

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-142-147

УДК 579.881.13

Ю.А. Панферова¹, Н.К. Токаревич¹, О.В. Блинова¹, А.А. Нафеев², Э.И. Сибеева²

Типирование некультивируемых изолятов *Coxiella burnetii* и *Coxiella*-подобных микроорганизмов, ассоциированных с клещами, с применением анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ²ФГБУ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», Ульяновск, Российская Федерация

Возбудитель Ку-лихорадки – внутриклеточный патоген *Coxiella burnetii* – распространен практически по всему миру; в его циркуляции участвует множество видов кровососущих клещей, опасных для животных и человека. С помощью молекулярно-генетических методов обнаружены близкородственные виды микроорганизмов рода *Coxiella* sp., ряд которых является эндосимбионтами клещей, а некоторые могут выживать в организме человека, вызывая инфекционный процесс. Существование видов, гены которых по нуклеотидной последовательности сходны с генами *C. burnetii*, затрудняет генодиагностику патогена у членистоногих переносчиков. **Цель** данной работы – изучение возможности применения ПЦР для молекулярной диагностики и секвенирования протяженного фрагмента гена 16S рРНК для дифференциации *C. burnetii* от *Coxiella*-подобных микроорганизмов. **Материалы и методы.** Индивидуальные пробы кровососущих клещей исследовали для обнаружения бактерий рода *Coxiella* sp. с помощью стандартной ПЦР. Для положительных образцов получали протяженные фрагменты гена 16S рРНК и исследовали его с помощью секвенирования и множественного выравнивания с гомологичными последовательностями. **Результаты и обсуждение.** Из 96 исследованных клещей, собранных на территории Ульяновской области, один был положителен на присутствие ДНК *C. burnetii* и один – на присутствие ДНК *Coxiella* sp. Для изолята *C. burnetii* наибольшее сходство выявлено с западноевропейскими штаммами, для *Coxiella*-подобного микроорганизма – с близкородственными бактериями из клещей того же вида. Отмечены уникальные полиморфизмы для обнаруженных микроорганизмов. Установлено, что родоспецифичные праймеры к фрагменту гена 16S рРНК способны амплифицировать не только бактерии рода *Coxiella* sp., но и генетически дистанцированные виды. Анализ последовательности протяженного фрагмента гена 16S рРНК позволяет дифференцировать *C. burnetii* от *Coxiella*-подобных микроорганизмов; некоторые полиморфизмы гена, по-видимому, возникли в процессе микроэволюции в различных географических регионах. В европейской части Российской Федерации *Coxiella*-подобные бактерии обнаружены впервые.

Ключевые слова: *Coxiella burnetii*, *Coxiella*-подобные микроорганизмы, кровососущие клещи, ПЦР, ген 16S рРНК, полиморфизмы.

Корреспондирующий автор: Токаревич Николай Константинович, e-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Для цитирования: Панферова Ю.А., Токаревич Н.К., Блинова О.В., Нафеев А.А., Сибеева Э.И. 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

Поступила 06.08.2022. Принята к публ. 29.12.2022.

Yu.A. Panferova¹, N.K. Tokarevich¹, O.V. Blinova¹, A.A. Nafeev², E.I. Sibeeva²

Typing of Uncultured Isolates of *Coxiella burnetii* and *Coxiella*-Like Microorganisms Associated with Ticks Using 16S rRNA Gene Nucleotide Sequence Analysis

¹Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation;

²Center of Hygiene and Epidemiology in the Ulyanovsk Region, Ulyanovsk, Russian Federation

