

ФБУН «Омский научно-исследовательский институт
природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора

**Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, Н.К. Токаревич,
А.К. Носков, Ю.А. Панферова, С.Ю. Красоткина,
Н.Л. Пичурина, Е.Н. Сокиркина, Д.И. Симакова,
О.С. Чемисова**

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ КУ

Практическое руководство

«Издательский центр КАН»
Омск 2023

УДК 616-071:616.9
ББК 53.4+52.526
Л 12

Рецензенты: д.м.н., профессор А.Н. Евстропов
д.м.н., профессор В.Н. Царев

Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Токаревич Н.К., Носков А.К. и др.

Л 12 Лабораторная диагностика лихорадки Ку: практическое руководство
[Текст] / науч. ред.- д-р мед. наук, профессор Н.В. Рудаков; ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций»; ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»; ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» – Омск: Издательский центр КАН, 2023. – 84 с.

ISBN 978-5-907526-42-6

Целью работы являлась подготовка методического руководства, посвященного практическим аспектам лабораторной диагностики лихорадки Ку с учётом накопленного современного опыта. Представленные материалы являются результатом многолетних исследований, выполненных сотрудниками ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций», ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», а также анализа современной отечественной и зарубежной литературы по данной проблеме.

В практическом руководстве основное внимание уделено описанию свойств и методов работы с *Coxiella burnetii*, вопросам лабораторной диагностики лихорадки Ку. Представлены краткие данные об этиологии, эпидемиологии, патогенезе, клинике, диагностике и профилактике, гетерогенности биологических и генетических свойств штаммов.

Издание рассчитано на микробиологов, эпидемиологов, инфекционистов и других специалистов здравоохранения и Роспотребнадзора, слушателей системы постдипломного образования, студентов медицинских ВУЗов.

УДК 616-071:616.9
ББК 53.4+52.526

ISBN 978-5-907526-42-6 © Коллектив авторов, 2023

© ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 2023;

© ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, 2023;

© ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список основных сокращений	4
Предисловие	5
1. Общая характеристика лихорадки Ку и её возбудителя	7
Х. Объекты исследования	16
2. Лабораторная диагностика лихорадки Ку	17
2.1. Общие требования	17
2.2. Специфическая индикация возбудителя лихорадки Ку	21
2.2.1. Полимеразная цепная реакция	22
2.2.2. Иммуноферментный анализ	28
2.2.3. Метод флюоресцирующих антител	35
2.3. Выделение <i>Coxiella burnetii</i>	39
2.3.1. Биологические методы	39
2.3.2. Культуральные методы	50
2.3.3. Бактериологический метод	51
2.3.4. Методы идентификации и генотипического изучения <i>C. burnetii</i> , включая секвенирование	52
2.4. Иммунологические методы диагностики лихорадки Ку	60
2.4.1. Правила получения и хранения материала для серологической диагностики	60
2.4.2. Иммуноферментный анализ	62
2.4.3. Реакция связывания комплемента	66
2.4.4. Реакция агглютинации	72
2.4.5. Реакция непрямой иммунофлюоресценции	73
2.4.6. Определение класса антител к <i>C. burnetii</i> в диагностике лихорадки Ку	75
Литература	77

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ВКО – внутренний контрольный образец
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА – иммуноферментный анализ
КРС – крупный рогатый скот
МКБ-10 – международная классификация болезней 10 пересмотра
МРС – мелкий рогатый скот
МФА – метод флуоресцирующих антител
ОП – оптическая плотность
ПБА – патогенные биологические агенты
ПМФА – прямой метод флуоресцирующих антител
ПЦР – полимеразная цепная реакция
п.н. – пара нуклеотидов
РА – реакция агглютинации
РИП – разведения исследуемых проб
РКЭ – развивающиеся куриные эмбрионы
РМА – реакция микроагглютинации
РНГА – реакции непрямой гемагглютинации
РНИФ – реакция непрямой иммунофлуоресценции
РНК – рибонуклеиновая кислота
рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота
РРК – раствор для разведения конъюгата
РСК – реакция связывания комплемента
ТМБ – раствор тетраметилбензидина
ФСРТ – фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий детергент твин-80
ЦБП – цитратный буферный раствор с перекисью водорода
ЦНС – центральная нервная система
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
IgG – иммуноглобулины класса G
IgM – иммуноглобулины класса M
IS – инсерционная последовательность
MEM – Minimum Essential Medium, среда Игла
MLVA – multiple locus variable-number tandem repeats analysis, мультилокусный анализ вариабельных тандемных повторов
MST – multi-spacer types
VNTR – variable number tandem repeat, мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов

ПРЕДИСЛОВИЕ

Лихорадка Ку и в наши дни оправдывает свое название, которое она получила от первых букв (Qu) английского слова *query* (неясный, неопределенный), т.е. – «лихорадка неясного генеза». Выявленное в 30-х годах прошлого века заболевание, вызываемое *Coxiella burnetii*, регистрируют на всех континентах и практически во всех странах мира. Эта инфекция представляет важную медико-социальную проблему в связи с широким распространением возбудителя в различных климатических зонах, многообразием путей передачи патогена (как правило, воздушно-пылевой, пищевой, контактный), профессиональным характером заражения и значимостью экономических потерь, обусловленных инфицированностью сельскохозяйственных животных, у которых лихорадка Ку может вызывать аборт, мертворождение плода и рождение ослабленного потомства с выраженными патологическими изменениями.

Вместе с тем, существуют как объективные, так и субъективные причины существенной гиподиагностики этой болезни у человека и животных.

Проблемы выявления случаев лихорадки Ку связаны с отсутствием патогномичных признаков инфекции, часто протекающей под масками других лихорадочных заболеваний (острые респираторные вирусные инфекции, грипп, COVID-19, атипичные пневмонии различной этиологии, бруцеллез, тифопаратифозные заболевания и др.) и верифицируемой только при серологическом обследовании. Отечественные тест-системы для выявления антител к *C. burnetii* в ИФА сертифицированы в 2019 г., соответственно серологическая диагностика лихорадки Ку в плановом порядке стала осуществляться только в последние годы. Целенаправленное обследование лиц из профессиональных групп риска в большинстве случаев не проводится в связи с отсутствием обследования резервуарных хозяев (прежде всего мелкий и крупный рогатый скот) на эту инфекцию и, соответственно, данных об эпизоотическом неблагополучии и наличии очагов среди сельскохозяйственных животных.

В последние годы, по данным ВОЗ, регистрация лихорадки Ку продолжается повсеместно. С учетом выраженной гиподиагностики лихорадки Ку как правило выявляется только вспышечная

заболеваемость или случаи в длительно эпидемиологически неблагополучных (очаговых) регионах. Так, на фоне эпидемиологического благополучия была зарегистрирована в Нидерландах (2007–2010 гг.) крупная вспышка лихорадки Ку, во время которой заболели более 4000 человек. Для ликвидации эпидемии в Нидерландах было выбраковано 20% коз, 5% овец, и принудительно вакцинировано поголовье скота ферм и частных хозяйств в радиусе 45 км. Не является исключением и Российская Федерация, на отдельных территориях которой в различные десятилетия выявлялись как групповые заболевания в конкретных очагах, так и регионы со стабильно выявляемой заболеваемостью.

Coxiella burnetii относится к микроорганизмам II группы патогенности и, с учетом преимущественного аэрогенного распространения, к работе с ним в соответствии с главой (гл.) IV Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА санитарных правил и нормам СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (далее – СанПиН 3.3686-21) предъявляются требования режима биологической безопасности, включающие вакцинацию персонала, что существенно снижает круг лабораторий, имеющих возможности работы с этим патогеном. Кроме санитарных правил, в 2022 г. изданы методические рекомендации МР 3.1.0281-22 «Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика лихорадки Ку». Опыт работы с этой гамма-протеобактерией (не риккетсией, относящихся к альфа-протеобактериям) исторически имеют единичные лаборатории риккетсиологического профиля. Указанные обстоятельства обусловили подготовку данного практического руководства по лабораторной диагностике лихорадки Ку.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИХОРАДКИ КУ И ЕЁ ВОЗБУДИТЕЛЯ

Определение. Лихорадка Ку (коксииеллёз) – вызываемая *Coxiella burnetii* зоонозная инфекция с длительным и самостоятельным существованием очагов сельскохозяйственных животных (как при бруцеллезе), наличием на отдельных территориях смешанных природно-хозяйственных (антропургических) очагов. Инфекция характеризуется разнообразными путями передачи возбудителя человеку, развитием распространенного ретикулоэндотелиоза, клинически сопровождающейся лихорадкой, интоксикацией, полиморфной симптоматикой, с потенциальной возможностью перехода в хроническую форму. По международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ-10) код А78, раздел «Риккетсиозы», по МКБ-11 код 1С33.

Возбудитель – *C. burnetii* относится к классу гамма-протеобактерий, порядку Legionellales, семейству Coxiellaceae (рода *Coxiella* и *Rickettsiella*) [33] и является единственным видом с валидным названием в роде *Coxiella*. *C. burnetii* относится ко II группе патогенности.

Характеристика возбудителя. *C. burnetii* облигатная внутриклеточная бактерия размером 0,2-0,4 мкм × 0,4-1,0 мкм. Грамотрицательна, хорошо окрашивается по методу Gimenez, жгутиков и капсулы не имеет [33]. Существует в двух клеточных формах и двух антигенных вариантах (антигенные фазы). При неблагоприятных условиях переходит в малую клеточную форму (small cellular variant), способствующую аэрогенному распространению, при развитии инфекционного процесса образует метаболически активную большую клеточную форму (large cellular variant) с высокой устойчивостью к воздействию систем клетки-хозяина.

Типовой штамм *C. burnetii*: ATCC VR 615 strain (Nine Mile Phase I) [33]. Референс штаммы включают: (1) ATCC V5-145 (штамм Henzerling, антиген в фазе II); (2) VR 616 (штамм Nine Mile Q, антиген в фазе II); (3) VR 147 штамм Dyer, выделенный из крови пациента USPHS Rocky Mountain Laboratory, 1938; (4) VR 542 штамм Ohio 314, полученный из коровьего молока, Огайо, 1955; (5) VR 614 штамм California 76, выделенный от коровы; и (6) VR 730 штамм Bangui, выделенный от человека в Центральной Африке.

Характеристика генома. Геномы штаммов *C. burnetii* представлены молекулами ДНК размером от 1969211 п.н. у штамма *C. burnetii* RSA439 до 2158758 п.н. у штамма Dugway 5J108-111 (Табл. 1). Содержание G+C% в хромосоме составляет примерно 43%, в плазмиде – 39-40%. Геном кодирует многие белки детоксикации (дисмутазы) позволяющие адаптироваться к кислой среде фаголизосомы клетки хозяина. Среди особенностей генома *C. burnetii* можно выделить следующие характеристики: большое число (719 или 39% от общего числа кодирующих рамок считывания) кодирующих последовательностей с гипотетическими функциями, не имеющих гомологов у гамма-протеобактерий, наличие около 80 псевдогенов, свидетельствующие о происходящей геномной редукции, и присутствие в геноме порядка 30-60 (у некоторых штаммов более) инсерционных последовательностей (IS), в том числе транспозонов, не характерных для таких типичных внутриклеточных патогенов, как *Chlamydia spp.* и *Rickettsia spp.*, у которых геном значительно редуцирован [40, 57]. Штаммы *C. burnetii* изолированы от человека, коз, овец, крупного рогатого скота, широкого круга диких позвоночных и членистоногих (Табл. 1).

C. burnetii может иметь несколько типов плазмид: pQpH1, QpRS, QpDG и QpH1. Плазмиды не являются определяющим фактором патогенности *C. burnetii*, они могут отсутствовать у штаммов (CbuG_Q212), вызывающих эндокардит у человека и содержать плазмиду (QpDG) у авирулентного для морских свинок штамма. Плазмидоподобные нуклеотидные последовательности могут быть интегрированы в хромосому. При анализе геномов выделено четыре клада штаммов: клад 1a и 1b (генотип CbNL01), клад 2 – генотип CbNL12 и Nine Mile-подобный генотип (Nine Mile, RSA331, Z3055 и др.), клад 3 – Scurry-генотип (бесплазмидные штаммы: CbuG_Q212) и некластеризованные штаммы разных генотипов (Shperling, Dugway 5J108-111, CbuK_Q154, MSU Goat Q177 и др.) [46]. Штаммы *C. burnetii* разных генотипов заражают различные виды хозяев с отличающейся эффективностью. Штаммы генотипа CbNL01 преимущественно выделяются от коз и человека, штаммы генотипа CbNL12 от крупного рогатого скота и почти никогда от коз и человека [46]. Это указывает на более высокую восприимчивость людей и коз к штаммам генотипа CbNL01.

Таблица 1. Характеристики геномов штаммов *Coxiella burnetii*

<i>Coxiella burnetii</i> штаммы	Источник	Номер доступа в базе данных GenBank	Размер хромосомы (п.н.)	G+C %	Количество генов	Плазмида	
						Тип	Размер (п.н.)
NL3262	Коза	NZ_CP013667.1	2093477	42,84	2401	QpH1	37320
CbRSA331	Человек	NC_010117.1	2016427	42,74	2272	QpH1	37317
CbuG_Q212	Человек	NC_011527.1	2008870	42,60	2208	интегрированная	
Nine Mile (NMR-SA493) (phase I)	Клещи <i>Dermacentor andersonii</i>	NC_002971.4	1995281	42,64	2085	QpH1	37319
Z3055	Овца	NZ_LK937696.1	1995463	42,60	2197	QpH1	
NMRSA439 (phase II)	Культура клеток	NZ_CP020616.1	1969224	42,64	2217	pQpH1	37319
NMRSA439 (phase II, clone 4)	Человек	NZ_CP018005.1	1969245	42,64	2219	pQpH1	37,319
MSU Goat Q177	Коза	NZ_CP018150.1	2090565	42,64	2305	QpRS	39281
CbuK_Q154	Человек	NC_011528.1	2063100	42,64	2302	QpRS	39280
Dugway 5J108-111	Грызуны	NC_009727.1	2158758	42,34	2358	QpDG	54179
2014-PE-15890	Коза	NZ_CP032542.1	2093382	42,90	2352	-	-
Nine Mile mutant (phase II)	(Китай)	NZ_CP035112.1	1987028	42,64	2255	без названия	37321
RSA439	Клещ <i>D. andersonii</i>	NZ_CP040059.1	1969211	42,64	2220	pQpH1	37318

*некластеризованные штаммы, представляющие разные генотипы [46].
н.и. – не изучали

Вирулентность и антигенные свойства. *C. burnetii* высоко вирулентна для человека (инфицирующая доза в некоторых случаях составляет менее 10 микробных клеток), обладает высокой инвазивностью, проникая через неповрежденные слизистые и микротравмы кожных покровов (при оказании акушерской и ветеринарной помощи, при убое и разделке туш животных, при нарушении режима биологической безопасности в лаборатории). В естественных условиях характеризуется высокой вирулентностью

и находится в фазе I, при пассировании на развивающихся куриных эмбрионах (далее – РКЭ) происходит смена фазового состояния антигена от фазы I к фазе II с потерей вирулентности (аттенуация) из-за перехода липополисахарида в усечённую форму, что связано с делецией генов, кодирующих O-антиген.

C. burnetii растёт в культивируемых клеточных линиях и в желточном мешке РКЭ.

Устойчивость к факторам внешней среды. *C. burnetii* длительно выживает в окружающей среде. Устойчива к действию физических (солнечные и ультрафиолетовые лучи, ионизирующая радиация, высокая температура), некоторых химических (эфир) факторов и дезинфицирующих (хлороформ, толуол) средств. В 1% растворе фенола сохраняется до 1 суток, в 0,5% растворе формалина до 4 суток. Во влажной среде при температуре 80-90 °С выживает около 30 минут, при кипячении погибает в течение 5 минут. При низких температурах сохраняет жизнеспособность при температуре минус 5-8 °С в течение нескольких месяцев. В сыром молоке сохраняется до 25 дней; в сливочном масле, в домашнем сыре и рассольных сырах до несколько месяцев; в мясе до 30 дней; во внутренних органах, костях, мышцах и лимфатических узлах контаминированных туш до 1 месяца и более; в овечьей шерсти, смушках – от 2 до 6 месяцев. В замороженных инфицированных мясных и молочных продуктах *C. burnetii* остаётся жизнеспособной в течение всего срока хранения.

Резервуар и источники возбудителя. *C. burnetii* экологически связана с позвоночными и членистоногими, вызывая заболевание у большого числа видов домашних, промысловых и диких млекопитающих, птиц и человека.

В природных очагах резервуаром *C. burnetii* являются дикие мелкие млекопитающие, иксодовые и аргасовые клещи. В антропургических очагах – сельскохозяйственные животные, среди которых основным источником возбудителя является мелкий и крупный рогатый скот.

