

Опыт изоляции *Coxiella burnetii* из сывороток крови больных с использованием клеточных линий и биопробных животных

В.В.Евдокимова, Д.И.Симакова, Л.П.Алексеева, Д.А.Левченко, М.Г.Мелоян, Е.Н.Сокиркина

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель исследования – оценить возможность выделения жизнеспособных бактерий *Coxiella burnetii* из сывороток крови больных острой лихорадкой Ку с использованием клеточных линий и биопробных животных.

В исследование взяты сыворотки крови больных, хранившиеся при -80°C . Изоляцию возбудителя лихорадки Ку проводили путем инокуляции сыворотки в культуру клеток Vero E6, Hep-2 и введением в биопробных животных (белые мыши, морские свинки) с последующими многократными пассажами *in vivo* и *in vitro*. Для мониторинга роста *C. burnetii* в культуре клеток и обнаружения ДНК возбудителя в суспензии органов зараженных животных применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В данном исследовании была изучена возможность применения культуры клеток для выделения и поддержания непрерывного роста *C. burnetii*. Изоляция последней была осуществлена из двух образцов сывороток крови с исходными значениями Ct 24,63 и Ct 28,04 в ПЦР-анализе. Культивирование возбудителя на клеточных линиях приводило к его элиминации через 3–4 пассажа, длительность которых составляла 7 дней. Пассирование возбудителя в биопробных животных с последующей инокуляцией инфекционного материала (суспензия перитонеальных макрофагов, легких, селезенки) в культуру клеток способствовало поддержанию жизнеспособности коксиелл более длительные сроки. Результаты эксперимента показывают, что стандартные образцы сыворотки, взятые у пациентов с острой лихорадкой Ку, являются ценным источником новых изолятов *C. burnetii*, причем для сохранения жизнеспособности микроорганизма не требуется особой обработки образцов.

Ключевые слова: лихорадка Ку, *Coxiella burnetii*, культура клеток, Vero E6, Hep-2, пассаж, макрофаги, биопробные животные

Для цитирования: Евдокимова В.В., Симакова Д.И., Алексеева Л.П., Левченко Д.А., Мелоян М.Г., Сокиркина Е.Н. Опыт изоляции *Coxiella burnetii* из сывороток крови больных с использованием клеточных линий и биопробных животных. Бактериология. 2024; 9(1): 63–71. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-63-71

Experience with isolation of *Coxiella burnetii* from patient sera using cell lines and bioassay animals

V.V.Evdokimova, D.I.Simakova, L.P.Alekseeva, D.A.Levchenko, M.G.Meloyan, E.N.Sokirkinina

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Aim. To evaluate the possibility of isolating viable *Coxiella burnetii* from the blood sera of patients with acute Q fever using cell lines and bioassay animals.

Blood sera from patients stored at -80°C were used in the study. Isolation of the causative agent of Q fever was performed by inoculation of serum into Vero E6, Hep-2 cell culture and injection into bioassay animals (white mice, guinea pigs) with subsequent multiple passages *in vivo* and *in vitro*. PCR was used to monitor the growth of *C. burnetii* in cell culture and to detect the pathogen DNA in organ suspension of infected animals.

In this study, the potential use of cell culture to isolate and maintain continuous growth of *C. burnetii* was investigated. Isolation of the latter was performed from 2 serum samples with initial Ct values of 24.63 and Ct 28.04 in a PCR assay. Cultivation of the pathogen on cell lines resulted in its elimination after 3–4 passages, the duration of which was 7 days. Passage of the pathogen in bioassay animals with subsequent inoculation of infectious material (suspension of peritoneal macrophages, lungs, spleen) into cell culture contributed to the maintenance of coxiella viability for longer periods. The experimental results show that standard serum samples taken from patients with acute Q fever are a valuable source of new isolates of *C. burnetii*, and no special sample processing is required to maintain the viability of the microorganism.

Key words: Q-fever, *Coxiella burnetii*, cell culture, Vero E6, Hep-2, passaging, macrophages, bioassay animals

For citation: Evdokimova V.V., Simakova D.I., Alekseeva L.P., Levchenko D.A., Meloyan M.G., Sokirkinina E.N. Experience with isolation of *Coxiella burnetii* from patient sera using cell lines and bioassay animals. Bacteriology. 2024; 9(1): 63–71. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-63-71

Для корреспонденции:

Евдокимова Вероника Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории диагностических препаратов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

Телефон: (863) 240-91-13

E-mail: evdokimova_vv@antiplague.ru

Статья поступила 10.01.2024, принята к печати 29.03.2024

For correspondence:

Veronika V. Evdokimova, PhD in Biological Sciences, Researcher, Laboratory of diagnostic preparations, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Phone: (863) 240-91-13

E-mail: evdokimova_vv@antiplague.ru

The article was received 10.01.2024, accepted for publication 29.03.2024

C*oxiella burnetii* – облигатный внутриклеточный бактериальный патоген, вызывающий зоонозное заболевание – лихорадку Ку. Заражение человека обычно происходит от инфицированных животных аспирационным и контактным путем. Домашние жвачные животные, такие как овцы, козы и крупный рогатый скот, считаются основными источниками человеческой инфекции в большинстве регионов мира [1, 2]. Однако *C. burnetii* были обнаружены у широкого спектра видов животных и птиц [3], в т.ч. среди тихоокеанских млекопитающих [4–6].

Заболееваемость выше среди людей, контактирующих с животными, в частности у ветеринаров и работников скотобоен, поскольку инфицированные животные распространяют возбудителя через свои фекалии, мочу, молоко [2, 7, 8]. Локализация патогена в вымени крупного рогатого скота является критическим фактором для выделения бактерий в молоко, но в настоящее время неизвестно, какие типы клеток способствуют персистенции и репликации *C. burnetii* в молочной железе [9]. Большое количество микроорганизмов также содержат амниотическая жидкость и плацента, а во время аборта может выделяться до 10^9 клеток *C. burnetii* на 1 г плаценты [10]. Однако прямой контакт с инфицированными животными не является обязательным условием для заражения. Благодаря своей высокой устойчивости возбудитель может сохраняться в течение нескольких месяцев в высушенных продуктах жизнедеятельности и распространяться ветром [7, 11].

Один из наиболее вирулентных эталонных штаммов *C. burnetii* (штамм RSA 493 / Nine Mile I) [12] был выделен от морской свинки, на которой питались собранные в полевых условиях древесные клещи Скалистых гор *Dermacentor andersoni*, что позволяет предположить передачу инфекции также через укусы клещей [3, 13–15]. Клещи заражаются при сосании крови инфицированных животных, что неоднократно доказано в эксперименте, и длительно сохраняют в себе возбудителя [16]. Коксии интенсивно размножаются в клетках эпителия кишечника, выделяются во внешнюю среду с испражнениями клещей, их коксальной жидкостью и слюнным секретом [17]. В последнее десятилетие во многих регионах, в т.ч. в Северной Евразии, у клещей разных таксономических групп обнаруживаются *Coxiella*-подобные организмы. Часть из них являются истинными эндосимбионтами клещей, которые не могут выживать в клетках теплокровных организмов, что, напротив, характерно для патогенного вида *C. burnetii* [18].

