

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Бондаренко Е.И.¹, Кудряшов А.В.¹, Евдокимова Л.С.², Ткачев С.Е.³, Аглетдинов Э.Ф.¹, Шварц Я.Ш.², Ставицкая Н.В.²

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛИХОРАДКИ КУ В ОБРАЗЦАХ МОКРОТЫ ОТ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

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

²ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Минздрава РФ, 630040, г. Новосибирск, Россия;

³Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, 420012, г. Казань, Россия

*Лабораторные методы исследования, используемые в диагностике лихорадки Ку (коксиеллеза), в большинстве регионов России не проводятся. Это приводит к гиподиагностике этого особо опасного заболевания. Бессимптомное течение инфекции у более половины заболевших, отсутствие патогномичных признаков и наличие широко спектра клинических проявлений при острой инфекции также способствуют снижению выявления коксиеллеза. Кроме того, не уделяется должного внимания изучению сочетанных с лихорадкой Ку инфекций у лиц с развитием иммунодефицитных состояний. После установления факта циркуляции коксиеллеза в Западной Сибири нами были проведены исследования, направленные на поиск генетических маркеров возбудителя Ку-лихорадки у больных туберкулезом, поступивших в Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза. С помощью ПЦР-РВ фрагмент гена IS1111 *C. burnetii* был выявлен в образцах мокроты у 10 из 94 (10,6%) обследованных. У шести из них наличие ДНК-маркера возбудителя лихорадки Ку в образцах было подтверждено с помощью секвенирования. Диагноз «туберкулез лёгких» поставлен по совокупности клинико-anamnestических, рентгенологических и лабораторных данных. Клинические формы заболевания у пациентов, содержащих в мокроте генетический материал коксиеллы, были распределены следующим образом: инфильтративный туберкулез лёгкого (ИТЛ) – у 6 человек; диссеминированный туберкулез лёгкого (ДТЛ) – у 1 больного; ИТЛ, осложнённый туберкулезом бронхов (ТБ) – у 1 обследуемого; ДТЛ совместно с ТБ – у 1 пациента. У восьми из перечисленных больных заболевание туберкулезом было выявлено впервые, один наблюдаемый был с рецидивом. Один пациент, также содержащий ДНК-маркер возбудителя Ку-лихорадки, был отнесен к категории непрофильных в связи с окончательным диагнозом “рак лёгкого”. Дополнительные исследования с помощью ПЦР-анализа показали наличие в мокроте одного больного ДНК как *M. tuberculosis*, так и *C. burnetii*. Таким образом, проведение комплексного обследования способствовало установлению у ряда пациентов города Новосибирска сочетанной с Ку-лихорадкой туберкулезной инфекции.*

Ключевые слова: лихорадка Ку; коксиеллез; *Coxiella burnetii*; туберкулез; ПЦР-РВ.

Для цитирования: Бондаренко Е.И., Кудряшов А.В., Евдокимова Л.С., Ткачев С.Е., Аглетдинов Э.Ф., Шварц Я.Ш., Ставицкая Н.В. Выявление генетических маркеров возбудителя лихорадки Ку в образцах мокроты от больных туберкулезом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (12): 729-738. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-12-729-738>

Для корреспонденции: Бондаренко Евгений Иванович, канд. мед.наук, науч.сотр. лаб. ПЦР АО «Вектор-Бест»; e-mail: ebondarenko@ngs.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.09.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликовано 00.12.2022

Bondarenko E.I.¹, Kudryashov A.V.¹, Evdokimova L.S.², Tkachev S.E.³, Agletdinov E.F.¹, Schwartz Y.S.², Stavitskaya N.V.²

IDENTIFICATION OF GENETIC MARKERS OF THE Q FEVER AGENT IN SPUTUM SAMPLES FROM TUBERCULOSIS PATIENTS.

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

²Novosibirsk Research Institute of Tuberculosis of the Ministry of Health of Russia;

³Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan Federal University, Kazan, Russia

*Laboratory research methods used in the diagnosis of Q fever (coxiellosis) are not carried out in most regions of Russia. This leads to underdiagnosis of this particularly dangerous disease. The asymptomatic course of infection in more than half of the patients, the absence of pathognomic signs and the presence of a wide range of clinical manifestations in acute infection also contribute to a decrease in the detection of coxiellosis. In addition, due attention is not paid to the study of infections associated with Q fever in persons with the development of immunodeficiency conditions. After establishing the fact of coxiellosis circulation in Western Siberia, we conducted studies aimed at searching for genetic markers of the causative agent of Q fever in patients with tuberculosis admitted to the Novosibirsk Tuberculosis Research Institute. Using PCR-RV, a fragment of the IS1111 *C. burnetii* gene was detected in sputum samples in 10 of 94 (10.6%) examined. In six of them, the presence of a DNA marker of the causative agent of Q fever in the samples was confirmed by sequencing. The diagnosis of “pulmonary tuberculosis” was made based on a combination of clinical, anamnetic, radiological and laboratory data. Of the patients containing coxiella genetic material in sputum, the clinical forms of the disease were distributed as follows: infiltrative pulmonary tuberculosis (IPT) – 6 patients; disseminated pulmonary tuberculosis (DPT) – 1 patient;*

IPT complicated by bronchial tuberculosis (BT) – 1 patient; DPT together with BT – 1 patient. In 8 of the listed patients, tuberculosis was detected for the first time. One observed patient had a relapse. One patient with a DNA marker of the causative agent of Q fever, was classified as non-core due to the final diagnosis of lung cancer. Additional studies using PCR analysis showed the presence of both M. tuberculosis and C. burnetii DNA in the sputum of one patient. Thus, conducting a comprehensive examination helped to establish tuberculosis infection in a number of patients in the city of Novosibirsk combined with Q fever.

Key words: *Q fever; coxiellosis; Coxiella burnetii, tuberculosis; RT-PCR.*

For citation: Bondarenko E.I., Kudryashov A.V., Evdokimova L.S., Tkachev S.E., Agletdinov E.F., Schwartz Y.S., Stavitskaya N.V. Identification of genetic markers of the Q fever agent in sputum samples from tuberculosis patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (12): 729-738 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-12-729-738

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

Information about authors:

Bondarenko E.I., <https://orcid.org/0000-0002-4699-9548>;
Kudryashov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8076-8455>;
Evdokimova L.S., <https://orcid.org/0000-0002-7608-2933>;
Tkachev S.E., <https://orcid.org/0000-0001-7767-380X>;
Agletdinov E.F., <https://orcid.org/0000-0002-6256-2020>;
Schwartz Y.S., <https://orcid.org/0000-0002-3036-9795>;
Stavitskaya N.V., <https://orcid.org/0000-0003-2616-6693>.

Conflict of interests. *The authors have no conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.09.2022

Accepted 20.10.2022

Published 00.12.2022

Введение. Лихорадка Ку (коксиеллёз) – природно-очаговое заболевание, которое широко распространено по всему миру, отмечается на всех континентах за исключением Антарктиды [1]. Этиологическим агентом лихорадки Ку выступает граммотрицательная бактерия *Coxiella burnetii*, относящаяся к роду *Coxiella*, семейства *Coxiellaceae* гаммапротеобактерий, называемая коксиеллой Бернета [2].