В ряде случаев источниками инфекции могут быть собаки, лошади, верблюды, яки, кошки, пушные животные в звероводческих хозяйствах, птицы в птицеводческих хозяйствах, декоративные птицы и другие животные.

Роль человека в передаче *C. burnetii* эпидемиологического значения не имеет.

Период заразительности источника: выделение *C. burnetii* у инфицированных животных происходит с молоком, испражнениями и мочой весь период болезни, с максимумом в период отёлов и окотов. Клещи могут сохранять инфекционный агент в течении жизни.

Механизм передачи возбудителя: аспирационный, с реализацией воздушно-пылевого пути передачи; контактный с прямым и непрямим путями передачи возбудителя; редко трансмиссивный (клещи) с реализацией контаминационного пути передачи.

При вдыхании аэрозоля с *C. burnetii*, у человека обычно развивается острая форма лихорадки Ку, проявляющаяся, как правило, в виде атипичной пневмонии и гепатита. При воздушно-пылевом пути передачи возбудителя от коз в виде аэрозоля риск заражения населения проживающего в радиусе 1 км от козьих молочных ферм в 46 раз больше, чем на расстоянии 5-10 км [47].

При заражении человека ведущее значение имеют воздушно-пылевой (преобладает в очагах мелкого рогатого скота – МРС) и контактный пути передачи, меньшее – алиментарный (преимущественно в очагах КРС) [1, 3]. С учетом высокой устойчивости возбудителя особое значение при лихорадке Ку имеет «пылевая инфекция». Факторами передачи *C. burnetii* человеку от больного животного служат сырье животного происхождения (шерсть, пух, шкуры), мясомолочные продукты, предметы ухода за животными, экскременты и другие объекты, инфицированные *C. burnetii* (Рис. 1). Трансмиссивный путь передачи является редким и маловероятным. При осложнении эпизоотической ситуации возрастает опасность возникновения эпидемии – суммы независимых друг от друга, одиночных или групповых актов заражения людей от животных или загрязненных возбудителем объектов внешней среды [8, 10].

C. burnetii является признанным агентом биологического оружия [48, 49, 59]. Лихорадка Ку может не вызывать высокой смертности непосредственно после применения *C. burnetii* в качестве аэрозольного биологического оружия, но вызывает острые заболевания, приводящие к дальнейшей инвалидизации. Хронизация инфекции может осложняться эндокардитом, приводящим к фатальным последствиям или синдромом хронической усталости.

Диагностика лихорадки Ку осложнена из-за неспецифических проявлений, эффективное лечение антибиотиками возможно только при острой форме инфекции [48].

Наиболее важным фактором передачи *C. burnetii* при акте биотерроризма является аэрозоль, кроме этого, для заражения человека может использоваться контаминированное почтовое отправление, контаминированные продукты питания и вода [48].

Естественная восприимчивость населения высокая, в некоторых случаях инфицирование завершается бессимптомной или субклинической формой болезни. Постинфекционный иммунитет напряжённый.

Современные эпидемиологические признаки (заболеваемость). В различных регионах мира наблюдается спорадическая, групповая и вспышечная заболеваемость лихорадкой Ку. В последние годы, по данным ВОЗ, регистрация лихорадки Ку осуществляется повсеместно. За прошедшие десятилетия самая крупная вспышка лихорадки Ку была зарегистрирована в Нидерландах (2007-2010 гг.), во время которой заболели более 4000 человек [38].

В США ежегодно регистрируется около 200 случаев заболевания с тенденцией к постоянному увеличению их числа [28]. Похожая ситуация отмечается в Болгарии, Франции и Германии. В западной Европе опасение вызывает рост числа заболевших коксиеллёзом с хроническим течением инфекции [27, 35-37]. Во многих странах мира регистрируются спорадические завозные случаи, которые обусловлены как заражением людей во время пребывания на неблагополучных по данной инфекции территориях, так и заражением от импортируемых инфицированных животных или материалов животного происхождения (шерсть, фураж, солома и др.) [26].

В Российской Федерации за период 2000-2021 гг. зарегистрировано 2410 случаев лихорадки Ку в 20 субъектах, из которых 1 964 (81,49%) приходилось на Южный федеральный округ (ЮФО).

Болеют лица всех возрастных групп, половых различий нет.

При росте количества частных козье-овечьих ферм в Российской Федерации в последние годы и возможном снижении качества ветеринарного надзора можно прогнозировать рост вспышек коксиеллеза в очагах козье-овечьего типа. Эпизоотолого-

эпидемиологический надзор за лихорадкой Ку и другими инфекциями, общими для человека и животных, должен проводиться совместными усилиями медицинских и ветеринарных служб в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими и ветеринарно-санитарными правилами [25].

К группам риска относятся: постоянные и временные работники животноводческих, звероводческих хозяйств (ферм), как благополучных, так и неблагополучных по лихорадке Ку; лица, занятые обслуживанием, стрижкой, забоем животных, первичной обработкой и транспортированием сырья и продуктов животноводства из этих хозяйств; постоянные и временные работники предприятий по переработке сырья и продуктов животноводства, поступающих из районов и хозяйств, неблагополучных по лихорадке Ку; медицинский, ветеринарный, зоотехнический и другой персонал, работающий с живыми культурами *S. burnetii* или заражённым материалом, с больными лихорадкой Ку.

Сезонность весенне-осенняя.

Официальные данные о регистрации лихорадки Ку в России, как и в других странах, не отражают реальное распространение этой инфекции. В Российской Федерации может иметь место выраженная гиподиагностика лихорадки Ку [26]. Об этом свидетельствуют многочисленные данные литературы [17, 60]. Одной из причин гиподиагностики лихорадки Ку являются трудности клинической диагностики, обусловленные выраженным полиморфизмом проявлений болезни и отсутствием патогномичных симптомов. Значительная гиподиагностика лихорадки Ку и, как следствие, нерациональное лечение больных приводят, с одной стороны, к её хронизации, с другой – к ошибочным представлениям о реальном распространении и отсутствию должной настороженности врачей к этой болезни. Поэтому решающее значение в диагностике лихорадки Ку имеют специфические лабораторные методы.

Предположить коксиеллезную природу болезни у людей можно путём тщательного сбора эпидемиологического и клинического анамнеза. Чаще лихорадкой Ку болеют лица с повышенным риском инфицирования в силу их профессиональной деятельности. В сельской местности это сельскохозяйственные рабочие, пастухи, чабаны, доярки, зоотехнический и ветеринарный персонал.

В городах – рабочие кожевенных предприятий, скотобоев, мясных и молочных комбинатов, шерстеобрабатывающих, меховых и хлопкопрядильных фабрик. Особую настороженность врачей должны вызывать эндокардиты и хронические пневмонии у трудовых мигрантов из Средней Азии [7] и сельских жителей.

Биологическая безопасность. При работе с культурой *S. burnetii* в лабораторных условиях особое внимание следует уделять биологической безопасности, учитывая высокую устойчивость микроорганизма к физическим и химическим дезинфицирующим средствам и мельчайшим размерам бактериальной клетки, проходящей через большинство фильтров.

При работе по выделению штаммов *S. burnetii* (метод биопробы на морских свинках, беспородных белых мышах, культивирование в желточных мешках РКЭ, культуре клеток) персонал лаборатории должен быть вакцинирован и защищён от возможного аэрогенного заражения. Указанные виды работ выполняют сотрудники аэрозольной лаборатории, соответствующей требованиям к изолированной лаборатории 3 уровня, в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями пунктов 342-343 гл. IV Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА СанПиН 3.3686-21.

При нарушении режима биологической безопасности, возможно, внутрिलाбораторное заражение.

С момента (1938 г.) первого описанного случая внутрिलाбораторного заражения R. E. Dyer (Rocky Mountain Laboratories, Hamilton) и 14 случаями заражения при работе со штаммом, выделенным от него – RSA439 (Табл. 1), в 1940 г. в Национальном институте здравоохранения (Вашингтон) [3], в США в период 1938-1950 гг. в лабораториях заразилось около 100 сотрудников, часть случаев не была зарегистрирована.

Инкубационный период. Инкубационный период у человека при лихорадке Ку колеблется от 3 до 32 дней и составляет в среднем 1–2 недели.

Основные клинические признаки. Лихорадка Ку у человека проявляется лихорадкой, другими общетоксическими симптомами, развитием бронхита, специфической атипичной пневмонии, поражением ЦНС и других систем организма. Инфекция характе-

ризуется полиморфизмом клинической картины, часто подострым и хроническим течением, при хронизации инфекционного процесса часто развивается эндокардит.

У сельскохозяйственных животных коксииеллез обычно протекает длительно и бессимптомно, сопровождаясь метритами, абортами (до 25%) или преждевременными окотами с мертворождением плода.

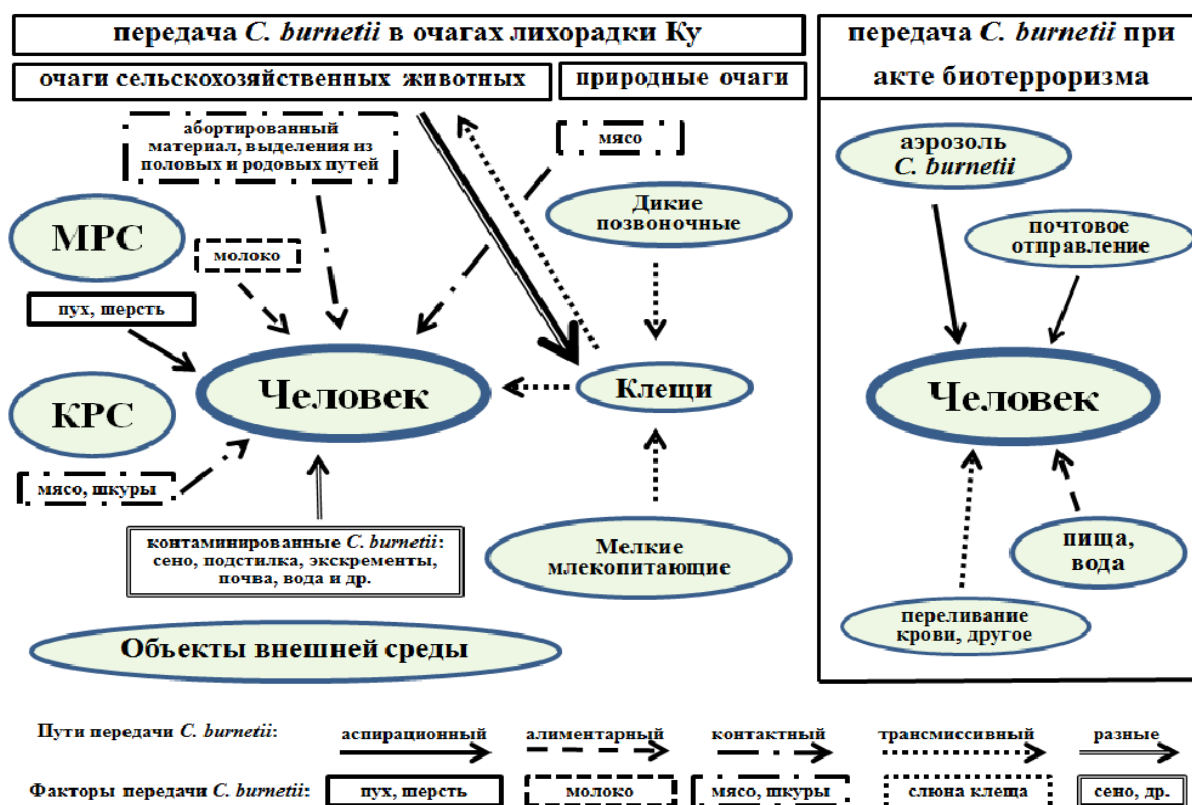


Рис. 1. Материалы, подлежащие исследованию, с учетом путей и факторов передачи *Coxiella burnetii* в очагах сельскохозяйственных животных (антропоургических), природных очагах и при акте биотерроризма

Профилактика. Разработаны живая («М-44») и химическая вакцины против лихорадки Ку. Специфическая профилактика населения и основные мероприятия по санации очагов лихорадки Ку среди сельскохозяйственных животных проводятся в соответствии с гл. XVII. Профилактика коксииеллеза (Лихорадка Ку) СанПиН 3.3686-21 и действующими ветеринарными правилами ВП 13.3.1221-96 «Коксииеллез (лихорадка Ку)».

Х. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с нормативно-директивными документами [6, 10, 15, 19] установлены клинико-эпидемиологические показания к отбору объектов для проведения исследования на лихорадку Ку:

1. Клинический материал (кровь и её компоненты, мокрота, промывные воды бронхов, спинномозговая жидкость и др.) от больных:

- с лихорадкой различного типа, продолжающейся более 5 дней и симптомами интоксикации различной степени выраженности;
- с лихорадкой и поражением дыхательной системы в виде бронхитов и пневмоний;
- с лихорадкой и экзантемой полиморфного характера;
- с лихорадкой и поражением гепатобиллиарной системы (гепатомегалия, желтуха различной интенсивности);
- из групп риска, поступающих из антропургического (хозяйственного) очага лихорадки Ку.

2. Секционный материал: кровь, экссудат, кусочки лёгких, сердца и других паренхиматозных органов исходя из клиники болезни;

3. Материал из антропургического (хозяйственного) очага лихорадки Ку:

- материал от больных/павших сельскохозяйственных животных (органы, биологические жидкости, абортированные плоды, абортированный материал, выделения из половых и родовых путей, молоко, молозиво, пух, шерсть и др.);
- клещи, снятые с больных сельскохозяйственных животных;
- сырье (пух, шерсть, шкуры и др.);
- продукция животного происхождения (молоко, сыры, другая молочная продукция, мясо и др.);
- пробы объектов окружающей среды из мест содержания и выпаса больных/павших сельскохозяйственных животных (подстилки, фураж, сено, солома, экскременты с/х животных, почва, вода и др.);

4. Материал из природного очага лихорадки Ку:

- материал от диких животных (мелкие млекопитающие), клещи;
- клещи, снятые с диких животных.

2. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ КУ

2.1. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ

Диагноз лихорадки Ку вследствие полиморфизма клинического течения невозможен без лабораторного подтверждения. Чаще используют серологические методы диагностики, традиционно основным методом считался реакция связывания компонента (РСК). В настоящее время используют более чувствительные методы – ИФА и реакцию непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) [4]. У больных преобладают антитела к антигену *S. burnetii* II фазы; антитела к антигену I фазы преобладают при формировании хронического течения.

Диагноз «лихорадка Ку» (коксиеллез) у человека считается установленным при лабораторном подтверждении любым из существующих методов (серологическим или молекулярно-генетическим), а также у больного с клиническими симптомами лихорадки Ку (см. показания к проведению обследования на лихорадку Ку) при подтверждённом случае коксиеллеза у контактного животного [10].

Диагноз лихорадка Ку у животных устанавливают комплексно на основании эпизоотологических и эпидемиологических данных, клинических признаков, результатов серологических исследований и обязательного выделения культур возбудителя этой болезни из организма больных животных [18]. Серологические обследование на лихорадку Ку у животных осуществляется в РСК, при длительном варианте её постановки в соответствии с методическими указаниями, утверждёнными ГУВ МСХ СССР 14.09.84 [11], с использованием антигена из *S. burnetii* фазы I. Диагностический титр антител в разведении 1:10 и выше.

Серологические и молекулярно-генетические исследования без накопления возбудителя могут быть проведены в бактериологических лабораториях, имеющих разрешительную документацию на работу с возбудителями III-IV групп патогенности. Исследования по выделению *S. burnetii* из материала от больного человека, инфицированного животного, из объектов окружающей сре-

ды или трупного материала, связанные с накоплением возбудителя, проводятся только в лабораториях, имеющих разрешительную документацию на работу с возбудителями I–II групп патогенности [10]. Выявление *S. burnetii* и выделение культуры данного патогена при исследовании материала, полученного от животных или объектов внешней среды, осуществляется теми же методами, что материала от больного человека.

Выделение возбудителя требует особых режимных мер (микроорганизм II-й группы патогенности), вакцинации персонала лаборатории, защиты от возможного аэрогенного заражения и может проводиться только в специализированных (риккетсиологических) лабораториях в соответствии со всеми требованиями, изложенными в гл. IV. Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА СанПиН 3.3686-21. Используют метод биопроб на морских свинках, беспородных белых мышах, культивирование в желточных мешках РКЭ и культуре клеток. Указанные виды работ выполняют двое сотрудников в помещении, соответствующем требованиям гл. IV. Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА СанПиН 3.3686-21, для удобства работы можно использовать бокс МБ II В2 (Ламинарный шкаф, БМБ-II-«Ламинар-С» -1,2 VIS-À-VIS; и др.). Использование бокса МБ II В2 позволяет работать одновременно двум сотрудникам (один выполняет основные манипуляции, второй ассистирует).