Коксии имеет две антигенные фазы: организмы фазы I, выделенные из естественных источников инфекции (клещи, животные, больные люди), чрезвычайно вирулентны. *C. burnetii* фазы II наблюдаются только в лабораторных условиях после длительного культивирования в системах с отсутствием иммунной компетентности и представляют собой бактерии с усеченным липополисахаридом. Необратимые мутации приводят к сильному ослаблению вирулентности *in vivo* [19, 20], поскольку *C. burnetii* теряет способность образовывать I антиген. Вирулентные свойства восстанавливаются после пассажей возбудителя через организм биопробных животных. У больных острой лихорадкой Ку преобладают антитела к антигену *C. burnetii* фазы II; антитела к антигену фазы I преобладают при формировании хронического течения инфекции [16].

Основными проявлениями острой лихорадки Ку у человека являются гриппоподобное заболевание, пневмония и гепатит, в то время как хроническая форма (2–5% от общего числа случаев заболевания) протекает в основном в виде инфекционного эндокардита [8, 21, 22]. Диагностика эндокардита затруднена невозможностью культивирования *C. burnetii* с использованием обычных сред. Как строго облигатную внутриклеточную бактерию, ее можно культивировать только в живых клеточных линиях, куриных эмбрионах и в организме лабораторных животных (морских свинок, белых мышей), но эти методы применимы только в лабораториях 3-го уровня биобезопасности. Таким образом, диагноз хронической лихорадки Ку основывается на серологическом тестировании парных сывороток, характеризующихся повышением титров антител к антигену I фазы [23].

Для лабораторной диагностики случаев острог коксиеллеза исследование сыворотки крови больного целесообразно проводить в первые дни лихорадочного периода болезни. Отрицательные результаты серологических реакций или низкие титры антител к коксиеллам II фазы являются основанием для проведения повторного исследования сыворотки крови, полученной от больного, через 7–10 дней после забора первой пробы и сравнения результатов одновременного исследования двух проб. Появление антител к коксиеллам Бернета II фазы или нарастание титров этих антител во второй пробе в 4 раза и более свидетельствуют о коксиеллезной природе заболевания [24].

В острой фазе заболевания *C. burnetii* может быть обнаружена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови и сыворотке до 17 дней после появления клинических признаков и симптомов [25, 26]. Положительный результат ПЦР на наличие в крови ДНК возбудителя почти всегда коррелирует с острой стадией лихорадки Ку, но реакция быстро становится отрицательной по мере нарастания специфических антител [26, 27]. Поскольку ПЦР не может дифференцировать жизнеспособные и нежизнеспособные бактерии, существует необходимость в применении биологического и культурального методов. Инокуляция образцов пациентов в клеточные культуры, зарекомендовавшая себя как способ накопления *C. burnetii* [28], позволяет получить жизнеспособные штаммы коксиелл для проведения дальнейших исследований возбудителя.

Традиционно для выделения и накопления большого количества *C. burnetii* и других риккетсий используются эмбрионы куриных яиц. Успехи в области клеточных культур позволили выращивать внутриклеточные бактерии в культуральных флаконах или многолуночных планшетах, содержащих монослой эукариотических клеток-хозяев. Выделение возбудителя в культуре клеток более безопасно, чем размножение *C. burnetii* в куриных эмбрионах, но имеет переменный процент успеха при выделении штаммов с различной вирулентностью [29, 30]. M.J.Roman et al. наблюдали инфицирование культуры клеток в течение более 2 лет без добавления новых клеток. Данный факт объясняется тем, что инфекция обычно не разрушает клеточную линию и инфицированные клетки имеют такую же прогрессию клеточного цикла, как и неинфицированные: происходит асимметричное деление, в результате которого образуется одна инфицированная и одна неинфицированная дочерняя клетка [31]. Выживание инфициро-

ванных клеток является важным для поддержания хронической коксиеллезной инфекции. Коксиелла может продлевать жизнеспособность клетки-хозяина двумя способами: она активно ингибирует апоптотический сигнальный каскад и индуцирует способствующие выживанию факторы [32].

Макрофаги считаются наиболее важными клетками-хозяевами для *C. burnetii* [8]. В этих клетках крупного рогатого скота и человека *C. burnetii* реплицируется в паразитофорных вакуолях с лизосомальными кислотными характеристиками, где кислый pH активирует метаболизм *C. burnetii* и инициирует репликацию микроорганизма [33]. Макрофаги также являются первым барьером врожденной иммунной системы, защищающим организм от патогенов. Во время ранней фазы инфекции, т.е. в течение первых часов от начала заболевания, *C. burnetii* индуцирует быструю экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, интерлейкин-12 и фактор некроза опухоли- α в бычьих [33] и мышинных макрофагах [34].

В мире существует мало изолятов *C. burnetii* из-за трудностей, связанных с выделением микроорганизма, и дефицита подходящих для этого образцов, в т.ч. от пациентов с острой лихорадкой Ку.

На территории Ростовской области после периода длительного эпидемиологического благополучия в 2022 г. было выявлено 27 случаев лихорадки Ку, а с января по август 2023 г. – девять. В 2022 г. заболевшие выявлены в г. Сальск (37,0%) и трех административных районах, расположенных в сухостепной зоне юго-востока области: Ремонтненский – 29,6%, Сальский – 29,6%, Целинский – 3,8%, население которых занимается в основном скотоводством и зерноводством. В 2023 г. отмечено расширение нозоареала за счет регистрации спорадической заболеваемости в Дубовском районе, который также относится к природно-сельскохозяйственной зоне с развитым скотоводством, в т.ч. овцеводством [35].

Цель нашей работы заключалась в оценке возможности выделения жизнеспособной *C. burnetii* из сывороток крови больных острой лихорадкой Ку с использованием клеточных линий и биопробных животных.

Материалы и методы

Образцы сывороток. Образцы сывороток крови двух пациентов (№63, №64) с подтвержденным диагнозом «Лихорадка Ку», взятые на 7–8-й день от начала появления клинических симптомов, поступившие из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» Роспотребнадзора.

Клеточные линии. В работе использовали клеточную линию Vero E6 (африканская зеленая мартышка, почка, морфология фибробластоподобная) и Her-2 (человек, карцинома гортани, морфология эпителиоподобная). Клеточные линии культивировали до слияния (до конфлюэнтности 80%) при температуре 37°C в присутствии 5% CO₂.

