

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Бондаренко Е.И.¹, Филимонова Е.С.^{2,3}, Краснова Е.И.^{2,3}, Криницина Э.В.¹, Ткачев С.Е.^{4,5}

СЛУЧАИ ЗАБОЛЕВАНИЯ КУ-ЛИХОРАДКОЙ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У ЖИТЕЛЕЙ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ, ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕДАВАЕМЫЕ КЛЕЩАМИ

¹АО «Вектор-Бест», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская обл., Россия;

²Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 630091, Новосибирск, Россия

³Городская инфекционная клиническая больница №1, 630099, г.Новосибирск, Россия;

⁴Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск, Россия;

⁵Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, 420012, г. Казань, Россия

Coxiella burnetii является возбудителем Ку-лихорадки (коксиеллёза), которая помимо острых проявлений часто протекает в латентной форме, склонна к хроническому течению и при отсутствии антибиотикотерапии имеет высокий риск инвалидизации или смертельного исхода. В результате наличия широкого спектра клинических проявлений, характерных для других инфекционных заболеваний, для постановки диагноза требуется применение лабораторных методов исследования (ЛМИ). Наличие антропоургических очагов Ку-лихорадки в Новосибирской области установлено еще в 90-х годах прошлого столетия, но должного внимания к ее лабораторной диагностике в этом регионе не уделяется. Целью исследования явилось выявление генетических и серологических маркеров возбудителя *C. burnetii* у больных в Новосибирской области, поступивших на лечение в лихорадящем состоянии с подозрением на заболевания, вызванные инфекциями, передаваемые клещами (ИПК). В результате исследования методом ПЦР-РВ у 9 из 325 больных в образцах крови выявлен ДНК-маркер возбудителя Ку-лихорадки. У трех больных наличие ДНК *C. burnetii* было подтверждено с помощью секвенирования фрагментов генов IS1111 и htpB. С помощью ИФА-тестов в образцах сыворотки крови четырех больных с положительными результатами ПЦР обнаружены антитела к возбудителю коксиеллёза. Контакт с клещом отмечен у 7 из 9 пациентов, у которых выявлена ДНК *C. burnetii* и отсутствовали маркеры других ИПК. Шесть человек были заражены на территории Новосибирской области, двое пострадали от присасывания клеща на Алтае, один случай – из Республики Киргизия. Таким образом, комплексный подход с применением как ПЦР-анализа, так и ИФА обеспечил выявление маркеров возбудителя Ку-лихорадки у больных, поступивших с подозрением на заболевание ИПК, тем самым дифференцируя ее от других инфекций. Контакт с клещом у большинства заболевших дает основание предполагать, что инфицирование возбудителем *C. burnetii* произошло трансмиссивным путем.

Ключевые слова: Ку-лихорадка; коксиеллёз; *Coxiella burnetii*; ПЦР-РВ; Новосибирская область.

Для цитирования: Бондаренко Е.И., Филимонова Е.С., Краснова Е.И., Криницина Э.В., Ткачев С.Е. Случаи заболевания Ку-лихорадкой, выявленные у жителей Новосибирской области, госпитализированных с подозрением на инфекции, передаваемые клещами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 229-236.
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-229-236>

Bondarenko E.I.¹, Filimonova E.S.^{2,3}, Krasnova E.I.^{2,3}, Krinitsina E.V.¹, Tkachev S.E.^{4,5}

CASES OF Q FEVER DETECTED IN RESIDENTS OF THE NOVOSIBIRSK REGION HOSPITALIZED WITH SUSPECTION OF INFECTIONS TRANSMITTED BY TICKS

¹AO «Vector-Best», « 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia;

²Novosibirsk State Medical University of MH of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

³City Infectious Clinical Hospital No.1, Novosibirsk, Russia;

⁴Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;

⁵Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan Federal University, Kazan, Russia

Coxiella burnetii is the causative agent of Q fever (coxiellosis), which, in addition to acute manifestations, often occurs in a latent form, is prone to chronic course and, in the absence of antibiotic therapy, has a high risk of disability or death. As a result of the presence of a wide range of clinical manifestations specific to other infectious diseases, the use of laboratory test methods (LTM) is required to make a diagnosis. The presence of Q fever anthroponotic foci in the Novosibirsk region was described in the 90s of the last century, but due attention to its laboratory diagnostics is not paid in this region. The aim of the study was to identify genetic and serological markers of the causative agent, *C. burnetii*, in patients of the Novosibirsk region who were admitted for treatment with fever with suspected tick-borne infections (TBIs). DNA marker of the causative agent of Q fever was detected in blood samples by real time PCR in 9 out of 325 patients. In three patients, the presence of *C. burnetii* DNA was confirmed by sequencing of the IS1111 and htpB gene fragments. In ELISA tests, antibodies against the causative agent of coxiellosis were detected in the blood sera of 4 patients with positive results of PCR analysis. Contact with tick was registered in 7 out of 9 patients who had *C. burnetii* DNA and lacked markers of other TBIs. Six people were infected in the Novosibirsk region, two suffered from tick's bite in Altai, and one case was from the Republic of Kyrgyzstan. Thus, a complex approach using both PCR analysis and ELISA provided the identification of markers of the Q fever causative agent in patients admitted with suspected TBIs, thereby differentiating it from other infections. Contact with ticks in most cases suggests that infection with *C. burnetii* had a transmissible pathway.

Key words: Q-fever; coxiellosis; *Coxiella burnetii*; PCR; Novosibirsk region.

For citation: Bondarenko E.I., Filimonova E.S., Krasnova E.I., Krinitsina E.V., Tkachev S.E. Cases of Q fever detected in residents of the novosibirsk region hospitalized with suspicion of infections transmitted by ticks. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 229-236 (in Russ.).
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-229-236>

Information about authors:

Bondarenko E.I.: ORCID: <https://0000-0002-4699-9548>;
Filimonova E.S.: ORCID: <https://0000-0002-7711-2188>;
Krasnova E.I.: ORCID: <https://0000-0003-2625-5442>;
Krinitsina E.V.: ORCID: <https://0000-0003-3979-6619>;
Tkachev S.E.: ORCID: <https://0000-0001-7767-380X>.

