

УДК 578.5
МРНТИ 34.15.25

DOI 10.52578/2305-9397-2024-4-1-26-36

Абаева М.Р., магистр естественных наук, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0002-1304-4702>
ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Б. Момышулы, 15, 080409, Казахстан, m.rahmetullaevna@biosafety.kz

Шыныбекова Г.О., магистр биологических наук, <https://orcid.org/0000-0002-6976-1540>
ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Б. Момышулы, 15, 080409, Казахстан, sh.gaukhar@biosafety.kz

Исабек А.У., магистр биологических наук, <https://orcid.org/0000-0002-5623-7571>
ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Б. Момышулы, 15, 080409, Казахстан, isabekova_aisha@mail.ru

Кожабергенов Н. С., магистр естественных наук, <https://orcid.org/0000-0001-6299-9399>
ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Б. Момышулы, 15, 080409, Казахстан, nurlanks@gmail.com

Орынбаев М.Б., кандидат ветеринарных наук, профессор, <https://orcid.org/0000-0002-5882-4964>
ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Б. Момышулы, 15, 080409, Казахстан, omb65@mail.ru

Султанкулова К. Т., кандидат биологических наук, профессор, <https://orcid.org/0000-0002-1332-1247>
ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Б. Момышулы, 15, 080409, Казахстан, k.sultankulova@biosafety.kz

Abayeva M. R., Master of Sciences, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0002-1304-4702>
«Research Institute for Biological Safety Problems» LLP, Zhambyl oblast, Korday region, Gvardeyskiy urban-type settlement, B. Momyshuly str., 15, 080409, Kazakhstan, m.rahmetullaevna@biosafety.kz

Shynybekova G. O., Master of Biological Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-6976-1540>
«Research Institute for Biological Safety Problems» LLP, Zhambyl oblast, Korday region, Gvardeyskiy urban-type settlement, B. Momyshuly str., 15, 080409, Kazakhstan, sh.gaukhar@biosafety.kz

Isabek A.U., Master of Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-5623-7571>
«Research Institute for Biological Safety Problems» LLP, Zhambyl oblast, Korday region, Gvardeyskiy urban-type settlement, B. Momyshuly str., 15, 080409, Kazakhstan, isabekova_aisha@mail.ru

Kozhabergenov N. S., Master of Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-6299-9399>
«Research Institute for Biological Safety Problems» LLP, Zhambyl oblast, Korday region, Gvardeyskiy urban-type settlement, B. Momyshuly str., 15, 080409, Kazakhstan, nurlanks@gmail.com

Orynbaev M. B., candidate of veterinary sciences, Professor, <https://orcid.org/0000-0002-5882-4964>
«Research Institute for Biological Safety Problems» LLP, Zhambyl oblast, Korday region, Gvardeyskiy urban-type settlement, B. Momyshuly str., 15, 080409, Kazakhstan, omb65@mail.ru

Sultankulova K. T., Candidate of Biological Sciences, Professor, <https://orcid.org/0000-0002-1332-1247>
«Research Institute for Biological Safety Problems» LLP, Zhambyl oblast, Korday region, Gvardeyskiy urban-type settlement, B. Momyshuly str., 15, 080409, Kazakhstan, k.sultankulova@biosafety.kz

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ КУ-ЛИХОРАДКИ У ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ IDENTIFICATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF Q FEVER IN IXODES TICKS

Аннотация

Ку-лихорадка – это зоонозная инфекция, вызываемая внутриклеточной грамотрицательной бактерией *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*). Ежегодно во всем мире появляются

сообщения об инфекциях, вызванных *C. burnetii*, у людей, домашних и диких животных. Молекулярная характеристика штаммов *C. burnetii*, сравнительный анализ генотипов *C. burnetii* может помочь идентифицировать источники инфекции у людей и животных, классифицировать циркулирующие штаммы и внести вклад в контроль и профилактику инфекций. Эта работа направлена на исследование распространённости *C. burnetii* среди иксодовых клещей, собранных от крупного рогатого скота в Туркестанской области. В наших исследованиях получены результаты молекулярно-генетического анализа генов *com-1*, *icd*, *cbbE'* изолята *C. burnetii*, выделенного из клещей, доставленных из Туркестанской области. Филогенетический анализ по гену 16S рРНК показал, что исследуемый изолят *C. burnetii* составляет одну группу со штаммом CB149 *C. burnetii*, относящийся к шестому генотипу (MST 6). В заключение следует отметить, что в этом исследовании подчеркивается роль клещей как потенциальных переносчиков *C. burnetii*. Результаты указывают на важность крупного рогатого скота как эффективных факторов в эпидемиологии Ку-лихорадки.

ANNOTATION

Q fever is a zoonotic disease caused by *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*), an obligate intracellular bacterium. *C. burnetii* infections are reported annually worldwide in humans, domestic and wild animals. Given the wide geographic distribution, diversity of reservoirs, transmission routes and clinical features of *C. burnetii*, studying its epidemiology is a complex task. Therefore, molecular characterization of *C. burnetii* strains, comparative analysis of *C. burnetii* genotypes can help to identify sources of infection in humans and animals, classify circulating strains and contribute to infection control and prevention. This work aims to investigate the prevalence of *C. burnetii* among ixodid ticks collected from domestic animals in the Turkestan region using molecular genetic analysis. In our studies, we obtained the results of molecular genetic analysis of the *com-1*, *icd*, *cbbE'* genes and genotyping by the 16S rRNA gene of the *C. burnetii* isolate isolated from a pool of ticks delivered from the Turkestan region. Phylogenetic analysis showed that the studied *C. burnetii* isolate constitutes one group with the CB149 *C. burnetii* strain, belonging to the sixth genotype (MST 6). In conclusion, this study highlights the role of ticks as potential vectors of *C. burnetii*. The results indicate the importance of domestic animals as effective agents in the epidemiology of Q fever.

Ключевые слова: *C. burnetii*, изолят, 16S рРНК, гнездовая ПЦР, секвенирование.

Key words: *C. burnetii*, isolate, 16S rRNA, nested PCR, sequencing.