В специализированных лабораториях, соответствующих всем требованиям, предъявляемыми гл. IV. Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА СанПиН 3.3686-21 может осуществляться комплексное исследование материала (от больных людей и сельскохозяйственных животных, секционного материала, образцы из объектов внешней среды: клещи, пищевые продукты, почва и др.) при лабораторной диагностике лихорадки Ку с последующим выделением штамма *S. burnetii* по схеме, приведённой на рисунке 2.

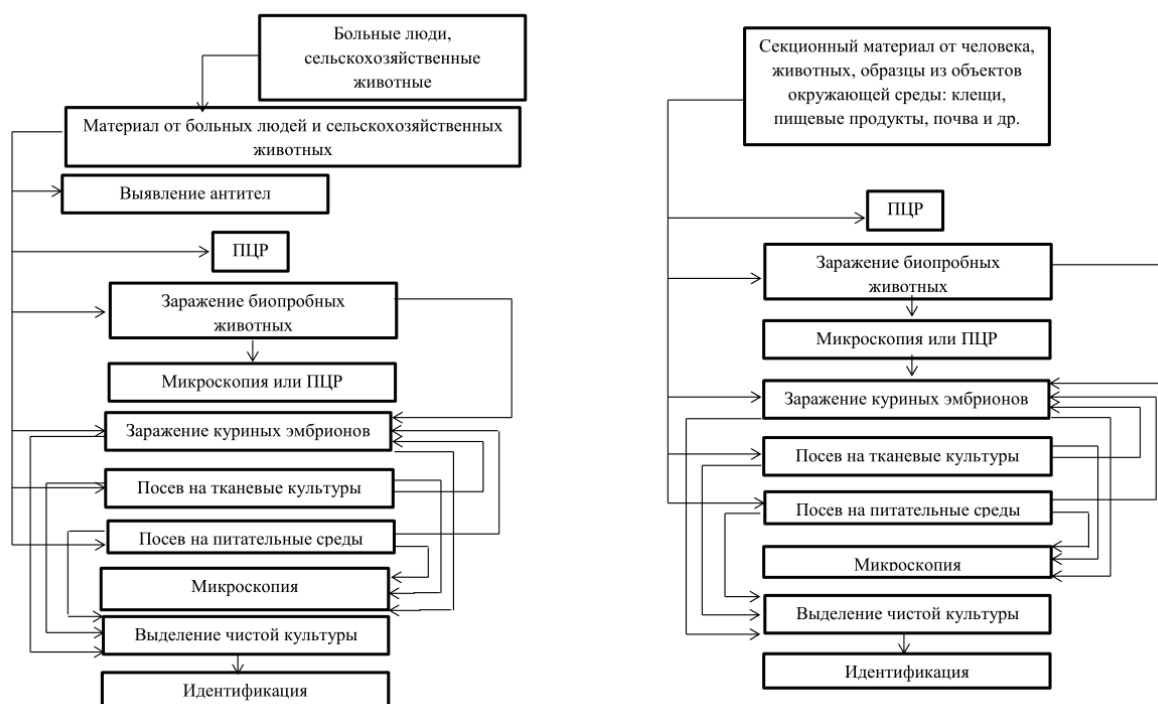


Рис. 2. Схема лабораторной диагностики лихорадки Ку и выделения возбудителя

Молекулярная диагностика лихорадки Ку основана на использовании ряда технологий. Постановка диагноза «Лихорадка Ку» может быть подтверждена детекцией ДНК *S. burnetii* в биологическом материале от больного (кровь, мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Для дифференциации штаммов применяют MLVA (мультилокусный, основанный на вариабельности числа тандемных повторов, анализ). Для выявления ДНК *S. 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.

При молекулярно-биологических исследованиях иксодовых клещей необходимо помнить, что ДНК *Coxiella*-подобных эндосимбионтов выявлена у 60 видов иксодовых и аргасовых клещей (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), включая, *Candidatus Coxiella mudrowiae*, который генотипирован в клещах *Rhipicephalus turanicus* [44].

В соответствии с данными размещенными на сайте Росздравнадзора (<http://www.roszdravnadzor.ru/services/misearch>) в Российской Федерации регламентированы к применению ряд медицинских изделий для осуществления серологических и молекулярно-биологических исследований при диагностике лихорадки Ку (Табл. 2).

Таблица 2. Медицинские изделия (диагностические тест-системы) для диагностики лихорадки Ку, прошедшие государственную регистрацию в Росздравнадзоре РФ

№	Наименование медицинского изделия/ уникальный номер реестровой записи	Регистрационный номер/дата государственной регистрации	Наименование организации-производителя медицинского изделия
1.	Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgG к антигенам коксииелл Бернета» (ИФА-анти-Ку-G)/34913	РЗН 2019/8718/ 06.08.2019	ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Москва
2.	Наборы реагентов диагностических для иммунологических исследований in vitro: Набор реагентов <i>Coxiella burnetii</i> (Q-fever) phase 1 IgG NovaLisa (вид 154920); Набор реагентов <i>Coxiella burnetii</i> (Q-fever) phase 2 IgG NovaLisa (вид 154920); Набор реагентов <i>Coxiella burnetii</i> (Q-fever) phase 2 IgM NovaLisa (вид 155250)/16663	ФСЗ 2011/10431/ 23.09.2016	НоваТек Иммунодиагностика ГмбХ NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Germany
3.	Наборы реагентов для лабораторной диагностики in-vitro: IgG-антитела к <i>Coxiella burnetii</i> (COXIELLA BURNETII ELISA IgG); IgM-антитела к <i>Coxiella burnetii</i> (COXIELLA BURNETII ELISA IgM)/o35038	ФСЗ 2009/05430/ 26.10.2009	«Вирселл С.Л.», Испания, Vircell S.L., Espan
4.	Реагенты in vitro для иммуноферментного анализа: Реагент для определения антител IgA к возбудителю Ку-лихорадки (фаза 1); Реагент для определения антител IgG к возбудителю Ку-лихорадки (фаза 1); Реагент для определения антител IgG к возбудителю Ку-лихорадки	ФСЗ 2012/12631 30.07.2012	«Институт Вирион Серион ГмбХ», Германия, Institut Virion\Serion GmbH, Friedrich- Bergius-Ring 19, 97076 Würzburg, Germany

	(фаза 2); Реагент для определения антител IgM к возбудителю Ку-лихорадки (фаза 2); Контрольный материал на IgG антитела к возбудителю Ку-лихорадки (фаза 2); Контрольный материал на IgM антитела к возбудителю Ку-лихорадки (фаза 2))/o80487		
5.	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Coxiella burnetii</i> в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® <i>Coxiella burnetii</i> -FL» по ТУ 9398-195-01897593-2011/34907	ФСР 2012/13923 13.03.2019	ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва
6.	Набор реагентов для выявления и идентификации НК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и возбудителя лихорадки Ку методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-ККГЛ/Ку-РВ) по ТУ 9398-008-46395995-2013/5518	РЗН 2016/4302 /5518/ 20.06.2016	ЗАО «Синтол», Москва

2.2. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛИХОРАДКИ КУ

Специфическая индикация возбудителя лихорадки Ку – это комплекс специальных мероприятий (исследований), осуществляемых для быстрого обнаружения ДНК (генетического материала) и/или антигенов *S. burnetii* в объектах внешней среды и образцах биологического материала человека и животных. Исследования материала от млекопитающих и птиц на инфицированность возбудителем лихорадки Ку с применением молекулярно-биологических (ПЦР, секвенирование) и серологических (ИФА) методов без накопления возбудителя могут быть проведены в бактериологических лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с ПБА III группы патогенности в соответствии с пунктом 1419 гл. XVII СанПиН 3.3686-21.

Выделение ДНК *S. burnetii*, хранение, обеззараживание образцов, а также постановку ПЦР проводят с использованием тест-

систем зарегистрированных в государственном реестре медицинских изделий Росздравнадзора в соответствии с правилами обращения с потенциально заражёнными материалами [19].

После выделения ДНК диагностику методом амплификации нуклеиновых кислот и учёт результатов реакции проводят согласно инструкциям к используемым тест-системам, имеющим разрешительную документацию для применения в клинической диагностике. В случае длительного хранения пробы ДНК необходимо поместить в низкотемпературную камеру (минус 20 °С). При транспортировке также необходимо обеспечить режим охлаждения, что достигается помещением проб в специальные контейнеры или термосы со льдом (на срок не более суток).

В лабораториях, имеющих разрешение на работу с микроорганизмами III группы патогенности после проведения анализа методом ПЦР, отрицательные и положительные (в случае невозможности передачи для дальнейшего исследования в специализированную лабораторию) пробы обеззараживают и уничтожают. В специализированных лабораториях, соответствующих требованиям, предъявляемыми гл. IV. Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА СанПиН 3.3686-21, отрицательные пробы обеззараживают и уничтожают, положительные пробы используют для дальнейшего выделения культур *S. burnetii*. Обеззараживание материала проводят согласно с методическими указаниями по организации работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности [13, 19].

2.2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Молекулярно-генетический анализ проводят с помощью набора реагентов для выявления ДНК *S. burnetii* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флюоресцентной детекцией «АмплиСенс *Coxiella burnetii* – FL» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора) или набора реагентов для выявления ДНК *S. burnetii* методом полимеразной цепной реакции «ОМ-Скрин-ККГЛ/Ку-РВ» («Синтол»), имеющих регистрационные удостоверения для проведения клинической диагностики (Табл. 2). Постановка ПЦР проводится в соответствии с инструкциями производителей.

Выявление ДНК *C. burnetii* в клещах, биологическом материале от людей (кровь, мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал) и животных (кровь, секционный материал, плацента и абортивный материал) можно осуществлять методом ПЦР с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL» с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации (ТУ 9398-195-01897593-2011) [5].

Принцип метода. Выявление ДНК *C. burnetii* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает три этапа: 1) экстракция ДНК из образцов биологического материала; 2) ПЦР-амплификация участка ДНК данного микроорганизма и 3) гибридизационно-флуоресцентная детекция, которая производится непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT). Экстракцию ДНК из биологического материала проводят в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. С полученными пробами проводится реакция амплификации участка ДНК *C. burnetii* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента TaqF-полимеразы. В реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени с нарастанием интенсивности флуоресценции. Накопление специфических продуктов амплификации регистрируется путём измерения интенсивности флуоресцентных сигналов в режиме «реального времени» (формат FRT).

Взятие, транспортировка и хранение материала. Осуществляется в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, а также СанПиН 3.3686-21.

Материал для исследования. Исследованию подлежат иксодовые клещи родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor* и *Ixodes*, материал от людей (цельная периферическая кровь, мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал: ткани мозга, сердца, лёгких, селезёнка) и животных (кровь, плацента, абортивный материал, секционный материал: селезёнка). Кровь, мокроту, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал доставляют в лабораторию в ёмкости со льдом в тече-

ние 1 суток. При поступлении в лабораторию проводят пробоподготовку крови, ликвора, промывных вод бронхов с получением бактериального осадка, после чего, либо сразу приступают к экстракции нуклеиновых кислот, либо замораживают пробу для длительного хранения. Клещей хранят живыми (до 1 месяца) или 1 неделю при температуре не выше минус 16 °С, далее при температуре не выше минус 68 °С. Секционный и абортивный материал, а также плаценту хранят 1 неделю при температуре не выше минус 16 °С, далее при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Проведение ПЦР-исследования

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов: 1) экстракция ДНК из исследуемых образцов; 2) проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»; 3) анализ и интерпретация результатов. Исследования приводятся в соответствии с Методическими рекомендациями по применению набора реагентов для выявления ДНК *S. burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Coxiella burnetii* – FL» Формат FRT (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов. Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87).

Проведение амплификации с детекцией в режиме «Реального времени».

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени». Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Готовят реакционную смесь на необходимое количество реакций. Постановка сопровождается амплификацией как минимум трёх контрольных образцов: отрицательного контроля экстракции (В–), положительного и отрицательного контролей ПЦР (К+ и К–).

2. В отдельной пробирке смешивают ПЦР-смесь-1-FRT *C. burnetii*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию (10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *Coxiella burnetii*; 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT; 0,5 мкл полимеразы TaqF).

3. Отбирают необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

4. Вносят в каждую пробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

Ниже приведен пример проведения амплификации и анализ результатов при помощи приборов iCycler iQ и iQ5, Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США).

1. Программируют амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (Табл. 3). Детекцию флуоресцентного сигнала назначают по каналам для флуорофоров FAM и JOE.

2. Устанавливают пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Лунка №1 должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.

3. Запускают выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступают к анализу и интерпретации результатов.

Таблица 3. Программа амплификации

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	25 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	56	25 с	FAM/FAM-490, JOE/HEX/JOE-530	
	72	15 с	–	

Анализ и интерпретация результатов. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

– по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО STI-87 (Рис 3.А.);

– по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *S. burnetii* (Рис 3.Б.).

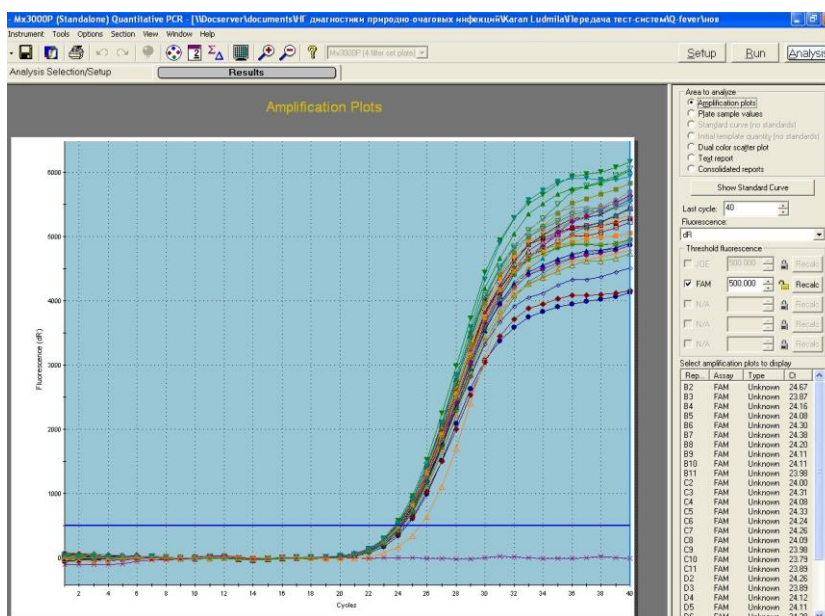


Рис. 3.А. Данные по каналу FAM/FAM-490;

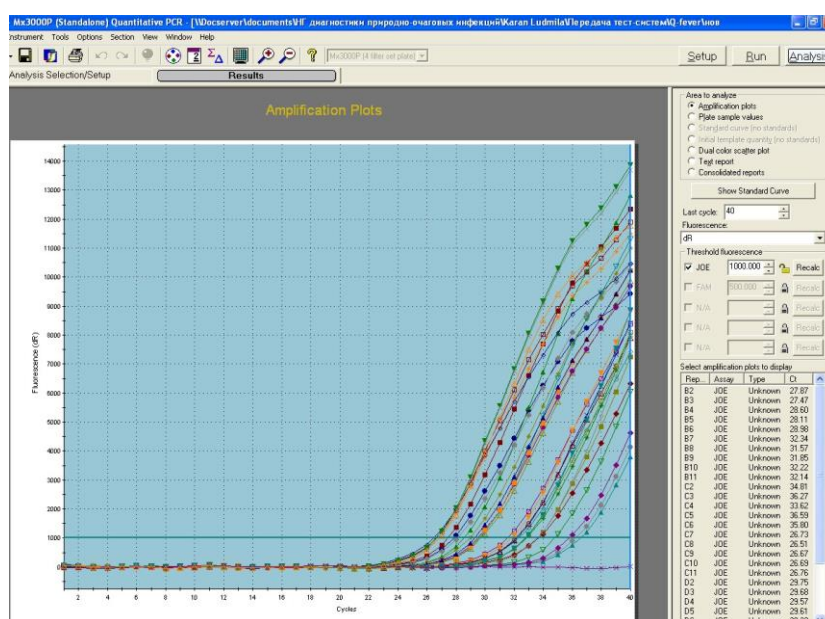


Рис. 3.Б. Данные по каналу JOE/HEX/JOE-530

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Интерпретация результатов реакции. ДНК *S. burnetii* обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъёма флуоресценции.

ДНК *S. burnetii* не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение, а по каналу JOE не определено значение порогового цикла *Ct*.

Результат анализа невалидный, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу JOE и по каналу FAM значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию по применению).