Биопробные животные. Использовали беспородных белых мышей массой 12–14 г. Антиген биопробным животным вводили внутривенно в объеме 0,5 мл. После эвтаназии в асептических условиях производили вскрытие и отбор биоматериала (перитонеальный лаваж, легкие, селезенка). Селезенку использовали для получения мазков-отпе-

чатков, окрашенных по Романовскому–Гимзе [19]. Суспензии перитонеальных макрофагов и гомогенаты легких исследовали методом ПЦР для выявления ДНК *C. burnetii*. Эти же образцы являлись материалом для заражения новой пары животных (следующий пассаж) и инокуляции в культуру клеток. Оставшийся материал после добавления сыворотки плодов коровы (СПК) замораживали при температуре -80°C. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с этическими нормами, изложенными в Директивах Европейского союза 2010/63/EU [36]. Все работы с животными были одобрены Комиссией по биоэтике (протокол №13 заседания от 30.11.2022).

Полимеразная цепная реакция. Выделение ДНК *C. burnetii* из образцов биологического материала и ПЦР проводили коммерческими наборами «РИБО-преп» и «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Результат считался положительным при значении Ct < 39. В качестве отрицательного контроля в ПЦР использовали чистую культуру Vero E6 и суспензии органов здоровых белых мышей.

Микроскопия. Наблюдение за культурой клеток проводили в инвертированном микроскопе Nikon Eclips TS-100 (Nikon, Япония) в режиме фазового контраста. Мазки-отпечатки органов инфицированных животных фиксировали этиловым спиртом в течение 30 мин, окрашивали по Романовскому–Гимзе [19] и изучали микроскопированием в проходящем свете Nikon Eclipse E200-F (Nikon, Япония) с иммерсионной системой при увеличении 10 × 100.

Питательные среды и реактивы. Для выращивания клеточных линий *in vitro* использовали жидкие питательные среды RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, США) и DMEM (Gibco, Invitrogen, США), в которые добавляли 10% термоинактивированной сыворотки плода коровы (ООО «БиолоТ», Россия), 2 мМ глутамин (PanReac Applichem, Германия). Для пассирования возбудителя лихорадки Ку на клеточных линиях использовали среду RPMI-1640 и DMEM без антибиотиков с содержанием 2–5% СПК, 2мМ глутамин.

Оборудование и расходные материалы. Клеточные линии культивировали в CO₂-инкубаторе MCO-19AIC (Sanyo, Япония). Пассирование возбудителя лихорадки Ку на культуре клеток проводили в пластиковых флаконах T25, 6- и 12-луночных планшетах в CO₂-инкубаторе Innova CO-48 (Newbrunswick Scientific, Великобритания) с 5%-м содержанием углекислого газа при температуре 36°C.

Биологическая безопасность. Все работы проводились в микробиологическом боксе III класса с учетом требований СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Протоколы заражения культуры клеток и биопробных животных. Исследуемые образцы сывороток крови больных хранились при -80°C. Перед заражением культуры клеток и биопробных животных проверяли наличие специфической ДНК *C. burnetii* в исследуемых сыворотках методом ПЦР. Установлено, что Ct в сыворотке №63 составил 24,63; в сыворотке №64 – 28,04.

Протокол №1. Инокуляция образцов сыворотки крови в культуру клеток Vero E6: 100 мкл сыворотки вносили в подготовленный конфлюэнтный (не менее 80% слияния) монослой клеток в лунки 12-луночного планшета, срок одного

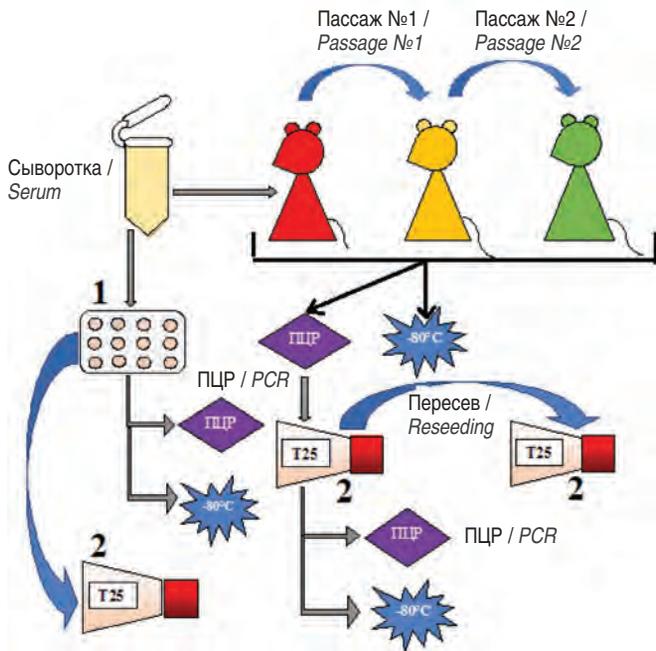


Рис. 1. Схема эксперимента по заражению культуры клеток и биопробных животных (белые мыши) материалом, содержащим ДНК *C. burnetii*: 1 – 12-луночный планшет с монослоем клеток Vero E6 или Hep-2, 2 – культуральный флакон T25 с монослоем клеток Vero E6 или Hep-2.

Fig. 1. Scheme of the experiment on infection of cell culture and bioassay animals (white mice) with material containing *C. burnetii* DNA: 1 – 12-well plate with a monolayer of Vero E6 or Hep-2 cells, 2 – T25 culture flask with a monolayer of Vero E6 cells or Hep-2.

пассажа – 7 дней. Начиная с 5-го пассажа культивирование проводили в культуральных флаконах T25. По истечении срока пассажа из лунок/флаконов отбирали культуральную жидкость для проведения ПЦР и 100 мкл переносили в лунку с новым монослоем клеток (следующий пассаж). Дальнейшее культивирование прекращали, если в двух пассажах подряд в ПЦР был получен отрицательный результат. Оставшиеся в культуральной среде клетки механически снимали со дна лунок, суспензию замораживали при -80°C, предварительно добавив СПК в качестве криопротектора. Всего было проведено 6 пассажей (42 дня) для сыворотки №63 и 8 (56 дней) – для сыворотки №64.