Введение. Ку-лихорадка – это глобальное зоонозное заболевание, вызываемое грамотрицательной и облигатной внутриклеточной бактерией *C. burnetii* [1] семейства *Coxiellaceae*, класса *Gammaproteobacteria* и типа *Proteobacteria* [2]. Ку-лихорадка вызывается высокоинфекционной облигатной внутриклеточной бактерией *C. burnetii*. Было обнаружено, что *C. burnetii* заражает как диких, так и домашних животных, птиц и членистоногих насекомых [3]. *C. burnetii* впервые выделен из твердых клещей: *Dermacentor andersoni*, собранный в Монтане [4] и *Haemaphysalis humerosa* из Австралии [5], с тех пор клещи рассматриваются как переносчики инфекции. Клещи признаны наиболее важными переносчиками различных патогенных бактерий, простейших и вирусов, вызывающих заболевания у людей и животных во всем мире [6]. *Coxiella burnetii* был обнаружен у более 40 различных видов клещей, собранных из различных мест обитания, таких как растительность, а также домашние и дикие животные [7]. Жвачные животные и клещи могут играть важную роль в поддержании домашних и диких циклов заболевания соответственно. Домашний цикл считается основным источником заражения человека. Однако связь между дикими и домашними циклами изучена плохо [8, 9]. Лабораторную диагностику Ку-лихорадки чаще всего осуществляют методами молекулярной биологии, которые опираются на нескольких методах, таких как гнездовая ПЦР [10], ПЦР в реальном времени [11] и в последнее время анализ петлевой изотермической амплификации (LAMP) [12]. На сегодняшний день метод ПЦР оказался очень чувствительным методом и имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами диагностирования Ку-лихорадки. Для обнаружения ДНК *C. burnetii* при постановке гнездовой ПЦР использовались гены-мишени, такие как внешний ген *com1* кодирующий мембранный белок, изоцитратдегидрогеназа ген *icd* [13, 14] и ген *cbbE'* кодирующий поверхностный белок *C. burnetii* [15].

Генотипирование по многослойному типированию последовательностей (MST) может помочь проследить распространение *C. burnetii* из одного региона в другой и от животного-резервуара к человеку. Некоторые генотипы MST присутствуют во многих континентах, тогда как другие ограничены очень специфическими эпидемическими ситуациями. Например, MST 20 был описан у жвачных животных в Европе, а также у людей и жвачных животных в США, что предполагает распространение заболевания инфицированными животными. MST 17 был выделен только из Французской Гвианы, вызывая тяжелые формы заболевания [16]. Наше исследование было направлено на обнаружение *C. burnetii* у иксодовых клещей, собранных от домашнего скота, чтобы оценить их роль в качестве резервуара и источника заражения.

Материалы и методы исследования. Выделение ДНК изолята возбудителя Ку-лихорадки *C. burnetii*. В качестве объекта исследования в работе был использован изолят *C. burnetii* возбудителя Ку-лихорадки, выделенный из клещей, доставленных из Туркестанской области. Выделение ДНК изолята возбудителя Ку-лихорадки проводили с использованием коммерческого набора реагентов для выделения ДНК InnuPREP DNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Праймеры для наработки и секвенирования генов *C. burnetii*. Для выявления ДНК *C. burnetii* в различных биологических материалах, включая пробы от сельскохозяйственных и диких животных, иксодовых клещей, используют различные варианты ПЦР с праймерами, комплементарными специфическим фрагментам генов плазмид и хромосомы. Анализ генотипирования ДНК *C. burnetii* основан на секвенировании межгенной области. Праймеры, используемые для амплификации и секвенирования генов *com-1*, *icd*, *cbbE'* и 16S rRNA [17] представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики праймеров для амплификации и секвенирования генов *C. burnetii*

Гены	Праймеры	Нуклеотидная последовательность праймера (5'–3')	Длина фрагмента (п.н.)
Com-1	OMP1	5'-AGTAGAAGCATCCCAAGCATTG-3'	501
	OMP2	5'-TGCCTGCTAGCTGTAACGATTG-3'	
	OMP3	5'-GAAGCGCAACAAGAAGAACAC-3'	438
	OMP4	5'-TTGGAAGTTATCACGCAGTTG-3'	
Icd	icd1	5'-CGGAGTCTCTTAGTGATGACGGA-3'	1300
	icd2	5'-GCCTTCTTTAGAAACCGGTTTAA-3'	
	icd1N	5'-GGAGTTAACCGGAGTATCCA-3'	370
	icd2N	5'-ATTGAGCGAACGTATGCCAC-3'	
CbbE'	QpRS1	5'-CTCGTACCCAAAGACTATGAATATATCC-3'	693
Плазмида QpRS	QpRS2	5'-AACACCGATCAATGCGACTAGCCC-3'	309
	QpRS3	5'-ACTTTACGTCGTTTAATTCGC-3'	
	QpRS4	5'-CACATTGGGTATCGTACTGTCCCT-3'	
16S rRNA	QF	5'-ATTGAAGAGTTTGATTCTGG-3'	1457
	QR	5'-CGGCCTCCCGAAGGTTAG-3'	

Выбранные праймеры были синтезированы на синтезаторе олигонуклеотидов Synthesizer H-16 (Германия), согласно инструкции, прилагаемой к прибору.

Амплификация участков генома изолятов возбудителя Ку-лихорадки методом ПЦР. Нарботку специфических участков ДНК проводили в термоциклере MasterCycler X50S фирмы Eppendorf (Германия). Используемые внешние праймеры OMP1-OMP2, Icd1-Icd2 и QpRS1-QpRS2 служат для начальной амплификации участка, включающего в себя целевой фрагмент ДНК. Вторая пара, внутренних праймеров OMP3-OMP4, Icd1N-Icd2N, QpRS3-QpRS4 отжигается на продукт первой и используется на втором этапе ПЦР с большим числом циклов. В таблице 2 представлены состав реакционной смеси и температурно-временной режим постановки ПЦР.

