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) и секвенирование и/или ПЦР-ПДРФ (Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов – RFLP) генов *icd*, *com1*, *mucZ*.

Недавно были описаны два метода типирования на основе ПЦР: мультилокусный анализ тандемных повторов (MLVA) и мультиспейсерное сиквенс типирование (MST), которые позволяют типировать *Coxiella burnetii* без необходимости выделения организма. Продолжаются научные исследования в области разработки новых подходов, таких как однонуклеотидный полиморфизм (SNP), сравнения их дискриминационных возможностей и информативной ценности.

В настоящее время MST и MLVA считаются наиболее дискриминационными методами в отношении *Coxiella burnetii*, позволяя идентифицировать до 36 различных генотипов. Более того, были разработаны базы данных по этим методам (<http://mlva.u-psud.fr/MLVAnet> и <http://ifr48.timone.univ.mrs.fr>). Такие базы данных позволяют легко проводить межлабораторное сравнение и дают более ясное понимание принципов размножения изолятов *Coxiella burnetii* или позволяют идентифицировать новые эмерджентные штаммы. Более того, эти методы все чаще используют для характеристики полевых образцов или изолятов, и следует всячески поощрять попытки разработать стандартизированную схему для MLVA, основанную на общих решениях для вызова аллелей и маркерных панелей, которая позволит сделать этот метод более доступным в ближайшем будущем. (Massung et al., 2012; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011; Sidi-Boumedine et al., 2009).

2. Серологические тесты

2.1. Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА)

Как показала сравнительная оценка различных методов, данная методика отличается высокой чувствительностью и достаточной специфичностью (Emery et al., 2014; Horigan et al., 2011; Kittelberger et al., 2009; Niemczuk et al., 2014; Rousset et al., 2007; 2009a). Этим методом легко пользоваться в условиях лабораторий, имеющих необходимое оборудование (спектрофотометр) и реагенты. ИФА предпочтительней, чем РНИФ и РСК. Особенно для диагностики болезней животных, поскольку она удобна для

крупномасштабного скрининга и обладает наибольшей робастностью. Готовые к использованию наборы есть в продаже и позволяют выявить смеси антител антифазы I и II. Контроль качества для некоторых наборов ИФА был усовершенствован при помощи внешних эталонных материалов, предоставленных французской национальной референтной лабораторией, и позволяющих стандартизировать партии наборов.

Антиген *Coxiella burnetii* для ИФА готовят, выращивая стандартные штаммы в куриных эмбрионах или в культуре клеток, как описано ниже для РИФ. Лунки микропланшета сенсибилизируют инактивированным цельноклеточным антигеном *Coxiella burnetii*. Разведенные образцы сыворотки добавляют в лунки, и они реагируют на антигены, связанные с твердофазным носителем. Несвязанный материал удаляют смыванием после необходимого периода инкубации. Конъюгат (меченный пероксидазой хрена антижвачный иммуноглобулин) вступает в реакцию со специфическими антителами, связанными с антигеном. Конъюгат, не вступивший в реакцию, удаляют смыванием после необходимого периода инкубации. Добавляют ферментный субстрат. Степень конверсии субстрата пропорциональна количеству связанных антител. Реакцию останавливают после необходимого периода времени и уровень окрашивания измеряют спектрофотометрическим способом.

2.1.1. Материалы и реагенты

Титрационные микропланшеты с 96 плоскодонными лунками, только что или давно сенсибилизированные антигенами *Coxiella burnetii*; микропланшет-ридер (спектрофотометр; 405 и/или 450 и/или 492 нм фильтры); влажный инкубатор с температурой 37°C; 8 и 12-канальные пипетки с одноразовыми пластиковыми наконечниками; шейкер для микропланшетов (на усмотрение).

Положительные и отрицательные контрольные сыворотки; конъюгат (анти иммуноглобулин жвачных или белок A/G, маркированный пероксидазой); десятикратная концентрация разбавителя (ФБР-Tween); дистиллированная вода; субстрат или хромоген (ТМВ [Тетраметилбензидин]); АВТS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоислота) для пероксидазы); перекись водорода.