For correspondence: Bondarenko E.I., Ph.d., researcher of PCR laboratory, AO «Vector-Best»; e-mail: ebondarenko@ngs.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.11.2020
Accepted 28.12.2020

Ку-лихорадка (Ку-риккетсиоз, Балканский грипп, коксиделлез, лихорадка Ку и др.) является зоонозной инфекцией, впервые описанной в 1935 г. в Австралии Е.Н. Derrick [1], который выделил это заболевание в самостоятельную нозологическую форму. Два года спустя, F.M. Burnet [2] и С.В. Philip [3] доказали риккетсиозную природу изолированного возбудителя заболевания, впоследствии получившего название *Coxiella burnetii*. Исходя из современной классификации микроорганизмов, которая основывается на сопоставлении нуклеотидных последовательности генов, полученных в результате их секвенирования, возбудитель Ку-лихорадки отнесен к роду *Coxiella*, семейству *Coxiellaceae*, порядку *Legionellales*, классу *Gamma proteobacteria* [4]. Таким образом, единственный представитель рода *Coxiella*, вид *C. burnetii* выделен из семейства *Rickettsiaceae*. Являясь внутриклеточным облигатным паразитом, *C. burnetii* в организме теплокровных в качестве клеток-мишеней использует мононуклеарные фагоциты. С эпидемической точки зрения выделяют первичные и вторичные очаги Ку-лихорадки. Первичные – природные очаги, образованные вследствие вовлечения в циркуляцию коксиделл около 100 видов диких млекопитающих, десятков видов птиц и более 70 видов клещей. Последние являются природным резервуаром инфекции, а также выступают в качестве вектора, передавая возбудитель во время присасывания от одних видов животных другим, тем самым обеспечивая его циркуляцию в природных очагах [5]. Вторичные очаги лихорадки Ку – антропогенные, или как их называют сельскохозяйственные, связаны с поражением сельскохозяйственных животных, в первую очередь, крупного и мелкого скота (коровы, лошади, верблюды, овцы, козы), комнатных питомцев (собак и кошек), домашней птицы [6, 7]. Заболевание коксиделлезом у животных часто протекает как скрытая, латентная инфекция, которая обостряется в периоды беременности и во время родов [8]. Именно сельскохозяйственные и домашние животные являются доминирующим источником инфицирования человека. В связи с этим, основными путями заражения Ку-лихорадкой являются аэрогенный (в результате вдыхания диспергированных частиц, которые образуются в результате высыхания испражнений животных, содержащих возбудитель), контактный (при уходе за животными, обработке мяса, шерсти и пуха), а также алиментарный (вследствие употребления в пищу сырых, термически не обработанных молочных продуктов). Именно контактный и аэрогенный пути заражения в 2008-2016 гг. привели к массовым эпидемиям Ку-лихорадки среди жи-

телей европейских стран, возникших как следствие эпизоотии мелкого рогатого скота на животноводческих фермах, где до 70% поголовья было заражено коксиделлезом. В результате десятки тысяч жителей развитых стран, таких как Нидерланды, Германия, Франция, Испания, Англия, Португалия и др., были инфицированы, отмечены смертельные случаи, нанесен серьезный экономический ущерб [9]. Исследования, проведенные в африканских странах, свидетельствуют о наличии стойких антропогенных очагов коксиделлеза, где процент скота, содержащего в крови антитела к возбудителю Ку-лихорадки, варьирует от 4 до 80% [8, 10]. В Чаде и Египте 70-80% поголовья верблюдов являются серопозитивными к возбудителю коксиделлеза. Данные ПЦР-анализа показали наличие ДНК возбудителя Ку-лихорадки в 22% образцах молока, полученных от коров в Египте, и в 63% образцов молока в Нигерии. В сельских регионах жилищные постройки размещаются, как правило, в непосредственной близости к местам содержания скота, что способствует передаче инфекции от животных к людям. Так, в Алжире у 15-24% жителей сельскохозяйственных районов выявлены антитела к возбудителю коксиделлеза, а в Намибии – у 26% обследованных доноров. В Сенегале более чем у 1% больных с лихорадкой в крови выявлена ДНК *C. burnetii* [8]. Эти данные свидетельствуют о возможности завозных случаев коксиделлеза в РФ и подводят к необходимости обследования ее граждан, посещающих Африканские страны.

В первичных очагах вероятен и трансмиссивный путь заражения коксиделлезом, как для человека, так и домашних животных в результате контакта с такими видами клещей, как *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. silvarum*, *H. punctata*, *Rh. sanguineus*, *H. concinna*, *H. japonica* и др., которые встречаются на территории РФ, и для которых доказана причастность к циркуляции *C. burnetii* и других возбудителей инфекций [8, 11 – 13]. Для лихорадки Ку не характерна типичная форма заболевания, отсутствуют патогномичные признаки, при этом ей присущ широкий спектр клинических проявлений, характерных для многих инфекционных заболеваний различной этиологии. В 60% случаев болезнь протекает бессимптомно, больные переносят ее на ногах, не обращаясь за медицинской помощью. По-видимому, данный факт и является причиной гиподиагностики этой инфекции. При острой манифестной форме Ку-лихорадка протекает в виде гриппоподобного состояния, лихорадки, атипичной пневмонии, бронхита, трахеита, менингоэнцефалита, гепатита, могут наблю-

даться поражения сердца. Смертность составляет около 1%. При отсутствии медикаментозного лечения переход в хроническую форму отмечается у 5-10% заболевших, возможным проявлением которой может быть эндокардит и васкулит [7, 8, 14]. В случае наличия у больного до инфицирования кокциеллезом сердечно-сосудистой патологии и иммунодефицитного состояния, развитие эндокардита может развиваться без острой фазы заболевания. Отсутствие должного лечения, требующего длительного применения антибиотикотерапии, сроком от нескольких месяцев до года и более, при эндокардите и васкулите, имеющих кокциеллезную этиологию, приводит к повышению смертности с 5 до 25- 60%. Особую опасность Ку-лихорадка представляет для беременных, у которых осложнения (спонтанные аборт, смерть и задержка роста плода, преждевременные роды) составляют более 80% [15].