Проведённые сравнительные исследования позволили установить, что чувствительность ПЦР для детекции ДНК *S. burnetii* в крови лихорадящих больных достигает 83-97,5% в зависимости от применяемой для диагностики тест-системы [16]. ПЦР-тест-системы, основанные на амплификации многокопийных элементов генома, позволяют выявить ДНК патогена на первых неделях заболевания, когда ещё не происходит образования антител; чувствительность при этом достигает 92,2%, а специфичность – 100% по сравнению с методом иммунофлуоресценции (метод «золотого

стандарта») [30, 40, 55]. Для диагностики коксииеллезной инфекции методом ПЦР и ПЦР в режиме реального времени применяются разные генетические маркеры. Особенности генного контента *C. burnetii* обеспечивают высокую специфичность ряда систем молекулярно-генетической детекции и отсутствие перекрестных реакций в отношении других возбудителей природно-очаговых инфекций, относящихся к I-II группе патогенности [23], в то же время возможны перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами, степень патогенности которых для человека к настоящему времени не ясна. Также следует учитывать возможность присутствия ДНК, но не жизнеспособного патогена, в некоторых биологических материалах [39].

Работы по детекции ДНК *C. burnetii* выполняют в соответствии с методическими указаниями по организации работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности [13].

Дальнейшее исследование образцов проводят согласно требованиям регламентирующих документов [13, 19].

Верификация результата ПЦР при работе с пробами членистоногих.

Учитывая широкое распространение коксииелла-подобных микроорганизмов у членистоногих, в частности клещей разных таксономических групп, целесообразно секвенировать протяженные фрагменты гена 16S рибосомальной ДНК, включающие переменные локусы гена, генов *groEL* либо *groV* в положительных находках для дифференциации *C. burnetii* от близкородственных *Coxiella spp.*, в том числе с неясной степенью патогенности для человека [34, 61].

2.2.2. Иммуноферментный анализ

В методических рекомендациях «Серологические методы диагностики риккетсиозов» [9] для выявления *C. burnetii* в биологических объектах, в том числе в клиническом материале, рекомендовано применение прямого метода флуоресцирующих антител (ПМФА) или реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с эритроцитарным иммуноглобулиновым диагностикумом. Однако применение этих методов крайне затруднено, так как соответ-

ствующие диагностические препараты в России не выпускаются в промышленном масштабе, однако при необходимости их производство может быть восстановлено, так как разработана необходимая техническая документация.

Для детекции антигенов *C. burnetii* в объектах внешней среды (смывы) и материалах биологического происхождения (органы животных, иксодовые клещи) может быть использована «Тест-система иммуноферментная для выявления антигенов коксиелл Бернета ИФА-Ку-АНТИГЕН» производства ФБУН «Санкт-Петербургский НИИЭМ им. Пастера» Роспотребнадзора. Данная иммуноферментная тест-система рекомендована для применения в практике здравоохранения решением Комитета медицинских иммунологических препаратов (Протокол заседания № 5 от 26.06.1997г.). ИФА тест-система предназначена для выявления антигена *C. burnetii* в объектах внешней среды, (смывы) и материалах биологического происхождения (органы животных, клещи). Она выявляет антигены *C. burnetii* в биологическом материале за счёт их связывания с поликлональными антителами, сорбируемыми на поверхности лунок стрипов. Образующийся комплекс антигено-антиген определяется с помощью пероксидазного конъюгата на основе поликлональных антител по изменению окрашивания содержимого лунок на этапе ферментного превращения субстратного раствора. Указанная тест-система позволяет выявлять 10-50 нг/мл корпускулярного антигена *C. burnetii* I-й фазы, что составляет $3,78 \times 10^5$ - $1,89 \times 10^6$ клеток возбудителя в 1 мл. Её чувствительность превосходит чувствительность ПМФА более чем в 6–12 раз, а чувствительность РНГА более чем в 16–32 раза [2, 22].

Взятие материала, отбор образцов из внешней среды проводятся согласно требованиям регламентирующих документов [9, 10]. В указанных ниже случаях для приготовления суспензий из биологического материала, когда это необходимо, возможно применение автоматических гомогенизаторов с комплектующими для гомогенизации, согласно протоколам производителя прибора.

1. Кровь. Кровь у людей берут из локтевой вены в количестве 4,5 мл с помощью одноразовой иглы (диаметр 0,8-1,1 мм) и специальной вакуумной системы типа «Vacuett» с ЭДТА или цитратом натрия, или стерильным шприцем в стерильные стеклянные

или пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Аккуратно перемешивают покачиванием до полного смешивания с антикоагулянтом.

2. Спинномозговая жидкость. Спинномозговую жидкость в количестве не менее 1 мл собирают, используя одноразовый иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5-2,0 мл. Предварительная обработка проб не требуется.

3. Биопсийный и аутопсийный материал. При исследовании биопсийного и аутопсийного материала, образцы забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя. Кусочки ткани размером не более 5 мм помещают в одноразовые стерильные пробирки 2 мл с транспортной средой. Пробирку плотно закрывают. При работе с макробиоптатами и макроаутоптатами кусочки ткани массой 0,1-1 г помещают в фарфоровую ступку и добавляют изотонический раствор хлорида натрия объемом 0,5-1 мл. Измельчают стерильными ножницами и растирают пестиком. Через ватный тампон отбирают 0,1-0,2 мл надосадочной жидкости стерильным наконечником с фильтром в стерильную микропробирку.

4. Мокрота. Мокроту забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл. Для разжижения мокроты применяют либо приготовленную *ex tempore* смесь NALC (N-ацетил-L-цистеина 0,25 г, 25 мл 4% раствора NaOH, 25 мл 0,1 М тризамещенного натрия цитрата), либо раствор «Муколизин» (Na_2HPO_4 0,0774 М, NaH_2PO_4 0,0226 М, бета-МЭ 0,094 М, 5% азид натрия в конечной концентрации 0,05%). Пробу объемом 1-2 мл смешивают либо с равным объемом смеси NALC, либо с пятикратным объемом раствора «Муколизин». Пробы со смесью NALC перемешивают покачиванием в течение 20-30 с и инкубируют в течение 15 мин, периодически встряхивая. Затем разводят 0,067 М фосфатным буфером (pH 6,8) до конечного объема 50 мл. Пробу центрифугируют в течение 10 мин при 9000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида. Пробы с раствором «Муколизин» перемешивают покачиванием в течение 20-30 с и инкубируют в течение 20-30 мин, периодически встряхивая. Затем отбирают 1 мл

разжиженной мокроты, помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой и центрифугируют при 9000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида.

5. Промывные воды бронхов. Промывные воды бронхов забирают в одноразовые, плотно завинчивающиеся пробирки объемом 50 мл. Автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл клинического материала, помещают в пробирку с завинчивающейся крышкой или защёлкой на 1,5 мл и центрифугируют при 7000 об/мин в течение 10 мин. Удаляют 900 мкл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешивают с 0,1 мл оставшейся жидкости.

6. Органы животных. Органы лабораторных, сельскохозяйственных и диких животных отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Кусочки органов массой до 10 г растирают в стерильной ступке со стеклянным порошком, после чего добавляют 0,9% раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируют в течение 10 мин при 12000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9% раствора натрия хлористого.

7. Членистоногие. Клещей, блох и комаров обрабатывают эфиром до обездвижения, нанося каплю эфира на ватно-марлевую пробку. После определения вида и пола материал может быть объединён в пулы в зависимости от вида, пола, места и даты сбора и помещён в сухие чистые пробирки объемом 1,5 мл.

Группировку проб осуществляют в соответствии с методическими указаниями по сбору, учёту и подготовке к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций [12].

Клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96% этанола, встряхивают на микроцентрифуге/встряхивателе и центрифугируют в течение 3-5 с при 2000 об/мин для удаления капель с крышки пробирки. После удаления из пробирки спирта, вносят 1,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида, встряхивают и осаждают капли с крышки пробирки на

микроцентрифуге/встряхивателе в течение 3-5 с при 2000 об/мин. Раствор натрия хлорида удаляют из пробирки. Переносят клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7-1,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида и гомогенизируют пробу. Наконечником с фильтром переносят гомогенизированную пробу в микроцентрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой объёмом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 об/мин в течение 2 мин для осветления пробы. Надосадочную жидкость переносят в отдельную микроцентрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой или защёлкой.

Исследуемые пробы воды в количестве 5–10 мл центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 мин. Осадок суспендируют в 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида.

8. Пищевые продукты. Твёрдые пищевые продукты в количестве 1 г растирают в ступке с 0,5–1,0 г стеклянного порошка, добавляют 2–4 мл бидистиллированной воды. Полученную суспензию центрифугируют при 2000 об/мин для осаждения крупных частиц. 1 мл супернатанта переносят в микроцентрифужные пробирки, повторно центрифугируют при 12000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида.

9. Почва. Почву в количестве 1,0–1,5 г тщательно перемешивают на вортексе с 2 мл бидистиллированной воды, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость объёмом 1 мл переносят в микроцентрифужные пробирки и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида.

Биологические и иммунологические свойства. Тест-система обладает способностью выявлять антигены *S. burnetii* (Ку-антиген) за счёт связывания с поликлональными антителами, сорбированными на поверхности полистирола лунок стрипов. Образующийся комплекс антитело-антиген выявляется с помощью пероксидазного конъюгата на основе поликлональных антител по появлению жёлтого окрашивания на этапе ферментативного превращения субстратного раствора.

Назначение. Тест-система предназначена для выявления Ку-антигена в объектах внешней среды, (смывы) и материалах биологического происхождения (органы животных, клещи).

Состав набора.

1. 8-луночные стрипы, сорбированные антителами к Ку-антигену;
2. Позитивный контрольный образец, содержащий антиген коксиилл Бернета, (К+);
3. Негативный контрольный образец, содержащий гетерологический антиген, (К-);
4. Конъюгат – поликлональные антитела к коксииллам Бернета, меченные пероксидазой хрена;
5. Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора, содержащий детергент – твин-80, (ФСРТ);
6. Цитратный буферный раствор с перекисью водорода, (ЦБП);
7. Раствор для разведения конъюгата, (РРК);
8. Раствор тетраметилбензидина, (ТМБ);
9. Раствор серной кислоты, (стоп реагент);
10. Полиэтиленовый пакет с молнией – 1 шт;
11. Инструкция по применению – 1 шт.

Подготовка реагентов осуществляется в соответствии с инструкцией по применению.

Подготовка материала для исследования: а) внутренние органы животных, клещей растирают в стерильной фарфоровой ступке и готовят 25% суспензию в 0,9% растворе хлорида натрия. Полученную суспензию подвергают трехкратной процедуре замораживания-оттаивания, инактивируют в водяной бане при температуре 100 °С в течение 20 мин и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 15 мин. Дальнейшее исследование проводят с супернатантом; б) смывы берут ватным тампоном, смоченным 0,9% раствором хлорида натрия, с поверхности не менее 200-300 см². Тампон помещают в пробирку, содержащую 2-5 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Перед исследованием тампон тщательно отжимают, содержимое пробирки инактивируют на водяной бане при температуре 100 °С в течение 20 мин.

Обработка исследуемого материала до инактивации возбудителя требует соблюдения требований, изложенных в гл. IV Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА СанПиН 3.3686-21.

Проведение иммуноферментного анализа.

1. Гидратация сорбированных антител к Ку-антигену. Во все лунки стрипов вносят по 200-300 мкл раствора ФСРТ. Инкубируют в течение 1-2 мин. при температуре 15-25 °С. Удаляют содержимое лунок в ёмкость с дезинфицирующим раствором с помощью отсасывателя.

2. Связывание Ку-антигена. Одну из лунок (А1) оставляют незаполненной (контроль субстрата). В две лунки вносят по 100 мкл раствора К⁺, в две другие лунки вносят по 100 мкл раствора К⁻, в остальные лунки вносят по 100 мкл исследуемых образцов. Планшет закрывают крышкой или помещают в полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 1 ч при температуре 37 °С. После инкубации лунки промывают 3-хратно раствором ФСРТ.

3. Связывание конъюгата. Во все лунки, кроме А1, вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют при температуре 37 °С в течение 1 ч. После инкубации лунки промывают 5-тикратно раствором ФСРТ.

4. Проведение иммуноферментной реакции. Во все лунки вносят по 100 мкл субстратного раствора. Планшет закрывают крышкой и выдерживают в темноте при температуре 15-25 °С в течение 20 мин.

5. Остановка ферментативной реакции. Реакцию останавливают внесением в каждую лунку по 50 мкл раствора серной кислоты.

Учёт и интерпретация результатов ИФА. При правильном проведении всех стадий анализа содержимое лунок с контролем субстрата и К⁻ остаётся бесцветным или бледно-жёлтым, а содержимое лунок с К⁺ приобретает жёлтую окраску.

Визуальный учёт.

Исследуемый образец регистрируют как положительный, при отчётливых различиях в интенсивности окрашивания по сравнению с растворами в лунках с контролем субстрата и К⁻.

Инструментальный учёт. Оптическую плотность (ОП) измеряют при длине волны 450 нм в лунках планшета с помощью вертикального фотометра. Лунка А1 с контролем субстрата служит в качестве кюветы сравнения. При правильном проведении анализа среднее значение в лунках с К⁺ должно быть не менее $0,60 \pm 0,10$ единиц ОП, в лунках с К⁻ – не должно превышать $0,15 \pm 0,05$ единиц ОП (Табл. 4).

Оценка результатов реакции. Если отношение (А) среднего значения ОП (ОП_{сред}) исследуемого образца к ОП_{сред} К- больше или равно 3 ($A \geq 3$), то результат считается положительным, при отношении ОП_{сред} исследуемого образца к ОП_{сред} К- меньше 3 ($A < 3$) результат оценивают как отрицательный. Положительный результат ИФА свидетельствует о наличии антигенов *S. burnetii* в исследуемом материале, отрицательный – о том, что данным методом антигены не выявлены.

Таблица 4. Пример оценка результатов реакции при инструментальном учёте

Образец	ОП при 450 нм	Среднее значение ОП при 450 нм	Значение А (ОП _{сред} /ОП _{сред} К-)
К-	0,17	0,18	
К-	0,19		
К+	0,92	0,90	
К+	0,88		
Проба 1	0,98	0,96	0,96/0,18 = 5,3
Проба 1	0,94		
Проба 2	0,24	0,22	0,22/0,18 = 1,2
Проба 2	0,20		

Проба 1: $A = 0,96/0,18 = 5,3$ – результат следует оценивать как положительный.

Проба 2: $A = 0,22/0,18 = 1,2$ – результат следует оценивать как отрицательный.

2.2.3. Метод флюоресцирующих антител

Прямым подтверждением лихорадки Ку у больного человека (или животных) является обнаружение в соответствующих материалах *S. burnetii* с помощью иммунолюминесцентного исследования по прямому методу Кунса. Материалом для исследования служит кровь больного. При необходимости обследования животных или членистоногих (определение источника инфекции) целесообразно готовить мазки из околоплодной жидкости, плаценты abortированных животных, органов abortированных плодов, гемолимфы и кишечника кровососущих клещей. Исследование материала на инфицированность *S. burnetii* с применением иммунолюминесцентного метода проводят следующим образом [8].

На тщательно вымытом и обезжиренном предметном стекле делают тонкий мазок или отпечаток исследуемого материала. После высыхания мазок фиксируют этиловым спиртом или ацетоном в течение 30 мин. По мазку синим восковым карандашом делают две окружности диаметром 0,5 см, чтобы создать барьер, препятствующий растеканию люминесцирующей сыворотки.

На одно окружённое поле фиксированного и высушенного мазка наносят каплю разведенной флуоресцирующей сыворотки против *S. burnetii* (рабочее разведение указано на ампуле) в смеси с равным объемом бычьего альбумина, меченного родамином, применяемого для снижения неспецифического свечения исследуемой ткани, а также органических и неорганических частиц, содержащихся в материале (в смеси оба конъюгата должны быть в рабочем разведении). На другое поле наносят гетерологичный или «нормальный» конъюгат, так же в смеси с бычьим альбумином.

Обработку мазков проводят 30 мин при температуре 37 °С во влажной камере (чашка Петри с увлажнённым дном), что предупреждает высыхание конъюгата. Отмывание мазков от избытка флуоресцирующей сыворотки производят в фосфатном буферном растворе (рН 7,2-7,4) в течение 10 мин. После ополаскивания дистиллированной водой препараты высушивают на воздухе и исследуют в люминесцентном микроскопе.

В мазках крови больного лихорадкой Ку человека, биопробах морских свинок и белых мышей *S. burnetii* специфически флуоресцируют в виде ярко светящихся мельчайших коккобациллярных корпускул зелёного цвета. Характерным является расположение возбудителя на поверхности эритроцитов. В контрольных мазках, обработанных нормальной или гетерологичной флуоресцирующими сыворотками, *S. burnetii* не обнаруживаются. Идентифицировать в мазках крови возбудителя можно, при условии, когда в большинстве полей, зрения видно не менее 2-3 флуоресцирующих *S. burnetii*, что соответствует примерно 2-5 млн. бактериальных клеток в 1 мл крови. *S. burnetii* обнаруживаются в мазках крови больного на высоте лихорадки.