Эпидемиологи выделяют два вида очагов коксиеллёза: природные (первичные) и антропоургические (сельскохозяйственные). Первичные очаги существуют за счет циркуляции коксиелл среди диких теплокровных животных посредством кровососущих членистоногих переносчиков [1, 3]. Антропоургические очаги лихорадки Ку связывают с заражением сельскохозяйственных и домашних животных, которые являются доминирующим источником инфицирования человека, хотя трансмиссивный путь заражения коксиеллезом через клещей также вероятен [4 – 9].

Выделяют три основных пути заражения лихорадкой Ку: аэрогенный, контактный и алиментарный. Аэрогенный путь возникает после вдыхания диспергированных частиц, образующихся в результате высыхания испражнений животных, которые содержат возбудитель. Поскольку *C. burnetii* сохраняется в почве эти аэрозоли могут образовываться спустя долгое время после выброса бактерий зараженными животными (моча, кал, амниотическая жидкость, плацента) [10–13].

Контактный путь инфицирования лихорадкой Ку происходит в результате непосредственного ухода за животными, их стрижки, принятии родов, при забое скота, обработке мяса, шерсти, а также пуха птицы. Алиментарный путь заражения отмечен в результате употребления в пищу сырых, не обработанных термически молочных продуктов (молока, сметаны, тво-

рога). Также, в результате попадания возбудителя от зараженных животных в открытые водоемы возможно возникновение заболеваний в результате купания, полива, употребления сырой воды [6].

В Российской Федерации официальные показатели заболеваемости лихорадкой Ку невысоки, от нескольких десятков до 300 случаев в год [14–16]. Несмотря лишь на спорадические зафиксированные случаи заболевания, контакт с возбудителем граждан в нашей стране является высоким. Анализ донорской крови из ряда регионов РФ показал наличие антител к возбудителю коксиеллеза в 1,5 – 4,3% случаев. Среди различных слоев населения этот показатель может варьировать от 2 до 40% [15]. К примеру, проведенные в Омской области серологические исследования показали наличие антител к коксиеллезу у 3,3% обследованных, которые относились к группам профессионального риска. Среди работников ветеринарных станций процент серопозитивных составлял 10,9%, среди работников мясоперерабатывающих предприятий области – 2,5% [16]. Эти данные дают основание предполагать о наличии гиподиагностики коксиеллеза в РФ. По мнению специалистов, переход в Российской Федерации к частному фермерскому хозяйству и ослабление контроля со стороны ветеринарных служб, способствовало возникновению скрытых очагов коксиеллеза в сельскохозяйственных регионах страны. Сложившаяся ситуация могла способствовать вовлечению в эпидемический процесс большого количества людей, как обслуживающего персонала животноводческих угодий, так и жителей близлежащих населенных пунктов, что должно было привести к увеличению риска заболевания, его хронизации без проведения своевременной диагностики и должного этиотропного лечения [15, 16].

Циркуляция *C. burnetii* зафиксирована в 50 субъектах РФ, в том в числе в Западной и Восточной Си-

бири, на Дальнем Востоке [1, 17–21]. Однако, многие врачи даже не подозревают о существовании очагов и возможности заболевания коккиеллезом в их регионах, вследствие чего лабораторная диагностика этого заболевания в стране не проводится на должном уровне. Также, нельзя упускать вероятность завоза заболевания коккиеллезом в результате посещения гражданами России слабо развитых сельскохозяйственных стран.

Для Ку-лихорадки характерен довольно широкий спектр клинических проявлений, которые свойственны и для многих других заболеваний с инфекционной этиологией. В 60% случаев болезнь протекает бессимптомно, и, как правило, пациенты не обращаются за профессиональной медицинской помощью. В случае острой формы заболевания для коккиеллеза характерны такие проявления, как лихорадка, гриппоподобные состояния, менингоэнцефалит, гепатит, атипичная пневмония, бронхит, трахеит, катаральные явления, возможно поражение сердца. Часто заболевание протекает доброкачественно, смертность не превышает 1%. Однако, у 5-10% заболевших при отсутствии должного этиотропного лечения отмечается переход заболевания в хроническую форму с развитием эндокардитов и васкулитов, требующих уже более длительного применения антибиотикотерапии сроком от нескольких месяцев до года и более. Отсутствие специфического лечения лихорадки Ку при наличии сердечно-сосудистой патологии приводит к повышению смертности с 5 до 60% [7, 14].

Существование коинфекции при лихорадке Ку требует отдельного дополнительного изучения. Для сельскохозяйственных животных, по-видимому, это довольно распространенное явление. Проведенное в Омской области комплексное лабораторное исследование животных на целый спектр инфекций показало, что возбудитель коккиеллеза в организме хозяев находится в ассоциации с микоплазмами, листериями, лептоспирами и хламидиями [22]. Существование сочетанной инфекции Ку-лихорадки с другими инфекционными заболеваниями для человека изучено мало. Целенаправленного комплексного исследования в этом направлении почти не проводилось и исследования носили скорее случайный характер. Тем не менее, даже по имеющимся публикациям можно судить, что такие случаи могут быть нередкими в клинической практике и систематически выявляться при условии проведения тщательного комплексного исследования.

При этом нельзя исключать существования коинфекции при развитии у больных патологии органов дыхания. Так, в “Soroka Medical Center” (Беэр-Шева, Израиль) из 346 пациентов, госпитализированных с внебольничными пневмониями, у 20 (5,8%) заболевание было обусловлено коккиеллезом. При этом у шести из них отмечалась коинфекция Ку-лихорадки с возбудителем *Mycoplasma pneumoniae*, еще у одного – с *Legionella pneumophila* [23]. Стоит отметить описание нескольких случаев коккиеллеза в сочетании с мiliary туберкулезом. Коинфекция была зафиксирована как у пожилого человека, так и у пациента среднего возраста с нормальным иммунитетом [24, 25]. Ещё в

одном исследовании описано выявление *C. burnetii* у пациента с дыхательной недостаточностью, являющейся следствием туберкулеза [26]. Однако, массовых исследований на наличие коинфекции туберкулеза с лихорадкой Ку, по-видимому, не проводилось.

В связи с этим, целью настоящего исследования являлось проведение анализа образцов мокроты, полученных от больных туберкулезом, на наличие генетических маркеров возбудителя Ку-лихорадки. Проводимое исследование одобрено этическим комитетом клиники, все пациенты дали письменное согласие.

Материал и методы. Получение образцов. Изначально, для проведения исследования были отобраны 300 пациентов, поступивших в клинику ФГБУ Новосибирского НИИ туберкулеза (ННИИТ) с диагнозом «туберкулез лёгких», поставленным по совокупности клинико-anamnestических, рентгенологических и лабораторных данных (Диаскинтест, люминесцентная микроскопия мазка, посев на плотные и жидкие питательные среды). В качестве диагностического материала использовали образцы утренней мокроты, полученные индивидуально от исследуемых больных в течение 2016 года. Большая часть собранного клинического материала была использована в работе по выявлению ДНК микобактерий туберкулеза с помощью ПЦР-теста «Реал-Бест ДНК МВТС» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) с последующим секвенированием положительных образцов. Оставшиеся пробы выделенной из образцов мокроты ДНК от 94 больных туберкулезом, в основном из числа отрицательных по результатам ПЦР-анализа на наличие *M. tuberculosis complex*, использовали для проведения дополнительного исследования по выявлению ДНК-маркера возбудителя лихорадки Ку.