Таблица 2 – Оптимизированный состав реакционной смеси и температурно-временные режимы постановки ПЦР

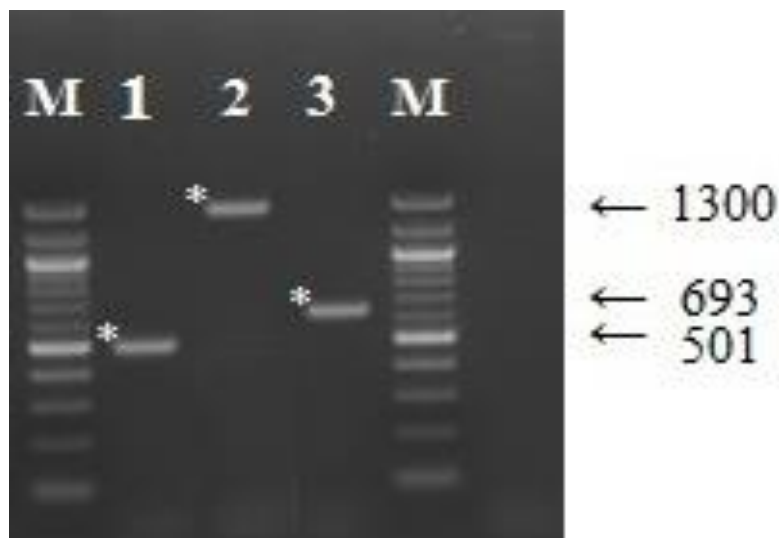
Название гена	Праймеры	Состав реакционной смеси	Температурно-временной режим (1)	Температурно-временной режим (2)
Com-1	OMP1-OMP2 501 bp OMP3-OMP4 438 bp	10x буфер – 2,5 мкл, 10 pM праймер F – 1 мкл, 10 pM праймер R – 1 мкл, Taq – 0,1 мкл, ДНК – 2 мкл/ ПЦР прод. – 1 мкл Вода – 18,4 мкл/19,4 мкл	94°C – 30 с.; 35 циклов 94 °C – 1 мин.; 54°C – 1 мин.; 68 °C – 1 мин.; 68°C – 7 мин.; 4°C – хранение	94 °C – 30 с.; 36 циклов 94 °C – 1 мин.; 54°C – 20 с.; 68 °C – 1 мин.; 68 °C – 7 мин.; 4 °C – хранение
Icd	Icd1-Icd2 1300 bp Icd1N-Icd2N 370 bp	10x буфер – 2,5 мкл, 10 pM праймер F – 1 мкл, 10 pM праймер R – 1 мкл, Taq – 0,1 мкл, ДНК – 2 мкл/ ПЦР прод. – 1 мкл Вода – 18,4 мкл/ 19,4 мкл	94°C – 30 с.; 35 циклов 94°C – 30 с.; 56°C – 1 мин.; 68 °C – 1 мин.; 68 °C – 7 мин.; 4°C – хранение.	94 °C – 30 с.; 35 циклов 94 °C – 30 с.; 54°C – 20 с.; 68 °C – 2 мин.; 68 °C – 7 мин.; 4 °C – хранение
cbbE`	QpRS1- QpRS2 693 bp QpRS3- QpRS4 309 bp	10x буфер – 2,5 мкл, 10 pM праймер F – 1 мкл, 10 pM праймер R – 1 мкл, Taq – 0,1 мкл, ДНК – 2 мкл/ ПЦР прод. – 1 мкл Вода – 18,4 мкл./ 19,4 мкл	94 °C – 30 с.; 36 циклов 94 °C – 30 с.; 54°C – 1 мин.; 68 °C – 2 мин.; 68 °C – 7 мин.; 4°C – хранение	94 °C – 30 с.; 36 циклов 94 °C – 30 с.; 51°C – 20 мин.; 68°C – 1,30 мин.; 68 °C – 7 мин.; 4 °C – хранение
16S PHK	QR-QF 1457 bp	10x буфер – 2,5 мкл, 10 pM праймер F – 1 мкл, 10 pM праймер R – 1 мкл, Taq – 0,1 мкл, ДНК – 2 мкл, Вода – 18,4 мкл	94 °C – 30 с.; 35 циклов 94 °C – 30 с.; 48°C – 1 мин.; 68 °C – 2 мин.; 68 °C – 7 мин.; 4°C – хранение	

Секвенирование амплифицированных фрагментов бактериальной ДНК. Секвенирование ДНК проводят методом дидеоксисеквенирования с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов (метод Сэнгера) на генетическом анализаторе 3500xl (Applied Biosystems, США) с использованием коммерческого набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США), согласно рекомендациям производителя. В качестве полимера для капилляров используют POP-7 (Thermo Fisher Scientific, США). Нарработку терминирующих продуктов ДНК проводят методом циклического секвенирования. Очистку ДНК от несвязавшихся красителей осуществляют гельфильтрацией на колонках Centri-Sep (Thermo Fisher Scientific, США) или с помощью CleanSeq Reagent (Magen, Германия) согласно прилагаемым к наборам инструкциям. Анализ нуклеотидных последовательностей генов проведено в программе Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Результаты исследования. Гнездовая ПЦР используется в ситуациях, когда необходимо повысить чувствительность или специфичность ПЦР, например, при амплификации определенного члена полиморфного семейства генов, присутствующей в очень низкой концентрации в клиническом образце, содержащем гетерогенную популяцию типов клеток. Вложенная ПЦР обычно включает две последовательные реакции амплификации, каждая из которых использует другую пару праймеров. Продукт первой реакции амплификации используется в качестве матрицы для второй ПЦР, которая праймируется олигонуклеотидами, которые помещаются внутри первой пары праймеров. Использование двух пар

олигонуклеотидов позволяет выполнять большее количество циклов, тем самым повышая чувствительность ПЦР. Улучшенная специфичность реакции достигается за счет связывания двух отдельных наборов праймеров с одной и той же целевой матрицей.