Протокол №2. Заражение биопробных животных: 100 мкл сыворотки крови (№63, №64) доводили стерильным физиологическим раствором до объема 0,5 мл и вводили внутрибрюшинно биопробным животным (по 2 мыши на каждую пробу). По истечении 14 дней (1-й пассаж) проводили эвтаназию 1 животного из каждой пары. В асептических условиях производили вскрытие и отбор органов (перитонеальные макрофаги, легкие, селезенка) для проведения ПЦР и заражения следующей пары животных. Оставшийся материал

после добавления СПК замораживали при -80°C. Второе опытное животное подвергали эвтаназии через 21 день от момента заражения, суспензии органов использовали для проведения ПЦР. Длительность всех последующих пассажей составляла 14 дней, по истечении которых производили эвтаназию и вскрытие биопробных животных: готовили суспензии макрофагов и легких от двух мышей, зараженных одной пробой, из общего объема отбирали аликвоты для обнаружения ДНК *C. burnetii* методом ПЦР, заражения новой пары животных (следующий пассаж), инокуляции в культуру клеток. Общая продолжительность пассажей в протоколе №2 составляла 112 дней.

Протокол №3. Заражение клеточных линий материалом, полученным от биопробных животных (белых мышей): суспензию перитонеальных макрофагов, клеток легкого и селезенки вносили во флаконы T25 на предварительно подготовленный конфлюэнтный монослой клеток Vero E6, Hep-2. В течение всего срока пассажа отбирали аликвоты культуральной жидкости через разные промежутки времени (от 7 до 28 дней) для ПЦР-анализа и замораживания. Культуры с положительным результатом в ПЦР поддерживались в исходных флаконах со сменой среды раз в неделю (1/3–1/2 от общего объема ростовой среды). Через 6–8 нед. проводили пересев содержимого исходных флаконов на новый монослой эукариотических клеток (2-й пассаж). На рис. 1 представлена схема экспериментов по протоколам №№ 1, 2, 3.

Результаты исследования и их обсуждение

Алгоритм проведенных исследований обусловлен особенностями внутриклеточного жизненного цикла и, как следствие, значительными ограничениями в лабораторной работе с необходимостью создания точно документированных протоколов заражения *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, отдельные штаммы и изоляты в значительной мере различаются по степени вирулентности в модельных экспериментах. В ходе настоящего исследования было применено несколько протоколов заражения моделей *in vitro* и *in vivo* клиническим материалом (см. раздел Материалы и методы).

Как показали результаты исследования (табл. 1), при внесении клинического материала от больных в культуру клеток Vero E6 регистрировали увеличение количества специфической ДНК *C. burnetii* в лунке с сывороткой №63 в конце 3-го пассажа (через 21 день от начала культивирования), затем ее снижение до отрицательного значения. Что касается сыворотки №64, то в аналогичных условиях не наблюдали повышения показателей Ct в ПЦР.

В то же время при заражении белых мышей клиническим материалом от больных (сыворотка крови №64) отмечали увеличение количества специфической ДНК *C. burnetii* в су-

Таблица 1. Результаты культивирования сыворотки больного, содержащей ДНК *C. burnetii*, на клетках Vero E6
 Table 1. Results of culturing patient serum containing *C. burnetii* DNA on Vero E6 cells

Клинический материал / Clinical material	№ пассажа/продолжительность в днях, значение Ct в ПЦР / Passage number/duration in days, Ct value in PCR							
	1/7 д. days	2/7 д. days	3/7 д. days	4/7 д. days	5/7 д. days	6/7 д. days	7/7 д. days	8/7 д. days
Сыворотка / Serum №63 (Ct 24,63)	34,6	33,34	19,5	26,5	Отр. / neg	Отр. / neg	-	-
Сыворотка №64 / (Ct 28,04)	29,7	30,24	32,6	36,3	Отр. / neg	35,9	Отр. / neg	Отр. / neg

спензии органов при пассаже длительностью 14 дней. Продление сроков пассажа до 21 дня приводило к снижению количества специфической ДНК, поэтому временной интервал последующих пассажей составлял 14 дней (табл. 2). На рис. 2 представлены фотографии окрашенного по Романовскому–Гимзе мазка-отпечатка селезенки белой мыши от пассажа №3, в органах которой методом ПЦР выявлена ДНК *C. burnetii* (Ct 17,1 и 18,5): визуализируется скопление микроорганизмов кокковидной формы, окрашенных в красно-фиолетовый цвет, на фоне голубой цитоплазмы разорванной клетки-хозяина.

Далее инфекционный материал переносили в культуру клеток для дальнейшего накопления ДНК *C. burnetii* на культуре клеток. Поскольку *C. burnetii* является облигатным внутриклеточным патогеном, инокуляцию в культуру клеток можно охарактеризовать только косвенными методами подсчета. Однократное обнаружение ДНК *C. burnetii* методом ПЦР не является убедительным доказательством присутствия жизнеспособных бактерий, особенно если Ct имеет высокие значения (35–39). Однако повторное обнаружение, сопровождающееся снижением значения Ct, свидетельствует об увеличении числа копий генома *C. burnetii* и, следовательно, является убедительным показателем роста бактерий [37].

Как показали результаты наших экспериментов (табл. 3), накопление ДНК *C. burnetii* зависело от исходного значения Ct в инфекционном материале. При Ct > 30 (суспензия клеток легкого) не происходило увеличения количества специфической ДНК и пассирование возбудителя в течение 42 дней привело к отрицательному результату. По-видимому, исходная доза *C. burnetii* не была оптимальной для заражения клеточной линии. При внесении в культуру клеток инфекционного материала с исходным значением Ct 20–30 (флакон №2) отмечено сохранение показателей количества специфической ДНК на протяжении 49 дней (со сменой ростовой среды раз в 7 дней) на уровне не ниже Ct 26, без дальнейшего повышения. Суспензию макрофагов, содержащую ДНК *C. burnetii* в пределах значений Ct 15–20 (флакон №3), культивировали в клетках Vero E6 в течение 104 дней (с одним пересевом). Установлено, что в течение первых 14 дней культивирования наблюдался прирост специфической ДНК до Ct 17,3–17,5, затем ее количество снижалось до Ct 20,8 через 48 дней и продолжалось уменьшение до значения Ct 27,8 после

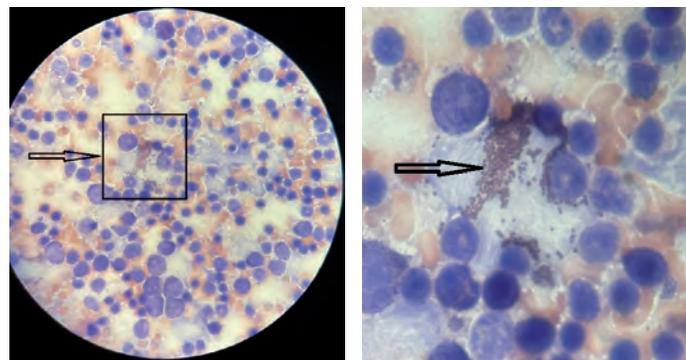


Рис. 2. Мазки-отпечатки органов биопробных животных (белые мыши, селезенка), окрашивание по Романовскому–Гимзе, увеличение 10 × 100.