Подготовка образцов мокроты и выделение суммарной ДНК. Инактивация образцов мокроты от больных туберкулезом проводилась с помощью реагента «Амплитуб-Преп» (ООО «Синтол», г. Москва) согласно инструкции производителя [27]. Обработку проводили в соотношении 1:1 (обр./реаг.) в течение не менее 1 ч и не более 24 часов. Образцы переносили в пробирки объемом 2 мл и центрифугировали 15 мин при 3000g (7000 об/мин) с использованием центрифуги MiniSpin (Eppendorf GmbH, Германия). Супернатант удаляли, осадок использовали для выделения ДНК набором реагентов «Реал-Бест ДНК Экстракция100» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Элюцию проводили в объёме 200 мкл согласно рекомендации производителя.

ПЦР-анализ на наличие ДНК-маркера возбудителя Ку-лихорадки. Скрининг выделенных образцов ДНК на наличие в них генетического маркера возбудителя коккиеллеза *C. burnetii* с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием разработанной в лаборатории ПЦР АО «Вектор-Бест» экспериментальной лабораторной версии теста «Coxbur-1». Набор реагентов «Coxbur-1» в своем составе содержит пробирки с лиофильно высушенной ПЦР-смесью, в состав которой входят специфичные праймеры Cbur-IS-F5 (5'-AGAGTCTGTGGTTAAAAGCAC-3') и Cbur-IS-R2

(5'-TATTCGCTAACGCCACACA-3'), а также зонд Cbur-IS-Z2 (5'-ROX-TCATTGAGCGCCGCGGAATGAATCG-(BHQ-2)-3'), которые обеспечивают амплификацию и детекцию участка гена *IS1111* *C. burnetii* длиной 70 п.н. Конечная концентрация олигонуклеотидов в реакции составляла 0,5 мкМ и 0,25 мкМ, соответственно. Для постановки ПЦР-РВ использовали по 30 мкл выделенной из мокроты суммарной ДНК, применяя следующий протокол амплификации: 1 стадия: 50°C – 2 мин; 2 стадия: 95°C – 2 мин; 3 стадия: 50 циклов (94°C – 10 с, 60°C – 20 с), с измерением флуоресценции при температуре 60°C. Все исследования в ПЦР-РВ сопровождали положительными и отрицательными контролями. В качестве набора сравнения использовали набор «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии, г. Москва) согласно инструкции производителя. Постановку реакций осуществляли на амплификаторе CFX96 (BioRad, США).

Секвенирование ДНК коксиилл. Положительные образцы ДНК, содержащие генетический маркер *C. burnetii*, дополнительно использовали для амплификации фрагментов генов *IS1111*, *16S pPHK* и гена белка теплового шока *B* (*heat shock protein B*, *hspB*) с последующим секвенированием полученных последовательностей с применением праймеров, представленных в табл. 1. Технология дизайна с последующим анализом рабочих комбинаций олигонуклеотидов изложена ранее [28]. Синтез олигонуклеотидов осуществлен на базе лаборатории химического синтеза АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Для амплификации исследуемых генетических маркеров коксииллы с целью дальнейшего секвенирования брали по 45 мкл проб ДНК, выделенных из образцов мокроты, при концентрации праймеров 0,5 мкМ. Используемая программа амплификации: I стадия: 94°C – 1 мин; II стадия 5 циклов: 94°C – 15 с, 62°C – 20 с, 72°C – 20 с; III стадия 45 циклов: 94°C – 15 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 секунд. Электрофоретический анализ полученных продуктов проводился на 1,5% агарозном геле. Очищенные с помощью колонок GFX (Amersham Biosciences, США) ампликоны были секвенированы в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск) по методу Сэнгера на приборе ABIPrism 3100 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, США). Для сборки полученных последовательностей ДНК-фрагментов использована программа MEGA 6.0 [29]. Анализ уровней сходства осуществляли с применением программного обеспечения BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК *C. burnetii* представлены в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) под следующими номерами: ген транспозазы *IS1111*– MW323302 (Novosibirsk-2016/1759), MW323303 (Novosibirsk-2016/1769), MW323304 (Novosibirsk-2016/1966), MW323305 (Novosibirsk-2016/2037), MW323306 (Novosibirsk-2016/2752), MW323307 (Novosibirsk-2016/2574); ген *hspB*– MW323308 (Novosibirsk-2016/1759); ген *16S rRNA*– MW315955 (Novosibirsk-2016/1769).

Результаты и обсуждение. Анализ образцов ДНК, выделенных из мокроты обследуемых больных на наличие генетического маркера возбудителя лихорадки Ку, проводился с помощью экспериментальной лабораторной версии ПЦР-теста в режиме реального времени «Coxbur-1», который ранее показал хорошие результаты при апробации его на клинических образцах, ветеринарном и полевом материале [18 – 20, 30].

Ранее с целью проведения исследований для выявления ДНК микобактерий туберкулеза в образцах мокроты с помощью ПЦР-теста «Реал-Бест ДНК МВТС» было отобрано 300 больных, которые поступили с диагнозом «туберкулёз лёгких» в клинику Новосибирского НИИ туберкулеза. У 151 из 300 (50,3%) обследованных больных в пробах суммарной ДНК, выделенных из образцов мокроты, с помощью ПЦР-РВ был выявлен ДНК-маркер возбудителя туберкулеза [31]. После проведения первичного скрининга и последующего комплекса дополнительных исследований оставшиеся пробы ДНК от 94 больных были использованы для проведения дополнительных исследований на наличие генетических маркеров других возбудителей инфекций. Необходимо отметить, что при анализе с помощью теста «Реал-Бест ДНК МВТС» эти оставшиеся пробы в большей степени показали отрицательные результаты на наличие маркера возбудителей *M. tuberculosis complex*. Тем не менее, несмотря на отрицательные результаты ПЦР-анализа, у 94 пациентов значился диагноз «туберкулёз легкого», поставленный на основании результатов рентгенологических, клинико-anamnestических и лабораторных исследований.

Таким образом, в результате дополнительно проведенного скрининга с помощью экспериментального теста «Coxbur-1», ДНК-маркер *C. burnetii* был выявлен в 10 из 94 (10,6%) образцов мокроты, полученных от больных туберкулезом (табл. 2).