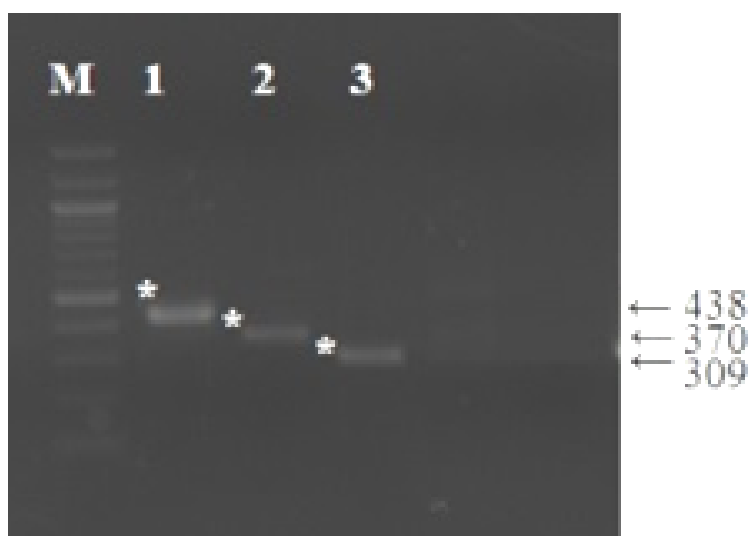
На рисунке 1 представлены результаты первого этапа гнездовой ПЦР для наработки генов *C. burnetii* *com-1*, *icd* и *cbbE*.



М – маркер, (100 bp DNA Ladder, NEB); 1 – ген *com-1* изолята *C. burnetii*; 2 – ген *icd* изолята *C. burnetii*; 3 – ген *cbbE* изолята *C. burnetii*

Рисунок 1 – Результаты ПЦР амплификации внешними праймерами генов изолята возбудителя Ку-лихорадки *C. burnetii* из иксодовых клещей, собранных в Туркестанской области

При проведении гнездовой ПЦР амплификации в одном из изолятов от клещей, доставленных из Туркестанской области наработались внутренними праймерами ПЦР-продукты, размеры которых составили 501 п.о. (ген *com-1*), 1300 п.н. (ген *icd*), п.о. и 693 п.о. (ген *cbbE*). ПЦР-продукты наработанные внешними праймерами были амплифицированы внутренними праймерами (рисунок 2).



М – маркер, (100 bp DNA Ladder, NEB); 1 – ген *com-1* изолята *C. burnetii*; 2 – ген *icd* изолята *C. burnetii*; 3 – ген *cbbE* изолята *C. burnetii*

Рисунок 2 – Результаты ПЦР амплификации внутренними праймерами генов изолята возбудителя Ку-лихорадки *C. burnetii* из клещей, доставленных из Туркестанской области

ПЦР-продукты генов *com-1*, *icd* и *cbbE* *C. burnetii* были секвенированы методом Сэнгера. Анализ нуклеотидных последовательностей генов проведено в программе Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Результаты представлены на рисунках 3-5.

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Coxiella burnetii isolate CPBCS29 capsular outer membrane protein (com1) gene, partial cds
Sequence ID: [MK945591.1](#) Length: 440 Number of Matches: 1

Range 1: 77 to 401 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
601 bits(325)	5e-167	325/325(100%)	0/325(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATAATTGGCCGTCGACACTGAGCAGCGCGTCGTGGAAGCATAATATTTTCCTTGTTAG	60		
Sbjct 77	ATAATTGGCCGTCGACACTGAGCAGCGCGTCGTGGAAGCATAATATTTTCCTTGTTAG	136		
Query 61	CGGCTGCTAATGATACTTTGGCAGCGTATTGCGATTGGCCGCCAAAAATGGGCAGTTCTT	120		
Sbjct 137	CGGCTGCTAATGATACTTTGGCAGCGTATTGCGATTGGCCGCCAAAAATGGGCAGTTCTT	196		
Query 121	TGAAGACACGCGGAGGTTTTATTTGTTTCACGATAGCTTGAATAACAGAATTCATGG	180		
Sbjct 197	TGAAGACACGCGGAGGTTTTATTTGTTTCACGATAGCTTGAATAACAGAATTCATGG	256		
Query 181	CTTTGCAATGGCCACATTGATAATCGAAAAATTCAACCAATGTAACATTGCCATGAGGAT	240		
Sbjct 257	CTTTGCAATGGCCACATTGATAATCGAAAAATTCAACCAATGTAACATTGCCATGAGGAT	316		
Query 241	TGCCTGCCACTGGTGATGCAGGGTCGTTAAATAATTTCTTTGCAATTTCTTTAATTGCTT	300		
Sbjct 317	TGCCTGCCACTGGTGATGCAGGGTCGTTAAATAATTTCTTTGCAATTTCTTTAATTGCTT	376		
Query 301	GTTGAGCGTGTCTTCTTGTGTCGC	325		
Sbjct 377	GTTGAGCGTGTCTTCTTGTGTCGC	401		

Рисунок 3 – Анализ результатов секвенирования гена *com-1* изолята *C. burnetii* от клещей, доставленных из Туркестанской области

Полученные результаты сравнительного анализа показали (рисунок 3), что исследуемый казахстанский изолят *C. burnetii* по гену капсулярного белка наружной мембраны (*com1*) идентичен на 100 % со штаммами из Генбанка: MK945591.1 изолят *Coxiella burnetii* CPBCS29 (Индия, 2020 г.), CP040059 *Coxiella burnetii* штамм RSA439 (Великобритания, 2019 г.).