2.1.2. Процедура тестирования

- i) Развести пробы сыворотки, включая контрольные сыворотки, до необходимой концентрации (1/100 или 1/400 в зависимости от используемого набора) и распределить 0.1 мл на лунку в двух повторностях. Контрольные сыворотки включают положительные и отрицательные сыворотки, предоставленные производителем, и внутреннюю положительную эталонную сыворотку из лаборатории, чтобы сравнить титры между разными тестами.
- ii) Накрыть планшет крышкой и инкубировать при комнатной температуре в течение 30-90 минут. Удалить содержимое и промыть три раза в промывочном растворе при комнатной температуре.
- iii) Добавить необходимое разведение свежеприготовленного конъюгата в лунки (0,1 мл на лунку).
- iv) Накрыть каждый планшет и инкубировать по схеме из пункта ii. Снова промыть три раза.
- v) Добавить 0,1 мл свежеприготовленного раствора хромогенного субстрата в каждую лунку (например, ТМВ в 0,1 М уксусной кислоты и 30% H₂O₂ раствор [0,2 мкл/мл]; или 0,25 мМ АВТS в цитратно-фосфатном буфере, рН 5,0 и 30% H₂O₂ раствор [0,1 мкл/мл]).

- vi) Встряхнуть планшет; инкубировать в соответствии с рекомендациями производителя, остановить реакцию, добавив стоп-раствор в каждую лунку, например, 0,05 мл 2 М серной кислоты для ТВМ или 10% додецилсульфат натрия для АВТС.
- vii) Считать коэффициент поглощения с каждой лунки с помощью ридера при 405 нм (АВТС) или 450 нм (ТМВ). Показатели поглощения используются для расчета результатов.

2.1.3. Интерпретация результатов

В коммерческих наборах показатели для интерпретации вложены в сами наборы. Например, рассчитать среднюю абсорбцию (Ab) образца сыворотки и положительных (Ab_{pos}) и отрицательных (Ab_{neg}) контрольных сывороток, и для каждой сыворотки рассчитать процент

$$\frac{Ab - Ab_{neg}}{Ab_{pos} - Ab_{neg}} \times 100$$

Интерпретировать результаты по следующей схеме:

Ab < 30% - отрицательная сыворотка

Ab > 30% - положительная сыворотка

Подготовить контрольную карту и рассчитать погрешность измерений величины в точке деления, чтобы интерпретировать результаты, близкие к точке деления.

2.2. Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ)

В системе здравоохранения адаптированный РНИФ в виде микроиммунофлюоресценции является методом серодиагностики ку-лихорадки (Tissoat-Dupont et al., 1994). Процедуру можно адаптировать для выполнения иммунопероксидазного анализа. Вкратце, используются антигены *Coxiella burnetii* фазы I и II; антигены фазы II получают выращиванием эталонного штамма *Coxiella burnetii* Nine Mile в культуре клеток, антиген фазы I получают из селезенки лабораторных животных.

Антиген разводят, выкапывают в лунки предметного стекла, дают высохнуть и фиксируют в ацетоне. Две формы инфекции у людей, острая и хроническая, демонстрируют разные серологические профили: во время острой фазы ку-лихорадки уровень антител IgG повышается только против фазы II, а при хронической форме ку-лихорадки наблюдают высокие уровни антител IgG и к фазе II, и к фазе I (Tissot-Dupont et al., 1994). Кроме того, лунки, отмеченные антигенами, можно купить у поставщика, предоставляющего форму фазы II или фазы I *Coxiella burnetii*. Их можно адаптировать путем замены человеческого конъюгата конъюгатом, адаптированным к различным видам животных. Тем не менее, интерпретация в отношении хронической или острой формы не была еще валидирована для жвачных.

2.2.1. Подготовка антигена

Ниже приведено описание процедуры подготовки *Coxiella burnetii* для серологической диагностики РНИФ на основе антигенов фазы II и фазы I, но в мире используют и другие модифицированные протоколы (Samuel et al., 2009). Значительные количества *Coxiella burnetii* (>10¹⁰ бактерий) можно получить через 2-5 недель в куриных эмбрионах или

культурах клеток. На заражение мышей может потребоваться 7-14 дней. Очистка бактерий от материала хозяина включает дифференциальное центрифугирование и занимает от одного до двух дней.