Необходимо отметить, что в настоящее время в государственном реестре медицинских изделий Росздравнадзора отсутствуют зарегистрированные препараты иммунофлуоресцентных сывороток.

В ходе эпидемиологического обследования, особенно при работе в природных очагах инфекции, а также при проведении эпидемиологической разведки, возникает необходимость лабораторного исследования, в том числе микроскопическими методами, кровососущих клещей и грызунов.

Исследование клещей. После определения вида клещей, их последовательно промывают в стерильном физиологическом растворе, 70% спирте, затем снова в двух порциях физиологического раствора. После этого у клеща отсекают дистальную фалангу лапки, а выделяющиеся капли гемолимфы распределяют по предметному стеклу. Далее клеща вскрывают, отделяя хитин, и извлекают кишечник, который отмывают в физиологическом растворе, и затем, равномерно растирая, распределяют мазок на предметном стекле. Мазки фиксируют, обрабатывают и исследуют так же, как и мазки крови.

Порядок работы по препарированию клещей, собранных в очагах лихорадки Ку, потенциально инфицированных *C. burnetii*. Работа с материалом проводится в боксе БМБ III класса. Работу по препарированию инфицированных клещей проводят научный сотрудник и лаборант-исследователь, аттестованные на знание правил работы с ПБА II-III группами опасности и допущенные к работе приказом директора учреждения. Выполнение работ следует проводить в противочумном костюме II типа. За соблюдение противоэпидемиологического режима ответственность несёт научный сотрудник.

Готовят 3 раствора для отмывки поверхности иксодид:

- 1) 40 мл 0,5% раствора моющего средства в колбе № 1;
- 2) 40 мл дистиллированной воды рН-7,0 в колбе № 2;
- 3) 40 мл 96% этилового спирта в колбе №3.

Колбы закрывают пробками, нумеруют и ставят в лоток. К каждой колбе ставят пустые колбы (1А, 2А, 3А) с воронками и с фильтрами из фильтровальной бумаги.

Дно лотка выстилают сплошным листом фильтровальной бумаги. По периметру стенок лотка укладывают жгут из ваты, смоченный дистиллированной водой и отжатый до полусухого состояния. На середину лотка помещают чашку Петри, справа от неё 2-а пинцета и ножницы. Предметные стёкла с лунками нумеруют для каждого клеща.

Основные работы. Приготовление мазков из гемолимфы проводится в ламинарном боксе БМБ III класса в противочумном костюме II типа.

Клещей помещают в колбу №1, закрывают колбу пробкой и вращательными движениями жидкости в колбе, промывают клещей в течение 1-2 мин. Затем сливают раствор с клещами через воронку с фильтром в пустую колбу, а клещей с фильтра перекладывают в колбу №2.

Колбу №2 с дистиллированной водой закрывают пробкой и промывают клещей от моющего средства, как указано выше. Затем переливают дистиллированную воду с клещами через воронку с фильтром, в пустую колбу и клещей с фильтра, перекладывают в колбу №3.

Колбу с этиловым спиртом закрывают пробкой и промывают клещей, как указано выше. Затем переливают этиловый спирт с клещами через воронку с фильтром в пустую колбу и клещей перекладывают в чашку Петри на фильтровальную бумагу для просушивания.

Взятие гемолимфы проводят у живых клещей путём ампутации дистальной фаланги лапки. Берут клеща пинцетом за спинку и брюшко, чтобы головка и передние лапки были свободны. Для распрямления лапок слегка сжимают тело клеща пинцетом и ножницами ампутируют дистальный сегмент. Из истекающей гемолимфы делают 2 мазка-отпечатка.

После заполнения всех лунок предметных стёкол мазками-отпечатками, мазки высушивают на открытом воздухе, фиксируют 96% этиловым спиртом в течение 30 мин. Для выявления *S. burnetii* мазки-отпечатки обрабатывают флуоресцирующими иммуноглобулинами к *S. burnetii*, параллельно мазки отпечатки прокрашивают по Здродовскому или Романовскому-Гимзе.

Предметные стёкла с зафиксированными мазками-отпечатками хранят в пластиковом контейнере при температуре минус 18-20 °С.

Клещей, с ампутированными конечностями, сохраняют живыми и используют для дальнейшего исследования гемолимфы, слюнных желёз, яичников и внутренних органов или приготовления суспензий для постановки биопробы на морских свинках или исследования в ПЦР и ИФА.

Исследование грызунов. Как правило, при исследовании грызунов на носительство *C. burnetii* используют селезёнку, в ретикулярных клетках которой *C. burnetii* сохраняются в течение длительного срока.

Мазки-отпечатки готовят так же, как при исследовании грызунов на туляремию или псевдотуберкулез. При необходимости более длительного сохранения материала или его перевозки можно использовать 50% стерильный глицерин, в который погружают селезёнку. Перед приготовлением мазков её промывают в 2-3 порциях физиологического раствора. Затем из селезёнки готовят эмульсию в 5-8 мл физиологического раствора, тщательно растирая её с кварцевым стерильным песком. Через 15-20 мин (после осаждения кусочков ткани) из надосадочной жидкости готовят мазки на предметном стекле; в дальнейшем исследование проводят так же, как при исследовании крови и клещей.

Препараты от клещей и грызунов обрабатывают коксиеллёзной флуоресцирующей сывороткой. В качестве контроля часть мазка (см. выше) целесообразно параллельно обрабатывать анти-туляремийной сывороткой (гетерологичный препарат). Это с одной стороны обеспечивает перекрестный контроль на специфичность, с другой – даёт прямые результаты на инфицированность грызунов и клещей возбудителями двух инфекционных болезней.

2.3. ВЫДЕЛЕНИЕ *COXIELLA BURNETII*

Из образцов проб, в результате исследования которых было подтверждено наличие в них генетических маркеров или антигенов *C. burnetii*, в лабораториях, имеющих разрешительную документацию на работу с возбудителями I – II групп патогенности, может быть продолжена работа по выделению культуры возбудителя следующими методами: биологическим (биопробы), культуральным и бактериологическим.

2.3.1. Биологический метод.

Для культивирования *C. burnetii* в организме лабораторных животных методом биопроб при лихорадке Ку используют, как правило, тот же материал, что и для микроскопического исследования. Микроскопическое исследование и постановку биопроб проводят обычно параллельно. Для биопроб используют морских

свинок (250-300 г), белых, мышей (12-14 г) и развивающиеся куриные эмбрионы (7-дневные) [8].

Лабораторных животных обычно используют для первичного накопления *S. burnetii* в случаях, если исследуемые пробы обильно контаминированы гетерологичными бактериями. Контаминацию гетерологичными бактериями проверяют на стандартных питательных средах [14].

Исследуемый материал растирают, добавляют стерильный физиологический раствор, тщательно эмульгируют и после отстаивания взвеси (или центрифугирования при малых оборотах) вводят внутрибрюшинно или подкожно подопытным морским свинкам (2-3 мл) или белым мышам (0,5-1 мл). При исследовании крови сыворотку отделяют стерильно от сгустка и используют её для серологического исследования. Сгусток растирают с песком, эмульгируют в физиологическом растворе и вводят внутрибрюшинно подопытным животным.

У морских свинок в результате заражения примерно через неделю развивается лихорадка (до 40-41 °С), продолжающаяся 5-7 дней. *S. burnetii* в большом количестве накапливаются в легких, печени и других органах. У белых мышей инфекция протекает, как правило, в скрытой форме, с накоплением большого количества *S. burnetii* в селезенке на 7-9-й день после заражения.

Положительный результат экспериментов доказывается обнаружением возбудителей в мазках-отпечатках из органов животных микроскопией, а также выявлением в их сыворотке крови специфических антител.

Серологическое исследование подопытных животных проводят первый раз через 25-30 дней, второй - через 2 месяца. Если при первом исследовании в сыворотке выявлены, антитела, то животных убивают, а эмульсией селезёнок заражают куриные эмбрионы и параллельно проводят пассаж на свежих морских свинках.

Заражение морских свинок для выделения штаммов S. burnetii.

Морских свинок (самцов) заражают путём введения в брюшную полость инфекционного материала (лиофилизированная культура живых *S. burnetii*, суспензии из желточных мешков РКЭ, зараженных *S. burnetii*, и органов биопробных животных,

суспензия из иксовых клещей и культур клеток). С этой целью лиофилизированную культуру живых *S. burnetii* растворяют в расчётном объёме стерильного фосфатного буферного раствора рН $7,2 \pm 0,1$. Суспензия из желточного мешка готовится из расчёта 3-5 мл стерильного физиологического раствора на 1 мешок. Из органов морской свинки готовят 10% суспензию на физиологическом растворе. Из отмытых в 70% спирте и стерильном физиологическом растворе иксовых клещей готовят 10% суспензию на физиологическом растворе.

Заражение морских свинок выполняют двое сотрудников в помещении, соответствующем требованиям, изложенным в гл. IV Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА СанПиН 3.3686-21. Заражение проводят с помощью стерильного шприца 10 мл с иглой большого калибра длиной 4 см. Материал для заражения набирают в шприц, после чего конец иглы вводят в стерильный ватик.

От попавшего с набираемым в шприц материалом воздуха освобождаются, повернув шприц вертикально вверх иглой, которая предварительно введена в толщу стерильного ватного тампона, упакованного в сложенный по типу конверта небольшой лист пергаментной бумаги. Иглу вкалывают в толщу ватика через складки бумаги, где её не касались руками. Ватики предотвращают разбрызгивание инфекционного материала из шприца, т. е. распространение ПБА в окружающей среде. Кроме того, игла, находясь в ватике, до момента инъекции остаётся стерильной.

Повернув шприц иглой вверх, осторожно выпускают из него пузырьки воздуха. Использованный ватик бросают в ёмкость с дезинфицирующим раствором. Заражение морских свинок представляет собой введение суспензии содержащей *S. burnetii* шприцем в брюшную полость. Для этого лаборант-исследователь фиксирует животное: правой рукой удерживает задние лапы, левой – передние лапы и голову. Животное держат в вертикальном положении головой вниз. В этом положении кишечник смещается в сторону диафрагмы, что в значительной степени уменьшает возможность его повреждения в момент прокола. Научный сотрудник обрабатывает место прокола 70% этиловым спиртом, затем большим и указательными пальцами левой руки захватывает и оттягивает складку кожи вместе с брюшиной в нижней трети жи-

вота. В оттянутую складку кожи вводят иглу и осторожно продвигают её вглубь. Чувство «провала», исчезновение ощущения сопротивления говорят о проникновении иглы в брюшную полость. После этого вводят содержащийся в шприце заражающий материал в объёме 3-5 мл создавая натяжение кожи и мышц брюшной стенки со стороны инъекции. Проникновение иглы ощущается по исчезнувшему сопротивлению брюшной стенки.

Термометрия и наблюдение за заражёнными морскими свинками. Температуру тела животным измеряют в прямой кишке электронным термометром. Перед использованием термометр протирают ватой, смоченной в 70% спирте, вытирают насухо и смачивают вазелиновым маслом. Глубина введения термометра должна быть всегда постоянной, так как от неё зависит температура. Измерение температуры в каждой группе животных в течение всего периода наблюдений производят одним термометром в одно и то же время. Одновременно с термометрией проводят наблюдение за скротальной реакцией, которая является внешним проявлением специфического перiorхита и иногда орхита. Обращают внимание на наличие гиперемии, отёка мошонки и увеличения яичек, которые перестают вправляться в брюшную полость.

Основные работы при вскрытии морских свинок.

Подготовка морской свинки к вскрытию. Вскрытие морских свинок проводят двое сотрудников в микробиологическом боксе на лабораторном столе из нержавеющей стали. Подлежащую вскрытию свинку усыпляют эфиром для наркоза. Усыпленное животное погружают в дезинфицирующий раствор, затем обсушивают шерсть полотенцем и фиксируют свинку животом вверх на специальной доске для вскрытия с приспособлением для фиксации конечностей. Шерсть в области брюшка, мошонки, паха и затылка тщательно удаляют (выщипывают или бреют).

Переднюю поверхность тела перед вскрытием для удаления остатка волос смачивают 96% спиртом и поджигают (завершающее фламбирование). После этого начинается собственно вскрытие, общая схема которого такова:

- 1) наружный осмотр;
- 2) разрезы, отделение покровов, вскрытие полостей и внутренний осмотр положения органов и состояния полостей;

- 3) взятие внутренних органов для исследования;
- 4) взятие головного мозга.

Разрез кожи делают по белой линии от лонной кости (симфиза) до шеи. Чтобы при этом не прорезать брюшину, пинцетом, находящимся в левой руке, приподнимают кожу и делают сначала поперечный надрез складки кожи, удерживаемой пинцетом у симфиза, а затем, вставив одну браншу ножниц в образовавшееся отверстие, разрезают кожу до шеи животного, после чего кожу разрезают по направлению к каждой из четырёх конечностей. Тупым путём кожу отпрепаровывают, открывая её лоскуты вправо и влево. Лоскуты кожи фиксируют корнцангами за верхние и нижние углы (Рис. 3). Наружный листок брюшины обрабатывают ватным тампоном, смоченным 70% спиртом.

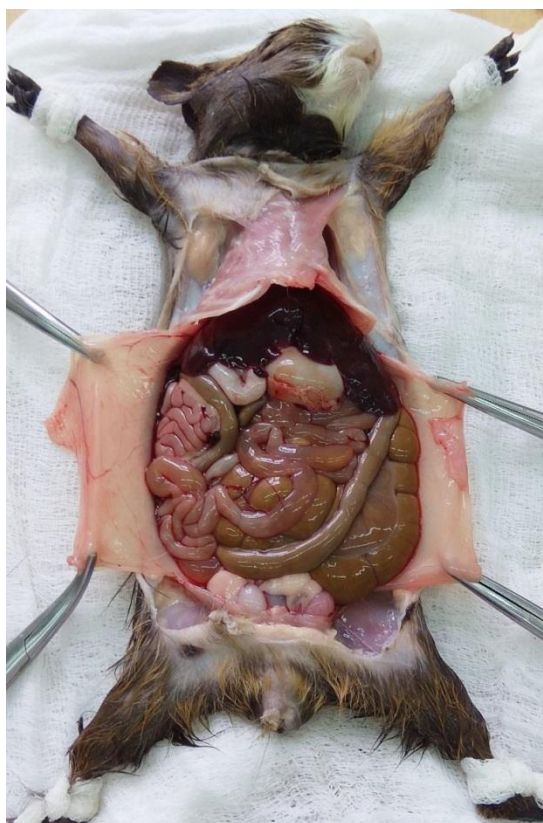


Рис. 3. Вскрытие морской свинки.

Яички, таким образом, оказываются в основании кожного треугольника. Для взятия яичек пинцетом Кохера захватывают за вершину треугольный лоскут кожи и оттягивают вниз. В результате обнажаются яички, покрытые влагалищными оболочками. Если обнажение не удаётся сразу, яички высвобождают из рыхлой клетчатки концом закрытых ножниц при оттягивании кожного лоскута пинцетом Кохера. Освобождённые яички после этого захватывают хирургическим пинцетом, отрезают ножницами от жирового придатка и переносят в 2 пробирки:

в стерильную – для пассивирования на биологических моделях, в пробирку с 70% спиртом – для исследования в ПЦР. Небольшим кусочком ткани органа делают мазки-отпечатки для последующей микроскопии.

Заменив инструменты, вскрывают брюшную полость. Для этого разрез брюшной стенки делают под линией диафрагмы и по белой линии до лонной кости. Треугольники брюшной стенки отводят в

стороны и фиксируют корнцангами. В качестве материала, содержащего *S. burnetii*, наибольший интерес представляют лёгкие, печень и другие органы. У морских свинок селезёнка имеет плоскую форму, размещена дорсолатеральнее желудка, с которой связана короткой брыжейкой. Её длина 2,5-3 см, ширина – 0,8-1 см.

Грудную полость вскрывают, подняв мечевидный отросток пинцетом, ножницами перерезают ребра в области хрящей. Осматривают грудную полость и при наличии изменений в органах описывают их. При наличии патологоанатомических изменений в лёгких, фрагменты органа берут для дальнейшего пассирования, а также делают мазки-отпечатки.

Череп вскрывают, укрепив животное в брюшном положении путём фиксации передних конечностей и головы. Кожу головы и шеи обрабатывают 96% спиртом и поджигают (завершающее фламбирование). Разрез кожи делают перпендикулярно оси тела за ушами, продолжают слева и справа вперёд к глазницам. Кожу вместе с ушами отпрепаровывают и отбрасывают вперёд, оголяя черепную коробку. Одну браншу ножниц вставляют в большое черепное отверстие и режут кости черепа влево и вправо по направлению к глазницам. Затем открывают надрезанную часть черепной коробки. Мозг животных, имеющий мажущуюся мягкую консистенцию, извлекают из основания черепа, подняв его слегка раздвинутыми браншами ножниц и подрезав черепно-мозговые нервы.