Fig. 2. Imprint smears of organs of bioassay animals (white mice, spleen), Romanovsky–Giemsa staining, magnification 10 × 100.

пересева содержимого флакона на новый монослой клеток (2-й пассаж). Суспензию клеток легкого, содержащую ДНК *C. burnetii* Ct 10–15 (флаконы №4, №5), культивировали в клетках Vero E6 и Hep-2 118 дней, регистрируя специфическую ДНК в диапазоне Ct 16–21 в течение 48 дней, а после пересева и последующего культивирования значения Ct были в пределах 21–27. Накопление специфической ДНК также установили при заражении культуры Vero E6 суспензией клеток селезенки от биопробного животного (флакон №6): от Ct 20 за первые 12 дней культивирования до Ct 15,7 через 106 дней роста.

Таким образом, в нашем опыте при инокуляции в культуру клеток суспензии органов биопробных животных (табл. 3, флакон 3) мы наблюдали увеличение числа копий генома *C. burnetii* в первые 14 дней культивирования в том случае, если исходный материал был со значением Ct < 20. При этом необходимо учитывать разведение образца в 6 раз при его посеве во флакон с культурой клеток. Увеличение длительности культивирования с 7 до 28 дней без смены ростовой среды не приводило к повышению количества ДНК возбудителя (флакон №7). Существенной разницы в накоплении ДНК *C. burnetii* на двух разных клеточных линиях отмечено не было. Однако клетки Vero E6 являются более оптимальной моделью, т.к. при значительном увеличении толщины монослоя они не открепляются от поверхности пластика, что позволяет длительно культивировать *C. burnetii* без пересева на

Таблица 2. Результаты обнаружения ДНК *C. burnetii* в суспензии органов зараженных белых мышей методом ПЦР
 Table 2. Results of detection of *C. burnetii* DNA in organ suspensions of infected white mice by PCR

Клинический материал / Clinical material	№ пассажа (продолжительность), значение Ct в ПЦР / Passage number (duration), Ct value in PCR																Кол-во дней / Number of days			
	Пассаж 1 (14 дней) / Passage 1 (14 days)	Пассаж 1а (21 день) / Passage 1a (21 day)	Пассаж 2 (14 дней) / Passage 2 (14 days)	Пассаж 3 (14 дней) / Passage 3 (14 days)	Пассаж 4 (14 дней) / Passage 4 (14 days)	Пассаж 5 (14 дней) / Passage 5 (14 days)	Пассаж 6 (14 дней) / Passage 6 (14 days)	Пассаж 7 (14 дней) / Passage 7 (14 days)	Пассаж 8 (14 дней) / Passage 8 (14 days)	клетки легкого / lung cells	макрофаги / macrophages	клетки легкого / lung cells	макрофаги / macrophages	клетки легкого / lung cells	макрофаги / macrophages	клетки легкого / lung cells		макрофаги / macrophages		
Сыворотка / Serum №63 (Ct 24,63)	28,9	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	33,5	Отр. neg	30,5	34,5	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	34,6	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	-	-	98
Сыворотка / Serum №64 (Ct 28,04)	21,6	17,1	35,3	27,1	12,5	19,1	18,5	17,1	24,3	23,4	21,2	19,1	21,7	22,5	18,4	18,2	21,1	20,1	112	

Таблица 3. Результаты культивирования материала от белых мышей, содержащего *C. burnetii*, на клетках Vero E6 и Hep-2
 Table 3. Results of culturing material from white mice containing *C. burnetii* on Vero E6 and Hep-2 cells

Материал для заражения / клеточная линия, Ct / Infection material/ cell line, Ct	№ тестирования /дни, значение Ct в ПЦР / Test No./days, Ct value in PCR												Кол-во дней пассажа / Number of days of passage
	1/7 д. / days	2/7 д. / days	3/7 д. / days	4/7 д. / days	5/7 д. / days	6/7 д. / days	-	-	-	-	-	-	
Флакон №1, сусп. кл. легкого/Hep-2, Ct 33,5 / Flask No1, lung cells susp./ Hep-2, Ct 33.5	32,3	35,4	Отр neg	35,99	Отр neg	Отр neg	-	-	-	-	-	-	42
Флакон №2, сусп. макрофагов/Vero E6, Ct 27,1 / Flask No2, macrophages susp. /Vero E6, Ct 27.1	28,1	30,38	30,7	35,09	32,94	31,4	7/7 д. days, пересев reseeding	8/7 д. days	-	-	-	-	49
Флакон №3, сусп. макрофагов/Vero E6, Ct 19,1 / Flask No3, macrophages susp. /Vero E6, Ct 19.1	17,3	17,5	21,8	21,48	19,2	20,8	7/7 д. days	8/7 д. days	9/7 д. days	10/14 д. days	11/21 д. days	-	104
Флакон №4, сусп. кл. легкого/Vero E6, Ct 12,5 / Flask No4, lung cells susp./ Vero E6, Ct 12.5	16,6	16,4	21,82	21,4	18,5	21,7	7/7 д. days	8/7 д. days	9/7 д. days	10/14 д. days	11/21 д. days	12/14 д. days	118
Флакон №5, сусп. кл. легкого/Hep-2, Ct 12,5 / Flask No5, lung cells susp./ Hep-2, Ct 12.5	17,6	17,4	19,61	20,31	19,3	21,0	7/7 д. days	8/7 д. days	9/7 д. days	10/14 д. days	11/21 д. days	12/14 д. days	118
Флакон №6, сусп. кл. селезенки /Vero E6, Ct 17,3 / Flask No6, susp. spleen cells/Vero E6, Ct 17,3	20,0	22,87	21,7	20,9	17,9	18,5	7/21 д. / days	8/14 д. / days	9/14 д. / days	10/14 д. / days, пересев reseeding	11/14 д. / days	12/28 д. / days	152
Флакон №7, сусп. макрофагов/Vero E6, Ct 23,4 / Flask No7, susp. macrophages/Vero E6, Ct 23,4	26,1	26,97	25,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47
Флакон №8, сусп. кл. легкого, хранение при -80°C/Vero E6, Ct 24,3 / Flask No8, lung cells susp./ storage at -80°C/Vero E6, Ct 24,3	28,72	27,8	29,7	29,0	-	-	-	-	-	-	-	-	35

новый монослой. Клетки Hep-2 в аналогичных условиях округляются, открепляются от поверхности пластика в виде единичных клеток и конгломератов, нарушая конфлюэнтность монослоя, в результате чего возникает необходимость пересева инфекционного материала на новый монослой.