Штаммы *Coxiella burnetii* Nine Mile Фазы II выращивают в непрерывном слое Vero или L929 клеток в колбах для разведения культуры объемом 150 см² при 35°C при 5% CO₂ с минимальной поддерживающей средой, обогащенной 2 mM L- глутамином и 4% фетальной телячьей сывороткой. Заражение контролируют с помощью микроскопического исследования внутриклеточных вакуолей или с помощью клеток, окрашенных по методу Gimenez, собранных из супернатанта в колбах. Для целей текущего мониторинга оказались чрезвычайно полезными недавние специфические количественные ПЦР исследования в реальном времени. Если наблюдают тяжелое заражение *Coxiella burnetii*, супернатанты из 15 колб по-отдельности осаждают центрифугированием (5000 g, 15 минут), ресуспендируют в 1 мл ФБР с 0,1% формальдегида и инкубируют на 24 часа при 4°C.

После объединения в пул оставшиеся клетки разрушают ультразвуком. Клеточные дебрис удаляют в ходе двух последующих этапов центрифугирования (100 g, 10 минут каждое). Суспензию в объеме 15 мл затем центрифугируют через 20 мл ФБР с 25% сахарозой (6000 g, 30 минут, без перерыва). Полученный в результате осадок смывают трижды в ФБР (6000 g, 10 минут), ресуспендируют в наименьшем возможном объеме стерильной дистиллированной воды и доводят до 2 мг/мл с помощью УФ - спектроскопии. Затем добавляют антибактериальный консервант, азид натрия, в итоговом разведении 0.1% или тиомерсал в концентрации 0,01%. Антиген, приготовленный таким образом замораживают при -20°C.

Для получения антигена фазы I мышам вводят возбудитель *Coxiella burnetii*, выращенный в клетках (в основном в фазе II). Селезенки удаляют через 9 дней после заражения. Каждую выращивают в 7.5 мл МЕМ и вводят в три культуральные колбы объемом 75см², содержащие клеточные монослои L929 или Vero (2,5 мл на колбу). Амплификацию *Coxiella burnetii* фазы I проводят в течение 4 недель с заменой культуральной среды раз в неделю. Зараженные клетки затем собирают, а бактерии очищают по схеме, описанной выше (в основном в фазе I).

Производить антиген можно также путем культивирования *Coxiella burnetii* в СПФ-эмбрионах. Микроорганизм вводят в желточный мешок яйца с 6-7 дневными эмбрионами, затем через 10-15 дней инкубации осуществляют сбор. Зараженные желточные мешки имеют типичную соломенно-желтую окраску с белыми пятнами. Незараженные желточные мешки имеют оранжевую окраску и отличаются вязкой консистенцией.

Все эмбрионы, погибшие до 5 дня инкубации, отбраковывают. Штамм, используемый для инокуляции яиц, является 1/100 гомогенатом желточного мешка в ФБР, содержащем пенициллин (500 международных единиц/мл) и стрептомицин (0,5 мг/мл). Желточные мешки объединяют в пул и гомогенизируют с тремя частями ФБР. Суспензию инактивируют в 1.6% формальдегиде в течение 24 часов при температуре 37°C. Затем сливают жидкий липидный супернатант. Суспензию центрифугируют при умеренной скорости (~ 500 g) в течение 30 минут. После удаления жидкости супернатанта добавляют больше ФБР и повторяют центрифугирование. Итоговую суспензию разводят в ФБР. В качестве антибактериального консерванта добавляют азид натрия или тиомерсал. Обильное содержание *Coxiella burnetii* и отсутствие бактериальных контаминантов в гомогенатах желточных мешков, суспендированных в ФБР проверяют при микроскопическом исследовании мазка на предметном стекле, окрашенном по методу

Stamp. Чтобы получить антиген фазы I можно размножить *Coxiella burnetii*, выделенный из материала селезенки зараженных лабораторных животных, поскольку измельченные экстракты селезенки далее переносят в желточные мешки, учитывая, что количество клеток фазы I по-прежнему высоко до шестого пассажа на яйцах.

Титрации антигена с тремя разными известными сыворотками (с высокими, умеренными и низкими титрами, соответственно) достаточно, чтобы определить необходимое разведение для дальнейших тестов иммунофлюоресценции.

2.2.2. Материалы и реагенты

Микроскоп для флуоресценции, влажная камера, чаша для промывания.