Abstract. The causative agent of Q fever, the intracellular pathogen *Coxiella burnetii*, is found almost worldwide; many types of blood-sucking ticks that are dangerous to animals and humans are involved in the circulation of the pathogen. Using molecular-genetic methods, closely related species of microorganisms of the genus *Coxiella* sp. have been discovered, some of which are endo-symbionts of ticks, and some can survive in the human body, causing an infectious process. The existence of species whose genes are similar in nucleotide sequence to those of *C. burnetii* makes it difficult to diagnose the pathogen in arthropod vectors. The aim of this work was to consider the use of PCR and sequencing of an extended 16S rRNA gene fragment for molecular diagnostics and differentiation of *C. burnetii* from *Coxiella*-like microorganisms. **Materials and methods.** Individual samples of blood-sucking ticks were examined to detect bacteria of the genus *Coxiella* sp. applying standard PCR. For positive samples, an extended fragment of the 16S rRNA gene was obtained and examined by sequencing and multiple alignment with homologous sequences. **Results and discussion.** Of the 96 examined ticks collected in the Ulyanovsk Region, one was positive for the presence of *C. burnetii* DNA and one – for the presence of *Coxiella* sp. The greatest similarity for the *C. burnetii* isolate was noted in comparison with Western European strains, for the *Coxiella*-like microorganism - with closely related bacteria from ticks of the same species. Unique polymorphisms for the detected microorganisms were identified. It has been established that genus-specific primers to the 16S rRNA gene fragment are able to amplify not only bacteria of the genus *Coxiella* sp., but also genetically distant species. Analysis of the sequence of the extended 16S rRNA gene fragment makes it possible to differentiate *C. burnetii* from *Coxiella*-like microorganisms; some gene polymorphisms appear to have arisen through microevolution

in different geographic regions. In the European part of the Russian Federation, *Coxiella*-like bacteria have been uncovered for the first time.

Key words: *Coxiella burnetii*, *Coxiella*-like microorganisms, blood-sucking ticks, PCR, *16S* rRNA gene, polymorphisms.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nikolay K. Tokarevich, e-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Citation: Panferova Yu.A., Tokarevich N.K., Blinova O.V., Nafeev A.A., Sibaeva E.I. Typing of Uncultured Isolates of *Coxiella burnetii* and *Coxiella*-Like Microorganisms Associated with Ticks Using *16S* rRNA Gene Nucleotide Sequence Analysis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 1:142–147. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-142-147

Received 06.08.2022. Accepted 29.12.2022.

Panferova Yu.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5211-5086>
Tokarevich N.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6433-3486>

Nafeev A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3113-6018>

Coxiella burnetii – возбудитель Ку-лихорадки у человека и коксиеллеза у животных. Это внутриклеточный патоген, относящийся к генетически обособленному роду, входящему в класс гамма-протеобактерий, порядок *Legionellales*, семейство *Coxiellaceae* и род *Coxiella*. Многие виды теплокровных и членистоногих хозяев участвуют в циркуляции бактерии в очагах инфекции по всему миру. Среди них иксодовые клещи, представленные в умеренной зоне Северного полушария видами родов *Ixodes* sp., *Dermacentor* sp., *Rhipicephalus* sp., *Hyalomma* sp. и некоторыми другими [1]. В начале 2000-х гг. применение методов молекулярной биологии, основанных на анализе последовательности гена *16S* рРНК и ряда других генов, позволило впервые обнаружить микроорганизмы, генетически дистанцированные от вида *C. burnetii*, но принадлежащие к тому же роду [2, 3]. Эти исследования легли в основу совершенно нового подхода к систематике *C. burnetii*: теперь бактерия рассматривалась не как представитель монофилетического вида, а как один из близкородственных организмов рода *Coxiella* sp.; степень патогенности некоторых «новых» видов-кандидатов внутри этого рода для теплокровных животных до сих пор плохо изучена. В последнее десятилетие во многих регионах, в том числе в Северной Евразии, *Coxiella*-подобные организмы обнаруживаются у клещей разных таксономических групп, и если часть из них являются истинными эндосимбионтами клещей, неспособными заражать животных и человека, то ряд других могут быть патогенными [4, 5].

Идентификация «новых» видов-кандидатов рода *Coxiella* sp. значительно усложнила молекулярную диагностику *C. burnetii* в членистоногих переносчиках, поскольку многие из ранее предложенных методов ПЦР и используемых генетических маркеров не были строго видоспецифичными при амплификации ДНК этих близкородственных видов [6]. Разработан ряд протоколов для подтверждения видовой принадлежности обнаруженного микроорганизма методом секвенирования генов «домашнего хозяйства» [7], однако позже установлено, что этим способом также можно обнаруживать генетически отдаленные микроорганизмы, ассоциированные с клещами [8]. Тем не менее анализ нуклеотидной последовательности полного или протяженного (включая несколько переменных регионов) гена *16S* рРНК позволяет

дифференцировать не только *C. burnetii* от *Coxiella*-подобных бактерий, но и штаммы коксиелл различного географического происхождения [9, 10]. Таким образом, секвенирование фрагментов гена *16S* рРНК, вероятно, может служить достаточно надежным маркером для дифференциации некультивируемых изолятов рода *Coxiella* sp., принадлежащих к разным видам.