В Российской Федерации официальные показатели заболеваемости Ку-лихорадкой не высоки и в период 1957-2014 гг. варьировали в пределах от 0,01 до 1,0 на 100 тыс. населения. Так, среднее число заболевших с 2007 по 2015 гг. составило 102 человека в год, пик заболевших отмечен в 2009 г. с максимальным количеством 205 случаев [14, 16]. При этом, несмотря на официальную регистрацию лишь спорадических случаев заболевания, контакт населения с возбудителем в нашей стране, по-видимому, является высоким. Так, в крови 1,5- 4,3% доноров из разных регионов страны выявлены антитела к возбудителю Ку-лихорадки, причем среди различных слоев населения этот показатель варьирует в пределах от 2 до 40% [16]. Серологические маркеры кокциеллеза активно выявляются у собак, поступающих в ветеринарные лечебницы (2,6% обследованных), а у сельскохозяйственных животных (2-29%), что сопоставимо с уровнем заражения скота в странах Африки [13]. Опубликованные данные дают основание предполагать о наличии стойких очагов в регионах России и о гиподиагностике Ку-лихорадки. Циркуляция кокциелл зафиксирована в 50 субъектах РФ, в том числе в Западной Сибири (в Омской и Новосибирской областях, Республике Алтай), Восточной Сибири (Республика Бурятия) и на Дальнем Востоке (Приморский край) [12, 17, 18, 19]. В период с 1957 г. до начала 2000-х годов спорадические случаи заболевания Ку-лихорадкой регистрировались у пациентов Новосибирской области [16, 20]. Далее, на протяжении 18 лет диагностика Ку-лихорадки не проводилась в связи с отсутствием диагностикумов для подтверждения данной нозологической формы.

Целью исследования явилось выявление генетических и серологических маркеров возбудителя *C. burnetii* у больных в Новосибирской области, поступивших на лечение в лихорадящем состоянии с подозрением на заболевания, вызванные инфекциями, передаваемые клещами.

Материал и методы. Обследованы 325 пациентов, поступивших в весенне-летний период 2018 г. на лечение в ГИКБ №1 г. Новосибирска с подозрением на заболевания инфекциями, передаваемыми клещами (ИПК). Критерием отбора для обследования пациентов явилось обязательное наличие лихорадочного состояния у больных, факт присасывания, напозвание клеща или посещение лесопарковой зоны. Для проведения анализа с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) образцы крови у пациентов забирали в период лихорадки натошак в пробирки S-Monovette, содержащие ЭДТА (SARSTEDT, Германия). Образцы цельной крови (ЦКР) каждого больного были использованы для ПЦР-анализа

непосредственно, а также для получения образцов лейкоцитарной фракции крови (ЛФК) по следующей схеме. Вакуумную пробирку с кровью центрифугировали 10 мин при 800 g. Отобранный верхний слой плазмы отбирали в отдельные пробирки вместе с лейкоцитарным кольцом, находящимся на границе двух фаз (плазма/эритроциты), и центрифугировали повторно 10 минут при 11000 g. Далее верхнюю часть плазмы удаляли, оставляя осадок и 200 мкл надосадочной жидкости, содержащей ЛФК. Полученный осадок ресуспендировали и использовали для выделения суммарной фракции нуклеиновых кислот (НК) с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителя. Параллельно от каждого обследуемого больного образцы НК выделяли тем же методом из 250 мкл ЦКР, предварительно обработанной раствором для гемолиза из набора «РеалБест Гемолитик» («Вектор-Бест», Новосибирск). Элюция выделяемых образцов НК проводилась в объеме 350 мкл. Для постановки ПЦР-РВ в реакции использовали по 50 мкл выделенного образца НК. Комплексное исследование с помощью ПЦР-РВ по выявлению генетических маркеров возбудителей ИПК проводили с применением коммерческих тестов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s. l./PHK ВКЭ*», «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*», «РеалБест ДНК *Rickettsia species*», «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*», «РеалБест ДНК *Babesia species*» («Вектор-Бест», Новосибирск). Дополнительное исследование выделенных проб НК проводили с помощью экспериментальной лабораторной версии тест-системы «Сохбур-1», разработанной в АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), представляющей набор реагентов для обнаружения ДНК-мишени *Coxiella burnetii* (фрагмент гена транспозазы *IS1111*) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной регистрацией данных. В состав диагностического набора реагентов «Сохбур-1» входят пробирки, содержащие лиофильно высушенные ПЦР-смеси, в которых обеспечивалась амплификация и детекция участка гена *C. burnetii* длиной 70 п.н. с помощью специфических праймеров Cbur-IS-F5, Cbur-IS-R2 и зонда Cbur-IS-Z2, конечная концентрация которых в реакции составила 0,5 мкМ и 0,25 мкМ соответственно. Последовательности используемых олигонуклеотидов и протокол амплификации ДНК-маркера описаны ранее [12]. Все постановки реакции сопровождались отрицательными и положительными контролями. Дополнительную амплификацию с положительных образцов, содержащих ДНК *C. burnetii*, по фрагментам генов *IS1111* и гена белка теплового шока В (heat shock protein В, *hspB*) с последующим секвенированием проводили с использованием праймеров, представленных в табл. 1.

Методология дизайна и анализа синтезированных праймеров и зондов, применяемых в данной работе, опубликованы ранее [21]. Олигонуклеотиды получены в лаборатории химического синтеза АО «Вектор-Бест». Для амплификации ДНК кокциеллы с целью дальнейшего секвенирования использовали 45 мкл выделенной из образца суммарной НК при концентрации праймеров 0,5 мкМ. Используемая программа амплификации: 1 стадия: 94°C – 1 мин; 2 стадия, 5 циклов: 94°C – 15 с, 62°C – 20 с, 72°C – 20 с; 3 стадия 45 циклов: 94°C – 15 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 секунд. Постановка ПЦР-РВ осуществлялась на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Для проведения электрофоретического анализа

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры, применяемые для амплификации и секвенирования участков генов *Coxiella burnetii*

Ген	Название праймеров	Структура праймера (5'→3')	Длина ампликона (п.н.)
<i>IS1111</i>	<i>PKO-Cbur-F4</i>	GTTGGTCCCTCGACAACA	390
	<i>PKO-Cbur-R2</i>	ACCGTATGAATCAGCTTAATCA	
<i>htpB</i>	P-CB-gro-F3	ATCATAGTCCGACGAGCTA	770
	P-CB-gro-R4	TCAAAGCCGTTATTGCTGGA	

полученных ампликонов применяли 1,5 % агарозный гель. Секвенирование продуктов ПЦР, очищенных с помощью колонок GFX (Amersham Biosciences, США), проводили по методу Сэнгера на секвенаторе ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). Сборка последовательностей ПЦР-фрагментов выполнена с помощью программы MEGA 6.0 [22]. Исследование уровней сходства проводили с помощью программного обеспечения BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Выравнивание последовательностей методом ClustalW и построение дендрограмм методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) выполняли с использованием программного обеспечения MEGA 6.0 [22]. Достоверность дендрограмм оценивали с помощью бутстреп-анализа с 1000 репликациями. Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК *C. burnetii* депонированы в международной базе данных NCBI под следующими номерами: гена транспозазы *IS1111* – МК064571 (Novosibirsk-2018/161), МК064572 (Novosibirsk-2018/180), МК064573 (Novosibirsk-2018/286); гена *htpB* – МК335931 (Novosibirsk-2018/161), МК335932 (Novosibirsk-2018/180), МК335933 (Novosibirsk-2018/286).