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Coxiella burnetii isolate C10 isocitrate dehydrogenase (icd) gene, partial cds
Sequence ID: [MK388255.1](#) Length: 330 Number of Matches: 1

Range 1: 28 to 208 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
335 bits(181)	3e-87	181/181(100%)	0/181(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATCTCCATCCATTCAATTTTTTCGCTTTCCAGCGTAGGATTTTCCACGGCGGCATCGACC	60		
Sbjct 208	ATCTCCATCCATTCAATTTTTTCGCTTTCCAGCGTAGGATTTTCCACGGCGGCATCGACC	149		
Query 61	ACGTTTTTCATGACGGGCGTGATATCAATGCCAATCCCATCTCCTTCGATAAAGGGAATA	120		
Sbjct 148	ACGTTTTTCATGACGGGCGTGATATCAATGCCAATCCCATCTCCTTCGATAAAGGGAATA	89		
Query 121	ATGGGTCGGTCAGGAACCTTCTAAAACGGCTTTATTAACGGTGATTTTTTACCTTTGGCTG	180		
Sbjct 88	ATGGGTCGGTCAGGAACCTTCTAAAACGGCTTTATTAACGGTGATTTTTTACCTTTGGCTG	29		
Query 181	G 181			
Sbjct 28	G 28			

Рисунок 4 – Анализ результатов секвенирования гена *Icd* изолята *C. burnetii* от клещей, доставленных из Туркестанской области

По результатам проведенного сравнительного анализа было известно (рисунок 4), что ген изоцитратдегидрогеназы (Icd) казахстанского изолята *C. burnetii* имеет 100 % степень идентичности с данными международной базы ГенБанк, такими штаммами как МК388255 *Coxiella burnetii* изолят С10 (Китай, 2020 г.), MN267693 изолята *Coxiella burnetii* В10 (Ухань, Китай, 2020 г.).

Coxiella burnetii str. Namibia plasmid QpRS, complete sequence
Sequence ID: [CP007556.1](#) Length: 38660 Number of Matches: 1

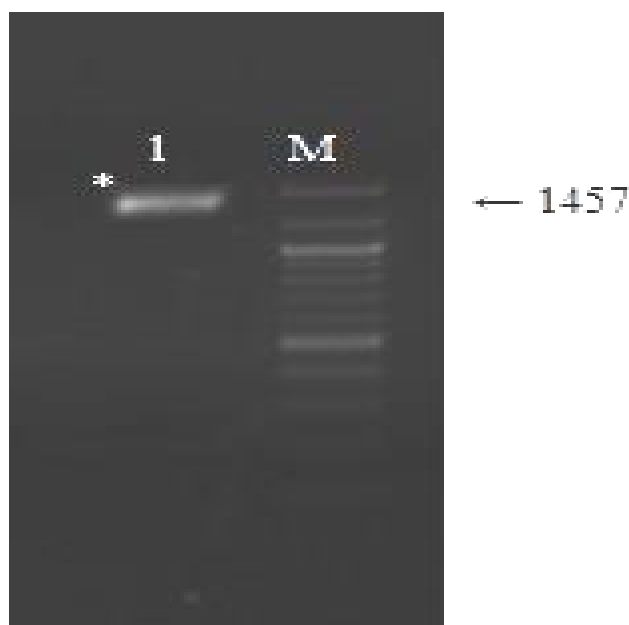
Range 1: 22996 to 23248 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Prev](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
468 bits(253)	4e-127	253/253(100%)	0/253(0%)	Plus/Plus
Query 1	tttttttCCACAAAAGTGCATCTTTGAAGAAAAACAGAAAGTGGGAAATTTACTCCC	60		
Sbjct 22996	TTTTTTTCCACAAAAGTGCATCTTTGAAGAAAAACAGAAAGTGGGAAATTTACTCCC	23055		
Query 61	CTAAACTGATAAGCCAGATATATCGAAAAGAACAGGAACCTTTGAAATAAGGGAAAAA	120		
Sbjct 23056	CTAAACTGATAAGCCAGATATATCGAAAAGAACAGGAACCTTTGAAATAAGGGAAAAA	23115		
Query 121	GTAAGGGACATCCACTACCGGTTACTAAGAACTGCTTAAGAGAGGGCAGGGAACGATAG	180		
Sbjct 23116	GTAAGGGACATCCACTACCGGTTACTAAGAACTGCTTAAGAGAGGGCAGGGAACGATAG	23175		
Query 181	TGTGTTGCGGTATTTACACAAAAGAACCCCTTGAAAAACGTAGCGGAAAAGGGACAGTACG	240		
Sbjct 23176	TGTGTTGCGGTATTTACACAAAAGAACCCCTTGAAAAACGTAGCGGAAAAGGGACAGTACG	23235		
Query 241	ATACCCAATGTGA	253		
Sbjct 23236	ATACCCAATGTGA	23248		

Рисунок 5— Анализ результатов секвенирования гена *cbbE* изолята *C. burnetii* от клещей, доставленных из Туркестанской области

Анализ нуклеотидных последовательностей плазмиды QpRS (рисунок 5) в программе BLAST подтверждает 99,60% идентичность казахстанского изолята *Coxiella burnetii* с Y15898.1 *Coxiella burnetii* ген плазмиды QpRS (Германия, 2016 г.) и 100 % идентичность с известными штаммами из Генбанка AF131076 *Coxiella burnetii* штамм R1140, KY271744 *Coxiella burnetii* штамм плазмиды Schperling (Нидерланды, 2020 г.).

Для определения типовой принадлежности проводили наработку ПЦР-продуктов гена 16S рРНК с использованием пар праймеров QF (5'-ATTGAAGAGTTTGATTCTGG-3') и QR (5'-CGGCCTCCCGAAGGTTAG-3'), размер наработанного продукта составил 1457 п.о. (рисунок 6).



М – маркер, (100 bp DNA Ladder, NEB); 1- результаты ПЦР амплификации гена 16S рРНК

Рисунок 6 – Результат ПЦР амплификации 16S рРНК гена изолята *C. burnetii* из клещей, собранных в Туркестанской области

С использованием секвенированных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК конструировано филогенетическое древо с помощью компьютерной программы Mega 11, методом Neigbor-Joining. Для проведения сравнительного анализа были взяты штаммы из Международной базы данных Генбанк. Как видно из рисунка 7, изолят *C. burnetii* из клещей, доставленных из Туркестанской области, образовали одну клональную группу по гену 16S рРНК со штаммом CB149 *C. burnetii* (Сенегал, 2013 г.), относящийся к шестому генотипу (MST 6).