Для определения жизнеспособности *C. burnetii* и их способности инфицировать клетки хозяина после хранения в условиях низкотемпературного холодильника материал от биопробных животных (белых мышей), содержащий *C. burnetii* (суспензия клеток легкого, Ct 24,3), был заморожен при температуре -80°C и хранился в течении 1 мес. Заражение культуры клеток этим материалом не привело к

увеличению количества специфической ДНК на протяжении 35 дней культивирования (табл. 3, флакон №8). В то же время при заражении белых мышей аналогичным материалом наблюдалось сохранение и увеличение количества ДНК в пределах Ct 19-25 на протяжении 28 дней (срок наблюдения, табл. 4).

В наших экспериментах поддерживали культуру *C. burnetii* в условиях *in vivo* и *in vitro* одновременно. Пассаж возбудителя через биопробное животное с последующим инфицированием культуры клеток способствовал поддержанию жизнеспособности коксии в течение более длительного времени. Наши наблюдения показали, что использование пери-

Таблица 4. Результаты культивирования *C. burnetii* в организме белых мышей после хранения суспензий органов при -80°C
Table 4. Results of cultivation of *C. burnetii* in the body of white mice after storing organ suspensions at -80°C

Материал от биопробных животных/Ст в ПЦР Material from bioassay animals/Ct in PCR	Пассаж 1 (14 дней) / Passage 1 (14 days)		Пассаж 2 (14 дней) / Passage 2 (14 days)		Пассаж 3 (14 дней) / Passage 3 (14 days)	
	легкие / Lung	макрофаги / macrophages	легкие / Lung	макрофаги / macrophages	легкие / Lung	макрофаги / macrophages
Суспензия клеток легкого / Lung cell suspension Ct 24,3	24,8	25,6	25,4	21,3	20,1	24,9
Перитонеальные макрофаги / Peritoneal macrophages Ct 23,4	25,6	23,6	20,7	19,5	23,8	24,2

тонеальных макрофагов оптимально как для повторного заражения биопробных животных, так и для инокуляции в культуру клеток, поскольку суспензия макрофагов содержит минимальную примесь эритроцитов.

Для увеличения числа копий генома *C. burnetii* в культуре клеток применяли различные способы оптимизации условий роста: варьирование сроков культивирования возбудителя без смены ростовой среды (от 7 до 28 дней), содержание эмбриональной сыворотки в ростовой среде (оптимально 3%), использование различных клеточных линий (более эффективной моделью является культура клеток Vero E6).

Согласно полученным результатам, инфицирующая доза является решающим фактором, обеспечивающим длительное культивирование возбудителя *in vitro* в монослое эукариотических клеток. В данной работе максимальный срок культивирования материала от биопробных животных на клетках Vero E6 составил 152 дня (срок наблюдения), что позволило накопить специфическую ДНК коксиелл до значения Ct 15,7 в ПЦР. Сопоставимый показатель специфической ДНК возбудителя лихорадки Ку, равный Ct 12,5, был получен при использовании в качестве биологической модели беспородных белых мышей.

Результаты проведенного исследования показали также, что образцы сыворотки крови пациентов с острой лихорадкой Ку являются ценным источником жизнеспособной *C. burnetii*. Безусловно, медленный рост микроорганизма из образцов, содержащих малое количество бактерий, ограничивает применение модели культуры клеток в качестве диагностического инструмента, однако ее польза очевидна в случае подтверждения диагноза и создания коллекций изолятов *C. burnetii*. Кроме того, оценка основных свойств возбудителя возможна только при условии выделения жизнеспособных микроорганизмов.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Marrie TJ, Raoult D. Q fever – a review and issues for the next century. Int J Antimicrob Agents. 1997;8(3):145-61. DOI: 10.1016/s0924-8579(96)00369-x
- Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. Vet Microbiol. 2011 Apr 21;149(1-2):1-16. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.10.007
- In Q-fever. The Disease, Vol 1. Ed. Marrie TJ. Boca Raton: CRC Press; 1990.
- Lapointe JM, Gulland FM, Haines DM, Barr BC, Duignan PJ. Placentitis due to *Coxiella burnetii* in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). J Vet Diagn Invest. 1999 Nov;11(6):541-3. DOI: 10.1177/104063879901100612
- Kersh GJ, Lambourn DM, Self JS, Akmajian AM, Stanton JB, Baszler TV, et al. *Coxiella burnetii* infection of a Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) found in Washington State. J Clin Microbiol. 2010 Sep;48(9):3428-31. DOI: 10.1128/JCM.00758-10
- Kersh GJ, Lambourn DM, Raverty SA, Fitzpatrick KA, Self JS, Akmajian AM, Jeffries SJ, Huggins J, Drew CP, Zaki SR, Massung RF. *Coxiella burnetii* infection of marine mammals in the Pacific Northwest, 1997–2010. J Wildl Dis. 2012 Jan;48(1):201-6. DOI: 10.7589/0090-3558-48.1.201
- Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. Emerg Infect Dis. 2004 Jul;10(7):1264-9. DOI: 10.3201/eid1007.030724
- Шпынов СН, Рудаков НВ, Зеликман СЮ. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Российской Федерации в период с 1957 по 2019 год. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;3:141-146. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-141-146
- Muskens J, van Engelen E, van Maanen C, Bartels C, Lam TJ. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. Vet Rec. 2011 Jan 22;168(3):79. DOI: 10.1136/vr.c6106
- Arricau-Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Excretion of *Coxiella burnetii* during an experimental infection of pregnant goats with an abortive goat strain CbC1. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;990:524-6. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07422.x
- Clark NJ, Soares Magalhães RJ. Airborne geographical dispersal of Q fever from livestock holdings to human communities: a systematic review and critical appraisal of evidence. BMC Infect Dis. 2018 May 15;18(1):218. DOI: 10.1186/s12879-018-3135-4
- Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, et al. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. Infect Immun. 2009 Dec;77(12):5640-50. DOI: 10.1128/IAI.00851-09
- Kazar J. *Coxiella burnetii* infection. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1063:105-14. DOI: 10.1196/annals.1355.018
- Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. PLoS Pathog. 2015 May 15;11(5):e1004892. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004892
- Rahman Md S, Chakrabarty A, Sarker RR, Sharmy ST, Sarker AS, Parvin S, et al. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in human, animals and ticks in Bangladesh. Afr J Microbiol Res. 2018;12(6):136-140. DOI: 10.5897/AJMR2017.8718