Для проведения серологических исследований забор крови производили в пробирки S-Monovette Z-Gel (SARSTEDT, Германия), которые центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин и далее отделяли полученные образцы сыворотки. Проверку на наличие антител класса М к ВКЭ, а также IgM и IgG к возбудителям ИКБ осуществляли с помощью ИФА-тестов производства АО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Наличие специфических антител класса G к *C. burnetii* в образцах сыворотки крови больных проводили с использованием двух тестов: «Coxiella burnetii ELISA IgG» («Vircell», Spain) и «Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgG к антигенам коксиелл Бернета» (ИФА-анти-Ку-G) (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург). Проведенное исследование одобрено этическим комитетом больницы, и все вовлеченные в него пациенты дали письменное согласие.

Результаты и обсуждение. В мае – июле 2018 г. в ГИКБ № 1 г. Новосибирска с подозрением на заболевание ИПК поступило 325 больных в лихорадящем состоянии. Согласно данным эпиданамнеза, развитие лихорадки у заболевших было сопряжено с присасыванием или напозанием клеща, либо развилось после посещения лесопарковой зоны. Применение комплексного подхода с использованием коммерческих ПЦР-тестов по выявлению генетических маркеров целого спектра возбудителей ИПК, циркулирующих в Западной Сибири (Новосибирской области), обеспечило выявление в образцах ЛФК

и ЦКР у обследованных больных РНК ВКЭ, ДНК боррелий, возбудителей ИКБ, ДНК *Borrelia miyaotoi*, возбудителя клещевой возвратной лихорадки (КВЛ), а так же ДНК *Rickettsia sibirica*, возбудителя сибирского клещевого тифа. Циркуляция перечисленных возбудителей ИПК в Новосибирской области отмечена ранее [23 – 26]. Дополнительно, выделенные образцы ДНК параллельно анализированы на наличие генетического маркера *C. burnetii*, возбудителя Ку-лихорадки с помощью экспериментальной лабораторной версии ПЦР-теста в режиме реального времени «Coxbur-1». В качестве ДНК-мишени в этом диагностическом тесте выбран участок генома *IS1111* коксиеллы длиной 70 п.н., детектируемый с помощью комбинации олигонуклеотидов Sbur-IS-F5, Sbur-IS-R2 и Sbur-IS-Z2, которая успешно апробирована ранее [12]. Фрагмент этого генома выбран на основании анализа базы данных NCBI, который свидетельствовал о наличии консервативной нуклеотидной последовательности *IS1111* в геномах известных на сегодняшний день штаммов и изолятов возбудителя Ку-лихорадки и отсутствия таковой в депонированных последовательностях других микроорганизмов. Ранее с помощью разработанного экспериментального лабораторного ПЦР-теста были получены положительные результаты при анализе клещей, ветеринарных образцов и клинического материала, полученного от больных, инфицированных возбудителем Ку-лихорадки, у которых наличие ДНК *C. burnetii* подтверждено данными секвенирования [12, 18, 19].

Таким образом, данные, полученные в результате использования ПЦР-теста «Coxbur-1», показали наличие у 9 из 325 (2,8%) обследованных лихорадящих больных в Новосибирской области ДНК-маркера *C. burnetii* в пробах суммарных НК, выделенных из клинических образцов. ДНК возбудителя коксиеллёза выявлена как в образцах ЦКР, так и в образцах ЛФК у 4 из 9 положительных: №8, 161, 180 и 286 (табл. 2), причем у 3 из них отмечалась ощутимая нагрузка ДНК-маркера *C. burnetii* (Ct от 28 до 34 цикла в ПЦР-РВ). Полученные результаты ПЦР-анализа воспроизведены в повторях. В качестве положительного контроля (ПКО) использованы ампликоны, ранее разработанные по участку гена *IS1111* с помощью праймеров, представленных в табл. 1, с использованием ДНК *C. burnetii*, выделенной из клещей [18]. Генетический маркер возбудителя дополнительно детектирован и в анализированных образцах сыворотки крови от больных № 161 и 286. Однако, у пяти пациентов (№ 3, 24, 40, 75 и 102) ДНК коксиеллы удалось выявить только в одном из двух видов анализируемого клинического материала, либо в образцах ЦКР, либо в образцах ЛФК с высокими значениями Ct (Ct=35–37), что свидетельствовало о низкой нагрузке возбудителя и затрудняло воспроизведение полученных положительных результатов в повторных постановках ПЦР-РВ. Тем не менее, кривые разгорания специфического зонда, подобранного к ДНК-мишени *C. burnetii* (участка гена *IS1111*), во всех реакциях исследуемых образцов были однотипны, имели сигмообразный (S-образный) профиль, уровень разгорания сопоставим с ПКО (рис. 1).

Присасывание (напозание) клеща отмечено в анамнезе 7 из 9 пациентов, у которых выявлен маркер возбудителя Ку-лихорадки. Шесть человек были заражены на территории г. Новосибирска или Новосибирской области, двое пострадали от присасывания клеща во время отдыха на Алтае, один – во время поездки в г. Бишкек (Республика Киргизия). Один из жителей Новосибирска