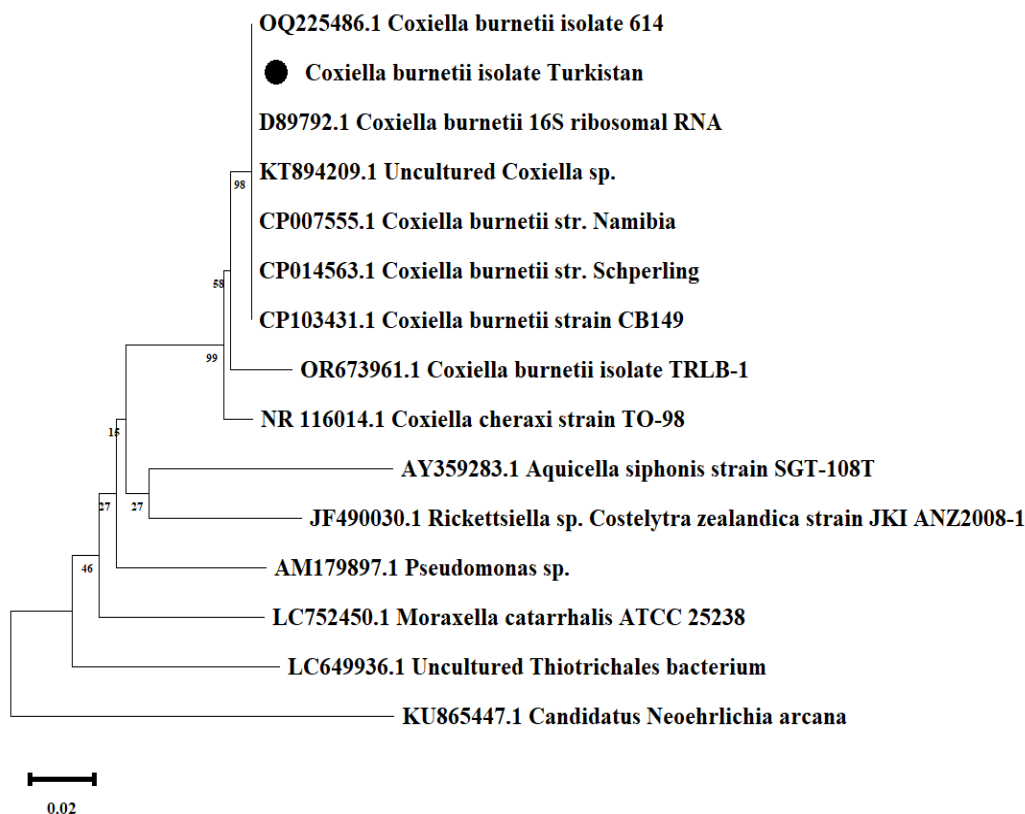


Рисунок 7 – Филогенетическое древо, основанное на нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК изолята *C. burnetii*

При проведении сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК определена идентичность казахстанского изолята *C. burnetii*, выделенного из клещей, доставленных из Туркестанской области со штаммами (CP014563 *Coxiella burnetii* str. Schperling из Кыргызстана, OQ225486.1 *Coxiella burnetii* isolate 614 из России, CP007555 *Coxiella burnetii* str. Namibia и CP103431 *Coxiella burnetii* strain CB149 из Сенегала) из базы данных Генбанк составляет 99-99,93 %.

Полученные результаты молекулярно-генетических анализов на основе нуклеотидных последовательностей генов *com1*, *icd*, *cbbE'* могут быть использованы для специфического выявления *C. burnetii* в патологических образцах.

Литературные данные показывают, что гены *icd* и *cbbE'* являются специфическими генами *C. burnetii*, тогда как ген *com1*, кодирующий белок внешней мембраны массой 27 кДа (OMP), был высококонсервативным среди штаммов *Coxiella* из различных клинических и географических источников [18] и является генетической мишенью для их обнаружения в клинических образцах [17].

Изоцитратдегидрогеназа (IDH), кодируемая геном *icd*, является ключевым ферментом цикла трикарбоновых кислот. Она катализирует превращение d-изоцитрата в α -кетоглутарат, который необходим для производства глутамата, предшественника аргинина, пролина и глутаминовой кислоты [14].

Ген *cbbE'*, кодирующий поверхностный белок, специфичный для плазмиды QpRS, экспонирован на поверхности бактерии и данный ген уникален для штамма *C. burnetii*, который вызывает хроническое заболевание у людей [19, 20].

В наших исследованиях получены положительные результаты по выявлению *C. burnetii* на основе специфических генов *com-1*, *icd*, *cbbE'*. Также исследуемый изолят *C. burnetii*, выделенный из клещей, доставленный из Туркестанской области при генотипировании по гену 16S рПНК, составляет одну группу со штаммом CB149 *C. burnetii*, относящийся к шестому генотипу (MST 6).

Закключение. Таким образом, генотипирование дает ценную информацию о типе циркулирующих штаммов *C. burnetii*, также является важным инструментом контроля вспышек *C. burnetii*. Полученные результаты в ходе исследования, расширили знания о распространении возбудителя Ку-лихорадки, передающиеся клещами в южном регионе Казахстана. Однако, необходимы дальнейшие исследования клещей в различных регионах для оценки текущей ситуации в стране. Выявление *C. burnetii* среди клещей требует всестороннего изучения природных очагов возбудителя Ку-лихорадки, так как клещи участвуют в циркуляции ряда патогенов человека.