Цель исследования – молекулярный скрининг и анализ последовательности протяженного фрагмента гена *16S* рРНК для дифференциации *C. burnetii* и *Coxiella*-подобных бактерий, ассоциированных с клещами, собранными на территории европейской части Российской Федерации, и их сравнение с нуклеотидными последовательностями *Coxiella* sp. различного географического происхождения, доступными в международной базе данных NCBI.

Материалы и методы

Кровососущих клещей собирали на флаг стандартным методом в лесных и лесолуговых местобитаниях Ульяновской области и помещали в индивидуальные пробирки. Вид клеща определяли по его морфологическим признакам [11].

После определения вида клещей дважды промыли в 75 % этаноле, затем стерильной водой, высушивали при комнатной температуре, индивидуально гомогенизировали в стерильном фосфатно-солевом буфере (300 мкл), выделяли ДНК с помощью набора Diatom DNA prep 100 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Выявление микроорганизмов рода *Coxiella* sp. с помощью стандартной ПЦР проводили с праймерами Cox1 F: GGACTGAGACACGGCCCCAGAC, Cox1 R: CTGCTGGCACAGAGTTAGCCAG.

Для проведения реакции брали 5 мкл элюированной ДНК-матрицы, по 0,5 мкМ каждого праймера, деионизированную воду и 5-кратный мастермикс Screen PCR mix HotStart (ЗАО «Евроген», Россия) в конечном объеме 25 мкл. В качестве положительного и отрицательного контроля использовали ДНК штамма Henzerling *C. burnetii* и деионизированную воду соответственно. Режим термоциклирования был следующим: первичная денатурация – 5 мин при температуре 94 °С; 40 циклов денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при 60 °С, элонгация – 60 с

при 72 °С. Амплификацию проводили в термоциклере Veriti (Thermo Scientific, США).

Продукты ПЦР электрофоретически разделяли в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в 1xTAE-буфере в течение 30 мин при 120 В. Визуализацию проводили с помощью УФ-трансиллюминатора, в сравнении с маркером молекулярной массы 100–1000 п.н. (ЗАО «Евроген», Россия).

Для всех положительных образцов протяженный (1450 п.н.) фрагмент гена *16S* рРНК амплифицировали по методу T. Masuzawa *et al.* [12] со следующими модификациями: 5 мкл элюированной ДНК-матрицы, 0,5 мкМ каждого праймера, деионизированную воду и 5-кратный мастермик Screen PCR mix HotStart (ЗАО «Евроген», Россия) вносили в реакционную смесь в конечном объеме 25 мкл. Режим термоциклирования был следующим: первичная денатурация – 5 мин при 94 °С; 40 циклов денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 40 с при 52 °С, элонгация – 120 с при 72 °С, финальная элонгация – 5 мин при 72 °С.

Продукты ПЦР электрофоретически разделяли в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в 1xTAE-буфере в течение 50 мин при 120 В. Визуализацию проводили с помощью УФ-трансиллюминатора. Ампликоны очищали с помощью набора PCR Clean Up (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование с прямого и обратного праймеров проводили с помощью BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific, США) согласно рекомендациям производителя с использованием генетического анализатора MegaBase1000 (Amersham, США).

Полученные последовательности выравнивали с помощью онлайн-сервиса BLAST по алгоритму megablast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, датасет от 10.03.2021), а также с помощью программы Ugene 1.31 с использованием алгоритма MUSCLE (с представителями рода *Coxiella* sp., отобранными из базы данных NCBI GenBank) [13].

Полную последовательность гена *16S* рРНК штамма Henzerling *C. burnetii* (референс-номер NCBI: CP014559.1) использовали для сравнения и расчета положений сайтов полиморфизмов.

Полученные последовательности депонированы в базу данных нуклеотидов NCBI (MZ047981, MZ048012).