16. Рудаков НВ, Зеликман СЮ, Шпынов СН. Лихорадка Ку: эколого-эпидемиологические аспекты: информационное письмо. ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. Омск: КАН, 2021.
17. Лобан КМ, Лобзин ЮВ, Лукин ЕП. Риккетсиозы человека: рук-во для врачей. М., СПб., ЭЛБИ-СПб, 2002;393-474.
18. Панферова ЮА, Токаревич НК, Блинова ОВ, Нафеев АА, Сибяева ЭИ. Типирование некультивируемых изолятов *Coxiella burnetii* и *Coxiella*-подобных микроорганизмов, ассоциированных с клещами, с применением анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Проблемы особо опасных инфекций. 2023;1:142-147. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-142-147
19. Рудаков НВ, Шпынов СН, Токаревич НК, Носков АК и др. Лабораторная диагностика лихорадки Ку: практическое руководство. ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций»; ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»; ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт». Омск: Издательский центр КАН, 2023.
20. Martinez E, Cantet F, Fava L, Norville I, Bonazzi M. Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. PLoS Pathog. 2014 Mar 20;10(3):e1004013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004013
21. Fenollar F, Fournier PE, Carrieri MP, Habib G, Messana T, Raoult D. Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. Clin Infect Dis. 2001 Aug 1;33(3):312-6. DOI: 10.1086/321889
22. Landais C, Fenollar F, Thuny F, Raoult D. From acute Q fever to endocarditis: serological follow-up strategy. Clin Infect Dis. 2007 May 15;44(10):1337-40. DOI: 10.1086/515401
23. Чеканова ТА, Петремгвдлшвили К. Лихорадка КУ в Российской Федерации: взгляд на заболеваемость через призму уровня развития лабораторной диагностики. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2022;21(6):5-12. DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-6-5-12
24. Фрейлихман ОА, Токаревич НК, Кондрашова ВД. Лабораторные методы диагностики Ку-лихорадки и генотипирование *Coxiella burnetii*. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2017;2:49-60.
25. Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11):5094-8. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5094-5098.2003
26. Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, Schellekens JJ, Leenders AC, Wever PC. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. Clin Vaccine Immunol. 2010 Feb;17(2):286-90. DOI: 10.1128/CVI.00454-09
27. Чеканова ТА, Шпынов СН, Неталиева СЖ, Бабаева МА. Диагностическая значимость определения спектра антител к *Coxiella burnetii* в I и II фазовых состояниях. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2018;23(4):165-171. DOI: 10.18821/1560-9529-2018-23-4-165-171
28. Boden K, Wolf K, Hermann B, Frangoulidis D. First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell-free medium (ACCM2). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 May;34(5):1017-22. DOI: 10.1007/s10096-015-2321-1
29. Spyridaki I, Gikas A, Kofteridis D, Psaroulaki A, Tselentis Y. Q fever in the Greek island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. J Clin Microbiol. 1998 Jul;36(7):2063-7. DOI: 10.1128/JCM.36.7.2063-2067.1998
30. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. J Clin Microbiol. 2005;43(10):4993-5002. DOI: 10.1128/JCM.43.10.4993-5002.2005
31. Lockhart MG, Islam A, Fenwick SG, Graves SR, Stenos J. Comparative sensitivity of four different cell lines for the isolation of *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Lett. 2012;334(2):75-8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02617.x
32. Панферова ЮА. Молекулярные основы патогенности *Coxiella burnetii*. Инфекция и иммунитет. 2016;6(1):7-24. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-1-7-24
33. Sobotta K, Hillarius K, Mager M, Kerner K, Heydel C, Mange C. *Coxiella burnetii* infect primary bovine macrophages and limits their host cell response. Infect Immun. 2016; 84(6):1722-1734. DOI: 10.1128/IAI01208-15
34. Tujulin E, Lilliehöök B, Macellaro A, Sjöstedt A, Norlander L. Early cytokine induction in mouse P388D1 macrophages infected by *Coxiella burnetii*. Vet Immunol Immunopathol. 1999;68(2-4):159-68. DOI: 10.1016/s0165-2427(99)00023-9
35. Сокиркина ЕН, Тушинский АА, Савина ИВ, Леоненко НВ, Шитова НВ, Симакова ДИ, и др. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Ростовской области за 2022–2023 гг. В сб.: Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за чумой и другими опасными инфекционными болезнями. Матер. научн.-практ. конф. Горно-Алтайск, 2023;65-66.
36. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2012.
37. Brennan RE, Samuel JE. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2003; 41(5):1869-74. DOI: 10.1128/JCM.41.5.1869-1874.2003

References

1. Marrie TJ, Raoult D. Q fever – a review and issues for the next century. Int J Antimicrob Agents. 1997;8(3):145-61. DOI: 10.1016/s0924-8579(96)00369-x
2. Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. Vet Microbiol. 2011 Apr 21;149(1-2):1-16. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.10.007
3. In Q-fever. The Disease, Vol 1. Ed. Marrie TJ. Boca Raton: CRC Press; 1990.
4. Lapointe JM, Gulland FM, Haines DM, Barr BC, Duignan PJ. Placentitis due to *Coxiella burnetii* in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). J Vet Diagn Invest. 1999 Nov;11(6):541-3. DOI: 10.1177/104063879901100612
5. Kersh GJ, Lambourn DM, Self JS, Akmajian AM, Stanton JB, Baszler TV, et al. *Coxiella burnetii* infection of a Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) found in Washington State. J Clin Microbiol. 2010 Sep;48(9):3428-31. DOI: 10.1128/JCM.00758-10
6. Kersh GJ, Lambourn DM, Raverty SA, Fitzpatrick KA, Self JS, Akmajian AM, Jeffries SJ, Huggins J, Drew CP, Zaki SR, Massung RF. *Coxiella burnetii* infection of marine mammals in the Pacific Northwest, 1997–2010. J Wildl Dis. 2012 Jan;48(1):201-6. DOI: 10.7589/0090-3558-48.1.201
7. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. Emerg Infect Dis. 2004 Jul;10(7):1264-9. DOI: 10.3201/eid1007.030724
8. Shpynov SN, Rudakov NV, Zelikman SYu. Analysis of Q Fever Incidence in the Russian Federation Between 1957 and 2019. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2021;3:141-146. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-141-146 (In Russian).
9. Muskens J, van Engelen E, van Maanen C, Bartels C, Lam TJ. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. Vet Rec. 2011 Jan 22;168(3):79. DOI: 10.1136/vr.c6106
10. Arricau-Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Excretion of *Coxiella burnetii* during an experimental infection of pregnant goats with an abortive goat strain CbC1. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;990:524-6. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07422.x
11. Clark NJ, Soares Magalhães RJ. Airborne geographical dispersal of Q fever from livestock holdings to human communities: a systematic review and critical appraisal of evidence. BMC Infect Dis. 2018 May 15;18(1):218. DOI: 10.1186/s12879-018-3135-4
12. Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, et al. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. Infect Immun. 2009 Dec;77(12):5640-50. DOI: 10.1128/IAI.00851-09