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования «Метагеномика микробиома иксодовых клещей Казахстана», ИРН AP19677632 и государственному заданию «Услуги по обеспечению биологической безопасности в сфере науки».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Abdel-Moein, K.A. The burden of *Coxiella burnetii* among aborted dairy animals in Egypt and its public health implications [Текст] / K.A. Abdel-Moein, D.A. Hamza // *Acta Tropica*. – 2017. – Vol.166. – P. 92-95.
- 2 Angelakis, E.Q fever [Текст] / Angelakis, D. Raoult // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – Vol.140. – P. 297-309.
- 3 Arricau-Bouvery, N Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? [Текст] / N. Arricau-Bouvery, A. Rodolakis // *Vet Res*. – 2005. – 36(3). – P. 327-49.
- 4 Davis, G.E. A filter-passing infectious agent isolated from Ticks [Text] / Davis G.E., Cox H.R., Parker R.R., Dyer R.E. // *Public Health Reports*. – 1938. – Vol. 53. – P. 2259-2282
- 5 Smith, D. J. W. Studies in the epidemiology of Q fever. 1. The isolation of six strains of *Rickettsia burneti* from the tick, *Haemaphysalis humerosa* [Текст] / Smith, D. J. W. and Derrick, E. H. // *Exper. BioI. and M. Sc*. – 1940. 18:1.
- 6 Colwell, D.D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives [Текст] / D.D. Colwell, F. Dantas-Torres, D. Otranto // *Veterinary Parasitology*. – 2011. – Vol.182. – P. 14-21
- 7 Roland, E. Y. Prevalence of *Coxiella*-infections in ticks - review and meta-analysis [Текст] / E. Y. Roland, K. Mertens-Scholz, H. Neubauer, F. Souaïbou // *Ticks and Tick-borne Diseases*. – 2022. Vol.13. 101926.
- 8 Bessas, A. Molecular evidence of vector-borne pathogens in dog and cat and their ectoparasites in Algiers, Algeria [Текст] / A. Bessas [and etc.] // *Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis*. – 2016.
- 9 Çekani, M. Report of a serological study of *Coxiella burnetii* in domestic animals in Albania [Текст] / M. Çekani, A. Papa, M. Kota, E. Velo, K. Berxholi // *The Veterinary Journal*. – 2008. - Vol.175. – P. 276-278.
- 10 Fenollar, F. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection [Текст] / F. Fenollar, P.E. Fournier, D. Raoult // *Clin Microbiol* – 2004. – 42. – P. 4919-4924. doi.org/10.1128/JCM.42.11.4919-4924.2004.
- 11 Schneeberger, P.M. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever [Текст] / P.M. Schneeberger, M.H. Hermans, E.J. Hannen, J.J. Schellekens, A.C. Leenders, P.C. Wever // *Clin Vaccine Immunol*. – 2010. – 17:286. – 290. doi.org/10.1128/CVI.00454-09.

12 Pan, L. Rapid, simple and sensitive detection of Q fever by loop-mediated isothermal amplification of the htpAB gene [Текст] / L. Pan, L. Zhang, D. Fan, X. Zhang, H. Liu, Q. Lu, Q. Xu // PLoS Negl Trop Dis. – 2013. – 7:e2231. doi.org/10.1371/journal.pntd.0002231.

13 Nguyen, S.V. Rapid method for detection of Coxiella burnetii antibodies using highdensity particle agglutination [Текст] / Nguyen, S.V., Otsuka, H., Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Noma, A. and Hirai, K. // Clin. Microbiol. – 1996. – 34. – P. 2947-2951.

14 Zhang, G.Q. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of Coxiella burnetii in human serum samples [Текст] / G.Q. Zhang, S.V. Nguyen, H. To, M. Ogawa, A. Hotta, T. Yamaguchi, H.J. Kim, H. Fukushima, Hirai K. // Clin. Microbiol. – 1998. – 36. – P. 77-80.

15 Ho, T. Isolation of Coxiella burnetii from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan [Текст] / T. Ho, K. K. Htwe, N. Yamasaki, G.Q. Zhang, M. Ogawa, T. Yamaguchi, H. Fukushima, K. Hirai // Microbiol. Immunol. – 1995. – 39. – P. 663-671

16 Glazunova, O. Coxiella burnetii genotyping [Текст] / O. Glazunova, V. Roux, O. Freylikman, Z. Sekeyova, G. Fournous, J. Tyczka, N. Tokarevich, E. Kovacava, T. J. Marrie, D. Raoult // Emerg Infect Dis. – 2005. – 11(8):1211-7. doi: 10.3201/eid1108.041354.

17 Emery, M.P. Coxiella burnetii Serology assays in goat abortion storm [Text] / M.P. Emery [and etc.] // Vet. Diagn. Investig. – 2014.

18 Lee, J.H. Identification of the Coxiella Sp. Detected from Haemaphysalis longicornis Ticks in Korea [Текст] / J.H. Lee, H.S. Park, W.J. Jang // Microbiol. Immunol. – 2004. – 48(2). – P. 125-130.

19 Nguyen, S.V. Molecular cloning of an immunogenic and acid-induced isocitrate dehydrogenase gene from Coxiella burnetii [Текст] / S.V. Nguyen, H. To, T. Yamaguchi, H. Fukushima, K. Hirai // FEMS Microbiology Letters. – 1999. – Vol. 175. – P. 101-106.

20 Minnick, M.F. Characterization and expression of the cbbE' gene of Coxiella burnetii [Текст] / M.F. Minnick, R.A. Heinzen, M.E. Frazier, L.P. Mallavia // Gen. Microbiol. – 1990. – 136. – P. 1099-1107.

REFERENCES

1 Abdel-Moein, K.A. The burden of Coxiella burnetii among aborted dairy animals in Egypt and its public health implications [Text] / K.A. Abdel-Moein, D.A. Hamza // Acta Tropica. – 2017. – Vol.166. – P. 92-95.

2 Angelakis, E.Q fever [Text] / Angelakis, D. Raoult // Veterinary Microbiology. – 2010. – Vol.140. – P. 297-309.

3 Arricau-Bouvery, N Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? [Text] / N. Arricau-Bouvery, A. Rodolakis // Vet Res. – 2005. – 36(3). – P. 327-49.

4 Davis, G.E. A filter-passing infectious agent isolated from Ticks [Text] / Davis G.E., Cox H.R., Parker R.R., Dyer R.E. // Public Health Reports. – 1938. – Vol. 53. – P. 2259-2282

5 Smith, D. J. W. Studies in the epidemiology of Q fever. 1. The isolation of six strains of Rickettsia burneti from the tick, Haemaphysalis humerosa [Text] / Smith, D. J. W. and Derrick, E. H. // Exper. Biol. and M. Sc. – 1940. 18:1.