При постановке ПЦР-РВ в положительных образцах ДНК значения порогового цикла (Ct) варьировали

Таблица 1

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

Ген	Название праймера	Последовательность праймера (5'→3')	Длина ампликона (п.н.)
IS1111	PKO-Cbur-F4	GTTGGTCCCTCGACAACA	390
	PKO-Cbur-R2	ACCGTATGAATCAGCTTAATCA	
<i>hspB</i>	P-CB-gro-F3	ATCATAGTCCGACGAGCTA	770
	P-CB-gro-R4	TCAAAGCCGTTATTGCTGGA	
<i>16S pPHK</i>	C-Lk-F2	TCGGGTTGTAAGCACTTTC	412
	C-Lk-R5	AGCTAGTTCTCATCGTTGAC	

Анализ образцов ДНК *C. burnetii*, выделенных из образцов мокроты больных

№ образцов	Клиническая форма	Категория	ПЦР Coxbur-1 (Ct)	Секвенирование по участкам генов			ПЦР «АмплиСенс» (Ct)
				<i>IS1111</i>	<i>htpB</i>	<i>16S pPHK</i>	
1769	ИТЛ	Вв	34, 34	<i>C.burnetii</i>	Не прошел	<i>C.burnetii</i>	29
1870	ДТЛ, ТБ бронхов	Вв	36	Не анализ.	Не анализ.	Не анализ.	Не анализ.
1966	ИТЛ	Рецидив	36	<i>C.burnetii</i>	Не прошел	Не прошел	Не анализ.
2037	ИТЛ	Вв	35, 35	<i>C.burnetii</i>	Не прошел	Не прошел	33
2113	ДТЛ	Вв	36	не прошел	Не анализ.	Не анализ.	Не анализ.
2156	ИТЛ	Вв	36, 36	не прошел	Не анализ.	Не анализ.	Не анализ.
2572	ИТЛ	Вв	36	<i>C.burnetii</i>	Не прошел	Не прошел	Не анализ.
2574	ИТЛ, ТБ бронхов	Вв	36	<i>C.burnetii</i>	Не прошел	Не прошел	Не анализ.
2818	ИТЛ	Вв	35	Не анализ.	Не анализ.	Не анализ.	Не анализ.
1759	Рак легкого	Не профильный	34, 36	<i>C.burnetii</i>	<i>C.burnetii</i>	Не анализ.	31

Примечание. ИТЛ – инфильтративный туберкулез легкого; ДТЛ – диссеминированный туберкулез легкого; ТБ бронхов – туберкулез бронхов; Вв – впервые выявлен; Не анализ. – не анализировался.

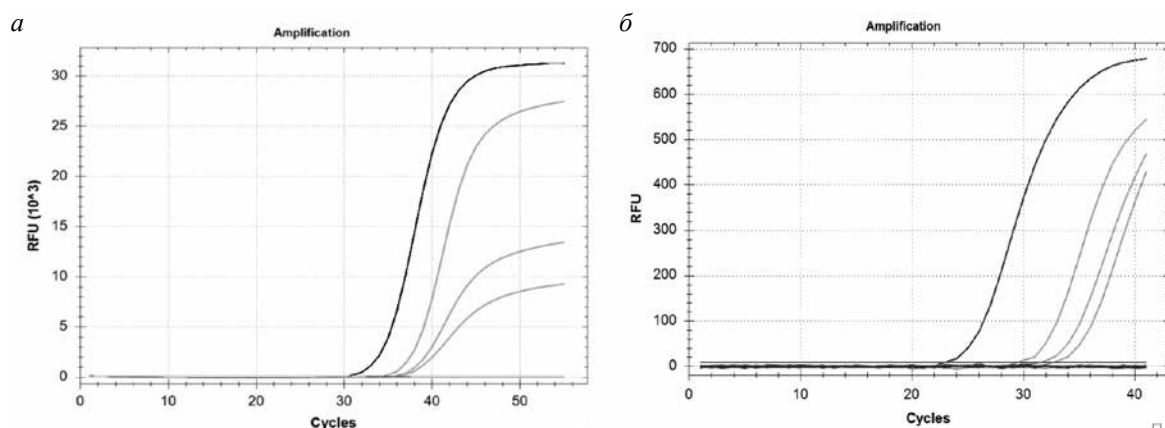


Рис. 1. Выявление генетических маркеров *C. burnetii* в образцах ДНК из мокроты больных с помощью двух ПЦР-тестов.

a – детекция с помощью экспериментального ПЦР-теста «Coxbur-1» участка гена *IS1111* возбудителя в 3-х исследуемых образцах со значениями Ct=34-36, для ПКО – Ct=30; *б* – детекция с помощью набора сравнения, ПЦР-теста «АмплиСенс Coxiella burnetii-FL», ДНК-маркера коксиеллы в 3-х образцах со значениями Ct=29-33, для ПКО – Ct=23.

в пределах 34 – 36, что соответствует разбросу количества генетического маркера возбудителя от 64 до 16 геномов/на реакцию, соответственно. При этом, наблюдаемые при постановке ПЦР в режиме реального времени профили кривых разгорания специфического зонда *Sbur-IS-Z2*, подобранного к ДНК-мишени *C. burnetii* (участку гена *IS1111*), были однотипны и имели характерный сигмообразный (S-образный) профиль, а уровень сигнала (разгорания зонда) в положительных образцах был сопоставим с уровнем разгорания, полученным при постановке положительного контроля (рис. 1, *a*).

Наличие дополнительно выделенного материала позволило воспроизвести положительные результаты в ПЦР-РВ для образцов ДНК (№1759, 1769, 2037, 2156) со значениями Ct=34 – 36 (см. табл. 2). Кроме того, три положительных образца ДНК коксиеллы (№ 1759, 1769, 2037) были также перепроверены в ПЦР-РВ с помощью официально зарегистрированного теста «АмплиСенс Coxiella burnetii-FL» (АмплиСенс, Москва). Использование набора сравнения подтвердило наличие генетического маркера возбудителя Ку-

лихорадки в трех имеющихся анализируемых образцах мокроты больных туберкулезом (рис. 1, *б*). Значения Ct, полученные с помощью двух ПЦР-тестов, можно считать сопоставимыми, так как согласно инструкции производителя теста «АмплиСенс Coxiella burnetii-FL» в протоколе установлены дополнительные 5 циклов амплификации ДНК без учета флюоресценции, которые не заложены в протоколе к экспериментальному набору «Coxbur-1».

Таким образом, воспроизводимость результатов по выявлению ДНК-маркера *C. burnetii* в ПЦР-РВ, полученных в ряде положительных образцов, дает основание считать о наличии возбудителя лихорадки Ку в мокроте исследуемых больных. С целью подтверждения положительных результатов ПЦР-анализа были предприняты попытки дополнительной амплификации ДНК *C. burnetii* по участку гена *IS1111* длиной 390 п.н., используя комбинацию праймеров РКО-*Sbur-F4* и РКО-*Sbur-R2* (см. табл. 1). Этот фрагмент гена транспозазы *IS1111* в своей последовательности содержит участок в 70 п.н., амплифицируемый праймерами *Sbur-IS-F5* и *Sbur-IS-R2*, входящими в состав

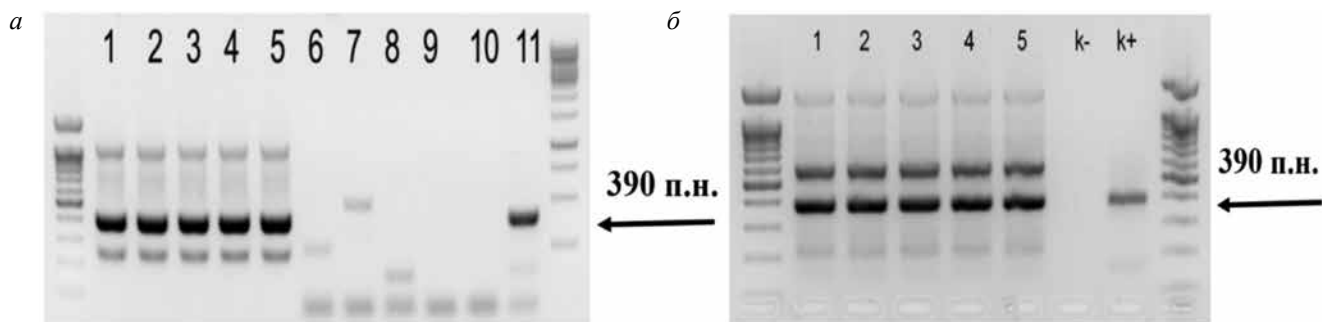


Рис. 2. Электрофореграммы ПЦР-продуктов участка гена *IS1111* возбудителя *C. burnetii*, длиной 390 п.н., амплифицированные с образцов ДНК из мокроты двух пациентов.

a – ДНК пациента № 1759, амплификация в пяти повторах (дорожки с 1 по 5), дорожка 10 – “отрицательный контроль” (К-), дорожка 11 – “положительный контроль” (К+); *б* – ДНК пациента № 1769, амплификация в пяти повторах.