Необходимо найти подходящие для антигенов предметные стекла. Антигены могут быть либо приготовлены в лаборатории или их можно купить у поставщика (см. выше). Описанный метод взят из набора BioMerieux, в качестве примера. На каждом готовом к использованию предметном стекле расположено 12 лунок, 7 мм в диаметре каждая, сенсibilизированные антигеном фазы II, полученных из культуры Vero клеток, и их можно хранить при 4°C или -20°C.

Концентрированный флуоресцентный конъюгат, который следует развести в ФБР +1% голубой Эванс в разведении, рекомендованном производителем.

ФБР, забуференный глицерин, 1% раствор красителя голубой Эванс.

2.2.3. Процедура тестирования

Двукратные разведения тестируемой сыворотки размещают на предметных стеклах с лунками, сенсibilизированными одним или двумя антигенами. При наличии специфических антител они связываются антигеном на стекле. Затем комплекс выявляют в ходе флуоресценции после добавления флуоресцентного конъюгата, распознающего видоспецифические иммуноглобулины.

- i) Приготовить серийные разведения сывороток от 1/40 до 1/640 в ФБР.
- ii) Нагреть предметные стекла, ранее сенсibilизированные антигеном, до комнатной температуры. Не трогать лунки.
- iii) Добавить 20 мкл каждого разведения сыворотки в лунки. Добавить отрицательные и положительные контрольные сыворотки. В одну лунку добавить 20 мкл ФБР в качестве контроля антигена.
- iv) Инкубировать во влажной камере в течение 30 минут при 37°C. Промыть предметное стекло дважды в ФБР в течение 10 минут каждое. Ополоснуть дистиллированной водой и просушить на воздухе.
- v) Добавить в лунки, включая контроли, 20мкл конъюгата против соответствующего вида (например, кроличий анти-козий или анти-овечий IgG[H+L], меченный ФИТЦ), свежеразбавленного в ФБР+голубой Эванс. Инкубировать во влажной камере в течение 30 минут при 37°C. Ополоснуть дистиллированной водой и просушить на воздухе. Добавить несколько капель забуференного глицерина и накрыть покровным стеклом. Проверить в флуоресцентном микроскопе при увеличении x 400 или больше.

2.2.4.Интерпретация результатов

Положительная реакция проявит себя в виде небольших ярких включений на темном фоне. Проверьте, чтобы сам конъюгат и отрицательная контрольная сыворотка давали отрицательный результат (отсутствие небольших ярких включений). Неспецифическая флуоресценция обычно проявляется пятнами неправильной формы. Положительные контроли должны давать известные титры с \pm одним разведением.

2.3. Реакция связывания комплемента (РСК)

РСК считается менее чувствительным тестом, чем ИФА и РНИФ, и по этой причине его не используют для диагностики болезней животных.

Микрометод холодной фиксации, разработанный Kolmer, применяют с использованием 96-луночного микропланшета с U-образным дном. Данный тест позволяет выявить комплемент-фиксирующие антитела, присутствующие в сыворотке. В этом методе используют антиген смеси фазы I и II, приготовленной из штаммов человека или штамма Nine Mile.

Реакцию проводят в два этапа. Сначала смешивают антиген и комплемент-фиксирующие антитела, инкубируют их в течение ночи при 4°C. На следующий день добавляют эритроциты овцы, сенсibilизированные антиовечьей сывороткой. Фиксация комплемента комплексом антиген/антитело на первом этапе не допускает лизиса эритроцитов; в противоположность этому, если нет комплемент - фиксирующих антител, то комплемент вызывает лизис сенсibilизированных эритроцитов. Скорость гемолиза обратно пропорциональна уровню специфических антител в образце сыворотки.

2.3.1. Реагенты

Вероналовый/кальциевый/магниевый буфер (VB), pH 7.2.

Гемолитическая система: смесь из равных частей 2% суспензии эритроцитов овцы в VB; гемолитическая сыворотка, разведенная до специфического титра в VB.

Комплемент: коммерческий лиофилизированный препарат или свежая сыворотка от морской свинки.

Антиген: используйте коммерческие антигены в концентрации титров, рекомендованных производителем, если титрацию антигенов проводят этим методом.

Положительные и отрицательный контрольные сыворотки.

2.3.2. Предварительная титрация

- i) Развести эритроциты овцы до итоговой концентрации 2% в VB.
- ii) Титровать гемолитическую сыворотку на микропланшете: 25 мкл комплемента в известной гемолитической концентрации (например, 1/30); 25 мкл растущих разведений гемолитической сыворотки +2% овечьих эритроцитов. Включить контроли без комплемента. Инкубировать в течение 30 минут при 37 °C. Установить разведение, равное 2 гемолитическим единицам.
- iii) Развести антиген в соответствии с рекомендациями производителя. Антиген можно также титровать: приготовить растущие разведения антигена (25 мкл горизонтально) и положительную сыворотку с известным показателем титров (25мкл, вертикально). Добавить 25 мкл суспензии сенсibilизированных эритроцитов и инкубировать в течение 30 минут при 37 °C. Титр антигена –

наивысшее разведение, вызывающее положительную реакцию с наивысшим разведением сыворотки. Проверить отсутствие антикомплементарной активности антигена при различных разведениях.

- iv) Титровать комплемент на микропланшете: серийно развести комплемент или сыворотку от морской свинки в VB, например, с 1/15 до 1/200. В каждую лунку, содержащую 25 мкл этого разведения, добавить 25 мкл антигена и 25 мкл гемолитической системы. Инкубировать в течение 30 минут при 37°C и установить разведение, равное 2 гемолитическим единицам комплемента.

2.3.3. Процедура тестирования

- i) Приготовить двукратное разведение образцов инактивированной сыворотки от 1/10 до 1/320 в шести лунках и в четырех дополнительных лунках при разведениях от 1/10 до 1/80 для выявления антикомплементарной активности (25 мкл на лунку).
- ii) Добавить 25 мкл разведенного антигена или 25 мкл VB в лунки с контрольной сывороткой.
- iii) Добавить 25 мкл разведенного комплемента во все лунки. Накрывать планшет пластиковой клейкой пленкой и инкубировать в течение 18 часов при 4 °С.
- iv) Вынуть планшеты из холодильника. Выдержать их до достижения комнатной температуры и добавить 25 мкл свежеприготовленной гемолитической системы. Инкубировать при 37°C в течение 30 минут. Центрифугировать планшеты при 500g в течение 5 минут при 4 °С. Проверить контроли и считать результаты.

2.3.4. Интерпретация результатов

Титры между 1/10 и 1/40 указывают на латентное заражение. Титры от 1/80 и выше в одной или нескольких сыворотках из группы или от 5-10 животных указывают на активную фазу заражения.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

РАЗДЕЛ НАХОДИТСЯ НА СТАДИИ ИЗУЧЕНИЯ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ANDERSON A., BIJLMER H., FOURNIER P.E., GRAVES S., HARTZELL J., KERSH G.J., LIMONARD G., MARRIE T.J., MASSUNG R.F., MCQUISTON J.H., NICHOLSON W.L., PADDOCK C.D. & SEXTON D.J. (2013). Diagnosis and management of Q fever – United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm. Rep.*, 62 (RR-03), 1–30
- ARRICAU-BOUVERY N., SOURIAU A., BODIER C., DUFOUR P., ROUSSET E. & RODOLAKIS A. (2005). Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine*, 23, 4392–4402.
- BEARE P.A., UNSWORTH N., ANDOH M., VOTH D.E., OMSLAND A., GILK S.D., WILLIAMS K.P., SOBRAL B.W., KUPKO J.J. 3RD, PORCELLA S.F., SAMUEL J.E. & HEINZEN R.A. (2009). Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.*, 77, 642–656.
- BERRI M., LAROUCAU K. & RODOLAKIS A. (2000). The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 72, 285–293.
- DRANCOURT M. & RAOULT D. (2005). Genus I. *Coxiella*. In: *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*, Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. & Garrity G.M., eds. Springer-Verlag, East Lansing, MI, USA, 237–241.
- DE CREMOUX R., ROUSSET E., TOURATIER A., AUDUSSEAU G., NICOLLET P., RIBAUD D., DAVID V. & LE PAPE M. (2012). *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 64, 120–122.
- ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) (2010). Panel with Representatives from the Netherlands, France, Germany, United Kingdom, United States of America. Risk assessment on Q fever. ECDC Technical Report, 40 pp. doi:10.2900/28860. Available online: www.ecdc.europa.eu
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (2010). Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Q Fever. *EFSA Journal*, 8 (5), 1595, 114 pp. doi:10.2903/j.efsa.2010.1595. Available online: www.efsa.europa.eu
- EMERY M.P., OSTLUND E.N., AIT ICHOU M., BALLIN J.D., MCFARLING D. & MCGONIGLE L. (2014). *Coxiella burnetii* serology assays in goat abortion storm. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 26, 141–145.
- GIMENEZ D.F. (1964). Staining rickettsiae in yolk-sack cultures. *Stain. Technol.*, 39, 135–140.
- GUATTEO R., BEAUDEAU F., JOLY A. & SEEGER H. (2007). *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.*, 38 (6) 849–860.
- GUATTEO R., SEEGER H., JOLY A. & BEAUDEAU F. (2008). Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine*, 26 (34), 4320–4338.

- HEINZEN R.A., HACKSTADT T. & SAMUEL J.E. (1999). Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.*, 7, 149–154.
- HORIGAN M.W., BELL M.M., POLLARD T.R., SAYERS A.R. & PRITCHARD G.C. (2011). Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 23, 924–931.
- JENSEN T.K., MONTGOMERY D.L., JAEGER P.T., LINDHARDT T., AGERHOLM J.S., BILLE-HANSEN V. & BOYE M. (2007). Application of fluorescent in situ hybridisation for demonstration of *Coxiella burnetii* in placentas from ruminant abortions. *APMIS*, 115, 347–353.
- KERSH G.J., WOLFE T.M., FITZPATRICK K.A., CANDEE A.J., OLIVER L.D., PATTERSON N.E., SELF J.S., PRIESTLEY R.A., LOFTIS A.D. & MASSUNG R.F. (2010). Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States (2006–2008). *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 4469–4475.
- KITTELBERGER R., MARS J., WIBBERLEY G., STING R., HENNING K., HORNER G.W., GARNETT K.M., HANNAH M.J., JENNER J.A., PIGOTT C.J. & O’KEEFE J.S. (2009). Comparison of the Q fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants: Recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. *NZ Vet. J.*, 57 (5), 262–268.
- KLEE S.R., TYCZKA J., ELLERBROK H., FRANZ T., LINKE S., BALJER G. & APPEL B. (2006). Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.*, 6, 2.
- LANG G.H. (1990). Coxiellosis (Q fever) in animals. In: *Q Fever. Volume I: The Disease*, Marrie T.J., ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 23–48.
- MASSUNG M.F., CUTLER S.J. & FRANGOULIDIS D. (2012). Molecular typing of *Coxiella burnetii* (Q fever). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 984, 381–396.
- MINNICK R.F. & RAGHAVAN R. (2012). Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 984, 231–248.
- NIEMCZUK K., SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA M., ŚMIETANKA K. & BOCIAN Ł. (2014). Comparison of diagnostic potential of serological, molecular and cell culture methods for detection of Q fever in ruminants. *Vet. Microbiol.*, 171, 147–152.
- O’NEILL T.J., SARGEANT J.M. & POLJAK Z. (2013). A systematic review and meta-analysis of Phase I inactivated vaccines to reduce shedding of *Coxiella burnetii* from sheep and goats from routes of public health importance. *Zoonoses Public Health*, 61, 519–533.
- QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. (1994). Bacterial pathogens: microscopy, culture and identification. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, Mosby-Year Book Europe Limited, 21–30.
- RAOULT D., LAURENT J.C. & MUTILLOD M. (1994). Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetii* for antigenic detection in cell cultures and in paraffin-embedded tissues. *Am. J. Clin. Pathol.*, 101, 318–320.

RAOULT D., VESTRIS G. & ENEA M. (1990). Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2482–2484.

ROEST H.-J., VAN GELDEREN B., DINKLA A., FRANGOULIDIS D., VAN ZIJDERVELD F., REBEL J. & VAN KEULEN L. (2012). Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS ONE*, 7 (11), e48949. doi:10.1371/journal.pone.0048949].

ROUSSET E., BERRI M., DURAND B., DUFOUR P., PRIGENT M., DELCROIX T., TOURATIER A. & RODOLAKIS A. (2009a). *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 428–433.

ROUSSET E., DURAND B., BERRI M., DUFOUR P., PRIGENT M., RUSSO P., DELCROIX T., TOURATIER A., RODOLAKIS A. & AUBERT M.F. (2007). Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet. Microbiol.*, 124, 286–297.

ROUSSET E., DURAND B., CHAMPION J.L., PRIGENT M., DUFOUR P., FORFAIT C., MAROIS M., GASNIER T., DUQUESNE V., THIERY R. & AUBERT M.F. (2009b). Efficiency of a phase I vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *CMI*, 15 (suppl 1), 1–2.

ROUSSET E., PRIGENT M., AMEZIANE G., BRUGIDOU R., MARTEL I., GROB A., LE GALL G., KERNINON S., DELAVAL J., CHASSIN A., VASSILOGLOU B., AULAGNON S., VALOGNE A., OGIER M., AUDEVAL C., COLOCCI F., PERENNES S., CAZALIS L., NICOLLET P., MAINGOURT C. & SIDI-BOUMEDINE K. (2012). Adoption by a network's laboratories of a validated quantitative real-time PCR method for monitoring Q fever abortions in ruminant livestock. *Euroreference*. No. 8, 21–27. Available online: <https://pro.anses.fr/euroreference/Documents/ER08-Meth-FievreQAvortEN.pdf>

SAMUEL J.E. & HENDRIX L.R. (2009). Laboratory maintenance of *Coxiella burnetii*. *Curr. Proto. Microbiol.*, 6C (suppl. 15), 1–16.

SCOTT G.H., WILLIAMS J.C. & STEPHENSON E.H. (1987). Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 691–700.

SERBEZOV V.S., KAZAR J., NOVKIRISHKI V., GATCHEVA N., KOVACOVA E. & VOYNOVA V. (1999). Q fever in Bulgaria and Slovakia. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 388–394.

SESHADRI R., PAULSEN I.T., EISEN J.A., READ T.D., NELSON K.E., NELSON W.C., WARD N.L., TETTELIN H., DAVIDSEN T.M., BEANAN M.J., DEBOY R.T., DAUGHERTY S.C., BRINKAC L.M., MADUPU R., DODSON R.J., KHOURI H.M., LEE K.H., CARTY H.A., SCANLAN D., HEINZEN R.A., THOMPSON H.A., SAMUEL J.E., FRASER C.M. & HEIDELBERG J.F. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 5455–5460.

SIDI-BOUMEDINE K., DUQUESNE V., ROUSSET E., COCHONNEAU D., CUTLER S.J., FRANGOULIDIS D., RODOLAKIS A., ROEST H.J., RUULS R., VAN ROTTERDAM B., VINCENT G. & THIÉRY, R. (2009). A multicentre MLVA and MST typing-ring trial for C.

burnetii genotyping: An approach to standardisation of methods. 5th MedVetNet Annual Scientific Conference. Madrid, Spain.

SIDI-BOUMEDINE K. & ROUSSET E. (2011). Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. EuroReference, No. 5, 30–37. Available online: <http://www.ansespro.fr/euroreference/numero5/PNB0I0.htm>

SIDI-BOUMEDINE K., ROUSSET E., HENNING K., ZILLER M., NIEMCZUCK K., ROEST H.I.J. & THIÉRY R. (2010). Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA Scientific Report on Question No EFSA-Q-2009-00511., 48 pp. Available online: www.efsa.europa.eu

SOLIMAN A.K., BOTROS B.A. & WATTS D.M. (1992). Evaluation of a competitive immunoassay for detection of *Coxiella burnetii* antibody in animal sera. J. Clin. Microbiol., 30, 1595–1597.

STEMMLER M. & MEYER H. (2002). Rapid and specific detection of *Coxiella burnetii* by LightCycler PCR. In: Methods and Applications. Microbiology and Food Analysis, Reisch U., Wittwer C. & Cockerill F., eds. Springer, Berlin, Germany 149–154.

THIELE D., KARO M. & KRAUSS H. (1992). Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella burnetii* in clinical specimens. Eur. J. Epidemiol., 8, 568–574.

TISSOT-DUPONT H., THIRION X. & RAOULT D. (1994). Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 1, 189–196.

VAN ASSELDONK M.A., PRINS J. & BERGEVOET R.H. (2013). Economic assessment of Q fever in the Netherlands. Prev. Vet. Med., 112, 27–34.

* * *

NB: Есть референтная лаборатория МЭБ по ку-лихорадке (см Таблицу в Части 4 этого Руководства по наземным животным или информацию на веб-сайте МЭБ по ссылке: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>. Для получения дополнительной информации по методам диагностики, реагентам и вакцинам от ку-лихорадки свяжитесь с референтными лабораториями МЭБ.