6 Colwell, D.D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives [Text] / D.D. Colwell, F. Dantas-Torres, D. Otranto // Veterinary Parasitology. – 2011. – Vol.182. – P. 14-21

7 Roland, E. Y. Prevalence of Coxiella-infections in ticks - review and meta-analysis[Text] / E. Y. Roland, K. Mertens-Scholz, H. Neubauer, F. Souaïbou // Ticks and Tick-borne Diseases. – 2022. Vol.13. 101926.

8 Bessas, A. Molecular evidence of vector-borne pathogens in dog and cat and their ectoparasites in Algiers, Algeria [Text] / A. Bessas [and etc.] // Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis. – 2016.

9 Çekani, M. Report of a serological study of Coxiella burnetii in domestic animals in Albania [Text] / M. Çekani, A. Papa, M. Kota, E. Velo, K. Berxholi // The Veterinary Journal. – 2008. - Vol.175. – P. 276-278.

10 Fenollar, F. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection [Text] / F. Fenollar, P.E. Fournier, D. Raoult // Clin Microbiol – 2004. – 42. – P. 4919-4924. doi.org/10.1128/JCM.42.11.4919-4924.2004.

11 Schneeberger, P.M. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever [Text] / P.M. Schneeberger, M.H. Hermans, E.J. Hannen, J.J. Schellekens, A.C. Leenders, P.C. Wever // Clin Vaccine Immunol. – 2010. – 17:286. – 290. doi.org/10.1128/CVI.00454-09.

12 Pan, L. Rapid, simple and sensitive detection of Q fever by loop-mediated isothermal amplification of the htpAB gene [Text] / L. Pan, L. Zhang, D. Fan, X. Zhang, H. Liu, Q. Lu, Q. Xu // PLoS Negl Trop Dis. – 2013. – 7:e2231. doi.org/10.1371/journal.pntd.0002231.

13 Nguyen, S.V. Rapid method for detection of *Coxiella burnetii* antibodies using highdensity particle agglutination [Text] / Nguyen, S.V., Otsuka, H., Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Noma, A. and Hirai, K. // Clin. Microbiol. – 1996. – 34. – P. 2947-2951.

14 Zhang, G.Q. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples [Text] / G.Q. Zhang, S.V. Nguyen, H. To, M. Ogawa, A. Hotta, T. Yamaguchi, H.J. Kim, H. Fukushima, Hirai K. // Clin. Microbiol. – 1998. – 36. – P. 77-80.

15 Ho, T. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan [Text] / T. Ho, K. K. Htwe, N. Yamasaki, G.Q. Zhang, M. Ogawa, T. Yamaguchi, H. Fukushima, K. Hirai // Microbiol. Immunol. – 1995. – 39. – P. 663-671

16 Glazunova, O. *Coxiella burnetii* genotyping [Text] / O. Glazunova, V. Roux, O. Freylikman, Z. Sekeyova, G. Fournous, J. Tyczka, N. Tokarevich, E. Kovacava, T. J. Marrie, D. Raoult // Emerg Infect Dis. – 2005. – 11(8):1211-7. doi: 10.3201/eid1108.041354.

17 Emery, M.P. *Coxiella burnetii* Serology assays in goat abortion storm [Text] / M.P. Emery [and etc.] // Vet. Diagn. Investig. – 2014.

18 Lee, J.H. Identification of the *Coxiella* Sp. Detected from *Haemaphysalis longicornis* Ticks in Korea [Text] / J.H. Lee, H.S. Park, W.J. Jang // Microbiol. Immunol. – 2004. – 48(2). – P. 125-130.

19 Nguyen, S.V. Molecular cloning of an immunogenic and acid-induced isocitrate dehydrogenase gene from *Coxiella burnetii* [Text] / S.V. Nguyen, H. To, T. Yamaguchi, H. Fukushima, K. Hirai // FEMS Microbiology Letters. – 1999. – Vol. 175. – P. 101-106.

20 Minnick, M.F. Characterization and expression of the cbbE' gene of *Coxiella burnetii* [Text] / M.F. Minnick, R.A. Heinzen, M.E. Frazier, L.P. Mallavia // Gen. Microbiol. – 1990. – 136. – P. 1099-1107.

ТҮЙІН

Қу-безгегі – *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) облигатты жасушаішілік бактерия тудыратын зооноздық ауру. Жыл сайын дүние жүзінде адамдарда, үй жануарларында және жабайы жануарларда *C. burnetii* тудыратын инфекциялар жайлы мәліметтер тіркеледі. *C. burnetii* географиялық тұрғыда кең таралуын, су қоймаларының әртүрлілігін, таралу жолдарын және клиникалық ерекшеліктерін ескере отырып, оның эпидемиологиясын зерттеу қиынға соғады. Осыған орай, *C. burnetii* штаммдарының молекулалық сипаттамасы және *C. burnetii* генотиптерінің салыстырмалы талдауы адамдар мен жануарлардағы инфекция көздерін анықтауға, айналымдағы штаммдарды жіктеуге және инфекцияны бақылау мен алдын алуға ықпал етеді. Бұл жұмыс молекулярлық-генетикалық талдау арқылы Түркістан облысындағы үй жануарларынан жиналған иксодид кенелер арасында *C. burnetii* таралуын зерттеуге бағытталған. Біздің зерттеулерімізде Түркістан облысынан әкелінген кенелер қорынан бөлінген *C. burnetii* изолятының *com-1*, *icd*, *cbbE'* гендерінің молекулярлық-генетикалық талдауының және 16S рРНҚ-ның генотипінің нәтижелерін алдық. Филогенетикалық талдау зерттелген *C. burnetii* изолятының алтыншы генотипке (MST 6) жататын *C. burnetii* CB149 штаммымен бір топ құрайтынын көрсетті. Қорытындылай келе, бұл зерттеу *C. burnetii* потенциалды векторы ретіндегі кенелердің рөлін көрсетеді. Нәтижелер Қу-безгегінің эпидемиологиясының тиімді факторлары ретінде үй жануарларының маңыздылығын көрсетеді.