ГРС набора реагентов «Сохбур-1». У 8 из 10 обследуемых больных образцы выделенной ДНК имелись в достаточном количестве для проведения дальнейшего исследования. Амплификаты соответствующей длины (390 п.н.) исследуемого гена-мишени были успешно наработаны в 6 из 8 анализируемых положительных проб ДНК *C. burnetii*: № 1759, 1769, 1966, 2037, 2572 и 2574. В качестве примера наработанные продукты амплификации фрагмента ДНК, полученные из мокроты двух больных, представлены на электрофореграммах (рис. 2, *a*, *б*).

Фрагменты гена *IS1111*, наработанные с образцов ДНК, выделенные от 6 больных, были успешно секвенированы, а их последовательности депонированы в базе данных GenBank (см. раздел “Материал и методы”). Результаты молекулярно-генетического анализа показали, что полученные нуклеотидные последовательности полностью идентичны между собой и на 100% соответствуют последовательностям более двух десятков различных штаммов *C. burnetii*, представленных в базе данных GenBank: RSA439, 42785537, 2014-PE15890, 18430, 701CbV1 и др. (CP040059, CP014548, CP032542, CP014553, CP014557, соответственно). Наблюдалось сходство полученных последовательностей ДНК от больных туберкулезом с другими последовательностями возбудителей коксиеллёза, выделенными нами ранее из клинического материала, клещей и ветеринарных образцов из ряда регионов Сибири и Дальнего Востока. Так, последовательности *IS1111*, полученные в результате секвенирования ДНК от больных туберкулезом, были на 99,43% (347 из 349 п.н.) идентичны последовательностям изолятов, полученных из крови трех лихорадящих больных, которые поступили в стационар г. Новосибирска с подозрением на инфекции, переносимые клещами (ИПК) [30]. Отмечен также высокий уровень сходства полученных последовательностей с образцом ДНК возбудителя Ку-лихорадки, выделенным с места присасывания клеща у лихорадящего больного из Республики Алтай (г. Горно-Алтайск), а также с последовательностями из клещей, отловленных в Амурской области, в Приморском крае, и с последовательностями ДНК *C. burnetii*, которые были выделены из образцов сыворотки сельскохозяйствен-

ных животных [18, 20]. Выравнивание полученных нами фрагментов *IS1111* и последовательностей, взятых из GeneBank, показало, что участки отжига двух специфичных праймеров и зонда (Cbur-IS-F5, Cbur-IS-R2, Cbur-IS-Z2), используемых в экспериментальном тесте «Сохбур-1» для амплификации и детекции фрагмента гена длиной 70 п.н., не содержат замен и делеций (рис. 3). Полученные данные дают основание для успешного использования, разработанного ПЦР-теста с целью выявления ДНК-маркера возбудителя Ку-лихорадки, циркулирующего, как на территории РФ, так и за рубежом.

Полученные нами результаты соответствуют опубликованным данным зарубежных исследователей о том, что последовательность *IS1111* *C. burnetii* является консервативной. Фрагмент этого гена выбран нами на основании анализа базы данных GenBank, который свидетельствует о наличии консервативной нуклеотидной последовательности *IS1111* в геномах известных штаммов и изолятов возбудителя Ку-лихорадки, а также в связи с отсутствием аналогичной последовательности в представленных геномах других известных на сегодняшний день микроорганизмов, что обеспечивает специфичность реакции. Выбор в пользу последовательности транспозазы *IS1111* в качестве мишени для амплификации был обусловлен еще и тем, что этот ген имеет большую копийность (от 8 до 31 на геном возбудителя) [14]. Использование многокопийных последовательностей позволяет повысить чувствительность ПЦР-анализа, что особенно важно для детекции ДНК-мишени при низких нагрузках возбудителя в анализируемых пробах, например, при хроническом течении заболевания.

Наряду с секвенированием полученных фрагментов *IS1111* дополнительно были предприняты попытки наработки фрагментов генов локусов *htpB* и *16S rRNA*, с применением праймеров, представленных в табл.1. Из пяти положительных проб ДНК, содержащих участок гена *IS1111*, которые были выделены из мокроты больных, фрагмент гена *16S rRNA* длиной 412 п.н. был наработан и секвенирован с образца № 1769. Полученная нуклеотидная последовательность, представленная в базе данных GeneBank под номером MW315955 (Novosibirsk-2016/1769), имеет 100% сходство с после-

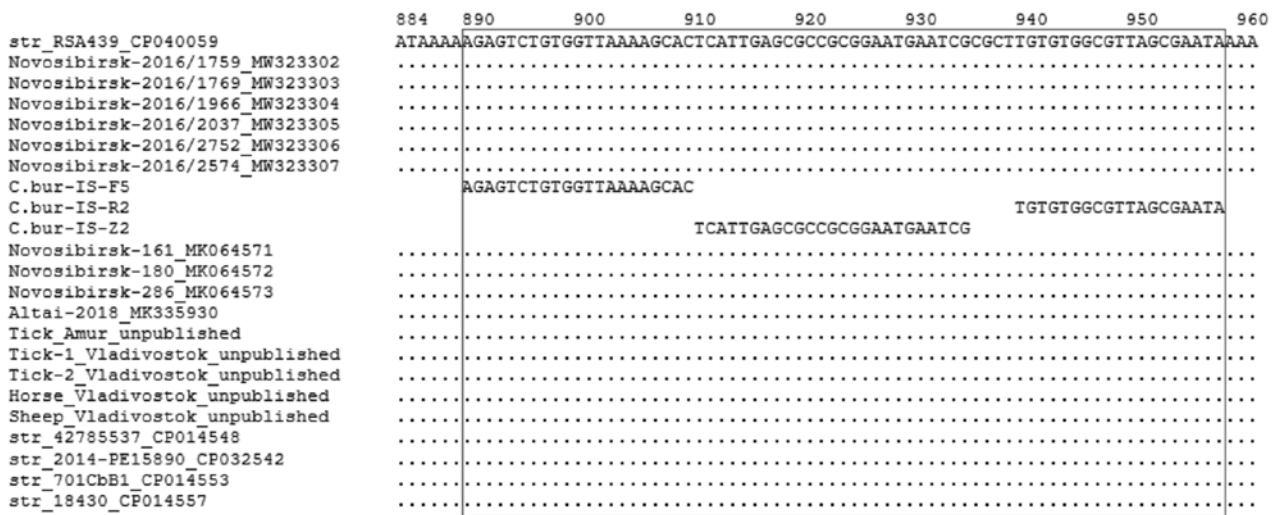


Рис. 3. Выравнивание последовательностей *IS1111 C. burnetii*. Участок отжига олигонуклеотидов обозначен рамкой. Одинаковые нуклеотидные остатки с референсной последовательностью str_2014-PE15890 (CP032542) обозначены точками, числа сверху обозначают положение нуклеотидных остатков в соответствии с таковыми в референсной последовательности. Сверху вниз: референсная последовательность, образцы от шести больных туберкулезом; олигонуклеотиды ПЦР-теста “Coxbur-1” (два праймера и зонд); образцы от трёх лихорадящих больных из г. Новосибирска; образец от больного из г. Горно-Алтайска; образцы из 3-х суспензий клещей, отловленных в Амурской области и Приморском крае; образцы от лошади и овцы из Приморского края; последовательности *IS1111* 4-х штаммов возбудителя, представленные в базе данных GenBank.