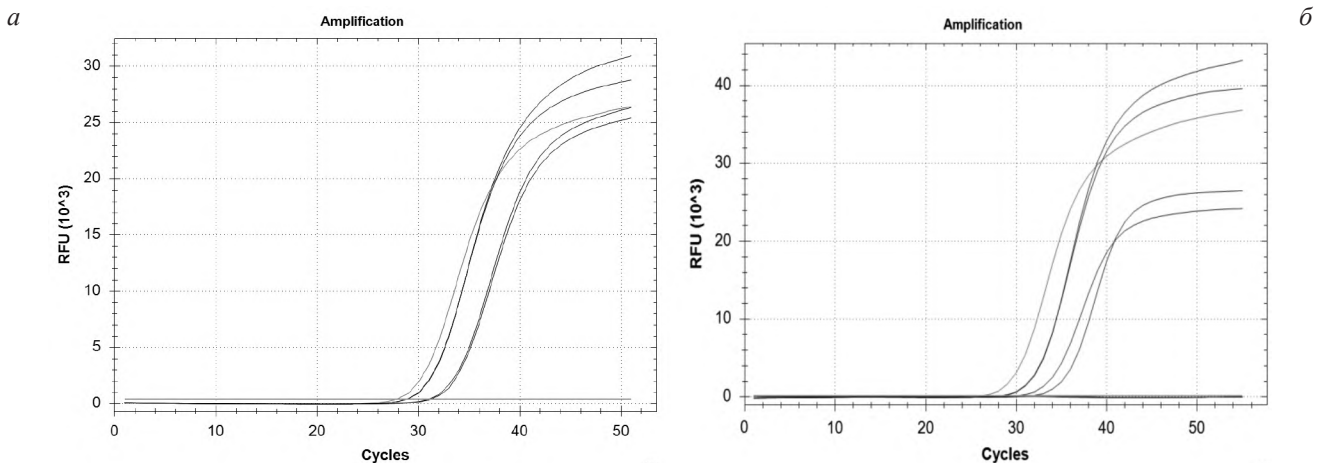


Рис. 1. Детекция в ПЦР-РВ ДНК-маркера *C. burnetii*, участка гена *IS1111*, в образцах суммарной НК, выделенной из ЦКР (а) и ЛФК (б) больных №161 и 180 (в двух повторах) со значениями $St=28-32$, для ПКО значения $St=27$.

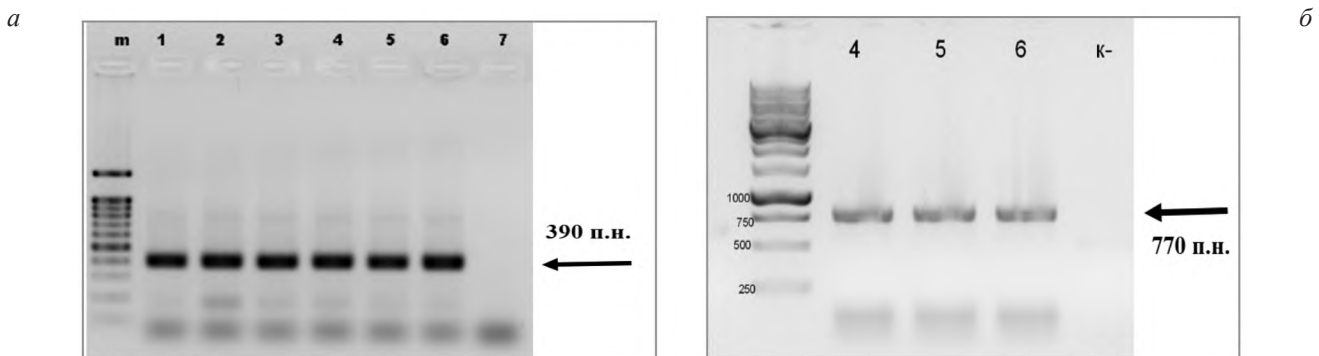


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК *C. burnetii*, выделенной из образцов крови лихорадящих больных №161, 180 и 286. а – амплификация по участку гена *IS1111* длиной 390 п.н. (в двух повторах); б – гена *htpB* длиной 770 п.н.

ска контакт с клещом отрицал, но до начала заболевания посещал дачу и был укушен собакой. Контакты с домашними и сельскохозяйственными животными, а также употребление в пищу сырого молока у других заболевших не фигурировали в анамнезе.

У всех обследованных заболевание протекало остро, с повышением температуры тела до 39-40 °С. Продолжительность лихорадки составила от 7 до 10 дней (в условиях лечения антибактериальными препаратами). Клинические проявления представлены умеренно выраженными интоксикационным синдромом (слабость, утомляемость) и головной болью. У некоторых пациентов отмечались фарингит, тошнота, рвота, диарея, гепатит либо гепатомегалия. При поступлении в ГИКБ №1 шести заболевшим был поставлен диагноз «клещевой энцефалит» (лихорадочная форма), трем другим – «сибирский клещевой тиф», ИКБ и ОРВИ (табл. 2). Однако, так как у пациентов в образцах крови детектирована ДНК *C. burnetii*, и не выявлены ДНК-маркеры к возбудителям других ИПК, циркулирующих в Западной Сибири, а также отсутствовали серологические маркеры к ВКЭ (IgM) и к возбудителям ИКБ (IgM, IgG), сделано предположение, что лихорадочные состояния у этих больных обусловлены именно наличием в крови возбудителя Ку-лихорадки. Поэтому с целью подтверждения положительных результатов ПЦР-анализа, которые получены с помощью теста «Сохбиг-1», были предприняты попытки амплифицировать ДНК *C. burnetii* по участкам генов *IS1111* и *htpB* длиной 390 и

770 п.н., соответственно, с использованием комбинаций праймеров (см. табл. 1). Амплификаты обоих участков генов соответствующей длины получены с проб ДНК, повторно выделенных из крови трех больных: №161, 180 и 286 (рис. 2). Попытка амплифицировать ДНК *C. burnetii*, полученную из образцов от 6 других положительных больных, оказалась безуспешной, возможно из-за низкой нагрузки возбудителя в крови, низкой нагрузки его ДНК в полученных пробах, что описано выше.

Наработанные ампликоны по участкам генов *IS1111* и *htpB*, ДНК которых выделена из крови трех больных (№161, 180, 286), успешно секвенированы и депонированы в базе данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Результаты проведенного молекулярно-генетического анализа свидетельствовали, что полученные по *IS1111* и *htpB* нуклеотидные последовательности трех изолятов Novosibirsk-2018/161 (МК064571 и МК335931), Novosibirsk-2018/180 (МК064572 и МК335932) и Novosibirsk-2018/286 (МК064573 и МК335933) полностью аналогичны между собой. Анализ последовательностей с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) показал, что последовательности этих трех изолятов 100% идентичны последовательностям двух штаммов *C. burnetii* «CbuK Q154» (CP001020) и «MSU Goat Q177» (CP018150), полноразмерные геномы которых представлены в базе данных GenBank. Следует отметить, что именно для *C. burnetii* последовательность *IS1111* является высококонсервативной, и в настоящее время для конкрет-

ного используемого нами локуса в базе данных GenBank отсутствуют аналогичные последовательности, полученные для *Coxiella*-подобных эндосимбионтов, выявленные в клещах. Согласно опубликованным данным, ген транспозазы *IS1111* является многокопийным геном, и его использование в качестве мишени в ПЦР позволяет повысить чувствительность анализа, что является причиной частого использования последовательностей его ДНК в качестве мишеней в диагностике возбудителя Ку-лихорадки [27]. Поэтому, для детекции *C. burnetii* в клинических образцах использован разработанный нами ПЦР-тест в режиме реального времени с праймерами, направленными к данному локусу. Тем не менее, хотя и считается, что последовательность *IS1111* присутствует только в геномах *C. burnetii*, для *Coxiella*-подобных эндосимбионтов описаны *IS1111*-подобные мобильные элементы, демонстрирующие 90% уровень сходства нуклеотидных последовательностей с последовательностями *IS1111 C. burnetii* [28], для которых может существовать широкий спектр вариантов, различающихся по последовательностям и длинам [29]. Таким образом, вследствие малой изученности данного вопроса и отсутствия соответствующих последовательностей в базе данных GenBank гипотетически допускали возможность, что последовательность *IS1111* для *C. burnetii* могла и не быть высокоспецифичной. Поэтому, для исключения ложноположительных результатов наряду с секвенированием полученных фрагментов *IS1111*, для подтверждения выявления участка ДНК *C. burnetii* использовали комбинацию праймеров Р-СВ-гро-F3 и Р-СВ-гро-R4 (см. табл. 1) для выявления другого локуса, соответствующего гену *htpB*. Дополнительно амплифицированные с образцов ДНК возбудителя, выделенные из трех изолятов (№161, 180, 286), фрагменты гена *htpB* длиной 770 п.н. были так же успешно

секвенированы (МК335931, МК335932, МК335933). Построенная дендрограмма по фрагменту гена *htpB* (рис. 3) наглядно свидетельствует о том, что полученные последовательности изолятов *C. burnetii* аналогичны последовательностям штаммов СbO1 (EU888864), СbС1 (EU888862) и Xinqiao (AY251297), две из которых описаны при получении рекомбинантного белка теплового шока В, используемого в качестве антигена для иммунодиагностики Ку-лихорадки [30]. При этом у секвенированных фрагментов отмечаются серьезные отличия от последовательностей *htpB Coxiella-like* бактерий, выделенных из таких клещей как, *I. ricinus*, *D. silvarum*, *D. marginatus* и других иксодид неустановленного вида. Таким образом, по результатам, полученным на основании последовательностей двух локусов *IS1111* и *htpB*, можно судить о том, что последовательности ДНК, выявленные из трех изолятов, действительно соответствует возбудителю *C. burnetii*.

Для дополнительной оценки правильности результатов, полученных в ПЦР-РВ с помощью разработанного экспериментального диагностического теста «Сохвир-1» использовали серологический метод для подтверждения возможного инфицирования больных возбудителем Ку-лихорадки. У всех пациентов, у которых в ПЦР-РВ выявлен ДНК-маркер *C. burnetii*, дополнительно проведен анализ образцов сыворотки крови с помощью иммуноферментных наборов реагентов испанского и российского производства, предназначенных для определения антител класса G к антигенам II фазы («Coxiella burnetii ELISA IgG» «Vircell») или к I и II фазам («ИФА-анти-Ку комплект №1» (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург). Взятие первой партии крови для проведения ИФА у обследованных больных произведено в первые дни острой фазы заболевания (на-

Таблица 2

Данные эпиданамнеза, предварительный диагноз, результаты молекулярно-генетического анализа и ИФА клинических образцов, полученных от больных, госпитализированных с подозрением на ИПК

№ больного	Эпиданамнез	Регион заражения	Первичный диагноз	ПЦР-РВ, выявление ДНК <i>C. burnetii</i> (значения Ct) в образцах:		Результаты секвенирования ДНК <i>C. burnetii</i> по участкам генов:		Выявление специфических антител класса G к <i>C. burnetii</i> (значения образцов в единицах ОП)	
				ЦКР	ЛФР	<i>IS1111</i>	<i>groEL</i>	«Coxiella burnetii ELISA IgG» «Vircell»	«ИФА-анти-Ку комплект №1» НИИ им. Пастера
3	Наползание клеща	Новосибирская обл.	КР	35, отриц	отриц., отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
8	Присасывание клеща	г. Бишкек, Киргизия	КЭ	36, отриц.	35, отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
24	Присасывание клеща	Республика Алтай	КЭ	отриц., отриц.	37, отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
40	Присасывание клеща	Республика Алтай	ИКБ	38, отриц.	отриц., отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
75	Присасывание клеща	Новосибирск	КЭ	отриц., отриц.	38, отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
102	Присасывание клеща	Новосибирск	КЭ	37, отриц.	отриц., отриц.	отриц.	отриц.	полож. (1,6 ое)	полож. (1,6 ое)
161	Дача, укусы собаки	Новосибирская обл.	КЭ	31, 31	29, 29	полож.	полож.	полож. (1,7 ое)	полож. (3,8 ое)
180	Наползание клеща	Новосибирская обл.	КЭ	30, 32	28, 30	полож.	полож.	полож. (1,5 ое)	полож. (3,6 ое)
286	Дача, лес	Новосибирская обл.	ОРВИ, КЭ	34, 34	30, 30	полож.	полож.	полож. (1,4 ое)	полож. (3,5 ое)

Примечание. КР – клещевой риккетсиоз (сибирский клещевой тиф); КЭ – клещевой энцефалит; ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз; ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция; ОП – оптическая плотность, указанная для положительных образцов. * – интерпретация результата исследования (отриц/полож) проведена в соответствии с инструкциями по применению наборов реагентов.

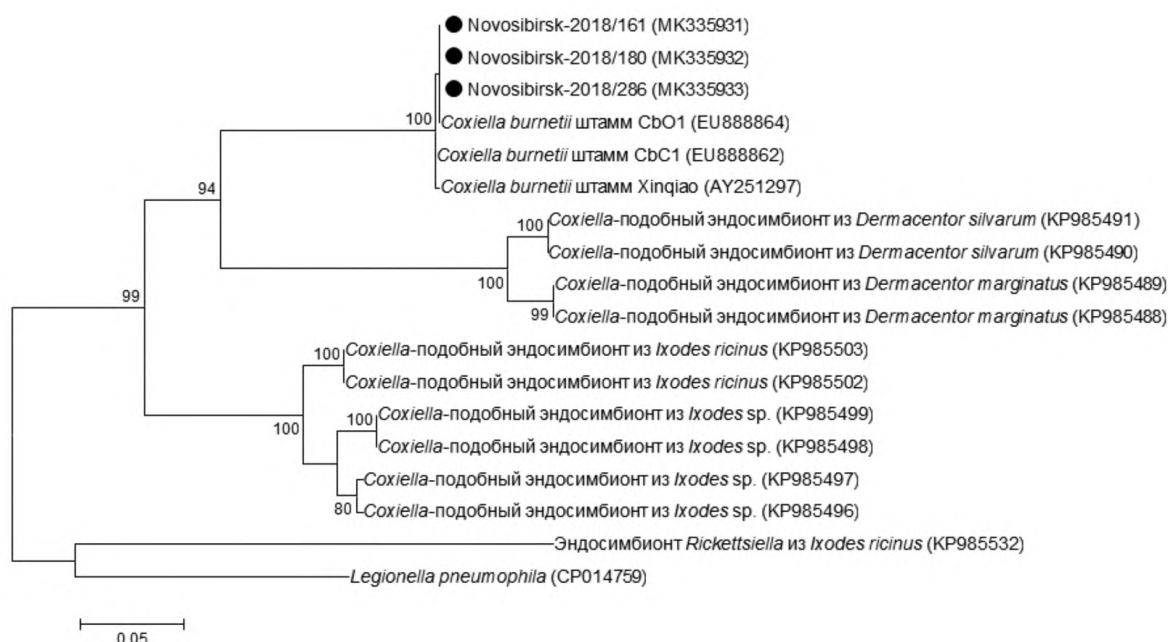


Рис. 3. Дендрограмма изолятов *C. burnetii*, построенная на основании последовательностей фрагмента гена *htpB* методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML). Номера доступа в базе данных GenBank указаны в скобках. Последовательности, определенные в данной работе, отмечены жирной точкой.

чало клинических проявлений), повторный – через 4-6 месяцев, в период реконвалесценции. Ни у одного из 9 больных в первичных образцах сыворотки специфические антитела (АТ) не были выявлены с помощью обоих тестов. Во второй партии сывороток у четырех из девяти больных (№102, 161, 180 и 286) обоими диагностикумами выявлены АТ к *C. burnetii* (табл. 2). Результаты ОП (оптической плотности) в ИФА варьировали от 1,4 до 1,73 о.е., при тестировании набором производства «Viracell» (Испания), и с ОП в диапазоне 1,6–3,8 о.е. – набором производства НИИ ЭИМ им. Пастера (Россия), при максимальном допустимом значении ОП 4,0 о.е для последнего.

Согласно нормативной документации, подтвердить диагноз Ку-лихорадки можно любым из существующих методов: серологическим, молекулярно-генетическим, микробиологическим (СП 3.1.7.2811-10 Профилактика коксиеллеза (лихорадка Ку), 2010 года № 181). Из серологических методов выбрали ИФА, как наиболее доступный и самый чувствительный. Сероконверсия при коксиеллезе наступает на 7-15 день после появления клинических симптомов, и АТ могут сохраняться в крови от нескольких месяцев до нескольких лет, что подтверждено рядом исследований [14, 27]. Особенно это показательно для специфических IgG. В полученных нами данных у четырех пациентов с положительным результатом ПЦР-РВ выявлены АТ к коксиелле в периоде реконвалесценции при параллельном исследовании двумя наборами разных производителей. Данный факт является прямым доказательством того, что четыре вышеуказанных пациента перенесли Ку-лихорадку. При этом у всех четырех серопозитивных больных с помощью ПЦР-анализа показано наличие в крови генетического маркера *C. burnetii*, у троих из которых наличие ДНК возбудителя дополнительно подтверждено с помощью секвенирования по двум участкам генов (см. табл. 2).

Заключение. Использование комплексного подхода с применением ПЦР-РВ и ИФА в анализе клинических

образцов, полученных от лихорадящих больных, поступивших в инфекционную больницу г. Новосибирска с подозрением на инфекцию, передаваемую клещами, обеспечило выявление генетических и серологических маркеров *C. burnetii*. Данные факты свидетельствуют о том, что часть коксиеллезных больных проходит «под маской» других ИПК, что, в свою очередь не позволяет назначить адекватное лечение. В связи с этим, больные с лихорадкой неустановленного генеза должны быть обязательно обследованы на заболевание коксиеллезом. В результате проведенного исследования данные, впервые полученные с использованием результатов ИФА и ПЦР-анализа, обеспечили выявление на территории Новосибирской области лиц с заболеванием лихорадкой Ку, возникшим в результате контакта с клещами. Это дает основание предположить, что на территории Западной Сибири помимо антропоургических существуют и природные очаги коксиеллеза. Для подтверждения этого предположения требуется проведение дополнительных широкомасштабных исследований.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-11, 15, 21, 22, 25, 26, 28-30 см. REFERENCES)

- Ржегачек И. Иксодовые клещи и риккетсии. В кн.: Ржегачек И., Дайтер А.Б. Риккетсиозы: сборник научных трудов Института им. Пастера. Л.; 1989; Т. 66: 68–90.
- Лубова В.А., Леонова Г.Н., Шутикова А.Л., Бондаренко Е.И. Индикация возбудителя Ку-лихорадки на юге Дальнего Востока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 720–8.
- Борисевич С.В., Яковлев Э.А. Эколого-эпидемиологические особенности возбудителя лихорадки Ку в Российской Федерации и странах Европы. *Бактериология*. 2016; 1(1): 96–101.
- Лукин Е.П., Мищенко О.А., Борисевич С.В. Лихорадка Ку в XXI в.: материал для подготовки лекции. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2019; 8(4): 62–77.

16. Яковлев Э.А., Борисевич С.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. Заболеваемость лихорадкой Ку в Российской Федерации и странах Европы: реалии и проблемы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4: 49-54. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-49-54>.
17. Красиков А.П., Рудаков Н.В. Риккетсиозы, коксиеллез и анаплазмозы человека и животных. Омск: ИЦ Омский научный вестник; 2013.
18. Сильченко Е.В., Ошорова Л.М., Бальжинимаева И.Ц., Бондаренко Е.И., Дашеева Н.А., Балданов Б.В., Сымбелова Т.А. Выявление клещевых инфекций с помощью ПЦР-анализа, проводимого в рамках клинических исследований на базе «Республиканской клинической больницы» г. Улан-Удэ. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3 (4): 138–42.
19. Щучинова Л.Д., Бондаренко Е.И. Случаи заражения людей Ку-лихорадкой трансмиссивным путем. В кн.: Покровский В.И., ред. Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XI Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием (1-3 апреля 2019 г.). М.: Медицинское Маркетинговое Агентство; 2019; 234–5.
20. Рудаков Н.В., Тофанюк Е.Ф., Бурцев Ю.К., Федоров Е.Г., Мельникова З.В. Эпидемиологическая характеристика очагов лихорадки Ку на территории Новосибирской области. В кн.: Ржегачек И., Дайтер А.Б. Риккетсиозы: сборник научных трудов Института им. Пастера. Л.; 1989; Т. 66: 43–54.
23. Тимофеев Д.И., Бондаренко Е.И., Топычканова Н.Г., Сибирцева С.Г., Малышкин М.Ф., Алексенцев В.А., Иванов М.К. Новые наборы реагентов для выявления нуклеиновых кислот вируса клещевого энцефалита и боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l. методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. *Новости «Вектор-Бест»*. 2014; 1(71): 2–11.
24. Бондаренко Е.И., Позднякова Л.Л., Сибирцева С.Г., Тимофеев Д.И., Фоменко Н.В., Иванов М.К. Набор реагентов для выявления *Borrelia miyamotoi* – возбудителя клещевой возвратной лихорадки методом ПЦР в режиме реального времени. *Новости «Вектор-Бест»*. 2013; 1 (67): 2–8.
27. Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Кондрашова В.Д. Лабораторные методы диагностики Ку-лихорадки и генотипирование *Coxiella burnetii*. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2017; 2: 49–60.
- eration and European countries. *Bakteriologiya*. 2016; 1(1): 96–101. (in Russian)
14. Lukin E.P., Mishhenko O.A., Borisevich S.V. Q fever in the XXI century: material for the preparation of the lecture. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2019; 8(4): 62–77. (in Russian)
15. Carcopino X., Raoult D., Bretelle F., Boubli L., Stein A. Q Fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1166: 79–89.
16. Yakovlev Ye.A., Borisevich S.V., Popova A. Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V. The incidence of Q fever in the Russian Federation and European countries: realities and problems. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; 4: 49-54. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-49-54>. (in Russian)
17. Krasikov A.P., Rudakov N.V. Rickettsioses, coxiellosis and anaplasmosis of humans and animals [Rikketsiozy, koksiiellyoz i anaplazmozny cheloveka i zhivotnykh]. Омск: IC Омский научный вестник; 2013. (in Russian)
18. Sil'chenko E.V., Oshorova L.M., Bal'zhinimaeva I.C., Bondarenko E.I., Dasheeva N.A., Baldanov B.V., Symbelova T.A. Detection of tick-borne infections using PCR analysis carried out during the clinical trials at the «Republican Clinical Hospital» in Ulan-Ude city. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3 (4): 138–42. (in Russian)
19. Shchuchinova L.D., Bondarenko E.I. Cases of Q fever infection of humans by transmissive pathway. In: Pokrovskij V.I., ed. Infectious Diseases in the modern world: evolution, current and future threats: Proceedings of the XI Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases with International Participation, 2019, April 1-3; Moscow: Meditsinskoe Marketingovoe Agentstvo; 2019; 234–5. (in Russian)
20. Rudakov N.V., Tofanyuk E.F., Burcev Yu.K., Fedorov E.G., Mel'nikova Z.V. Epidemiological characteristics of Q fever foci on the territory of the Novosibirsk region. In: Rzhegachek I., Dajter A.B. Rickettsioses: collection of scientific works of Institute named for Pasteur. Leningrad; 1989; 66: 43–54. (in Russian)
21. Alieva E.E., Bondarenko E.I., Maliy K.D., Shvalov A.N., Verbenets E.A., Gafarova M.T. The role of Rhipicephalus sanguineus ticks parasitizing dogs in the spread of tick-borne rickettsial pathogens in the city of Sevastopol. *New Microbes and New Infections*. 2020; 36. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100704>.
22. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipksi A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics zanalysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30 (12): 2725–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
23. Timofeev D.I., Bondarenko E.I., Topychkanova N.G., Sibirceva C.G., Malyskhin M.F., Aleksentsev V.A., Ivanov M.K. New reagent kits for the detection of nucleic acids of tick-borne encephalitis virus and borrelia of the *Borrelia burgdorferi* s.l. complex by PCR with real-time detection. *Новости «Вектор-Бест»*. 2014; 1(71): 2–11. (in Russian)
24. Bondarenko E.I., Pozdnyakova L.L., Sibirceva C.G., Timofeev D.I., Fomenko N.V., Ivanov M.K. Reagent kit for detection of *Borrelia miyamotoi* – the causative agent of tick-borne recurrent fever by real-time PCR. *Новости «Вектор-Бест»*. 2013; 1 (67): 2–8. (in Russian)
25. Igolkina Y., Krasnova E, Rar V, Savelieva M, Epikhina T, Tikunov A, Khokhlova N, Provorova V, Tikunova N. Detection of causative agents of tick-borne rickettsioses in Western Siberia, Russia: identification of Rickettsia raoultii and Rickettsia sibirica DNA in clinical samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24(2): 199. e9-199.e12. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.003.
26. Tkachev S.E., Fomenko N.V., Rar V.A., Igolkina Y.P., Kazakova Y.V., Chernousova N.Y. PCR-detection and molecular-genetic analysis of tick-transmitted pathogens in patients of Novosibirsk region, Russia. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008; 298(S1): 365–7.
27. Freylikhman O.A., Tokarevich N.K., Kondrashova V.D. Laboratory methods for the diagnosis of Q fever and genotyping of *Coxiella burnetii*. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2017; 2: 49–60. (in Russian)
28. Vilcins I.M., Old J.M., Deane E. Molecular detection of Rickettsia, Coxiella and Rickettsiella DNA in three native Australian tick species. *Exp. Appl. Acarol.* 2009; 49: 229–42.
29. Duron O. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in Coxiella-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiology Letters*. 2015; 362(17): fmv132. doi: 10.1093/femsle/fmv132.
30. Fernandes I., Rousset E., Dufour P., Sidi-Boumedine K., Cupo A., Thiery R., Duquesne V. Evaluation of the recombinant Heat shock protein B (HspB) of *Coxiella burnetii* as a potential antigen for immunodiagnostic of Q fever in goats. *Vet. Microbiol.* 2009; 134 (3-4): 300–4.

Поступила 13.11.20

Принята к печати 28.12.20