Результаты и обсуждение

Исследовано 96 иксодовых клещей, относящихся к видам *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*. По данным анализа *in silico*, длина продукта ПЦР варьирует в пределах 203–207 п.н. для микроорганизмов рода *Coxiella* sp. с использованием праймеров Cox1 F – Cox1 R (blast.ncbi.nlm.nih.gov, алгоритм blastn). С помощью ПЦР с этими родоспе-

цифичными праймерами получено пять положительных образцов, для которых проведена ПЦР с целью выявления протяженной нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК. Полученные ампликоны секвенировали в двух направлениях и проводили анализ гомологии с ранее опубликованными последовательностями штаммов и изолятов *C. burnetii* и *Coxiella*-подобных микроорганизмов.

При анализе нуклеотидных последовательностей установлено, что один из исследованных образцов содержал ДНК *C. burnetii*, а другой – ДНК *Coxiella*-подобного микроорганизма. В трех образцах обнаружена ДНК генетически отдаленных микроорганизмов: *Pseudomonas* sp. в двух пробах, *Stenotrophomonas* sp. в одном образце. И *Coxiella burnetii*, и *Coxiella* sp. обнаружены у клещей вида *D. marginatus*.

Для положительного на наличие *C. burnetii* образца гомология по гену *16S* рРНК при сравнении с другими штаммами составила 99,16–99,83%, а максимальная степень сходства отмечена с западноевропейскими штаммами (Henzerling и Heizberg, происходящими из Италии и Греции соответственно). Выявлены специфические SNP (однонуклеотидные полиморфизмы) по сравнению с азиатским (Schperling) и североамериканским (Nine Mile I 493) штаммами, но общие для выявленного и западноевропейского (референтный штамм – Henzerling RSA 331) штаммов: 638C>T. Обнаружены уникальные полиморфизмы SNP, характерные для изолята из Ульяновской области (по сравнению со штаммами Henzerling, Nine Mile I, Schperling): 974A>G, 996A>G. В связи с этим можно предположить, что некоторые полиморфизмы в последовательности гена *16S* рРНК могут возникать спонтанно в ходе микроэволюции в разных географических регионах (рис. 1).

Степень сходства последовательности у *Coxiella*-подобного микроорганизма с *C. burnetii* по протяженной последовательности гена *16S* рРНК составила менее 96%. При проведении анализа последовательностей генов других *Coxiella*-подобных бактерий, ассоциированных с клещами, этот образец кластеризовался с бактериями, обнаруженными в клещах *D. marginatus* в Западной Европе (гомология последовательностей – 99,33%).

При анализе нуклеотидных последовательностей методом множественного выравнивания обнаружены полиморфизмы, характерные либо для видов-кандидатов *Coxiella*-подобных микроорганизмов, ассоциированных с конкретным видом клещей, либо уникальные SNP для изолята, обнаруженного в Ульяновской области. В целом группа *Coxiella*-подобных микроорганизмов, выделенных из *D. marginatus*, кластеризовалась с изолятами из других видов клещей, отнесенных к роду *Dermacentor*: *D. silvarium*, *D. everestianus* (гомология нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК – 98,23–98,99%). Между тем существуют уникаль-