Все извлечённые органы делят на части - основную (большую по размеру) помещают в стерильные пробирки для дальнейших пассажей, небольшие фрагменты органов помещают в пробирки с 70% спиртом, а также делают мазки-отпечатки для световой и люминесцентной микроскопии.

Контроль степени накопления *S. burnetii*. Степень накопления *S. burnetii* проверяют микроскопируя мазки, окрашенные методом флуоресцирующих антител и по методу Здродовского. Приготовленные на стерильных предметных стёклах мазки-отпечатки из кусочка ткани желточного мешка высушивают на воздухе и фиксируют в ацетоне в течение 20 мин. Окрашивают по методу Здродовского. Оценку степени накопления *S. burnetii* проводят визуально, накопление *S. burnetii* оценивают по общепринятой четырехкрестовой шкале. Для люминесцентной микроскопии обычно используют РНИФ.

Заключительные работы. После завершения работы удаляют флаконы с органами животных в холодильник, проводят текущую дезинфекцию боксового блока. Остатки инфицированного материала выдерживают в емкости с дезраствором 24 часа с последующим автоклавированием. Рабочую одежду подвергают автоклавированию.

Культивирование *C. burnetii* на лабораторных мышах

В качестве лабораторных животных для культивирования *C. burnetii* обычно используют лабораторных мышей. Различные линии (штаммы) мышей существенно различаются по чувствительности к *C. burnetii*. Так мыши А/Ј более чувствительны к этому патогену, чем С57ВL/6Ј. Из экономических соображений чаще опыты проводят на белых беспородных мышах (самцах). Их чувствительность к *C. burnetii* может быть существенно повышена при применении иммунодепрессантов.

При бактериальной контаминации в гомогенизированные пробы добавляют пенициллин (200 ЕД/мл) и стрептомицин (400 ЕД/мл), выдерживают при комнатной температуре один час и внутрибрюшинно вводят мышам (массой 12–14 г) в объёме 0,5 мл. У белых мышей инфекция, как правило, протекает в скрытой форме, с накоплением *C. burnetii* в селезёнке на 7–9 – день после заражения. Этот орган стерильно извлекают, готовят мазки - отпечатки селезёнки, окрашивают их по методу Гименеса и микроскопируют. Из селезенок мышей, содержащих коксииеллы стерильно готовят гомогенизированные пробы для последующего культивирования *C. burnetii* в развивающихся куриных эмбрионах.

Для воспроизведения лихорадки Ку чувствительной моделью являются морские свинки. В качестве инфицирующего материала может быть использована кровь больного, гомогенизаты различного происхождения (клещи, органы животных), смывы с объектов внешней среды и др., в которых по данным ПЦР были обнаружены генетические маркеры *C. burnetii*, антигены *C. burnetii* с помощью ИФА или гомогенизаты селезенок лабораторных мышей, в которых по методу Гименеса было выявлено небольшое количество возбудителя.

Проверку контаминированности проб гетерологичными бактериями и при необходимости их обработку антибиотиками проводят также как при заражении мышей. Морским свинкам (мас-

сой 200- 250г) внутрибрюшинно вводят 0,5 мл инфицированного материала. Животным ежедневно ректально измеряют температуру. Обычно через неделю (срок в значительной степени зависит от дозы *C. burnetii*) развивается лихорадка (до 40-41 °С), продолжающаяся 4-7 дней. На первые дни лихорадки следует взять кровь у животного и исследовать её с помощью ПЦР. При получении положительного результата этой кровью следует инокулировать куриные эмбрионы.

Культивирование *C. burnetii* в развивающихся куриных эмбрионах.

Исходным материалом (особенно сгустком крови) можно заразить и непосредственно куриные эмбрионы. Для этого в желточный мешок 6-7-дневных развивающихся эмбрионов вводят 0,4-0,5 мл взвеси испытуемого материала. Эмбрионы инкубируют в термостате при 37 °С и ежедневно овоскопируют. Эмбрионы, погибшие до 4-го дня включительно, уничтожают (гибель от посторонних причин), а погибшие в более поздние сроки или оставшиеся живыми до предельного срока инкубации (11-12 дней после заражения) помещают в холодильник до вскрытия.

Эмбрионы вскрывают стерильно, берут желточный мешок, каплю содержимого желточного мешка вносят в сахарный бульон с целью контроля на загрязнение посторонней бактериальной флорой. Из кусочка оболочки желточного мешка делают параллельные мазки. Один из них обрабатывают специфической флуоресцирующей сывороткой, а парный окрашивают по Здродовскому или по Романовскому-Гимзе для световой микроскопии.

Для выделения и пассивирования *C. burnetii* кроме куриных эмбрионов и морских свинок можно использовать белых мышей массой 12-14 г, которых заражают внутрибрюшинно испытуемым материалом. Изолированные культуры кокциелл могут быть лиофильно высушены. В сухом виде культуры *C. burnetii* в холодильнике (+ 4 °С) могут сохраняться в течение десятков лет.

Микробиологические исследования с кокциеллами требуют специальных условий, соблюдения особого режима и разрешения на работу с *C. burnetii* (II группа патогенности). Это ограничивает круг лабораторий Роспотребнадзора, работающих по выделение и изучению возбудителей лихорадки Ку. Иммунологические исследования (см. ниже) не требуют особых условий и должны осуществляться повсеместно.

Техника заражения и вскрытия РКЭ. При заражении и вскрытии развивающихся куриных эмбрионов технологические операции выполняют 2 сотрудника (научный сотрудник и лаборант-исследователь или два научных сотрудника), имеющие разрешение на работу с ПБА II группы патогенности и допущенные к работе приказом руководителя учреждения.

Работу по заражению и вскрытию развивающихся куриных эмбрионов выполняют двое сотрудников в помещении, соответствующем требованиям, изложенным в гл. IV. Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА СанПиН 3.3686-21. За соблюдение противоэпидемического режима при работе отвечают оба сотрудника.

Подготовительные работы. Отбор и инкубирование развивающихся куриных эмбрионов. Для работы используют свежее оплодотворенное куриное яйцо массой 40 ± 5 г, с белой чистой скорлупой. При поступлении в специализированную (риккетсиологическую) лабораторию РКЭ овоскопируют, отбраковывают нежизнеспособные или имеющие дефекты (трещины) скорлупы эмбрионы.

Отобранные РКЭ укладывают на подставки с горизонтальными гнёздами величиной 3,5-4,0 см тупым концом вверх и помещают в термостат. Инкубирование проводят в течение 5-6 суток при относительной влажности воздуха 60-65% и температуре 37 °С. Для заражения используют 6-7 суточные РКЭ [3].

В течение всего периода инкубации РКЭ ежедневно овоскопируют, а также поворачивают вокруг продольной оси. Термостат проветривают ежедневно в течение 30-40 мин.

На 2-4 сутки РКЭ овоскопируют с целью отбраковки погибших и неполноценных эмбрионов. В дальнейшем овоскопию проводят 2 раза в сутки.

Подготавливают боксовый блок к работе. Готовят стерильные растворы и питательные среды (мясо-пептонный агар, мартеновский бульон, тиогликолевая среда). Готовят дезинфицирующие растворы.

Основные работы по заражению РКЭ.

Приготовление взвеси овокультуры живых *C. burnetii*.

РКЭ заражают путём введения в желточный мешок инфекционного материала (лиофилизированная культура живых *C. burnetii*, суспензии из желточных мешков РКЭ, зараженных *C. burnetii*, и органов биопробных животных). С этой целью лиофилизирован-

ную культуру живых *S. burnetii* растворяют в расчётном объёме стерильного фосфатного буферного раствора pH $7,2 \pm 0,1$. Суспензия из желточного мешка готовится из расчёта 3-5 мл стерильного физиологического раствора на 1 мешок. Из органов морской свинки готовят 10% суспензию на физиологическом растворе. Для проведения пассажей заражающую дозу подбирают с таким расчётом, чтобы вызвать максимальную гибель эмбрионов на 8-9-е сутки после заражения [3].

Заражение куриных эмбрионов проводят двое сотрудников. Для этого скорлупу 5-6 дневных РКЭ обрабатывают 70% этиловым спиртом, а место прокола 5% спиртовым раствором йода на площади не более, чем $0,5 \times 0,5$ см, который затем удаляется спиртовым тампоном. Затем смоченную 96% спиртом поверхность яйца обжигают. Скорлупу над воздушной камерой прокалывают стерильным троакаром (смоченный 96% спиртом троакар прожигают в пламени спиртовки). Заражение РКЭ проводят с помощью стерильного шприца с иглой среднего калибра длиной 3-4 см. Заражение РКЭ по Коксу представляет собой введение суспензии *S. burnetii* шприцем в полость желточного мешка через воздушную камеру. Для этого яйцо берут левой рукой так, чтобы тупой его конец с отмеченной воздушной камерой был направлен вперёд при расположении отметки эмбриона внизу. Через отверстие в скорлупе на глубину 2,5-3 см вводят иглу шприца и инъецируют жидкость, содержащую *S. burnetii* в объёме 0,5 мл. Иглу вынимают, а отверстие в скорлупе герметизируют расплавленным стерильным парафином. После заражения и герметизации на яйцах делают карандашом надписи с обязательным указанием номера РКЭ, заражающего материала (название штамма, суспензия органов биопробного животного и др.) и даты. По окончании каждого серийного заражения делают контрольные высевы на стерильность в сахарный бульон.

Инкубирование и овоскопия развивающихся куриных эмбрионов. Зараженные РКЭ инкубируют в термостате в условиях, как описано в выше и ежедневно овоскопируют для определения жизнеспособности куриных эмбрионов. Оптимальной для эмбрионов, зараженных *S. burnetii* является температура 37°C .

Эмбрионы, погибшие ранее 3-х суток (травматическая гибель), отбраковывают, помещают в ёмкость с дезинфицирующим раствором и обезвреживают автоклавированием при температу-

ре 132 ± 2 °С в течение 1 часа. При дальнейшей ежедневной ово-скопии отбирают для вскрытия погибшие эмбрионы (отсутствие подвижности, сглаженный сосудистый узор) или явно больные (ограниченная подвижность, менее ясный сосудистый узор). Погибшие эмбрионы выдерживают в течение 24-48 часов при температуре культивирования или в условиях постепенного снижения температуры в отключённом термостате.

Основные работы при РКЭ. Вскрытие развивающихся куриных эмбрионов выполняют двое сотрудников в помещении, соответствующем требованиям, изложенным в гл. IV Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА СанПиН 3.3686-21 (см. выше). За соблюдение противоэпидемического режима при работе отвечают оба сотрудника. Работа проводится в защитных костюмах I типа. Куриные эмбрионы на подложке переносят из термостата в бокс, предварительно обработав в предбоксе ватным тампоном, смоченным 70% спиртом. Тупой конец яйца, подлежащий вскрытию, обрабатывают спиртом и йодом, как указано выше (заключительное фламбирование). Затем скорлупу яиц прокалывают профламбированным пинцетом немного выше границы воздушной камеры и циркулярно надламывают на том же уровне. Отделённый фрагмент скорлупы помещают в ёмкость с дезинфицирующим раствором для эмбрионов. Пинцет помещают в ёмкость с дезинфицирующим раствором для инструментов.

Для дальнейшей работы используют два стерильных профламбированных пинцета. Хорион-аллантаисную оболочку отслаивают пинцетом и удаляют, извлекают пинцетами эмбрион, отделяют его за пупочный канатик, захватывают желточный мешок, избавляются от содержимого желточного мешка, оставляя его оболочку, которую помещают во флакон со стеклянными бусами, предварительно отделив небольшие кусочки желточной оболочки для приготовления мазка-отпечатка. Флакон закрывают ватно-марлевыми пробками. Для приготовления мазков стерильным пинцетом захватывают небольшой кусочек желточного мешка с хорошо выраженным сосудом, максимально избавляются от примеси желтка, используя стерильную фильтровальную бумагу. Затем этим тканевым кусочком наносят тонкие мазки на поверхность хорошо обезжиренных предметных стёкол. На шлифованный край стекла простым карандашом наносится маркировка.

Флаконы с желточными оболочками маркируют с указанием штамма *C. burnetii*, № заражённого эмбриона и даты вскрытия. Затем флаконы с инфицированными желточными оболочками помещают в низкотемпературный холодильник и хранят при температуре минус 70 ± 5 °С до получения результатов контрольных исследований (контроля стерильности желточных оболочек и контроля степени накопления *C. burnetii*).

Контроль стерильности желточных оболочек. Проводят путём посева кусочка ткани желточной оболочки на сахарный мартемовский бульон. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37 ± 1 °С в течение 2-х суток. Отсутствие роста посторонней микрофлоры свидетельствует о стерильности посевного материала. Нестерильные желточные оболочки подвергают автоклавированию при условиях, указанных выше.

Контроль степени накопления *C. burnetii*. Степень накопления *C. burnetii* проверяют микроскопируя мазки, окрашенные методом флуоресцирующих антител и по методу Здродовского. Приготовленные на стерильных предметных стёклах мазки-отпечатки из кусочка ткани желточного мешка высушивают на воздухе и фиксируют в ацетоне в течение 20 мин. Окрашивают по методу Здродовского. Оценку степени накопления *C. burnetii* проводят визуально, накопление *C. burnetii* оценивают по общепринятой четырехкрестовой шкале. Для люминесцентной микроскопии обычно используют РНИФ.

Заключительные работы. После завершения работы удаляют флаконы с инфицированным материалом в холодильник, посевы с желточной оболочки переносят в термостат, проводят текущую дезинфекцию боксового блока. Остатки инфицированных куриных эмбрионов выдерживают в ёмкости с дезраствором 24 часа с последующим автоклавированием. Рабочую одежду подвергают автоклавированию.

2.3.2. Культуральный метод.

Метод культивирования *C. burnetii* на клеточных культурах в России, по данным литературы, не применялся. В зарубежных лабораториях его используют, как правило, для исследования материала от больных людей [43, 52, 62]. Возможно использование разных клеточных линий: DH82 и Vero характеризовались наибольшей чувствительностью к *C. burnetii*, а L929 и ХТС – наименьшей [40].

В качестве инокулята используют гепаринизированную кровь, гомогенизированные клапаны сердца, лимфатические узлы, биопсию легкого или кожи, костный мозг и др. Клетки эукариот, выращенные на среде MEM с 10% фетальной коровьей сыворотки и 2 mM L-глутамина, со стерильными покровными стёклами 12 мм, инкубируют 3 суток при 37°C и 5% CO₂ до достижения монослоя. При посеве крови образец центрифугируют при 1000 об/мин 1 час. Затем вносят в клеточную культуру 0,5 мл образца. Другие образцы вносят в объеме 1 мл. Клетки с инокулятом центрифугируют 1 час при 500-700 g, затем супернатант удаляют, дважды промывают клетки стерильным фосфатно-солевым буфером и заливают культуральной средой. Инокулированные клетки культивируют 10-20 суток. Количество *C. burnetii* определяют микроскопированием клеток на покровных стёклах с помощью окраски по методу Гименеса. Удовлетворительным накоплением считают десятки клеток *C. burnetii* не менее, чем в 50% клеток эукариот. Если количество кокциелл меньше – клетками эукариот инокулируют куриные эмбрионы. При удовлетворительном количестве *C. burnetii* проводят их идентификацию.

2.3.3. Бактериологический метод.

Сравнительно недавно разработана среда АССМ-2 для выращивания *C. burnetii* [54]. Коммерческим препаратом является продукт «2x АССМ-2» (Sunrise Science, США). Бактериологический метод в России, по данным литературы, не применялся.

Данная среда рекомендована как для культивирования *C. burnetii* из клинического материала, так и для культивирования «чистых» штаммов кокциелл. Однократную среду готовят согласно инструкции производителя, стерилизуют фильтрацией через мембраны 0,22 мкм.

Исследуемый материал, например, в случае хронической лихорадки Ку, кусочки клапанов сердца, гомогенизируют в 3 мл стерильного фосфатно-солевого буфера. 0,6 мл суспензии ткани добавляют к среде АССМ-2 до конечного объёма 20 мл и культивируют в флаконе градации «для клеточных культур» площадью дна 25 см² в газовой среде, содержащей 92,5 N₂, 5% CO₂, 2,5% O₂. На 5, 7 и 14 сутки после инокуляции отбирают аликвоты [32]. Количество *C. burnetii* определяют микроскопированием клеток с помощью окраски по методу Гименеса. Удовлетворительным

накоплением считают десятки микробных клеток не менее, чем в 50% полей зрения. Если количество кокциелл меньше – клетками инокулируют куриные эмбрионы. При удовлетворительном количестве *C. burnetii* проводят их идентификацию.

2.3.4. Методы идентификации и генотипического изучения *C. burnetii*, включая секвенирование

Идентификацию, выделенной культуры *C. burnetii*, проводят в два этапа.

1-й этап – исследование с помощью реагентов для выявления ДНК *C. burnetii* методом ПЦР «АмплиСенс *Coxiella burnetii* – FL» или «ОМ-Скрин-ККГЛ/Ку-РВ» («Синтол»), либо по общедоступным протоколам [16, 23].

2-й этап – для подтверждения амплификации ДНК *C. burnetii* используется метод ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру гена 16S рРНК [50]. Суммарную ДНК из исследуемого образца выделяют с помощью общедоступных наборов для выделения ДНК; для постановки ПЦР применяются общедоступные мастер-миксы либо наборы реагентов. ПЦР проводится с использованием праймеров E8F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG и E1541R AAGGAGGTGATCCANCCRCA; конечная концентрация праймеров 0,5 мкМ, условия амплификации: денатурация 2 мин. 94 °С; 30 циклов: 1 мин 94 °С, 1 мин 55 °С, 1 мин. 72°С; 10 мин 72 °С [31]. Далее ампликоны (продукты ПЦР) очищаются с помощью общедоступных наборов для очистки продуктов ПЦР [21] и анализируются с помощью секвенирования по методу Сэнгера с помощью анализатора нуклеиновых кислот (секвенатора) и соответствующих расходных реагентов для каждого типа анализатора, с помощью секвенирующих праймеров прямого E341R: (TGCIGCCICCCGTAGG) и обратного E1115F (CAACGAGCGCAACCCT) [50].

Очистка (пурификация) ПЦР-продуктов

ПЦР – продукты после амплификации подвергают очистке [21], применяя Microcon-PCR Filter Units в соответствии с инструкцией.

Методика очистки:

- 1) В каждый фильтр, помещенный в пробирку типа «Эппендорф», объемом 1,5 мл, вносят 400 мкл дистиллированной воды (для отмывки образца);
- 2) В каждый фильтр вносят 20 мкл ампликона;

- 3) Центрифугируют при 3 200 об/мин в течение 15 мин;
- 4) Пробирку с содержимым сбрасывают;
- 5) Фильтр помещают в чистую пробирку;
- 6) В фильтр вносят 20 мл дистиллированной воды (для элюации ДНК);
- 7) Экспозиция 2 мин;
- 8) После экспозиции фильтр вынимают из пробирки переворачивают и помещают в пробирку;
- 9) Центрифугируют при 3 200 об/мин в течение 20 мин;
- 10) Фильтр сбрасывают, очищенный образец ДНК в пробирке готов для секвенс-реакции.

Секвенирование

Синтез цепи ДНК начинают с добавления к ней праймера (комплементарного), ДНК-полимеразы и смеси четырех дидезоксинуклеотидов (ddA; ddC; ddG; ddT) [21]. Конец 5' метится флюоресцентным красителем или P³² (радиоактивный фосфор) что позволяет установить местонахождение молекулы ДНК в геле. Смесь разделяют на четыре пробирки, в каждую из которых добавляют по одному из дидезоксинуклеотидов. Рост каждой молекулы ДНК заканчивается, когда к ней случайно присоединяется дидезоксинуклеотид. Если в последовательности, состоящей из 100 оснований, гипотетически имеется 25 положений для аденина А, то в большинстве из них будет прикреплен обычный аденин dA, однако ddA будет достаточно чтобы синтезировалось 25 молекул различного размера, заканчивающихся аденином. При внесении вещества из пробирки в гель и проведении электрофореза молекулы ДНК будут разделены на 25 частей и образуют 25 полос. По этому же принципу произойдет разделение молекул ДНК и в трех остальных пробирках. Для определения всей последовательности ДНК состоящей из 100 оснований необходимо сопоставить все полосы, полученные при разделении фрагментов ДНК полученных в каждой из 4 пробирок.

Секвенс-реакция

Секвенс-реакцию с ПЦР-продуктами выполняют, применяя d-Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) в соответствии с инструкцией по применению.

Секвенс-реакцию с ПЦР-продуктами каждой пробы выполняют в двух пробирках: в первой с прямым праймером, во второй с обратным [21].

Стандартный протокол для ПЦР, с использованием d-Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit:

1) В пробирки для проведения ПЦР вносят по 3 мкл d-Rhodamine Terminator;

2) В каждую пробирку вносят по 4 мкл дистиллированной воды;

3) В первую пробирку вносят 0,5 мкл раствора содержащего прямой праймер (10 пМоль/мкл) – E341R: (TGCIGCCICCCGTAGG);

4) Во вторую пробирку вносят 0,5 мкл раствора содержащего обратный праймер (10 пМоль/мкл) – E1115F (CAACGAGCGCAACCCT);

5) В каждую пробирку вносят по 3 мкл очищенного образца ДНК.

Методика:

Пробирки с пробами для секвенс-реакции помещают в амплификатор.

Реакцию выполняют в следующем режиме: денатурация 5 мин. 96 °С; 25 циклов: 30 сек. 96 °С, 20 сек. 55 °С, 2 мин. 60 °С.

Преципитация (осаждение) ДНК

1) После секвенс-реакции для осаждения ДНК, меченной d-Rhodamine Terminator в каждую микропробирку (содержащую 10 мкл меченой ДНК) вносится 26 мкл дистиллированной воды и 64 мкл 96° этилового спирта [21]. Инкубируют в темноте в течение 20 мин при комнатной температуре.

2) Осаждение ДНК, меченной d-Rhodamine Terminator, завершают центрифугированием при 3 000 об/мин в течение 30 мин;

3) Переворачивают пробирки и центрифугируют при скорости 800 об/мин в течение 1 мин.

4) Подсушивают осадок образца ДНК, меченной d-Rhodamine Terminator.

5) В каждую пробирку добавляют по 15 мкл формамида.

6) Встряхивают содержимое пробирки на «Вортексе»;

7) Пробирки с образцами для секвенирования помещают в планшет и ставят в секвенатор.

Секвенирование выполняют на ABI 3100 PRISM (Applied Biosystems) автоматическом секвенаторе или другой модели.

Консенсус последовательностей, полученных с прямым и обратным праймерами в секвенс-реакции

После секвенирования осуществляют консенсус последовательностей, полученных в секвенс-реакции с каждым из праймеров (прямым и обратным), применяя программу «Sequencher 4,2 Demo» [21], другое общедоступное программное обеспечение, например, Unipro UGENE или аналоги [53].

Идентификация установленных нуклеотидных последовательностей в Genbank

Полученные нуклеотидные последовательности идентифицируют в режиме прямого доступа с нуклеотидными последовательностями, депонированными в базе данных GenBank с помощью программы NCBI BLAST [21].

Для реконструкции филогенетических деревьев по сравнению штаммов и изолятов рекомендуется применять выравнивание по алгоритму MUSCLE, построение по алгоритму Neighbor-joining с бутстрепом не менее 500 [50].

После идентификации *C. burnetii*, содержащиеся в удовлетворительном количестве в оболочках желточных мешков, клеточных культурах или выращенные на среде АССМ-2, помещают в ампулы, их лиофильно высушивают или хранят при температуре -80 °С. *C. burnetii* сохраняет жизнеспособность в течение десятков лет.

Внутривидовое типирование микроорганизма.

При исследовании традиционными методами микробиологического анализа практически невозможно выделить специфические особенности фенотипа отдельных штаммов *C. burnetii* или их групп, кроме того, их применение затрудняется чрезвычайно высокой контагиозностью патогена, специфической внутриклеточной нишей, в которой микроорганизм обитает в естественных условиях, и сложной процедурой культивирования. Типирование *C. burnetii* проводится, как правило, с помощью методов молекулярной биологии. Идентификация отдельных изолятов *C. burnetii* и их групп с помощью молекулярно-биологических методов является важнейшим инструментом в изучении как эпидемиологических вопросов, например, при возникновении вспышек лихорадки

ки Ку, так и в решении фундаментальных задач, направленных на изучение эволюции этого микроорганизма как достаточно необычного патогена [58].

Определение геномной группы изолята.

При исследовании геномных характеристик *S. burnetii* по доступным в базах данных полным геномам, разные группы исследователей выделяют шесть или восемь геномных групп, изоляты которых характеризуются определёнными свойствами и, как правило, обнаруживаются в определённых географических регионах. Предполагается, что у штаммов отдельных геномогрупп, может быть, разный патогенетический потенциал при оценке в системах *in vivo* с использованием модельных животных (морских свинок) [40].

Разделение на геномные группы является достаточно трудоёмким процессом не только ввиду необходимости использования систем высокопроизводительного секвенирования для получения нуклеотидных последовательностей штамма либо геномной гибридизации на микрочипах, но и ввиду отсутствия общепринятого, стандартизированного протокола обработки данных (пайплайна). В то же время, отдельные алгоритмы и программные продукты для анализа геномов позволяют проводить исследования в области молекулярной эпидемиологии *S. burnetii* [41, 45, 57].

Типирование с использованием спейсерных участков генома.

Разработана методика генотипирования штаммов и изолятов *S. burnetii* с помощью анализа нуклеотидной последовательности некодирующих межгенных спейсеров, более вариабельных, нежели кодирующие участки генома [42], основанная на применении ПЦР с праймерами к консервативным участкам спейсеров с последующим секвенированием ампликонов по Сэнгеру. Этот подход применяется для типирования штаммов и изолятов *S. burnetii*, в настоящее время выделяют более 60 разных типов MST (multi-spacer types) [51, 56]. Данный метод также называют «геотипированием», поскольку наблюдается приуроченность отдельных типов к определённым географическим регионам, в то же время существуют и типы, распространенные сразу на нескольких континентах [40]. Панель из спейсеров, обладающая максимальной дискриминирующей способностью, состоит из десяти спейсеров, хотя в ряде исследований типирование проводят лишь с некоторыми из них.

Мультилокусное типирование tandemных повторов перемной копииности.

В геномах многих микроорганизмов были обнаружены мини- и микросателлитные повторы, размер которых варьировал у разных штаммов и изолятов в зависимости от числа копий повторяющегося элемента (мотива повтора). Методика типирования штаммов и изолятов *S. burnetii* с помощью оценки длин tandemных повторов была разработана и апробирована на выборке из изолятов различного географического происхождения [29, 58]. В оригинальной схеме использовалось 17 локусов мини- и микросателлитов, ряд исследователей в дальнейшем использовали лишь часть из этих локусов. Особенностью данного метода является то, что длина локуса сателлита может быть оценена не только с помощью секвенирования по Сэнгеру, но и с помощью фрагментного анализа с флюоресцентно меченым праймером, что значительно упрощает и удешевляет стоимость анализа; в простейших экспериментах с минисателлитами может использоваться гель-электрофорез в высокоразрешающих агарозных гелях, что дополнительно снижает затраты. Проводились исследования изолятов одновременно методами мультилокусного VNTR-анализа (MLVA) и типирования спейсеров, результаты, как правило, достаточно конкордантны [56]. В то же время, есть данные о том, что метод типирования tandemных повторов обладает не стопроцентной межлабораторной воспроизводимостью [40]. В зависимости от технических возможностей исследователи могут выбрать либо метод типирования спейсеров, либо использовать оба метода для более полной характеристики изолятов.

Анализ полноразмерных геномов S. burnetii, основанный на математическом моделировании методом формального анализа строя

Применение комплексного подхода, основанного на использовании инструментов формального анализа строя, позволяет провести изучение происхождения штаммов *S. burnetii* во время массовой заболеваемости (вспышке) людей лихорадкой Ку. Как это было апробировано применительно к вспышке, произошедшей в Нидерландах в 2007-2010 годах, что позволило дать оценку их эпидемической значимости [24, 57].

Полноразмерные геномы 10 штаммов и 8 плазмид *C. Burnetii* (Табл. 1) были загружены из базы данных GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome и изучены с применением программ «карты генов» и «матрицы сходства» [57].

Применение «матрицы сходства» позволило выделить шесть групп штаммов *C. burnetii*:

- штаммы NL3262 и Z3055 (генотип CbNL01), имеющие 84,9% компонентов хромосом с полной гомологией, что в 1,8-7,0 раз больше, чем у других штаммов, отличающихся по структуре хромосом и большим количеством копий генов кодирующих транспозазу IS110 (клад 1a и 1b);

- штамм RSA 493 NMI (генотип CbNL12) и его клоны RSA439 clone 4 NMII, RSA 439 NMII с высоким процентом гомологичных компонентов хромосом 86,89 и 85,56 соответственно, по структуре хромосом близкие к штамму Z3055 (клад 2). Распределение по группам 1 и 2 не противоречит, а объясняет равноудалённую позицию штамма Z3055, по данным Kuley с соавт. [46];

- штамм RSA 331, равноудалённый по показателю процента компонентов с полной гомологией хромосом по отношению к первой группе штаммов: NL3262 (47,14%), Z3055 (46,15%) и второй: RSA 493 (36,05%), RSA439 clone 4 (37,33%), RSA 439 (36,84%), а также плазмид штаммов обеих групп (34,48-50,0%), а по структуре хромосомы наиболее близок штамму NL3262 (клад 2);

- бесплазмидный штамм CbuG_Q212 (Scurry генотип), имеющий низкий процент компонентов с полным сходством (гомологией) с хромосомами других штаммов 13-19,05% (клад 3);

- штаммы CbuK_Q154 и «MSU Goat Q177», содержащие высокий процент компонентов с полной гомологией хромосом (76,55%) и максимальный по плазмидам QpRS (95,75%), но низкий по отношению к хромосомам (12,06-22,2%) и плазмидам (6,74-10,87%) других штаммов, что позволяет судить об общности их происхождения и отдалённой позиции в отношении других штаммов (некластеризованные штаммы разных генотипов);

- штамм Dugway 5J108-111, имеющий низкий процент компонентов хромосомы с полной гомологией по отношению к хромосомам всех других штаммов (17,15-22,2%) и плазмиде pQpDG (5,56-8,93%) (некластеризованные штаммы разных генотипов).

Два штамма *C. burnetii*, выделенные от козы (NL3262) и овцы (Z3055), продемонстрировали тесную связь, сохранив при этом высокий процент компонентов, имеющих полную гомологию (84,9%). В хромосомах этих штаммов могла произойти выраженная коллинеарная перегруппировка в результате возрастания количества инсерционных элементов, связанная со сменой хозяина. Необходимо отметить, что эти два штамма имели один тип плазмиды QpH1.

Три штамма, включая оригинальный Nine Mile (NMRSA493, phase I), выделенный из клещей *D. andersonii* (Табл. 1), а также NMRSA 439 (phase II), полученный на культуре клеток и NMRSA439 (phase II, clone 4), выделенный от человека, продемонстрировали реорганизацию геномов [57]. Эта перестройка геномов соответствовала изменению фазового состояния *C. burnetii* из фазы I в фазу II в результате перехода микроорганизма к человеку и на культуру клеток, что продемонстрировало аналогичный процент компонентов хромосом, имеющих полную гомологию (85,56-86,89%). В обоих случаях перестройка генома могла привести к адаптации микроорганизма к новой экологической нише.

Ослабление ветеринарно-санитарного контроля способствовало созданию условий для развития эпизоотического процесса и формированию очагов коксидиоза с последующим заражением персонала ферм по производству козьего сыра. Во время эпизоотии, могла произойти смена экологической ниши (хозяина) *C. burnetii* – переход «овечьего» Z3055-подобного штамма к «козьему» – NL3262. На это указывает высокий процент компонентов хромосом с полной гомологией, что сопровождалось резким увеличением количества копий IS110, вызвавшим рост вирулентности, с дальнейшим формированием эпидемически значимых штаммов (NLhu3345937, 42785537 и NL-Limburg).

Подтверждена важная роль коз в эпидемиологии лихорадки Ку как источника возбудителя с учётом клональности штаммов NL3262 и NL-Limburg, выделенных во время подъема заболеваемости в Нидерландах, при высоком проценте гомологичных компонентов хромосом и плазмид штаммов «MSU Goat Q177» и K_Q154, также выделенных от козы и человека.

Массовость заболеваний могла быть обусловлена высоким риском заражения населения при реализации аэрогенного механизма передачи возбудителя – *C. burnetii*.

Впервые на основании анализа и сравнения полноразмерных геномов *C. burnetii* было продемонстрировано, что штамм Z3055, выделенный из абортированной плаценты овцы является наиболее близким со штаммом NL3262, выделенным в Нидерландах из абортированной плаценты козы.

Применение инструментов математического моделирования (формального анализа строя позволило) за счёт более тонкой дифференциации структуры геномов позволило выделить шесть групп штаммов *C. burnetii*.

Полученные результаты позволили сделать предположение о происхождении штаммов, вызвавших значительное осложнение эпидемической ситуации лихорадки Ку в Нидерландах в 2007-2010 гг. Показано, что ведущим мотивом в реорганизации генома *C. burnetii* является адаптация штамма к новой экологической нише (хозяину).