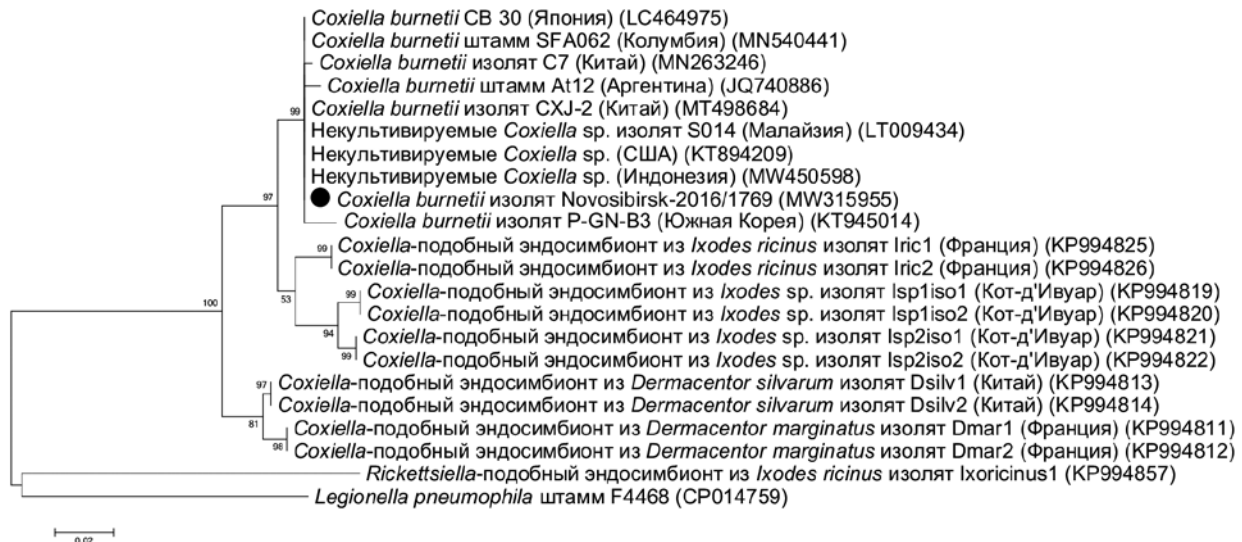


Рис. 4. Дендрограмма изолятов *C. burnetii*, построенная на основании последовательностей фрагмента гена *16S rRNA* (длиной 371 п.н.) методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML). Номера доступа в базе данных GenBank указаны в скобках. Здесь и на рис. 5, 6 – последовательность, определенная в данной работе, отмечена жирной точкой.

довательностями фрагмента гена *16S rRNA* штаммов и изолятов *C. burnetii*, выделенных в Китае, Японии, Южной Кореи, Аргентины, Колумбии и др. стран, а также ряда некультивируемых бактерий рода *Coxiella* из Малайзии, Индонезии и США (MN263246, LC464975, KT945014, JQ740886, MN540441, LT009434, KT894209, MW450598). Меньший уровень сходства (99,83% и ниже) наблюдался с рядом последовательностей различных изолятов и штаммов *C. burnetii*, а также *Coxiella*-подобных эндосимбионтов, выделенных из различных видов клещей (рис. 4).

Следует отметить, что несмотря на то, что последовательности фрагментов гена *16S rRNA* имели высокое

сходство с последовательностями не только других изолятов и штаммов *C. burnetii*, но и *Coxiella*-подобных эндосимбионтов, типирование по другому локусу, *IS1111*, присутствующему строго у *C. burnetii* и неопisanному у других *Coxiella*-подобных микроорганизмов, позволяет нам судить о том, что выявленные нами изоляты относятся именно к возбудителю лихорадки Ку.

Кроме того, из шести образцов мокроты, содержащих ДНК *C. burnetii*, для образца № 1759 был разработан и секвенирован фрагмент гена *htpB* (Novosibirsk-2016/1759, MW323308). Полученная последовательность *htpB* длиной 581 п.н. была на 100% идентична нуклеотидным последовательностям из

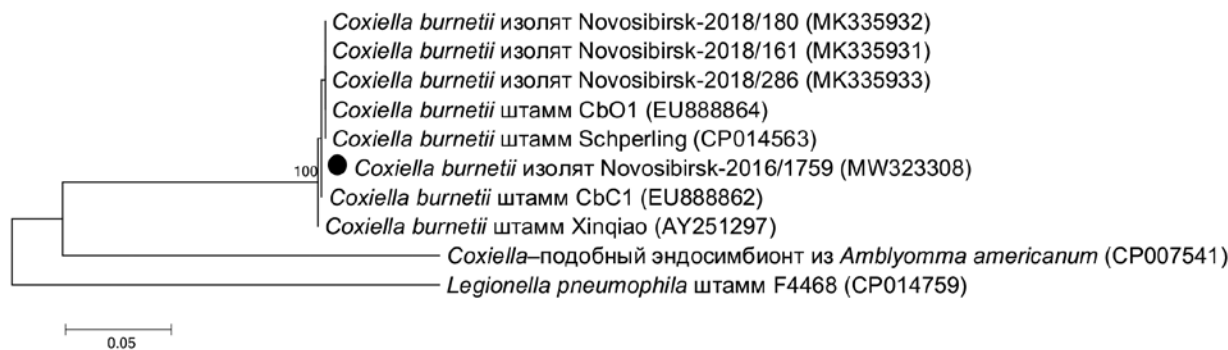


Рис. 5. Дендрограмма изолятов *C. burnetii*, построенная на основании последовательностей фрагмента гена *htpB* (длиной 581 п.н.) методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML). Номера в базе данных GenBank указаны в скобках.