13. Kazar J. *Coxiella burnetii* infection. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1063:105-14. DOI: 10.1196/annals.1355.018
14. Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. PLoS Pathog. 2015 May 15;11(5):e1004892. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004892
15. Rahman Md S, Chakrabarty A, Sarker RR, Sharmy ST, Sarker AS, Parvin S, et al. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in human, animals and ticks in Bangladesh. Afr J Microbiol Res. 2018;12(6):136-140. DOI: 10.5897/AJMR2017.8718
16. Rudakov NV, Zelikman SYu, Shpynov SN. Lihoradka Ku: ekologo-epidemiologicheskie aspekty: informacionnoe pis'mo. FBUN «Omskij NII prirodno-ochagovykh infektsii» Rospotrebnadzora. Omsk: KAN, 2021. (In Russian).
17. Loban KM, Lobzin YuV, Lukin EP. Rikketsiozy cheloveka: ruk-vo dlya vrachej. M., SPb., ELBI-SPb, 2002;393-474. (In Russian).
18. Panferova YuA, Tokarevich NK, Blinova OV, Nafeev AA, Sibaeva EI. Typing of Uncultured Isolates of *Coxiella burnetii* and *Coxiella*-Like Microorganisms Associated with Ticks Using 16S rRNA Gene Nucleotide Sequence Analysis. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2023;1:142-147. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-142-147 (In Russian).
19. Rudakov NV, Shpynov SN, Tokarevich NK, Noskov AK, et al. Laboratornaya diagnostika likhoradki Ku: prakticheskoe rukovodstvo. FBUN «Omskij NII prirodno-ochagovykh infektsii»; FBUN «Sankt-Peterburgskij NII epidemiologii i mikrobiologii im. Pastera»; FKUZ «Rostovskii-na-Donu nauchno-issledovatel'skii protivochumnyi institut». Omsk: Izdatel'skii tsentr KAN, 2023. (In Russian).
20. Martinez E, Cantet F, Fava L, Norville I, Bonazzi M. Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. PLoS Pathog. 2014 Mar 20;10(3):e1004013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004013
21. Fenollar F, Fournier PE, Carrieri MP, Habib G, Messana T, Raoult D. Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. Clin Infect Dis. 2001 Aug 1;33(3):312-6. DOI: 10.1086/321889
22. Landais C, Fenollar F, Thuny F, Raoult D. From acute Q fever to endocarditis: serological follow-up strategy. Clin Infect Dis. 2007 May 15;44(10):1337-40. DOI: 10.1086/515401
23. Chekanova TA, Petremgvdishvili K. Q Fever in the Russian Federation: a View on Incidence through the Level of Development of Laboratory Diagnosis. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2022;21(6):5-12. DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-6-5-12 (In Russian).
24. Freylikhman OA, Tokarevich NK, Kondrashova VD. Methods of laboratory diagnosis of Q fever and genotyping of *Coxiella burnetii*. Infectious Diseases. News, Opinions, Training. 2017;2:49-60. (In Russian).
25. Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11):5094-8. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5094-5098.2003
26. Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, Schellekens JJ, Leenders AC, Wever PC. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. Clin Vaccine Immunol. 2010 Feb;17(2):286-90. DOI: 10.1128/CVI.00454-09
27. Chekanova TA, Shpynov SN, Netalieva SZh, Babaeva MA. Diagnostic significance of antibodies spectrum to *Coxiella burnetii* in I and II phases. Epidemiology and Infectious Diseases (Epidemiologiya i infektsionnye bolezni). 2018;23(4):165-171. DOI: 10.18821/1560-9529-2018-23-4-165-171 (In Russian).
28. Boden K, Wolf K, Hermann B, Frangoulidis D. First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell-free medium (ACCM2). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 May;34(5):1017-22. DOI: 10.1007/s10096-015-2321-1
29. Spyridaki I, Gikas A, Kofteridis D, Psaroulaki A, Tselentis Y. Q fever in the Greek island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. J Clin Microbiol. 1998 Jul;36(7):2063-7. DOI: 10.1128/JCM.36.7.2063-2067.1998
30. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. J Clin Microbiol. 2005;43(10):4993-5002. DOI: 10.1128/JCM.43.10.4993-5002.2005
31. Lockhart MG, Islam A, Fenwick SG, Graves SR, Stenos J. Comparative sensitivity of four different cell lines for the isolation of *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Lett. 2012;334(2):75-8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02617.x
32. Panferova YuA. *Coxiella burnetii* pathogenicity molecular basis. Russian Journal of Infection and Immunity. 2016;6(1):7-24. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-1-7-24 (In Russian).
33. Sobotta K, Hillarius K, Mager M, Kerner K, Heydel C, Mange C. *Coxiella burnetii* infect primary bovine macrophages and limits their host cell response. Infect Immun. 2016; 84(6):1722-1734. DOI: 10.1128/IAI01208-15
34. Tujulin E, Lilliehöök B, Macellaro A, Sjöstedt A, Norlander L. Early cytokine induction in mouse P388D1 macrophages infected by *Coxiella burnetii*. Vet Immunol Immunopathol. 1999;68(2-4):159-68. DOI: 10.1016/s0165-2427(99)00023-9
35. Sokirkina EN, Tushinskii AA, Savina IV, Leonenko NV, Shitova NV, Simakova DI, i dr. Analiz zabolevaemosti likhoradkoi Ku v Rostovskoi oblasti za 2022–2023 gg. V sb.: Aktual'nye voprosy epidemiologicheskogo nadzora za chumoi i drugimi opasnymi infektsionnymi boleznyami. Mater. nauchn.-prakt. konf. Gorno-Altaysk, 2023;65-66. (In Russian).
36. Direktiva 2010/63/EU Evropeiskogo parlamenta i soveta po okhrane zhivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh tselyakh. St. Petersburg, 2012. (In Russian).
37. Brennan RE, Samuel JE. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2003; 41(5):1869-74. DOI: 10.1128/JCM.41.5.1869-1874.2003

Информация о соавторах:

Симакова Диана Игоревна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующего лабораторией диагностических препаратов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Алексеева Людмила Павловна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории диагностических препаратов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Левченко Дарья Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующего лабораторией экспериментально-биологических моделей и биологической безопасности ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Мелоян Мисак Геворгович, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Сокиркина Елена Николаевна, младший научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Diana I. Simakova, PhD in Biological Sciences, Head of the Laboratory of diagnostic preparations, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Ludmila P. Alekseeva, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Senior Researcher, Laboratory of diagnostic preparations, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Daria A. Levchenko, PhD, MD, Senior Researcher, Head of the Laboratory of Experimental Biological Models and Biological Safety, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Misak G. Meloyan, Junior Researcher, Laboratory of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Elena N. Sokirkina, Junior Researcher, Department of Epidemiology, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor