НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА

З л е н к о
О к с а н а Б о р и с і в н а

УДК 619:616.98-078:579.841.95:57.083.33:577.2.08:636

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМІЇ (ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ ТА ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ), ЕПІЗООТОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ І ГЕНОТИПУВАННЯ ЗБУДНИКА

03.00.20 — біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ — 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН України

Науковий керівник: доктор ветеринарних наук,
професор, член-кореспондент НААН
заступник директора з наукової роботи
Герілович Антон Павлович
Національний науковий центр
«Інститут експериментальної і
клінічної ветеринарної медицини» НААН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
завідувач кафедри органічного синтезу і
нанотехнологій
Кричковська Лідія Василівна,
Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут»

доктор біологічних наук, професор
головний науковий співробітник
відділу молекулярної імунології
Колибо Денис Володимирович,
Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

Захист відбудеться «29» березня 2021 р. о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01154, м. Київ, вулиця Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01154, м. Київ, вулиця Леонтовича, 9.

Автореферат розісланий «__» лютого 2021 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук Карлова Н.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Туляремія - це зоонозна інфекція, що спричиняється грам-негативною бактерією *Francisella tularensis*. Це захворювання є ендемічним у більшості європейських країн. Природні вогнища туляремії є стійкими, вони можуть існувати століттями, проявляючи себе періодичними спалахами захворювань серед гризунів і епідеміями серед людей. У ендемічній зоні туляремія може виникати щорічно чи з перервою у десятиріччя. Тварини-носії являють епізоотологічну небезпеку для людини, інфікуючи виділеннями воду, побутові речі, харчові продукти. При «наземній» циркуляції, *F.tularensis* репродукується в організмах гризунів і лагоморф. Передача захворювання здійснюється переважно членистоногими векторами. При «водній» циркуляції, джерелами інфекції є бобри, ондатри та водяні щурі, в організмі яких збудник персистує протягом тривалого часу, а його передача до людей та сприйнятливих тварин відбувається через контаміновану воду. Передача туляремії від людини до людини не була описана. (Pearson A. et. al, 1998; Oyston P. et.al.,2004; Sjostedt A, 2007).

В Україні епідемічна та епізоотична ситуація в різні роки була неоднаковою і залежала від соціально-економічних умов, рівня діагностики, якості проведення відповідних заходів та координації дій фахівців медичної та ветеринарної служб. Було встановлено, що під час збройних конфліктів у Косово, Боснії та Герцеговині, а також за часів Другої світової війни відмічалася значна кількість спалахів туляремії внаслідок загального погіршення рівня гігієни населення і санітарних умов. Тому, для України ця проблема набуває особливої актуальності через проведення бойових дій на сході України, адже великі території наразі є неконтрольованими (Reintjes R. et.al., 2002; Hightower J et.al.., 2014; Hestvik V. et.al., 2015; Болотін В. та ін., 2016).

Зважаючи на те, що наразі бракує вітчизняних тест-систем для ідентифікації збудника туляремії, розробка та вдосконалення методів діагностики на основі полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу є безумовно перспективним напрямком досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася впродовж 2015-2020 рр. згідно аспірантського плану наукових досліджень ННЦ «ІЕКВМ», затвердженого Національною академією наук України, та у рамках завдання 38.01.01.02 Ф «Встановити видо- та родоспецифічні генетичні маркери збудників емерджентних інфекційних захворювань ВРХ, свиней, птиці та розробити методологію їх моніторингу і діагностики на основі молекулярно-генетичних технологій» (2016-2020 рр., номер держреєстрації 0116U000237), а також за підтримки Інституту Мікробіології Бундесверу та GIZ Gmbh у рамках проекту «Україно-німецька ініціатива «Біологічна безпека з управління зоонозними ризиками на територіях, розташованих біля зовнішніх кордонів країн-членів Європейського союзу» (2016-2020 рр., номер держреєстрації 16.9072.6-007.04.)

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є розробка і вдосконалення засобів діагностики туляремії на основі ПЛР та ІФА, проведення молекулярно-генетичного скринінгу і серомоніторингу щодо поширення туляремії, а також аналіз генетичних маркерів мінливості ізолятів *F.tularensis*, виділених на території України.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

- сконструювати і отримати рекомбінантні антигени на основі білків GroEl, SucB та FTT0975 для ідентифікації антитіл до збудника туляремії методом ІФА.

- сконструювати і отримати рекомбінантний позитивний контроль гена *tul4 F. tularensis* для діагностики збудника туляремії методом ПЛР у реальному часі.

- дослідити епізоотичну ситуацію з туляремії на території України молекулярно-генетичними і серологічними методами.

- проаналізувати генетичні маркери мінливості культур *F. tularensis*, виділених на території України у 1996-2016 рр.

Об'єкт дослідження: туляремія та її лабораторна діагностика.

Предмет дослідження: геном та антигенні детермінанти *F. tularensis*, біологічні, молекулярно-генетичні та філогеографічні особливості збудника туляремії, конструювання рекомбінантних антигенів та плазмідних контролів для серологічної та молекулярної діагностики туляремії, MLVA-типування збудника *F. tularensis*.

Методи дослідження: Робота виконана з використанням молекулярно-генетичних (ПЛР, MLVA-типування, секвенування), біотехнологічних (генна інженерія, хроматографія, культивування гібридом), серологічних (ІФА, вестерн-блотинг), філогенетичних (MLVA-типування і кластеризація), біоінформатичних, у т.ч. математико-статистичних методів досліджень (аналіз нуклеотидних послідовностей, аналіз відповідностей, метод невиваженого попарного середнього, стандартне відхилення, коефіцієнт варіативності).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше в Україні розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантних антигенів на основі протеїнів GroEl, SucB, FTT0975 для ідентифікації антитіл проти збудника туляремії у сироватках крові від свині та людини методом ІФА, а також розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантного позитивного контролю для ідентифікації генетичного матеріалу *F.tularensis* методом ПЛР. Новизна зазначених розробок підтверджена 3 патентами України на корисну модель.

Вперше на території України був проведений серомоніторинг щодо туляремійної інфекції серед диких кабанів (*Suc scrofa*), у ході якого було встановлено наявність антитіл до *F.tularensis* серед диких кабанів в 12 областях України. Найбільший відсоток позитивності до *F.tularensis* було виявлено в Чернівецькій (50%), Хмельницькій (41,2%), Чернігівській (33,3%) і Харківській (21%) областях України.

Отримані нові дані з епізоотологічного стану щодо туляремії на територіях Харківської, Дніпропетровської і Миколаївської областей у результаті проведення епізоотичного скринінгу з використанням молекулярно-генетичних методів і з відбором різноманітного польового матеріалу (зразки від гризунів, кліщі та об'єкти

середовища). Було підтверджено циркуляцію *F.tularensis* на територіях Харківської (23% зразків було позитивними), Дніпропетровської (1,9% зразки було позитивними) і Миколаївської областей (0,4% зразки було позитивними). Встановлено, що частота виявлення генетичного матеріалу *F. tularensis* найвища серед зразків кліщів родини *Ixodidae*.

Вперше при використанні методу MLVA проведено генотипування 20 українських ізолятів *F.tularensis* за 12 локусами, внаслідок чого визначені їх генотипи та спорідненість з іншими генетично подібними популяціями. Встановлено генотип *F.tularensis*, що був віднесений до «європейського» кластеру, який превалював впродовж 10 років у більшості областей України.

Практичне значення одержаних результатів. Результати досліджень використано для розробки нормативної документації щодо способу отримання рекомбінантних протеїнів, деклараційний патент України на корисну модель № UA 143739 «Спосіб отримання рекомбінантних антигенів GroElFTT, FTT0975, SucBFTT для діагностики туляремії за допомогою ІФА», а також виготовлення, контролювання та застосування ПЛР-тест-системи з рекомбінантним позитивним контролем для виявлення ДНК збудника туляремії, деклараційний патент України на корисну модель № UA 135803 «Рекомбінантний контрольний зразок для виявлення ДНК збудника туляремії методом полімеразної ланцюгової реакції pTZ57R/T_FTFP» і №UA 133254 «Тест-система для виявлення ДНК збудника туляремії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції "Tul-DNA-test"».

Результати роботи покладені у «Методичні рекомендації щодо лабораторної діагностики туляремії методами полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу», розглянуті та схвалені методкомісією ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 6.11.2019 р., та затверджені Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 1 від 11.04.2020 р.).

Розроблені та вдосконалені методики серологічного (ІФА, вестерн-блотинг) та генетичного (ПЛР) досліджень на туляремію клінічних зразків та зразків середовища, рекомендовані до використання у роботі спеціалістами гуманної та ветеринарної медицини.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто проведено основний обсяг пошукових, аналітичних та експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів, статистична обробка даних, формулювання висновків і практичних пропозицій, а також оформлення рукопису. Отримання рекомбінантних протеїнів та MLVA-генотипування були здійснені за участю доктора Юлії Шварц на базі Інституту мікробіології Бундесверу (Німеччина). Серологічні дослідження (конкурентний ІФА та вестерн-блотинг) були проведені за протоколом Інституту мікробіології Бундесверу та оптимізовані для роботи в ННЦ «ІЕКВМ» особисто здобувачем. Збір польового матеріалу для епізоотичного скринінгу проведено здобувачем сумісно з головним ентомологом Г.Є. Ткачем (ДУ «Харківський обласний лабораторний центр»). Частина матеріалу для досліджень була люб’язно надана завідуючою лабораторії особливо небезпечних інфекцій Винокуровою К. В. (ДУ «Миколаївський обласний лабораторний центр»), головним лікарем-епідеміологом Дніпропетровської області Шамичковою Г. Р. (ДУ

«Дніпропетровський обласний лабораторний центр») та заступником директора з наукової роботи Інституту ветеринарної медицини НААН, доктором вет.наук Ситюком М. П. Молекулярно-генетичні дослідження проведені на базі ННЦ «ІЕКВМ» особисто здобувачем з використанням власних розробок. Опрацювання результатів проведені пошукувачем під керівництвом заступника директора з наукової роботи ННЦ «ІЕКВМ», доктора вет. наук, член-кореспондента НААН Геріловича А.П.

Апробація результатів досліджень Основні результати були представлені, обговорені та схвалені на звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» у 2015-2020 рр., а також на наступних наукових конференціях: - Міжнародній науково-практичній конференції «Транскордонні емерджентні хвороби тварин (африканська чума свиней, нодулярний дерматит ВРХ, грип птиці, блютанг, бруцельоз та ін.): актуальні аспекти біологічної безпеки та контролю» (м. Одеса, 2017р.), - 2-му Всеукраїнському дослідницькому симпозіумі «Єдине здоров'я» (м. Київ, 2017), - 3-му Всеукраїнському дослідницькому симпозіумі «Єдине здоров'я» (м. Київ, 2018), - 5-му Європейському симпозіумі з приводу хламідіозу тварин (ЕМАС-5) (Одеса, 2018), - 16-й конференції з медицинської біобезпеки (м. Мюнхен, 2018), - Всеукраїнській науково-практичній конференції «Інфекційні хвороби в практиці лікаря-інтерніста: сучасні аспекти» (м. Суми, 2018), - 4-му Всеукраїнському дослідницькому симпозіумі «Єдине здоров'я» (м. Київ, 2019), - Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека (м. Київ, 2019); - симпозіумі з біобезпеки і біозахисту «One health – one vision», (м. Тбілісі, 2019); - семінарському засіданні в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна (м. Київ, 2020).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 17 наукових праць, з яких 5 – у фахових виданнях України, одна – у зарубіжному фаховому виданні, одні методичні рекомендації а також 3 описи до деклараційних патентів України на корисну модель.

Структура дисертації. Основний зміст дисертації викладено на 131 сторінці комп'ютерного тексту та ілюстровано 12 таблицями і 32 рисунками. Робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів та їх обговорення, висновків, списку джерел літератури, який містить 130 найменувань, та додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

У розділі детально описано біологічні, генетичні та епідеміологічні характеристики збудника туляремії *F.tularensis*, наведена актуальна ситуація з поширення туляремії в світі та в Україні. Представлено огляд методів лабораторної діагностики туляремії (культивування збудника, серологічні дослідження, визначення генетичного матеріалу методом ПЛР та різновиди генотипування). Проаналізовано доцільність застосування цих методів для

різних підходів, їх переваги та недоліки. Висвітлено необхідність та можливі варіанти удосконалення методів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження, результати яких викладені у дисертаційній роботі, виконані в період з 2015 по 2020 рр. у відділі молекулярної епізоотології та діагностики Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Частину експериментальних даних було отримано на базі Інституту мікробіології Бундесверу (Мюнхен, Німеччина).

Створення рекомбінантних антигенів

Для створення рекомбінантних антигенів були обрані три протеїни *F.tularensis*, що мають антигенні властивості: 2-оксоглутаратдегідрогеназа, компонент Е2, дигідроліпоамід сукцинілтрансферази (SucB), шаперон 60 (GroEl) та потенційний протеїн FTT0975. Амплікони для вказаних протеїнів напрацьовували з використанням специфічних праймерних систем власної розробки. Рестрікційний аналіз та лігацію у вектор pASG103 проводили з використанням рестриктази ESP31. Трансформацію проводили з використанням компетентних клітин *E.coli* Lemo21(DE3). Отримані трансформовані клітини висівали на чашки Петрі з середовищем LB і карбеніциліном.

Для перевірки отриманих клонів-продуцентів обирали лише незабарвлені колонії та проводили класичну ПЛР з праймерними системами, що використовувались при напрацюванні ампліконів. Позитивні колонії культивували в поживному бульйоні LB з карбеніциліном та проводили екстракцію плазмід з рекомбінантної культури клітин *E. coli* комерційним набором «Plasmid Miniprep Kit» згідно інструкції виробника. Отримані плазміди секвенували для перевірки правильності послідовностей та рамки зчитування лігованого ПЛР-продукту. 24-годинну культуру отриманих клонів індукували ангідротетрацикліном протягом 3-6 годин. Хроматографічну очистку проводили за принципом афінності з використанням рідинного хроматографу Akta Pure та колонок StrepTacin XT. Для перевірки якості очистки протеїнів вимірювали їх концентрацію та проводили вертикальний електрофорез і вестерн-блотинг зі вторинними Strep-tag антитілами згідно протоколу виробника Strep-tag колонок.

Створення рекомбінантного позитивного контролю

З метою конструювання плазмідного контролю, напрацьовані за допомогою ПЛР ділянки гену *tul4* збудника туляремії були екстраговані з гелю за допомогою комерційного набору «GeneJet Gel Extraction kit» згідно інструкції виробника. Екстраговані продукти ампліфікації вбудовували шляхом лігіювання до плазмідного вектору pTZ57R/T з використанням комерційного набору «Ins TA clone PCR Cloning Kit». Хімічну трансформацію бактерій *E. coli* штаму DH5*a* проводили з використанням компетентних клітин, підготовлених за методикою Chang A. та співавторів [93]. Трансформовані клітини *E. coli* штаму DH5*a* висівали на LB-агар з додаванням ампіциліну та інкубували в шейкері-інкубаторі за температури 37 °С. Для контролю лігації проводили

блакитно-білий скринінг з додаванням до чашок Петрі, окрім ампіциліну, IPTG (50 мг/мл) та X-Gal (50 мг/мл), після чого обирали для подальших досліджень лише білі колонії.

Скринінг трансформованих бактеріальних колоній щодо наявності рекомбінантних плазмід проводили за допомогою ПЛР з використанням праймерних систем FT-FP_F/R та M13 _F/R. Секвенування плазмід проводили в компанії Eurofins BioPharma Product Testing (Мюнхен, Німеччина).

Проведення серомоніторингу та молекулярно-генетичного скринінгу

З метою аналізу поширення туляремії на території України дослідили 707 зразків сироваток крові від диких кабанів із 18 областей України (Вінницька, Донецька, Житомирська, Запорізька, Івано-Франківська, Кіровоградська, Київська, Луганська, Одеська, Полтавська, Рівненська, Сумська, Тернопільська, Харківська, Херсонська, Хмельницька, Чернівецька, Чернігівська). Зразки були досліджені методом конкурентного імуноферментного аналізу і*n-house,* розробленим Інститутом мікробіології Бундесверу. Позитивні зразки були підтверджені методом імуноблотингу.

Крім цього, з метою вивчення епізоотичної ситуації щодо туляремії проводили дослідження хвостів гризунів, кліщів, пелет, зразків води та сіна у природних осередках на території Харківської (n=380), Дніпропетровської (n=105) та Миколаївської (n=501) областей. Зразки на території Харківської області були відібрані дисертантом власноруч, у складі зоологічної групи ДУ «Харківський ОЛЦ МОЗ України», а саме за участю головного ентомолога Харківської області Ткача Г.Є.; зразки для дослідження із Дніпропетровської області були надані завідуючою відділенням особливо небезпечних інфекцій Шамичковою Г.Р. (ДУ «Миколаївський ОЛЦ МОЗ України»); зразки із Миколаївської області були надані завідуючою відділенням особливо небезпечних інфекцій Винокуровою К.В. (ДУ «Миколаївський ОЛЦ МОЗ України»). Екстракцію ДНК збудника туляремії з польового матеріалу проводили методом афінної сорбції (Pitcher D. et.al., 1989; McCormick R. M., 1989) із власною модифікацією. Зразки були досліджені з використанням праймерних систем, заснованих на ділянках гену *tul4* (Buzard et.al., 2012) та *16S* (Zlenko et.al., 2020).

Проведення MLVA-генотипування

При проведенні MLVA-генотипування були використані 20 ДНК-лізатів культур *F.tularensis,* надані завідуючою референс-лабораторією з дослідження особливо небезпечних патогенів Видайко Н.Б (Центр громадського здоров'я МОЗ України). MLVA-генотипування проводили з використанням 13 VNTR-локусів *F.tularensis* (Johansson A. et.al., 2004; Vogler A.J. et.al., 2008). Реакцію проводили з використанням приладу Genescan 1200 LIZ POP 7. Аналіз результатів і побудову філогенетичних дерев проводили методом невиваженого попарного середнього (англ. Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Mean (UPGMA)). Генотипуванню передувало проведення класичної ПЛР, для якої готували мастермікси за протоколом виробника Multiplex PCR Mix (Quiagen, Німеччина).

Програмне забезпечення

Підбір праймерів проводили за допомогою комп'ютерної програми AmplyfiX 1.0 та Primer2. Аналізування послідовностей проводили в програмі BioEdit. Дизайн та теоретичний аналіз плазмідного вектору здійснено в програмному пакеті Clone Manager 7 (Sci Ed Software, США). Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми PAST 3 (Natural History Museum, University of Oslo, Норвегія) і Excel. Географічне розташування місць відбору зразків картували за допомогою програми qGIS 2.6.1. Аналіз отриманих даних після MLVA проводили за допомогою програмного забезпечення GeneMapper ver. 3.5 (Applied Biosystems, США) та Bionumerics (Applied Maths, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розробка рекомбінантних антигенів щодо виявлення збудника туляремії методом ІФА.

Для клонування було обрано 3 протеїни *F.tularensis*: FTT0077 -2-оксоглутаратдегідрогеназа, компонент E2 дигідроліпоамід сукцинилтрансферази (SucB), FTT1696 - шаперон 60 (GroEl) та потенційний протеїн FTT0975. Гени, що кодують ці протеїни, були клоновані до вектору pASG103 з афінною структурою для хроматографічного очищення Twin-Strep-tag®. Було сконструйовано три експресуючі плазміди pASG103_SucB (5460 п.н.), pASG103_GroEl (5607 п.н.), pASG103_FTT0975 (4920 п.н.)

Випробування очищених протеїнів FTT0975, Sucb та GroEl для виявлення їх антигенних властивостей проводили методом вестерн-блотингу з позитивними і негативними сироватками до *F.tularensis* від свиней та людини. Були обрані наступні елюйовані фракції: FTT0975 – фракція E4 (273 мкг/мл), SucB – фракція E4 (274 мкг/мл) та GroEl – фракція A3 (208 мкг/мл) (рис.1).

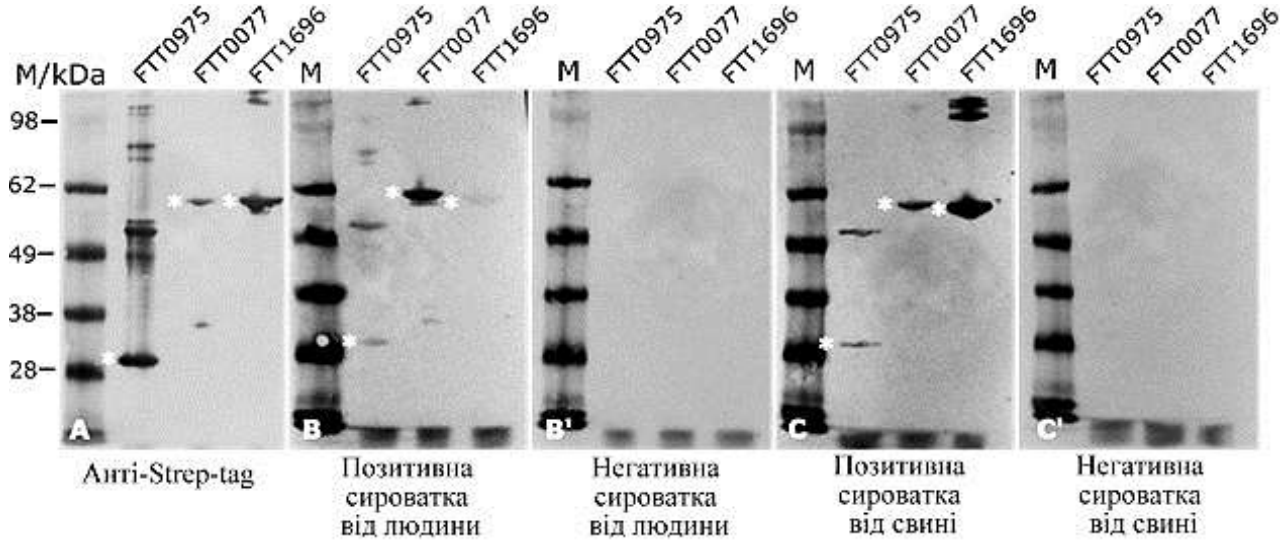

Рис. 1 Результати вестерн-блотингу очищених протеїнів з позитивними і негативними сироватками від людини та свині. M – маркер довжини SeeBlue Plus2 Prestained. Зірочкою позначені протеїни очікуваної маси (FTT0975: 26 кДа; FTT0077: 52 кДа; FTT1696: 57 кДа)

Досліди показали, що всі три досліджувані протеїни мали антигенні властивості та не демонстрували фонового сигналу при дослідженні з негативними сироватками.

Далі, ці протеїни були випробувані як антигени при проведенні непрямого ІФА. Кожен протеїн був серійно розведений у співвідношенні 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 і 1:800 в карбонатному буфері. Позитивні та негативні зразки сироваток, що використовували при тестуванні, також титрували у співвідношенні 1:50, 1:100, 1:200, 1:400. При виборі робочої концентрації для подальшого використання протеїнів звертали увагу не тільки на значення оптичної щільності позитивних зразків, а і на співвідношення значень позитивного зразку та фонового значення оптичної щільності негативного зразку. Також, при виборі робочих концентрацій спирались на динаміку зменшення сигналу: при різкому нелінійному зменшенні значень оптичної щільності для роботи обирали найближчі попередні стабільні концентрації. Під час проведення всіх досліджень, значення внутрішньосистемних коефіцієнтів варіативності були менше допустимих 10%. Значення міжсистемних коефіцієнтів варіативності були менше допустимих 15%, що підтверджує достовірність отриманих результатів.

Для подальшого випробування у якості антигенів для ІФА нами були обрані протеїни GroEl та SucB, що показали високу крос-реактивність з сироватками, позитивними щодо усіх підтипів *F.tularensis*. Подальші випробування протеїну FTT0975 було вирішено не проводити через його високу крос-реактивність з сироватками, позитивними щодо бруцел. Обрані протеїни перевіряли в трьох повторах на панелі сироваток від диких кабанів (n=100) та порівнювали результати з ІФА, розробленим Інститутом мікробіології Бундесверу, що засновується на використанні ліпополісахаридного антигену. Достовірність результатів підтверджували методом вестерн-блотингу. Зразки, що були позитивні в ІФА, але непідтверджені у вестерн-блотингу, перевіряли щодо антитіл проти бруцел комерційним набором (Serion ELISA classic Brucella IgG kit, Institut Virion/Serion, Німеччина) (таблиця 1).

Таблиця 1

Порівняння чутливості і специфічності способів детекції антитіл проти *F.tularensis*

Способи детекції антитіл проти *F.tularensis*, що порівнюються	Чутливість, %	Специфічність, %	Крос-реактивність з *Brucella spp.*,%
ІФА, заснований на ЛПС (ІМБ, Німеччина)	100	71	15,09
ІФА, заснований на протеїні SucB	100	75,5	6,12
ІФА, заснований на протеїні GroEl	100	75	12

Як можна побачити з таблиці 1, чутливість всіх трьох методів дорівнювала 100% при підтвердженні результатів методом вестерн-блотингу, що означає відсутність хибно негативних результатів. Обидві розроблені в роботі системи є більш специфічними в порівнянні з ІФА, розробленим Інститутом мікробіології Бундесверу. Найвищу специфічність продемонстрував ІФА з використанням антигену SucB (75,5 %).

Для перевірки крос-реактивності, всі хибно-позитивні зразки були протестовані щодо наявності антитіл проти *Brucella spp.*. Розроблені в роботі системи, засновані на протеїнах SucB і GroEl мали нижчу крос-реактивність до антитіл проти *Brucella spp* в порівнянні з ІФА Інституту мікробіології Бундесверу: (6,12% та 12% проти 15,09%, відповідно).

Таким чином, нами було розроблено і отримано рекомбінантні антигени GroEl, SucB і FTT0975 *F. tularensi*s і підтверджено їх антигенні властивості при дослідженні сироваток від людей і свиней. Було підтверджено ефективність використання протеїнів GroEl і SucB в ІФА щодо антитіл проти збудника туляремії у сироватках від свиней (чутливість обох методів становила 100%, специфічність 75,5% для ІФА, заснованого на протеїні SucB і 75% для ІФА, заснованого на протеїні GroEl), а також визначено оптимальні концентрації антигенів і сироваток для проведення досліджень. Протеїн GroEl у концентрації 1,04 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:100 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для загальнородової диференціації антитіл до *F. tularensi*s. Протеїн SucB також може використовуватись для загальнородової диференціації антитіл до збудників туляремії у концентрації 1,37 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:100 як від свиней, так і від людей. Протеїн FTT0975 у концентрації 2,73 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:50 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для диференціації підтипів *F. tularensi*s.

Розробка рекомбінантного позитивного контролю для виявлення генетичного матеріалу збудника туляремії

З метою отримання рекомбінантного позитивного контрольного зразку для діагностики збудника туляремії методом ПЛР, було сконструйовано плазмідний вектор pTZ57R/T, який містить вставку ділянки гену *tul4* (103 п.н.), що є консервативним для всіх підтипів *F.tularensis*. Вектор було трансформовано у компетентні клітини *E.coli* DH5a. Повна довжина створеного вектору складала 2990 п.н. (рис. 3.)

Вектор pTZ57R/T містить ген стійкості до ампіциліну та ген *lacZ*, що використовувались як селективні маркери для перевірки клонів *E. coli* DH5α. Після проведення синьо-білої трансформації з використанням IPTG та X-Gal, перевірку білих колоній проводили з використанням специфічних праймерів FT-FP до гену *tul4*. Для додаткової перевірки вставки амплікону ділянки гену *tul4* в плазміді було обрано системи праймерів M13 F/R, специфічні до ділянок вектору навколо полілінкерного сайту плазміди.

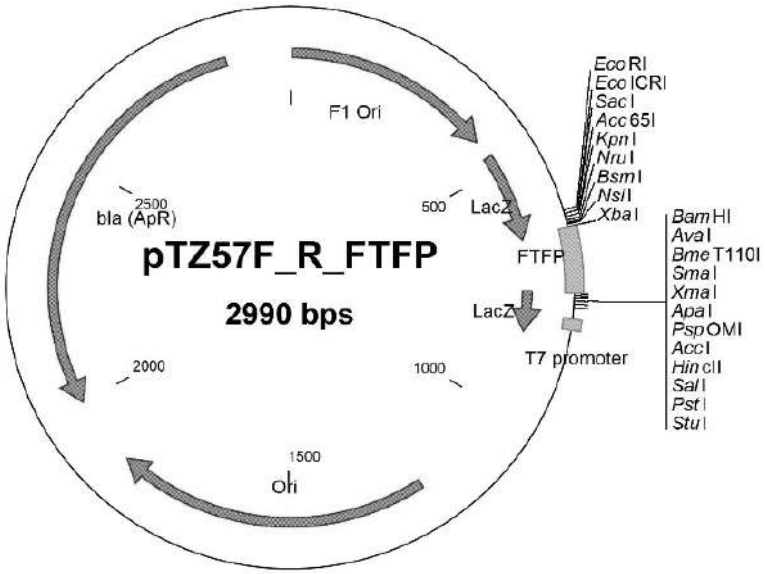

Рис. 3. Рекомбінантний позитивний контрольний зразок pTZ57F_R_FTFP для детекції генетичного матеріалу збудника туляремії методом ПЛР

За результатами секвенування, екстраговані плазміди з колонії №1 були обрані для подальших досліджень стосовно визначення чутливості ПЛР із використанням праймерних систем FT-FP (рис. 4).

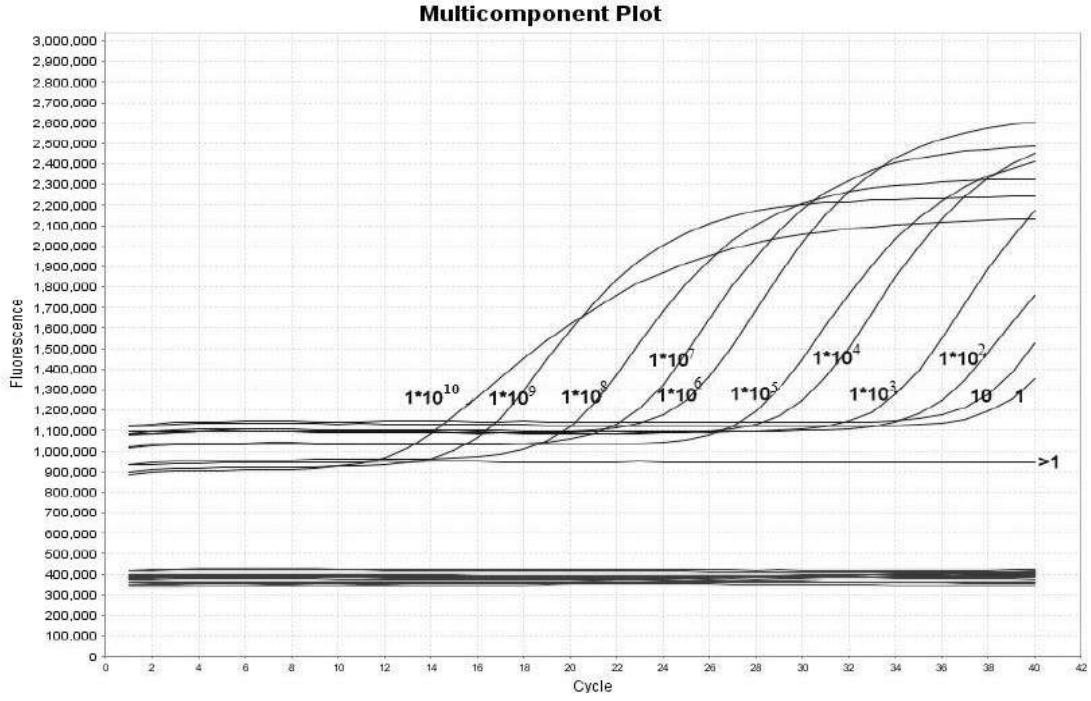

Рис.4 Ампліфікаційні криві титрування плазміди pTZ57F_R_FTFP. На рисунку вказані кількості копій плазмід для кожної реакції в 1 мікролітрі.

Отже, було отримано ампіцилін-резистентний клон *E. coli* DH5a, трансформований сконструйованою плазмідою pTZ57F_R_FTFP зі вставкою гену *tul4* довжиною 103 п.н., який може бути використаний у якості

позитивного контролю для детекції генетичного матеріалу збудника туляремії як методом класичної ПЛР, так і у режимі реального часу. Поріг чутливості даного методу – 1 копія у мікролітрі, чи 5 копій на реакцію.

Дослідження сироваток крові від диких кабанів щодо наявності антитіл до *F.tularensis.*

Дикий кабан (*Sus scrofa*) є корінним видом парнокопитих в Україні, що мешкає здебільшого в лісах та лісо-степових зонах. Проблема серопревалентності туляремії серед диких кабанів у світі вивчена недостатньо, а в Україні такі дослідження ніколи не проводили. З метою вивчення епізоотологічної ситуації щодо циркуляції туляремії серед диких кабанів України були проведені серологічні дослідження сироваток від кабанів з різних регіонів.

Для індикації антитіл до туляремії в сироватках крові диких кабанів використовували *in house* методику конкурентного імуноферментного аналізу (кІФА), розроблену в Інституті мікробіології Бундесверу. Позитивні зразки підтверджували методикою Вестерн-блотингу. Було досліджено 701 зразок сироваток від диких кабанів, зібраних протягом 2011-2013 років (таблиця 1).

Таблиця 1

Кількість досліджених зразків щодо наявності антитіл до *F.tularensis* методами ІФА та Вестерн-блотингу

Загальна кількість зразків	**Позитивні сироватки до *F.tularensis* в ІФА**		**Позитивні сироватки до *F.tularensis* у вестерн-блотингу**	
	кількість	%	кількість	%
701	270	38,5	86	12,3

У порівнянні з результатами досліджень, проведених в інших країнах Європи, загальний відсоток зразків, серопозитивних до *F.tularensis* (12,3%), є достатньо високим і може свідчити про неблагополучну епізоотологічну ситуацію з туляремії в Україні. Зразки були зібрані, в основному, в лісистих та лісостепових регіонах країни, оскільки ліси - це найбільш типовий біотоп проживання кабанів. Найвищий відсоток позитивних зразків було виявлено у Чернівецькій та Хмельницькій областях (50% та 41,2% відповідно).

Ці області розташовані в лісистих регіонах з великою кількістю річок та періодичними повенями, які можуть сприяти розповсюдженню *F.tularensis* subsp. *holarctica* та її інфікуванням, для якої характерний водний тип поширення. Також, досить високий відсоток позитивних зразків було виявлено у Чернігівській (33,3%) і Харківській областях (21%) (рис. 5, 6).

Результати даного дослідження відповідають результатам досліджень Центру громадського здоров'я МОЗ України (Hightower et.al., 2014) згідно яким найбільш великі та стабільні природні осередки з туляремії розташовані у Чернігівській, Сумській та Хмельницькій областях. Однак деякі лісостепові

райони, такі як Харківська область, також відомі як території з постійною циркуляцією збудника туляремії.

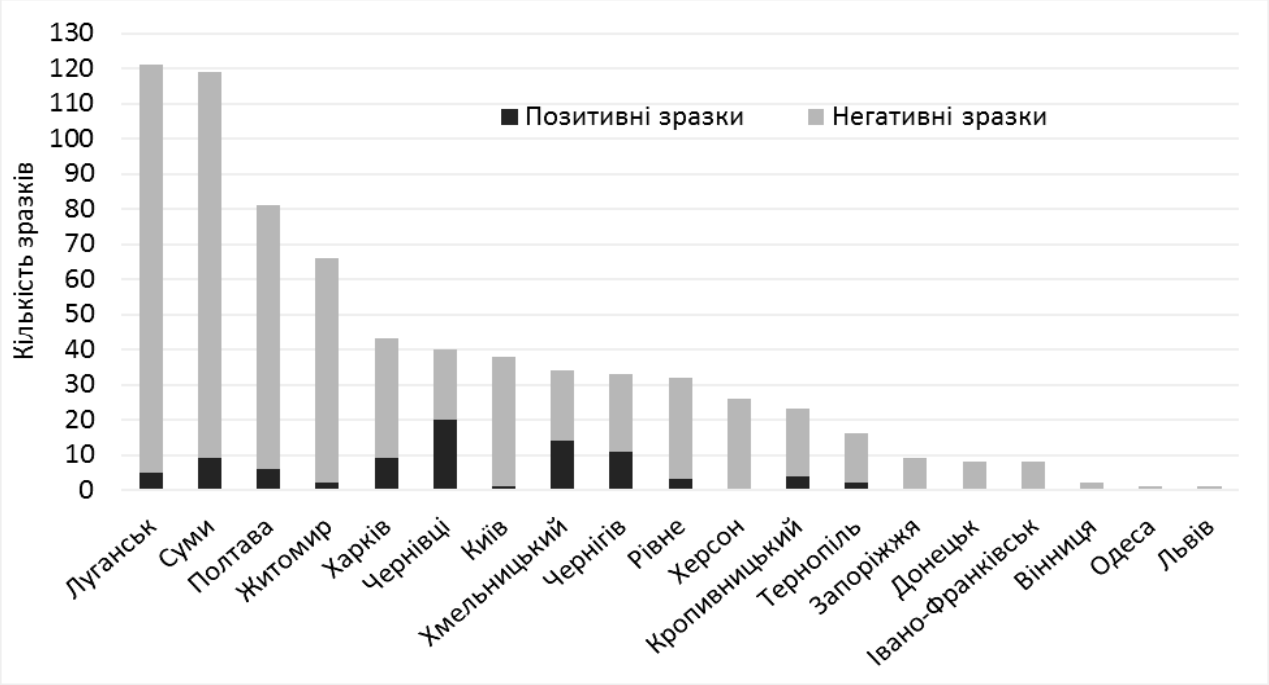

Рис.5. Відношення серопозитивних та серонегативних зразків до *F.tularensis* по регіонах

Дослідження зразків від гризунів, кліщів та об'єктів довкілля щодо наявності генетичного матеріалу *F.tularensis* у Харківській, Миколаївській та Дніпропетровіській областях

Природні осередки туляремії присутні у 23 з 25 областей та охоплюють основні ландшафти та географічні зони України (Stupnitskaya V. et. al., 1965; Русев І. Т., 2011; Nechoroshych Z.M. et. al., 2015). Харківська область розташована в лісостепових та степових регіонах, Дніпропетровська та Миколаївська області є справжніми степовими районами, і їхні біотопи, сприятливі для проживання гризунів-переносників збудника туляремії, і є частково схожими: нагірні листяні ліси і борові тераси характерні для лісової частини Харківщини; заплавні луки, поля, лісосмуги, ярові ліси характерні для всіх трьох областей. Окрім гризунів, у досліджуваних регіонах відомо 6 видів іксодових кліщів, що мають важливе значення у передачі та циркуляції туляремії (Русев И.Т, 2005; Akimov I. A., 2010).

Нами було обстежено польові зразки (від гризунів, кліщі, пелети, вода та сіно) за допомогою ПЛР для поглибленого вивчення епізоотологічної ситуації туляремії на територіях Харківської, Дніпропетровської та Миколаївської областей. Дослідження хвостів гризунів замість стандартного дослідження внутрішніх органів було обрано у ряді випадків з причин біобезпеки: розтин тварин, потенційно хворих на туляремію, може проводитися тільки в умовах BSL-3 лабораторії.

Харківська область

У Харківській області було зібрано 380 зразків (183 хвости гризунів, 181 кліщ, 15 пелет, 1 проба води), із яких 23% були позитивними щодо вмісту генетичного матеріалу *F. tularensis* (88 зразків): 19,2% (74 зразки) кліщів, 2,6% (10 зразків) хвостів гризунів, 1% (4 зразки) пелет сови сірої *(Strix aluco*). Зразки були зібрані у м. Харків (53 проби), Валківському (52 проби), Харківському (16 проб), Балаклійському (45 проб), Дергачівському (55 проби), Зміївському (61 пробу), Краснокутському (41 проба), Печенізькому (4 проби) і Богодухівському районах (53 проби).

Позитивні результати були виявлені в селі Газове Богодухівського району (48 позитивних зразків); селі Рай-Оленівка Харківського району (10 позитивних зразків); с. Крейдянка Балаклійського району (10 позитивних зразків); НПП «Гомільшанські ліси» Зміївського району (15 позитивних зразків), харківському лісопарку (4 позитивних зразка) та селі Перекіп Валківського району (1 зразок) (рис. 6).

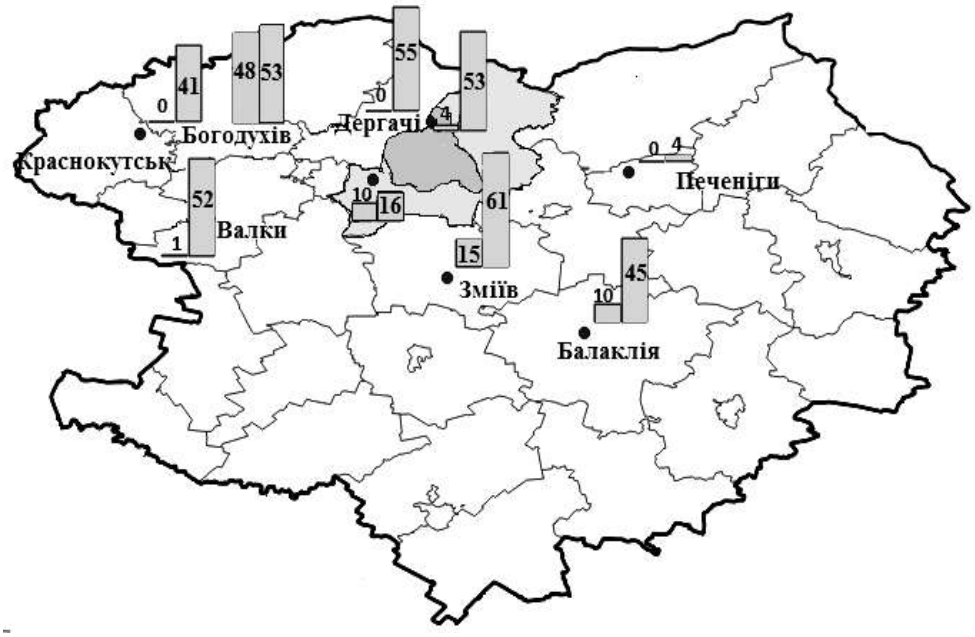

Рис.6 Географічне розташування районів відбору проб у Харківській області (зразки групуються за районами). Харків та Харківський район позначені сірим кольором. Позитивні зразки позначені у стовпчиках ліворуч. Загальна кількість зразків позначена у стовпчиках праворуч

Дніпропетровська область.

Для проведення цього дослідження було зібрано 105 проб з двох районів Дніпропетровській області: Петропавлівського (67 проб) та П'ятихатського району (38 проб). Лише два зразки (1,9%) показали позитивний результат щодо генетичного матеріалу збудника туляремії у ПЛР: зразок від гризуна *Apodemus agrarius*, зібраний у П'ятихатському районі поблизу села Червона поляна та зразок кліща *Dermacentor marginatus*, зібраний у Петропавлівському районі поблизу села Петропавлівка (рис. 7).

Всього було зібрано 105 зразків: хвости гризунів (52 зразки), кліщі *Dermacentor marginatus* (35 зразків), пелети *Strix aluco* (10 зразків), вода (6 зразків) та сіно (2 зразки).

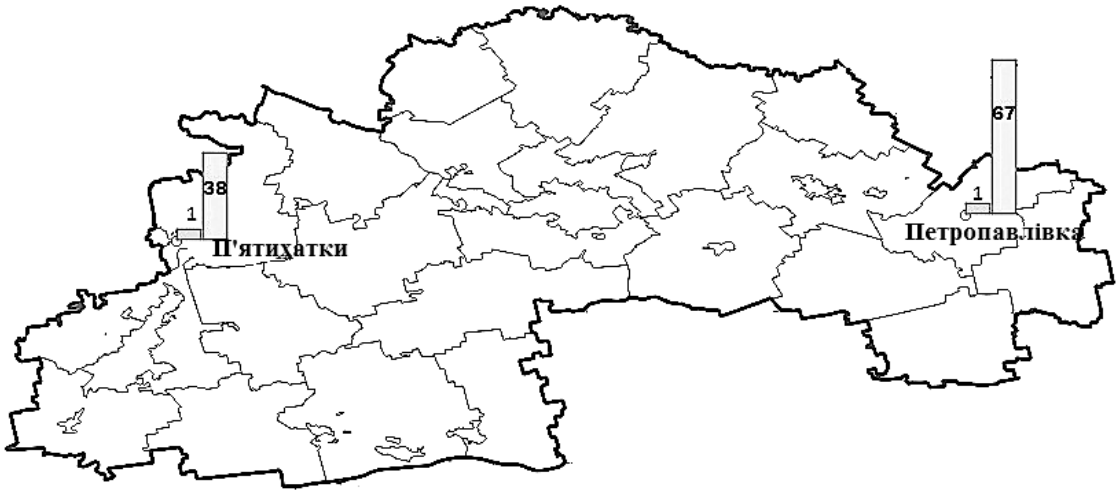

Рис. 7. Географічне розташування місць відбору зразків у Дніпропетровській області (зразки групуються за районами). Позитивні зразки позначені у лівому стовпчику. Загальна кількість зразків позначена у правому стовпчику

Миколаївська область

У Миколаївській області було зібрано 501 зразок з території 7 районів: Вознесінський район (190 зразків), Вітовський район (106 зразків), Первомайський район (101 зразок), Снігурівський район (62 зразки), Кривоозерівський район (34 зразки), Очаківський район (4 зразки), Березнегуватський район (4 зразки) (рис. 8).

Рис. 8. Географічне розташування районів відбору зразків у Миколаївській області (зразки групуються за районами). Позитивні зразки позначені у стовпчиках праворуч. Загальна кількість зразків позначена у стовпчиках ліворуч

У цій області були досліджені лише хвости гризунів та, за виключеннями, гомогенати органів (17 зразків із Вознесінського району, 43 зразки із Вітовського району і 4 зразки із Очаківського району). З усіх досліджених зразків лише 2 були позитивними щодо генетичного матеріалу збудника туляремії (0,4%). Позитивні зразки належали гризунам видів *Sylvaemus sylvaticus* та *Mus musculus* і були зібрані у Вітовському районі, с. Зелений гай, та у Вознесенському районі, с. Баштанка, відповідно.

Аналіз відповідності (correspondence analysis)

Для порівняння частоти виявлення *F. tularensis* у різних типах зразків ми провели аналіз відповідності із зразками з усіх трьох областей (рис. 9).

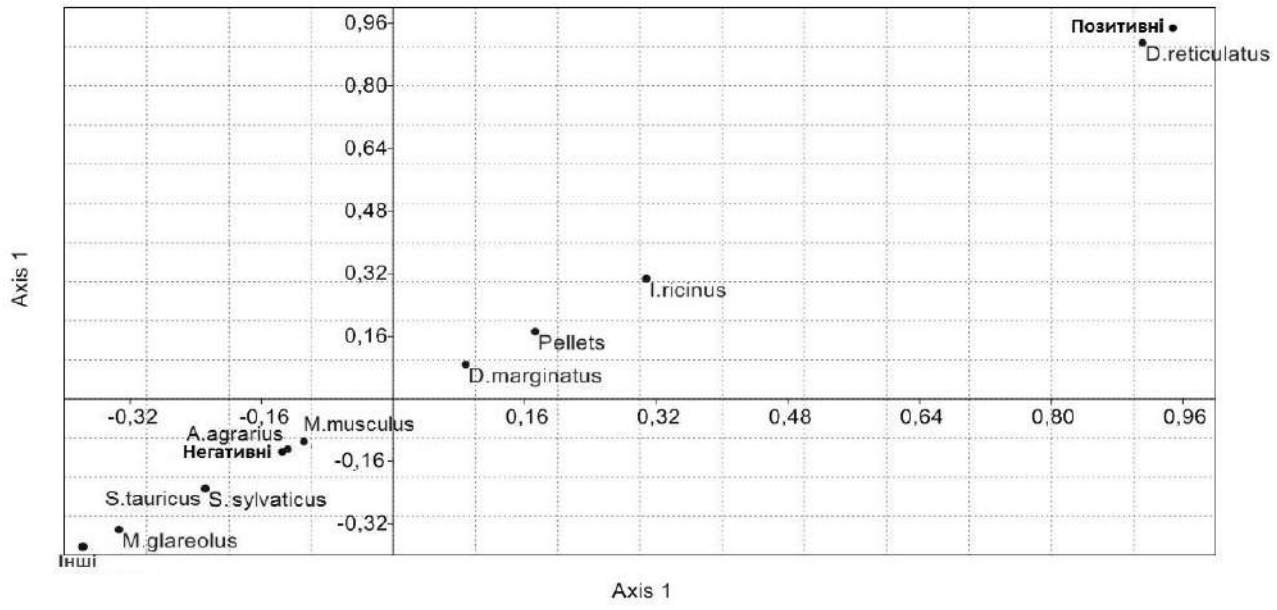

Рис 9. Результат аналізу відповідності (CA) для всіх зразків, згрупованих за видами чи типами матеріалів. Чим ближче назва типу зразка до напису «позитивний», тим вища частота виявлення *F. tularensis* у цьому типі зразка. Координати осі 1 (axis 1) показують зважені відстані між різними видами та групами, позначені на графіку крапками. Під «іншими» видами зразків зашифровані види: *M. spicilegus, C. suaveolens, C. migratorius, S. uralensis, M. laevis, S. araneus, S. minutus, M. minutus, M. oeconomus,* а також вода і сіно.

Аналіз відповідностей нашого дослідження показав, що кліщі родини *Ixodidae*, особливо *D. reticulatus* та *I. ricinus,* частіше переносять туляремійну інфекцію, ніж гризуни, що відповідає попереднім результатам попередніх досліджень на території України.

MLVA-генотипування ізолятів *F.tularensis*, виділених на території України впродовж 1997-2016 рр.

З метою встановлення молекулярно-епізоотологічних характеристик 20 ізолятів *F.tularensis*, виділених на території України у 1997-2016 рр, та їх

зв'язку з іншими типовими ізолятами *F.tularensis* було проведене MLVA-генотипування за 13 локусами (Farlow J. el.al., 2001; Johansson A. et.al., 2004; Vogler A.J. et.al., 2008).

До складу дослідженої панелі увійшли зразки з 11 областей України: Сумська, Чернігівська, Рівненська, Волинська, Львівська, Полтавська, Одеська, Кримська, Миколаївська, Запорізька, Вінницька. Зразки були зібрані співробітниками обласних лабораторних центрів від пацієнтів (3 зразки), гризунів (8 зразків), зайцеподібних (1 зразок), кліщів (6 зразків) та навколишнього середовища (2 зразки).

Було встановлено, що всі ізоляти належать до одного підвиду *Francisella tularensis* subsp. *holarctica,* що відповідає даним МЕБ та ВООЗ щодо розповсюдження різних підтипів *F. tularensis* по всій земній кулі. У межах цього підтипу було виділено три різних генотипічних кластери, названі нами відповідно до спорідненості цих кластерів із штамами сусідніх країн: російсько-азербайджанський (5 зразків), чехо-словацький (1 зразок) та європейський (14 зразків) кластери. Ці кластери позначені червоними колами (рис. 10).

Рисунок 10. MLVA-кластерний аналіз досліджуваних зразків методом попарного внутрішньогрупового невиваженого середнього із середньоарифметичною кластеризацією

До європейського кластеру потрапила найбільша кількість зразків (14), що були виділені з усіх досліджених регіонів: Сумської, Чернігівської, Рівненської, Волинської, Львівської, Полтавської, Одеської, Кримської, Миколаївської, Запорізької, Вінницької областей. Українські зразки, що потрапили до цього кластеру, мали 100% ідентичність між собою та були споріднені до зразків з Польщі, Німеччини, Австрії, Франції, Швеції, Російської Федерації та Азербайджану. Українські штами відрізнялись від цих споріднених штамів кількістю тандемних повторів у локусі FT-M03. Вони мали 23 тандемних повтори, в той час як інші штами мали 10, 15, 16, 17, 18, 19 та 24 тандемних повтори.

Російсько-азербайджанський кластер містив 5 ізолятів, що були виділені з Криму, Запорізької, Сумської та Вінницької областей (штами № 456, 60, 37, 562

/ 278о, 493). Ізолятів відрізнялись між собою замінами в локусах FT-M04 (3 та 4 тандемні повтори) і FT-M20 (3 та 4 тандемні повтори) та були найбільш споріднені до ізолятів із Росії та Азербайджану. Відмінності між російськими та українськими ізолятами були виявлені у локусі FT-M03 (16 тандемних повторів в українських зразках і 18 у російських). Відмінності між азербайджанськими та українськими ізолятами були в локусах FT-M06 (4 повтори в українських ізолятах і 5 в азербайджанських) і FTM03 (16 повторів в українських ізолятах і 17 в азербайджанських).

Один ізолят, що потрапив до чехо-словацького кластеру і був найбільш спорідненій до ізолятів з колишньої Чехословаччини та Польщі, був виявлений на Чернігівщині за номером 523. Цей зразок відрізнявся від інших зразків, що також потрапили у цей кластер, 2 тандемними повторами у локусі FT-M06, замість 6 повторів.

Серед всіх генотипів найчастіше зустрічався генотип, пов'язаний з європейським кластером. Цей генотип був ізольований у 1996, 1998– 2000, 2003, 2005, 2006, 2008, 2010, 2011 та 2016 роках на територіях всіх досліджених регіонів України (рис. 11).

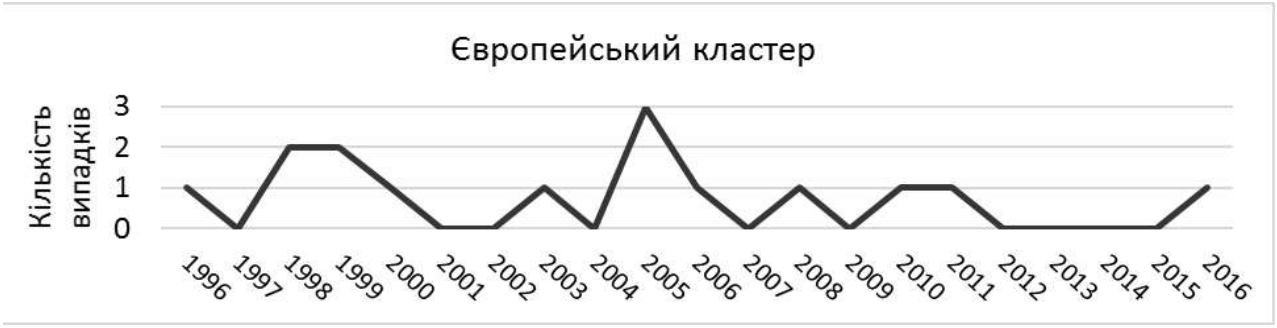

Рисунок 11. Розподіл досліджуваних зразків Європейського кластеру за роками

Таким чином, нами встановлено провідний типовий український генотип, який поширюється на території всієї України, зберігається протягом років та пов'язаний з європейськими генотипами *Francisella tularensis*. Зразок, який був віднесений до Чехо-словацького кластеру, був виділений із сіна на Чернігівщині та, можливо, був випадково завезений до країни.

ВИСНОВКИ

1. У дисертаційній роботі, на підставі проведеного комплексу епізоотологічних, молекулярно-генетичних, молекулярно-біотехнологічних, серологічних, філогенетичних, біоінформатичних та математико-статистичних досліджень вивчено епізоотичну ситуацію в Україні щодо туляремії та удосконалено систему її лабораторної діагностики за рахунок впровадження методик на основі полімеразної ланцюгової реакції, імуноферментного аналізу та вестерн-блотингу.

2. На основі проведених біоінформатичних досліджень були сконструйовані три рекомбінантні протеїни *F.tularensis* (GroEl, FTT0975, SucB), підтверджено

ефективність їх використання у якості антигенів в ІФА щодо антитіл проти збудника туляремії у сироватках від свиней (чутливість обох методів становила 100%, специфічність 75,5% для ІФА, заснованого на протеїні SucB і 75% для ІФА, заснованого на протеїні GroEl), підтверджено їх антигенні властивості при дослідженні сироваток від людей, а також визначено оптимальні концентрації антигенів і сироваток для проведення досліджень. Протеїн GroEl у концентрації 1,04 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:100 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для загальнородової диференціації антитіл до *F. tularensis*. Протеїн SucB також може використовуватись для загальнородової диференціації антитіл до збудників туляремії у концентрації 1,37 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:100 як від свиней, так і від людей. Протеїн FTT0975 у концентрації 2,73 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:50 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для диференціації підтипів *F. tularensis*.

3. На основі проведених досліджень був сконструйований позитивний контрольний зразок на основі плазмідного вектору pTZ57F_R_FTFP та зі вставкою гена *F.tularensis tul4* довжиною 103 п.н. Доведена можливість використання вектору в якості позитивного контрольного зразку для визначення генетичного матеріалу збудника туляремії методом ПЛР та ПЛР у реальному часі з аналітичною чутливістю реакції – 1 копія в мікролітрі (5 копій на реакцію).

4. За результатами молекулярно-генетичних досліджень щодо скринінгу генетичного матеріалу збудника туляремії встановлено, що в Харківській області (n = 380) 23% відібраних зразків були позитивними, у Дніпропетровській області (n = 105) 1,9%, і в Миколаївській області (n = 501) 0,4%. Всього було зібрано 216 зразків кліщів, 736 зразків від гризунів, 25 пелет, 2 зразки сіна, 7 зразків води. За результатами аналізу відповідностей, найчастіше туляремію переносять кліщі родини *Ixodidae*, а саме *D. reticulatus* та *I. ricinus* (74,2% і 29,3% позитивних зразки відповідно).

5. За результатами серомоніторингу диких кабанів України щодо туляремії, виявлено 87 (12,3 %) серопозитивних тварин з 707 досліджених. Основна кількість позитивних зразків припала на Чернівецьку (33,9 %) та Хмельницьку (30,6 %) області. Також, непідтверджені у вестерн-блотингу сироватки були досліджені на бруцельоз, з яких 142 були позитивні (20,1 %).

6. За результатами MLVA-типування 20 ізолятів *F. tularensis*, встановлено, що всі вони належать до голарктичного підтипу. Було виявлено підтип, що циркулює на всій території України впродовж 10 років, до нього належало 14 ізолятів (штами № 222, 86, 317, 138 \ 15, 201 (2 зразки), 205 \ 15, 103, 21, 128, 351 \ 278о, 359 \ 278о, 132, 66). Один зразок (штам №523), споріднений за тандемними повторами із зразками з території колишньої Чехословаччини, був виділений із сіна на Чернігівщині та, можливо, був випадково завезений до країни.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Zlenko O.B**., Gerilovych A.P. Development of recombinant positive control for *Francisella tularensis* detection by qPCR / *Biotechnologia Acta*. 2018. Vol. 11, No 4. P. 68-72 (*Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті*).

2. Genotyping of *Francisella tularensis* isolates from Ukraine / **Zlenko O. B.**, Durr A., Schwarz J., Vydaiko N. B., Gerilovych A. P. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2018. Vol. 4, No 4. P. 12-15 (*Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті*)

3. PCR based prevalence study of *Francisella tularensis* in Kharkiv, Dnipropetrovsk, and Mykolaiv oblasts during 2015–2018 / **Zlenko O. B.**, Tkach G. E., Sukhorukova A.B., Kylypko L.V., Machota L. S., Ignatenkov O. S., Vinokurova K. V., Shamychkova G. R., Shtepa O. P., Rezvykh V. G., Schwarz J., Duerr A., Popp C., von Buttlar H., Wolfel R., Solodiankin O.S., Gerilovych A. P. *J Vet Res*. 2020. Vol. 64, No 1. P. 63-71 (*Особистий внесок – брала участь в плануванні, зборі польових зразків та лабораторному проведенні досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті*)

4. Development of recombinant antigen-based ELISA for the detection of anti-tualremia antibodies in swine and human sera: a pilot study / **Zlenko O. B.**, Popp C., von Buttlar H., Gerilovych A. P., Schwarz J. *Biotechnologia Acta*. 2020. Vol. 13, No 1. P. 45-55 (*Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті*)

5. Case report on the human infection with tularemia in Mycolaiv region, 2018 / **Zlenko O.B**., Ignatenkov O.S., Vinokurova K.V., Gerilovych A.P. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2020. Vol. 6, No 1. P. 15-17 *Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті*).

6. Аналіз біологічних ризиків поширення туляремії у природних осередках у східних регіонах України / Болотін В. І., Стегній Б. Т., Солодянкін О. С., **Зленко О. Б.**, Герілович А. П. *Ветеринарна медицина*. 2016. № 102. С. 30–33. *(Особистий внесок – брала участь в узагальненні результатів та підготовці статті)*

7. Рекомбінантний контрольний зразок для виявлення ДНК збудника туляремії методом полімеразної ланцюгової реакції pTZ57R/T_FTFP : пат. 135803 Україна : МПК C12N 15/00, C12N 15/63 (2006.01). № u201811113; заявл. 12.11.2018; опубл. 25.07.2019, Бюл. №14/2019 (*Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці патенту*).

8. Тест-система для виявлення ДНК збудника туляремії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції "Tul-DNA-test": пат. 133254 Україна : МПК C12N 15/31 (2006.01), C12Q 1/6806 (2018.01), C12R 1/00. № u201811130; заявл. 12.11.2018; опубл. 25.03.2019, Бюл. № 6/2019 (*Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці патенту*).

9. Спосіб отримання рекомбінантних антигенів GroElFTT, FTT0975, SucBFTT для діагностики туляремії за допомогою ІФА: пат. 143739 Україна : МПК (2006): C12N 15/00, C12N 15/70 (2006.01); заявл. 21.02.2020; опубл. 10.08.2020, Бюл. № 15/2020 (*Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці патенту*).

10. Рудова Н., **Зленко О**., Солодянкін О., Стегній Б., Бузун А., Болотін В., Герілович А. Нові дані з приводу розповсюдження *F.tularensis* серед диких кабанів та домашніх свиней в Україні. *CBEP Ukraine Regional One Health Research Symposium,* Київ, 24-28 квітня, 2017

11. **Zlenko O.**, Солодянкін О., Герілович А. Розробка рекомбінантного позитивного контролю для виявлення *Francisella tularensis* методом ПЛР у режимі реального часу. *3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium,* Київ,16-20 квітня, 2018

12. **Zlenko O.B.**, Durr A., Schwarz J., Vydaiko N.B., Gerilovych A.P. MLVA analysis of *Francisella tularensis* samples collected on the territory of Ukraine from 1997 to 2016. *European Meeting on Animal Chlamydiosis (EMAC-5)*, Одеса, 3-5 жовтня, 2018

13. **Zlenko O.B.**, Schwarz J.R., Duerr A., von Buttlar H., Gerilovych A.P. Seroprevalence of *Francisella tularensis* among wild boars in Ukraine. *16th Medical Biodefence Conference*, Мюнхен, 28-31 жовтня, 2018

14. **Зленко О.Б.** Розповсюдження туляремії як природно-опосередкованої інфекції. *Інфекційні хвороби в практиці лікаря-інтерніста: сучасні аспекти,* Суми, 30-31 травня 2018 р.

15. **Zlenko O.**, Ignatenkov O., Vinokurova K., Schwarz J., Duerr A. , von Buttlar H. , Woelfel R., Solodiankin O., Gerilovych A. Case report on the human infection with tularemia in Mykolaiv region, 2018. *4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium*, Київ, 20-24 травня, 2019

16. **Зленко О.Б.**, Ткач Г.Є., Сухорукова А.Б., Килипко Л.В., Махота Л.С., Schwarz J., Duerr A., Popp C., von Buttlar H., Wolfel R., Солодянкін О. С., Герілович А.П. Дослідження зразків від гризунів, кліщів та середовища щодо наявності генетичного матеріалу *F.tularensis* у Харківській області. *Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека*, Київ, 10-11 жовтня, 2019

17. **Zlenko O**. Development of recombinant antigens for the diagnosis of tularemia. *Biosafety and Biosecurity symposium. One health – one vision*, Тбілісі, 20-21 листопада, 2019

АНОТАЦІЯ

Зленко О. Б. Лабораторна діагностика туляремії (імуноферментний аналіз та полімеразна ланцюгова реакція), епізоотологічний моніторинг і генотипування збудника — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 — біотехнологія. Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Харків, 2020.

Дисертація присвячена розробці засобів діагностики туляремії на основі плазмідних рекомбінантних конструкцій. Уперше в Україні розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантних антигенів на основі протеїнів GroEl, SucB, FTT0975 для ідентифікації антитіл проти збудника туляремії у сироватках крові від свині та людини методом ІФА, а також розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантного позитивного контролю на основі гену *tul4* для ідентифікації генетичного матеріалу *F.tularensis* методом ПЛР.

Уперше на території України був проведений серомоніторинг щодо туляремійної інфекції серед диких кабанів (*Suc scrofa*), у ході якого було встановлено наявність антитіл до *F.tularensis* серед диких кабанів в 12 областях України. Також, отримані нові дані з епізоотологічного стану щодо туляремії на територіях Харківської, Дніпропетровської і Миколаївської областей у результаті проведення епізоотичного скринінгу з використанням молекулярно-генетичних методів.

Проведено MLVA генотипування 20 українських ізолятів *F.tularensis* за 12 локусами, внаслідок чого визначені їх генотипи та спорідненість з іншими генетично подібними популяціями. Встановлено генотип *F.tularensis*, що був віднесений до «європейського» кластеру, який превалював впродовж 10 років у більшості областей України.

SUMMARY

Zlenko OB Laboratory diagnosis of tularemia (enzyme - linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction), epizootological monitoring and genotyping of the pathogen - Manuscript.

The dissertation thesis on competition of the candidate scientific degree in biological sciences on a specialty 03.00.20 - biotechnology. National Research Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine". Kharkiv, 2020.

The thesis is devoted to the development of tularemia laboratory diagnostics methods based on the plasmid recombinant constructions. For the first time in Ukraine, the efficiency of recombinant antigens usage based on GroEl, SucB, and FTT0975 proteins for identification of anti-tularemia antibodies in swine and human sera by ELISA was proved, and the effectiveness of recombinant positive control based on *tul4* gene was also proved in *F.tularensis* detection by PCR.

For the first time in Ukraine, seromonitoring for tularemia infection among wild boars (*Suc scrofa*) was conducted, during which the presence of antibodies to *F.tularensis* was found in 12 regions of Ukraine. Also, new epiziitological data on tularemia were obtained from Kharkiv, Dnipropetrovsk and Mykolaiv regions using molecular genetic methods.

MLVA genotyping of 20 *F. tularensis* Ukrainian isolates was performed at 12 loci. As a result, the genotypes and relatveness with other genetically similar populations were determined. The *F.tularensis* genotype, which was assigned to the "European" cluster, prevailed for 10 years in most regions of Ukraine.