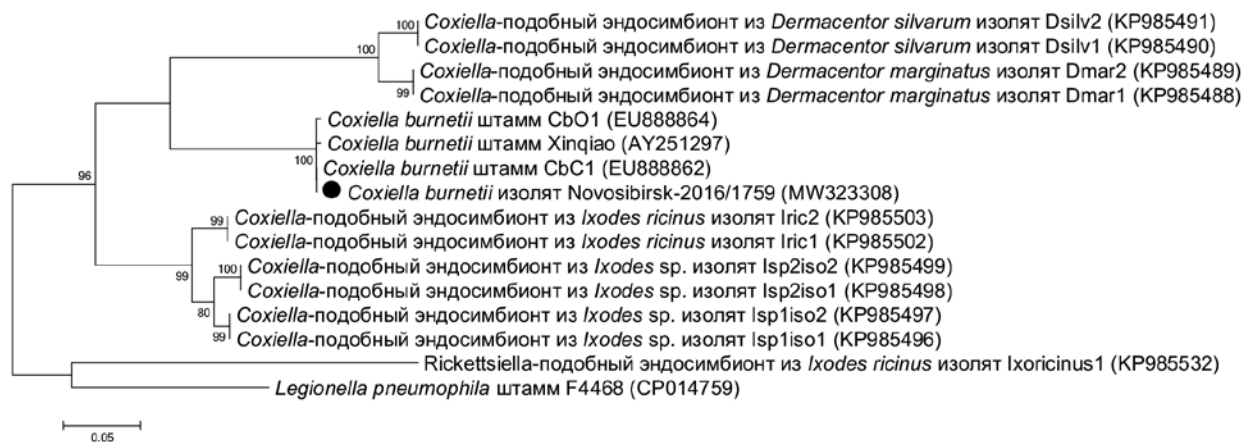


Рис. 6. Дендрограмма изолятов *C. burnetii*, построенная на основании последовательностей фрагмента гена *htpB* (длиной 370 п.н.) методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML). Номера доступа в базе данных GenBank указаны в скобках.

полтора десятков штаммов *C. burnetii* (EU888864, CP014563, AY251297, CP040059, CP035112, CP014557, CP018005, CP020616 и др.). Кроме того, еще ряд штаммов и изолятов имели уровень сходства 99,83% (580 из 581 п.н.) с полученной нами последовательностью, в том числе три изолята, ранее выделенные нами из крови лихорадочных больных, которые поступили в Городскую инфекционную клиническую больницу № 1 г. Новосибирска с подозрением на ИПК (МК064571, МК064572, МК064573) (рис. 5) [30].

Также, в GeneBank были найдены более короткие фрагменты *htpB* длиной 370 п.н. *Coxiella*-подобных эндосимбионтов, выделенных из различных видов клещей, для которых отмечено сходство 99,73% и менее с последовательностью образца Novosibirsk-2016/1759 (MW323308), ДНК которой была нами выделена из мокроты больного туберкулезом (рис. 6).

Таким образом, полученные с помощью разработанного экспериментального теста «Сохвиг-1» данные свидетельствуют о наличии у части больных туберкулезом в мокроте ДНК-мишени возбудителя Ку-лихорадки. Значения *St* варьировали в пределах 34 – 36 цикла, что попадает в рабочий диапазон чувствительности теста. Исходя из расчета разведения исходных образцов во времени инаktivации, объема полученного при центрифугировании осадка, конечного объема элюции при выделении ДНК и конечного объема образца, используемого в

постановке реакции, в 1 мл исходных образцов мокроты у больных туберкулезом могло содержаться от 100 до 400 копий гена-мишени (*IS1111*).

При этом, исходя из данных о высокой копийности *IS1111* в геноме возбудителя, можно сделать заключение о низкой нагрузке *C. burnetii* в мокроте обследованных больных, от единичных бактерий до нескольких десятков в 1 мл. Небольшое содержание возбудителя в дыхательных путях у больных может указывать на хронический процесс лихорадки Ку, протекающий в организме больного в дополнение к доминирующей туберкулезной инфекции. Вполне возможно, что именно развитие иммуносупрессии, возникшей в результате туберкулеза, является причиной возникновения сочетанной инфекции.

С другой стороны, нельзя исключить, что при проведении стандартной процедуры инаktivации возбудителя туберкулеза в мокроте с помощью реагента «Амплитуб-Преп», экспозиция образца с которым проводилась от 1 до 24 часов, могло происходить разрушение стенки *C. burnetii*, что в свою очередь явилось причиной частичной или полной деградации ДНК возбудителя. В этом случае при постановке ПЦР-РВ могут быть отмечены либо крайне низкие нагрузки ДНК-маркера возбудителя коксиеллеза, либо получены ложноотрицательные результаты. Поэтому можно предположить, что у ряда пациентов с хроническим течением заболевания лихорадки Ку,

возбудитель мог быть и не выявлен с помощью ПЦР-анализа по причине низкой нагрузки в исследуемом образце. Обработка мокроты раствором «Амплитуб-преп», предназначенным в первую очередь для работы с мокротой от больных туберкулезом, но не адаптированным для выявления возбудителей лихорадки Ку, может приводить к потерям ДНК *C. burnetii*, в связи с чем необходим дополнительный детальный анализ образцов интактной (необработанной) мокроты для использования в ПЦР, а также дополнительное применение серологических методов с целью выявления специфических антител к антигенам коксиеллы.

Данные, полученные секвенированием фрагментов генов *IS1111*, *16S rRNA* и *hspB*, подтвердили наличие ДНК возбудителя Ку-лихорадки у 6 из 10 больных. У четырех пациентов (№ 1966, 2037, 2572, 2574) выделенную ДНК *C. burnetii* удалось секвенировать по одному гену – *IS1111*, у больного № 1759 по двум генам, *IS1111* и *hspB*, а у больного № 1769 – по *IS1111* и *16S rRNA*. По-видимому, многокопийность гена *IS1111 C. burnetii* обуславливает получение лучших результатов секвенирования по сравнению с ее однокопийными генами *16S rRNA* и *hspB*.

Только у одного пациента (№ 1870) из девяти, положительных по наличию ДНК коксиеллы, результаты ПЦР-анализа, которые были получены с помощью теста «Реал-Бест ДНК МВТС», показали наличие генетического маркера *M. tuberculosis*. При этом нагрузка ДНК этого патогена была низкой (Ct=36). Тем не менее, у других восьми больных, содержащих в мокроте генетические маркеры лихорадки Ку, был сохранен диагноз «туберкулез». Является ли снижение нагрузки возбудителя туберкулеза в дыхательных путях больного причиной присоединения коксиеллезной инфекции, или же развитие этой сочетанной инфекции происходит в результате общего ослабления защитных свойств организма и развития иммуносупрессии на фоне основного заболевания и применения антибиотикотерапии, требует дополнительных исследований.

Из 10 пациентов, содержащих генетические маркеры возбудителя коксиеллеза в образцах мокроты, клинические формы заболевания туберкулезом были распределены следующим образом: инфильтративный туберкулез легкого (ИТЛ) – у 6 человек; диссеминированный туберкулез легкого (ДТЛ) – у 1 больного; ИТЛ, осложненный туберкулезом бронхов (ТБ) – у 1 обследуемого; ДТЛ совместно с ТБ – у 1 пациента. У 8 из перечисленных больных заболевание туберкулезом оказалось впервые выявленным и лишь один пациент (№ 1966 с ИТЛ) был с рецидивом. Один из десяти пациентов (№ 1759) был отнесен к категории непрофильных, так как в результате дополнительного обследования у него был установлен окончательный диагноз «рак легкого» (см. табл. 2). По-видимому, этот случай с онкобольным связан с проявлением у него иммуносупрессии и является скорее закономерностью, чем исключением. Так, во Франции в 90-х годах *P. Vroquij* и соавт. [32], описали у 20% больных с лихорадкой Ку иммунодефицитные состояния: у семи больных диагностирован рак, у одного пациента отмечен хронический миелоидный лейкоз, два пациента оказались

с синдромом приобретенного иммунодефицита, один больной перенес трансплантацию почки и находился на иммуносупрессивной терапии, еще один пациент получал кортикостероидную терапию, два пациента находились на почечном диализе и еще два пациента пребывали в состоянии хронического алкоголизма.