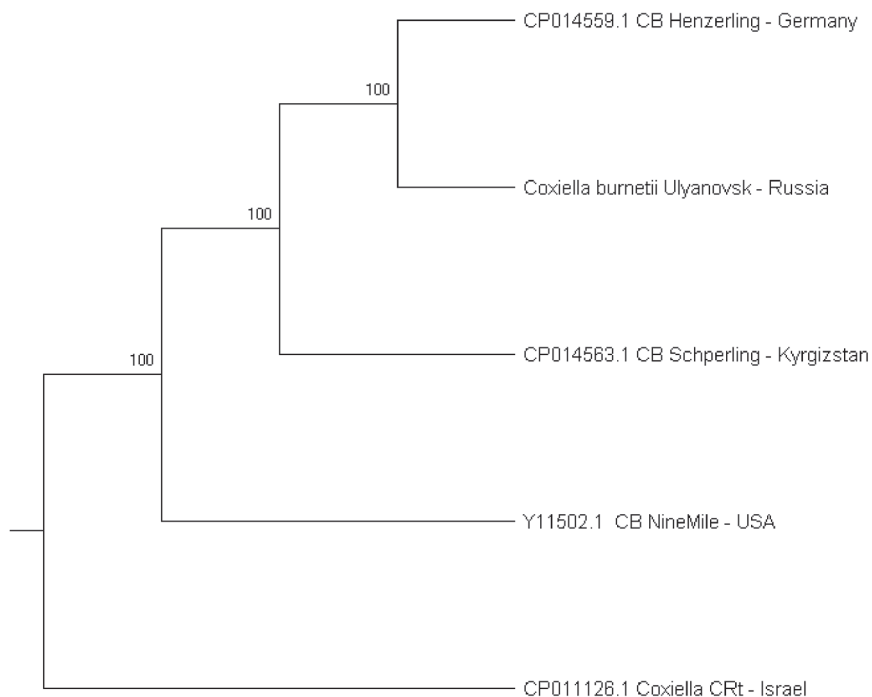


Рис. 1. Дендрограмма генетического родства штаммов и изолятов *C. burnetii*:

CB – *Coxiella burnetii*; *CRt* – *Coxiella*-подобный микроорганизм из клещей *Rhipicephalus turanicus*

Fig. 1. Dendrogram of genetic affinity of the strains and isolates of *C. burnetii*:

CB – *Coxiella burnetii*; *CRt* – *Coxiella*-like microorganism from *Rhipicephalus turanicus* ticks

ные SNP, характерные для выявленного изолята, отличающие его от других, ассоциированных с *D. marginatus*: 627G>A, 896G>C, 1033G>T, 1128G>T, 1178G>C. Общим признаком последовательности гена изолятов, ассоциированных с *D. marginatus*, были SNP 48A>G, 236G>A, 925G>A. Следующими по степени сходства были изоляты вида-кандидата *C. mudrowiae* из клещей *Rhipicephalus* sp. (штамм CRt, 95,71 %). Степень гомологии последовательности гена *16S* рРНК выявленных бактерий со штаммами *C. burnetii* составила 94,78–95,62 % (рис. 2).

В настоящее время пересматривается номенклатура в пределах рода *Coxiella* sp., а также в целом в пределах семейства *Coxiellaceae*. Описаны новые виды и роды [14–17]; собраны данные о *Coxiella*-подобных микроорганизмах, ассоциированных с клещами, в ряде случаев это истинные эндосимбионты, которые не могут выживать в клетках теплокровных организмов, что, напротив, характерно для патогенного вида *C. burnetii* [9, 15].

Анализ нуклеотидной последовательности фрагментов гена *16S* рРНК и генов «домашнего хозяйства» в настоящее время является основным методом исследования таксономии некультивируемых и трудно культивируемых *Coxiella*-подобных микроорганизмов, ассоциированных с клещами, и их дифференциации от истинного патогена *C. burnetii*. В то же время существует несколько клад, объединяющих виды-кандидаты с разной степенью сходства [18].

Для стандартной ПЦР-амплификации ДНК микроорганизмов рода *Coxiella* sp. не разработано высокоспецифичного метода. Как и в нашем случае с использованием стандартной ПЦР с оригинальными праймерами, предложенные методы, основанные на гнездовой ПЦР, позволяют выявлять близкородствен-

ные бактерии в клещах [8]. Используемая нами методика с применением родоспецифичных праймеров *Coх1* – *Coх2* также требует подтверждения результатов ПЦР секвенированием, так как специфичность праймеров не составляет 100 %. В то же время секвенирование протяженного фрагмента гена *16S* рРНК позволяет с высокой степенью дискриминации определять видовую специфичность некультивируемого изолята, выявленного при молекулярном скрининге. Помимо идентификации изолята как вида или вида-кандидата, метод позволяет идентифицировать некоторые уникальные полиморфизмы, которые, по видимому, связаны не только с видом бактерий, но и с географическим происхождением изолята.

В настоящее время без дополнительных исследований трудно установить, являются ли бактерии *Coxiella* sp., ассоциированные с клещами *Dermacentor* sp., истинными эндосимбионтами или патогенами теплокровных животных. Однако можно утверждать, что они существуют как виды-кандидаты, генетически дистанцированные от *C. burnetii*. Так, на основании молекулярного скрининга и анализа нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК изучены некультивируемые изоляты, родственные *C. burnetii* и *Coxiella* sp. *Coxiella*-подобные микроорганизмы впервые обнаружены на территории европейской части России; ранее подобные микроорганизмы находили только на территории Дальнего Востока [2, 19]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при определении таксономического положения на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК следует учитывать процент гомологии гена и соотношение полиморфизмов в группе близкородственных бактерий.

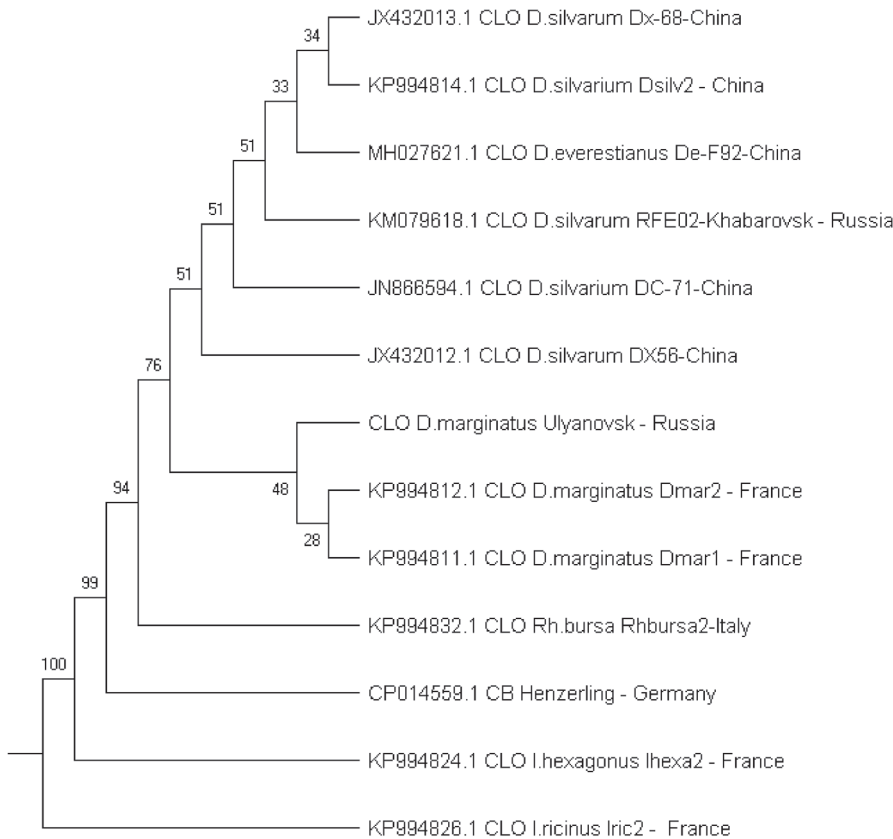


Рис. 2. Дендрограмма генетического родства штаммов и изолятов *Coxiella*-подобных микроорганизмов:

CB – *Coxiella burnetii*; CLO – *Coxiella*-подобный микроорганизм

Fig. 2. Dendrogram of genetic affinity of the strains and isolates of *Coxiella*-like microorganisms:

CB – *Coxiella burnetii*; CLO – *Coxiella*-like microorganism

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Spitalska E., Kocianova E. Tick-borne microorganisms in southwestern Slovakia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 990:196–200. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07362.x.

2. Mediannikov O., Ivanov L., Nishikawa M., Saito R., Sidelnikov Y.N., Zdanovskaya N.I., Tarasevich I.V., Suzuki H. Molecular evidence of *Coxiella*-like microorganism harbored by *Haemaphysalis concinna* ticks in the Russian Far East. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 990:226–8. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07367.x.

3. Lee J.H., Park H.S., Jang W.J., Koh S.E., Park T.K., Kang S.S., Kim B.J., Kook Y.H., Park K.H., Lee S.H. Identification of the *Coxiella* sp. detected from *Haemaphysalis longicornis* ticks in Korea. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(2):125–30. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03498.x.

4. Zhong J. *Coxiella*-like endosymbionts. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 984:365–79. DOI: 10.1007/978-94-007-4315-1_18.

5. Guimard T., Amrane S., Prudent E., El Karkouri K., Raoult D., Angelakis E. Case report: Scalp eschar and neck lymphadenopathy associated with bacteremia due to *Coxiella*-like bacteria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2017; 97(5):1319–22. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0251.

6. Duron O. The *IS1111* insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015; 362(17):fnv132. DOI: 10.1093/femsle/fnv132.

7. Duron O., Jourdain E., McCoy K.D. Diversity and global distribution of the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(5):557–63. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.04.003.

8. Špitalská E., Sparagano O., Stanko M., Schwarzová K., Špitalský Z., Škultéty L., Havlíková S.F. Diversity of *Coxiella*-like and *Francisella*-like endosymbionts, and *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* as pathogens in the tick populations of Slovakia, Central Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(5):1207–11. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.05.002.

9. Machado-Ferreira E., Vizzoni V.F., Balsemão-Pires E., Moerbeck L., Gazeta G.S., Piesman J., Voloch C.M., Soares C.A.

Coxiella symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitol. Res.* 2016; 115(12):4691–9. DOI: 10.1007/s00436-016-5230-z.

10. McLaughlin H.P., Cherney B., Hakovirta J.R., Priestley R.A., Conley A., Carter A., Hodge D., Pillai S.P., Weigel L.M., Kersh G.J., Sue D. Phylogenetic inference of *Coxiella burnetii* by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One.* 2017; 12(12):e0189910. DOI: 10.1371/journal.pone.0189910.

11. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства Ixodinae. Фауна СССР. Паукообразные. Т. 4. Вып. 4. Л.: Наука; 1977. 396 с.

12. Masuzawa T., Sawaki K., Nagaoka H., Akiyama M., Hirai K., Yanagihara Y. Identification of rickettsiae isolated in Japan as *Coxiella burnetii* by 16S rRNA sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47(3):883–4. DOI: 10.1099/00207713-47-3-883.

13. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012; 28(8):1166–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.

14. Leclerque A., Kleespies R.G. 16S rRNA-, *GroEL*- and *MucZ*-based assessment of the taxonomic position of ‘*Rickettsiella melolonthae*’ and its implications for the organization of the genus *Rickettsiella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008; 58(Pt. 4):749–55. DOI: 10.1099/ijs.0.65359-0.

15. Gottlieb Y., Lalzar I., Klasson L. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol. Evol.* 2015; 7(6):1779–96. DOI: 10.1093/gbe/evv108.

16. Mehari Y.T., Jason Hayes B., Redding K.S., Mariappan P.V.G., Gunderson J.H., Farone A.L., Farone M.B. Description of ‘*Candidatus Berkiella aquae*’ and ‘*Candidatus Berkiella cookevillensis*’, two intranuclear bacteria of freshwater amoebae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(2):536–41. DOI: 10.1099/ijsem.0.000750.

17. Bojko J., Dunn A.M., Stebbing P.D., van Aerle R., Bacela-Spychalska K., Bean T.P., Urrutia A., Stentiford G.D. ‘*Candidatus Aquirickettsiella gammari*’ (Gammaproteobacteria: Legionellales: Coxiellaceae): A bacterial pathogen of the freshwater crustacean *Gammarus fossarum* (Malacostraca: Amphipoda). *J. Invertebr. Pathol.* 2018; 156:41–53. DOI: 10.1016/j.jip.2018.07.010.

18. Papa A., Tsioka K., Kontana A., Papadopoulos C., Giadinis N. Bacterial pathogens and endosymbionts in ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8(1):31–5. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.09.011.

19. 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):724–8. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-724-728.

References

1. Spitalska E., Kocianova E. Tick-borne microorganisms in southwestern Slovakia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 990:196–200. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07362.x.
2. Mediannikov O., Ivanov L., Nishikawa M., Saito R., Sidelnikov Y.N., Zdanovskaya N.I., Tarasevich I.V., Suzuki H. Molecular evidence of *Coxiella*-like microorganism harbored by *Haemaphysalis concinna* ticks in the Russian Far East. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 990:226–8. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07367.x.
3. Lee J.H., Park H.S., Jang W.J., Koh S.E., Park T.K., Kang S.S., Kim B.J., Kook Y.H., Park K.H., Lee S.H. Identification of the *Coxiella* sp. detected from *Haemaphysalis longicornis* ticks in Korea. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(2):125–30. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03498.x.
4. Zhong J. *Coxiella*-like endosymbionts. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 984:365–79. DOI: 10.1007/978-94-007-4315-1_18.
5. Guimard T., Amrane S., Prudent E., El Karkouri K., Raoult D., Angelakis E. Case report: Scalp eschar and neck lymphadenopathy associated with bacteremia due to *Coxiella*-like bacteria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2017; 97(5):1319–22. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0251.
6. Duron O. The *IS1111* insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015; 362(17):fnv132. DOI: 10.1093/femsle/fnv132.
7. Duron O., Jourdain E., McCoy K.D. Diversity and global distribution of the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(5):557–63. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.04.003.
8. Špitalská E., Sparagano O., Stanko M., Schwarzová K., Špitalský Z., Skultéty L., Havlíková S.F. Diversity of *Coxiella*-like and *Francisella*-like endosymbionts, and *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* as pathogens in the tick populations of Slovakia, Central Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(5):1207–11. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.05.002.
9. Machado-Ferreira E., Vizzoni V.F., Balsemão-Pires E., Moerbeck L., Gazeta G.S., Priesman J., Voloch C.M., Soares C.A. *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitol. Res.* 2016; 115(12):4691–9. DOI: 10.1007/s00436-016-5230-z.
10. McLaughlin H.P., Cherney B., Hakovirta J.R., Priestley R.A., Conley A., Carter A., Hodge D., Pillai S.P., Weigel L.M., Kersh G.J., Sue D. Phylogenetic inference of *Coxiella burnetii* by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One.* 2017; 12(12):e0189910. DOI: 10.1371/journal.pone.0189910.
11. Filippova N.A. [Ixodid Ticks of the Subfamily Ixodinae. Fauna of the USSR. Arachnids]. Vol. 4. Issue 4. Leningrad: “Science”; 1977. 396 p.
12. Masuzawa T., Sawaki K., Nagaoka H., Akiyama M., Hirai K., Yanagihara Y. Identification of rickettsiae isolated in Japan as *Coxiella burnetii* by 16S rRNA sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47(3):883–4. DOI: 10.1099/00207713-47-3-883.
13. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012; 28(8):1166–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
14. Leclerque A., Kleespies R.G. 16S rRNA-, *GroEL*- and *MucZ*-based assessment of the taxonomic position of ‘*Rickettsiella melolonthae*’ and its implications for the organization of the genus *Rickettsiella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008; 58(Pt. 4):749–55. DOI: 10.1099/ijs.0.65359-0.
15. Gottlieb Y., Lalar I., Klasson L. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol. Evol.* 2015; 7(6):1779–96. DOI: 10.1093/gbe/evv108.
16. Mehari Y.T., Jason Hayes B., Redding K.S., Mariappan P.V.G., Gunderson J.H., Farone A.L., Farone M.B. Description of ‘*Candidatus Berkiella aquae*’ and ‘*Candidatus Berkiella cookevillensis*’, two intranuclear bacteria of freshwater amoebae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(2):536–41. DOI: 10.1099/ijsem.0.000750.
17. Bojko J., Dunn A.M., Stebbing P.D., van Aerle R., Bacela-Spychalska K., Bean T.P., Urrutia A., Stentiford G.D. ‘*Candidatus Aquirickettsiella gammari*’ (Gammaproteobacteria: Legionellales: Coxiellaceae): A bacterial pathogen of the freshwater crustacean *Gammarus fossarum* (Malacostraca: Amphipoda). *J. Invertebr. Pathol.* 2018; 156:41–53. DOI: 10.1016/j.jip.2018.07.010.
18. Papa A., Tsioka K., Kontana A., Papadopoulos C., Giadinis N. Bacterial pathogens and endosymbionts in ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8(1):31–5. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.09.011.
19. 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 [Clinical Laboratory Biagnostics]*. 2020; 65(11):724–8. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-724-728.

Authors:

Панферова Ю.А., Токареви́ч Н.К., Блинова О.В. Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 14, Mira St., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru
 Нафеев А.А., Сibaева Е.И. Center of Hygiene and Epidemiology in the Ulyanovsk Region, 5, Pushkareva St., Ulyanovsk, 432049, Russian Federation.

Об авторах:

Панферова Ю.А., Токареви́ч Н.К., Блинова О.В. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.
 Нафеев А.А., Сibaева Э.И. Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области. Российская Федерация, 432049, Ульяновск, ул. Пушкирева, 5.