Заключение. Таким образом, у больных туберкулезом нами были обнаружены генетические маркеры возбудителя Ку-лихорадки в образцах мокроты при ее обработке стандартными методами пробоподготовки. Учитывая сходство течения заболевания при туберкулезе и лихорадки Ку, а также распространенность ВИЧ-инфекции в субъектах Сибирского и Дальневосточного федеральных округов, представляется необходимым продолжить аналогичное комплексное исследование у категории пациентов с сочетанной ВИЧ и туберкулезной инфекцией для оптимизации лечебно-диагностической тактики. Дальнейшие исследования с применением ПЦР-РВ для анализа интактной мокроты, полученной от больных туберкулезом, а также применение серологических методов исследования помогут оценить реальное число случаев коинфекции туберкулеза и лихорадки Ку.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4, 5, 7-8, 11-13, 19, 24-29, 32
см. REFERENCES)

1. Федорова Н.И. Эпидемиология и профилактика Ку-риккетсиоза. М.: Медицина; 1968.
3. Ржегачек И. Иксодовые клещи и риккетсии. В кн.: Ржегачек И., Дайтер А.Б. Риккетсиозы: сборник научных трудов Института им. Пастера. Л.; 1989; 66: 68–90.
6. Рудаков Н.В., Зеликман С.Ю., Шпынов С.Н. Лихорадка Ку: эколого-эпидемиологические аспекты: информационное письмо. ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. Омск: Издательский центр КАН; 2021.
9. Борисевич С.В., Яковлев Э.А. Эколого-эпидемиологические особенности возбудителя лихорадки Ку в Российской Федерации и странах Европы. *Бактериология*. 2016; 1(1): 96–101.
10. Здродовский П.Ф., Голиневич Е.М. Учение о риккетсиях и риккетсиозах. М.; Медицина; 1972.
14. 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.
15. 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. DOI:10.21055/0370-1069-2015-4-49-54.
16. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Зеликман С.Ю. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Российской Федерации в период с 1957 по 2019 год. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:141–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-141-146.
17. Красиков А.П., Рудаков Н.В. Риккетсиозы, коксиеллез и анаплазмозы человека и животных. Омск: ИЦ Омский научный вестник; 2013.
18. 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.
19. 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.
20. 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 междуна-

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- родным участием. 2019, 1-3 апреля; Москва. М.: Медицинское маркетинговое агентство. 2019; 234–5.
21. 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: 66: 43–54.
22. Красиков А.П., Заболотных М.В., Рудаков Н.В. Эколого-эпизоотологическая характеристика и лабораторная диагностика лихорадки Ку крупного рогатого скота по материалам изучения в Омской области. *Вестник Омского государственного аграрного университета*. 2017; 4 (28): 158–62.
27. Эргешов А. Э., Черноусова Л. Н., Андреевская С. Н. Новые технологии диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза. *Вестник РАМН*. 2019; 74(6): 413–22.
30. Бондаренко Е.И., Филимонова Е.С., Краснова Е.И., Криницина Э.В., Ткачев С.Е. Случай заболевания Ку-лихорадкой, выявленные у жителей Новосибирской области, госпитализированных с подозрением на инфекции, передаваемые клещами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 65 (11): 229–36.
31. Кудряшов А.В., Дзюбенко В.В., Чередниченко А.Г., Альховик О.И., Евдокимова Л.С., Камаев Е.Ю., Иванов М.К. Выявление возбудителей туберкулеза в мокроте больных с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК МВТС». *Новости «Вектор-Бест»*. 2019; 92 (2): 7–9.
16. Shpynov S.N., Rudakov N.V., Zelikman S.Yu. Analysis of Q Fever Incidence in the Russian Federation Between 1957 and 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; 3:141–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-141-146. (in Russian)
17. Krasikov A.P., Rudakov N.V. Rickettsioses, coxiellosis and anaplasmosis of humans and animals [Rikketsiozy, koksiiellyoz i anaplazmozy cheloveka i zhivotnykh]. Omsk: Omskiy nauchnyi vestnik; 2013. (in Russian)
18. Lubova V.A., Leonova G.N., Shutikova A.L., Bondarenko E.I. Indication of the causative agent of Q fever in the south of the Far East. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65 (11): 720-8. (in Russian)
19. 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)
20. 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: Moscow: Meditsinskoe Marketingovoe Agentstvo; 2019; 234–5. (in Russian)
21. Rudakov N.V., Tofanyuk E.F., Burtsev 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)
22. Krasikov A.P., Zabolotnykh M.V., Rudakov N.V. Ecological and epizootological characteristics and laboratory diagnosis of Q fever in cattle based on materials from a study in the Omsk region. *Vestnik Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2017; 4 (28): 158–62. (in Russian)
23. Lieberman D., Boldur I., Manor E., Hoffman S., Schlaeffer F., Porath A. Q-fever pneumonia in the Negev region of Israel: a review of 20 patients hospitalised over a period of one year. *J. Infect.* 1995; 30(2): 135–40.
24. Sumida Y., Kanemasa K., Fukumoto K., Katoh N., Imamura S., Itoh Y., Okanoue T. A case of miliary tuberculosis complicating acute Q fever. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 2006; 103(12):1377–83
25. Simões S., Santos A., Vaio T., Leitão S., Santo R.M., Costa N. Miliary tuberculosis and Q fever in an immunocompetent patient. *Rev. Port. Pneumol*. 2009; 15(2): 325–9
26. Abe T., Horiba M., Shindo J., Kimura T., Komiya T., Yamaki K., Kume H., Shimokata K. A case of Q fever infection causing acute exacerbation of chronic respiratory failure. *Nihon Kokyūki Gakkai Zasshi*. 2004; 42(2): 195–9
27. Ergeshov A. E., Chernousova L. N., Andreevskaya S. N. New technologies for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2019; 74(6): 413–22. (in Russian)
28. 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; DOI:10.1016/j.nmni.2020.100704.
29. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipksi A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30 (12): 2725–9. DOI:10.1093/molbev/mst197.
30. 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*. 2021; 66 (4): 229-36. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-4-229-236. (in Russian)
31. Kudryashov A.V., Dzyubenko V.V., Cherednichenko A.G., Al'hovik O.I., Evdokimova L.S., Kamaev E.Yu., Ivanov M.K. Detection of tuberculosis pathogens in the sputum of patients using the «Real-Best DNA MBTC» reagent kit. *Novosti «Vektor-Best»*. 2019; 92 (2): 7–9. (in Russian)
32. Brouqui P., Dupont H.T., Drancourt M., Berland Y., Etienne J., Lepoint C., Goldstein F. et al. Chronic Q fever. Ninety-two cases from France, including 27 cases without endocarditis. *Arch. Intern. Med.* 1993; 153(5): 642–8.