2.4. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ КУ

В настоящее время в России специфическая диагностика лихорадки Ку в подавляющем большинстве случаев осуществляется с помощью серологических методов [20]. В ответ на заражение *C. burnetii* в организме человека на ранних стадиях инфекции образуются антитела на белковые компоненты микробной клетки – антитела к коксиеллам II фазы. На поздней стадии острой инфекции или при хроническом течении болезни синтезируются антитела на липополисахаридные компоненты клетки возбудителя, так называемые антитела к *C. burnetii* I фазы.

2.4.1. Правила получения и хранения материала для серологической диагностики.

Для серологического исследования (определение антител) необходимы две пробы сыворотки крови, 1-я проба берётся в день постановки предварительного диагноза (как правило, 5-6 дни болезни), 2-я проба – через 1-2 недели после первой. Взятие крови осуществляется из вены в объёме 3-4 мл, или из третьей фаланги среднего пальца в объёме 0,5-1,0 мл в одноразовую пластиковую пробирку без антикоагулянта. Пробы крови отстаивают при комнатной

температуре в течение 30 мин или помещают в термостат при 37 °С на 15 мин. После центрифугирования (10 мин при 3000 об/мин) сыворотку переносят в стерильные пробирки, используя для каждого образца отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Срок хранения цельной крови – не более 6 ч, при комнатной температуре, замораживание недопустимо. Срок хранения сыворотки крови при комнатной температуре – не более 6 ч, при температуре 2-8 °С – в течение 5-10 суток. Допускается хранение сыворотки в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18 °С не более 1 года. Перед использованием образцы размораживают при температуре от 16 до 25 °С и перемешивают встряхиванием. Образцы проб сывороток, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием 10 мин. при 6000 об./мин.

Не допускается использование исследуемого материала, прошедшего термообработку, консервированного азидом натрия, с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом.

Повторное замораживание сыворотки не допускается.

Иммунологические методы диагностики лихорадки Ку включают в себя серологические тесты, из которых наиболее часто в настоящее время применяют иммуноферментный анализ (ИФА), из «классических» серологических методов, наиболее эффективно применявшихся ранее, необходимо отметить РСК и реакцию агглютинации (РА), которая ранее считалась обязательной для лабораторного диагноза лихорадки Ку. Кроме того, были разработаны дополнительные иммунологические пробы: реакция микроагглютинации (РМА) с диагностикумом из *S. burnetii*, меченных изотиоционатом флуоресцеина, реакция непрямой иммунофлуоресценции по методу Кунса, реакция кольцепреципитации с растворимым антигеном из *S. burnetii* I-й фазы.

Иммунологические реакции применяют для лабораторного подтверждения диагноза лихорадки Ку у больных людей и выявления переболевших, обнаружения инфекции у сельскохозяйственных и домашних животных, равно как среди диких грызунов, для оценки эффективности вакцинации и других эпидемиологических вопросов. Серологические реакции – необходимый этап комплекса исследований по изоляции и идентификации возбудителя.

2.4.2. Иммуноферментный анализ.

Серологическую диагностику лихорадки Ку у людей можно осуществлять с применением ИФА тест-систем отечественного и зарубежного производства, зарегистрированных в Росздравнадзоре (Табл. 2). Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgG к антигенам коксииелл Бернета» (ИФА-анти-Ку-G) производства ФБУН «Санкт-Петербургский НИИЭМ им. Пастера» Роспотребнадзора предназначен для серологической текущей и ретроспективной *in vitro* диагностики лихорадки Ку по наличию антител IgG-класса в сыворотке крови человека с помощью качественного иммуноферментного анализа для осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора. Набор реагентов может быть применён для осуществления мероприятий по контролю и профилактике внебольничных пневмоний (гл. XL. Профилактика внебольничных пневмоний СанПиН 3.3686-21) для исключения лихорадки Ку. Набор реагентов предназначен для специалистов учреждений Роспотребнадзора (центры гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ, противочумные учреждения, научные организации, санитарно-эпидемиологические службы министерств и ведомств), а также специалистов медицинских учреждений, имеющие специальность врача клинической лабораторной диагностики.

Целевым анализом, выявляемым набором реагентов, являются сывороточные антитела класса IgG к антигенам *S. burnetii*, присутствие которых в сыворотке свидетельствует об инфицированности обследуемого человека возбудителем лихорадки Ку и при наличии клинико-эпидемиологических данных позволяет диагностировать лихорадку Ку (пункт 1408 гл. XVII. Профилактика коксииеллеза (Лихорадка Ку) СанПиН 3.3686-21). IgG-антитела к *S. burnetii* могут сохраняться в течение длительного времени после перенесения заболевания, поэтому их обнаружение при стёртой клинической картине является основанием для повторного исследования через 10-12 дней. Четырёхкратное увеличение титра антител к *S. burnetii* в «парных сыворотках» указывает на текущую инфекцию, а отсутствие изменения титра антител свидетельствует о перенесённом заболевании в прошлом.

Анализируемые образцы. Исследуемые образцы сыворотки крови хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 3 суток от момента взятия крови. Допускается хранение сыворотки в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18 °С не более 1 года. Перед использованием образцы размораживают при температуре от 16 до 25 °С и перемешивают встряхиванием. Образцы проб сывороток, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием 10 мин. при 6000 об./мин.

Не допускается использование исследуемого материала, прошедшего термообработку, консервированного азидом натрия, с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным пропуском ввиду возможной интерференции гемоглобина, липидов и бактериальных продуктов с коксифеллезными антителами, что может привести к ложноположительным результатам. Обязательным условием является разбавление анализируемой сыворотки перед использованием в 400 раз, что гарантирует нивелирование действия возможных интерферентов, присутствующих в следовых количествах. Повторное замораживание сыворотки не допускается.

Проведение анализа.

Подготовка сывороток. Выполняют предварительное разведение (1:20), смешав 5 мкл исследуемой сыворотки с 95 мкл раствора для разведения исследуемых проб (РИП) в разведении 1:20. Для этого используют дополнительный 96-луночный планшет. В случае необходимости титрования сывороток разводить их раствором РИП с шагом 2. Разведённые сыворотки хранению не подлежат.

Подготовку раствора фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСРТ), раствора конъюгата и субстратного раствора осуществляют в соответствии с инструкцией по применению тест-системы ИФА.

Проведение иммуноферментного анализа. Для регидратации сорбированный Ку-антиген перед использованием промыть раствором ФСРТ: в лунки внести по 250 мкл раствора ФСРТ и выдержать в течение 5 мин. при температуре 20 ± 2 °С. Затем раствор из лунок удалить с помощью автоматического промывателя (вошера).

Одну из лунок (А1) оставить незаполненной в качестве контроля субстрата, другую (В1) оставить незаполненной для контроля конъюгата, в две лунки (А2 и В2) внести по 100 мкл раствора К+, в две другие (А3 и В3) – по 100 мкл раствора К-. В остальные лунки

внести по 95 мкл раствора ФСРТ и по 5 мкл предварительно разведённой в РИП в 20 раз исследуемой сыворотки. В результате чего исследуемая сыворотка в лунке разбавляется в 400 раз. Планшет закрыть крышкой и выдержать во влажной камере при температуре 37 ± 1 °С в течение 1 ч. После инкубации содержимое лунок удалить автоматическим отсасывателем в сосуд, заполненный до половины 6% раствором перекиси водорода, затем лунки промыть, внося в каждую не менее 250 мкл раствора ФСРТ и удаляя раствор автоматическим отсасывателем. Промывать 3 раза. После последней промывки удалить остаточную влагу постукиванием перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Связывание конъюгата. Во все лунки, за исключением А1, внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет закрыть крышкой или поместить во влажный полиэтиленовый пакет и инкубировать при температуре 37 ± 1 °С в течение 1 ч во влажной камере. Затем содержимое лунок удалить автоматическим отсасывателем и промыть 5 раз.

Проведение ферментативной реакции. Перед проведением ферментативной реакции планшет промыть дистиллированной водой для удаления остатков ФСРТ. Для этого во все лунки внести по 250 мкл дистиллированной воды и выдержать 5 мин. при температуре 20 °С, затем воду удалить автоматическим отсасывателем. Во все лунки планшета внести по 100 мкл субстратного раствора. Планшет поместить в защищенное от света место и выдержать 20 мин. при 15-25 °С.

Остановка ферментативной реакции. Во все лунки внести по 50 мкл Стоп-реагента.

Учёт и интерпретация результатов реакции. Учёт результатов анализа проводить спектрофотометрическим методом не позднее, чем через 30 мин. после внесения Стоп-реагента при длине волны 450 нм с помощью анализатора иммуноферментного ИФА-ОЭП-001 (г. Москва) или аналогичного ему. При проведении измерений осуществить установку «нулевого» уровня ОП по лунке А1 («бланк») с контролем субстратного раствора, вводя на приборе автоматический режим вычитания ОП А1 из значений ОП во всех остальных лунках. Результат учитывается, если значение ОП в лунках с К⁻ не превышает 0,10 оптических единиц (о.е.), а значение ОП в лунках с К⁺ не менее 0,70 о.е.

Оценка результатов производится следующим образом. Если отношение среднего значения ОП (ОП_{ср}) исследуемой сыворотки к ОП_{ср} К– ≥ 3 , и при этом ОП_{ср} исследуемой сыворотки имеет значение выше 0,50 о.е., то этот результат следует оценивать как положительный, и сыворотка содержит антитела класса IgG к антигену *C. burnetii*. Если отношение ОП_{ср} исследуемой сыворотки к ОП_{ср} К– меньше 3 или ОП_{ср} исследуемой сыворотки $\leq 0,50$ о.е., то этот результат следует оценивать как отрицательный, и сыворотка не содержит антител класса IgG к антигену *C. burnetii*.

Положительный результат ИФА, то есть выявление антител к *C. burnetii*, может свидетельствовать как о текущем заболевании Ку-лихорадкой, так и об инфицированности (или иммунизации) *C. burnetii* в прошлом.

Для дифференциации положительных результатов ИФА анамнестического характера от текущего заболевания следует сравнить титры сывороточных антител к антигенам *C. burnetii* в динамике болезни с интервалом 10-12 дней в ранний период её клинических проявлений.

Титром антител считают наибольшее разведение сыворотки, при котором результаты ИФА оцениваются как положительные. Нарастание титров в 4 и более раз подтверждает наличие текущей коксиеллёзной инфекции. В случае отсутствия возможности исследования парных сывороток, обнаружение антител к *C. burnetii* при значительных разведениях сыворотки (1:3200 и выше) может свидетельствовать в пользу недавно перенесённой лихорадки Ку.

Наборы производства Vircell S.L. предназначены для выявления антител только к *C. burnetii* фазы II, так как для сенсibilизации планшетов был использован штамм Nine Mile (ATCC VR – 616), находящийся в этом фазовом состоянии. В отечественной системе производства ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», СПб, использован гидролизный антиген российского штамма *C. burnetii* фазы I, что позволило значительно повысить чувствительность ИФА за счёт пространственной демаскировки антигена *C. burnetii* фазы II при сохранении или даже активации антигена фазы I. Выявление антител к *C. burnetii* с помощью указанных реагентов

проводиться в соответствии с инструкциями производителей. Установлено, что при сравнении результатов исследования сывороток крови больных лихорадкой Ку и реконвалесцентов (от 1-й недели болезни до 4 лет после заболевания) антитела к *S. burnetii* были выявлены в 97+ 1,7%, 91+ 3,3%, 87+ 2,8% и 63+4,8% случаев соответственно с помощью ИФА, с набором отечественного производства, НМФА, РА, и РСК. Набор реагентов «ИФА – анти Ку G» позволяет обнаружить антитела к коксиеллам как на ранних сроках лихорадки Ку, так и на протяжении ряда лет после перенесения заболевания, что обосновывает целесообразность применения этого набора для ИФА не только для лабораторной диагностики, но и для сероэпидемиологического надзора за инфекцией [2].

Для лабораторной диагностики случаев острого коксиеллеза исследование сывороток крови больного следует проводить в первые дни лихорадочного периода болезни. Как правило, с помощью «ИФА – анти Ку G» антитела к *S. burnetii* выявляются на 5-7 день лихорадки. IgM- антитела к *S. burnetii* могут выявляться несколько раньше. Для лабораторного подтверждения лихорадки Ку необходимо повторное одновременное исследование «парных сывороток» (см. выше).

Для постановки окончательного диагноза лихорадки Ку необходим комплекс серологических, клинических и эпидемиологических данных.

2.4.3. Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента. Сущность реакции заключается в связывании комплемента комплексом антиген+антитело, что обнаруживается в присутствии индикатора (бараньих эритроцитов, сенсibilизированных гемолитической сывороткой). При образовании специфического комплекса антиген+антитело последний связывает комплемент, вследствие чего после добавления гемолитической системы не возникает гемолиза. Если комплекс антиген+антитело не образуется, то свободный комплемент вызывает гемолиз сенсibilизированных эритроцитов. Таким образом, положительный результат РСК характеризуется отсутствием или задержкой гемолиза, а отрицательный – феноменом гемолиза [8].

Реакцию связывания комплемента можно ставить при 37 °С и путём длительного связывания на холоде (при +4 °С). Последний способ чувствительнее, но требует большого срока для завершения исследования (около суток); поэтому для диагностических целей обычно применяют метод постановки РСК в термостате, что позволяет закончить исследование в течение одного дня.

Для постановки РСК необходимы 5 ингредиентов: 1) испытуемая сыворотка, 2) антиген, 3) комплемент, 4) гемолитическая сыворотка, 5) эритроциты барана.

Реакцию ставят в общем объёме 0,5 мл, т.е. берут по 0,1 мл каждого ингредиента. Обязательным условием постановки РСК является использование точно оттитрованных компонентов.

Для обеспечения точности получаемых результатов необходимо пользоваться отдельной посудой (пробирки, пипетки, колбы), хорошо вымытой и высушенной в сухожаровом шкафу.

Для каждого ингредиента реакции используют отдельную пипетку. Все разведения делают в свежеприготовленном стерильном физиологическом растворе (0,85% раствор химически чистого хлорида натрия в дистиллированной воде).

Исследуемую сыворотку прогревают перед опытом в течение 30 мин при 56-58 °С (для разрушения содержащихся в ней комплемента и ингибиторов).

Антиген, применяемый для серодиагностики лихорадки Ку с помощью РСК, представляет собой очищенную взвесь убитых *C. burnetii*, выращенных в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов и находящихся во II-й фазе. Этот препарат выпускается в сухом виде, перед постановкой опыта его разводят физиологическим раствором.

Антиген *C. burnetii* титрует изготовитель. В соответствии с данными титрования на этикетке сухого антигена указывают объём жидкости, в котором он должен быть растворен. Антиген из *C. burnetii* II-й фазы снабжён наставлением по его применению. Учитывая, что у реконвалесцентов и переболевших могут быть антитела и к I-й фазе возбудителей, серологические исследования желательнее проводить в РСК с двумя антигенами из *C. burnetii* I-го и II-го фазовых состояний.

Антигены из *C. burnetii* в I-й фазе представляют очищенную взвесь убитых *C. burnetii*, прошедших после выделения лишь несколько пассажей на куриных эмбрионах. Антиген I-й фазы может быть получен и из селезенок белых мышей, инфицированных *C. burnetii* в I-й фазе. Антиген из *C. Burnetii* I-й фазы промышленностью не выпускается, но он может быть приготовлен в любой лаборатории, имеющей право работы с этим возбудителем.

Комплемент применяют согласно прилагаемой к этому препарату инструкции. Комплемент следует титровать каждый раз перед постановкой опыта.

Гемолитическая сыворотка выпускается в ампулах; это сыворотка кролика, иммунизированного по определённой схеме взвесью бараньих эритроцитов. На этикетке гемолитической сыворотки указан её титр. В опыт гемолитическую сыворотку вводят в тройном титре: например, рабочий титр, указанный на этикетке, равен 1:1000; в этом случае в опыт берут сыворотку, разведённую 1:600. При длительном хранении первоначальный титр гемолитической сыворотки может снижаться. Проверку её титра производят следующим образом (Табл. 5). Готовят основное разведение сыворотки 1:100 (0,1 мл сыворотки + 9,9 мл физиологического раствора). В ряд пробирок последовательно разливают по 0,2 мл разведений сывороток, начиная с 1:1000; в каждую пробирку добавляют комплемент в разведении 1:10 в объёме 0,2 мл и по 0,2 мл 3% взвеси бараньих эритроцитов; затем доливают в каждую пробирку по 0,4 мл физиологического раствора. Смесь ингредиентов выдерживают в термостате при 37 °С в течение 1 ч. По наличию полного гемолиза эритроцитов судят о титре сыворотки. Схема титрования гемолитической сыворотки представлена в таблице 5.

Бараньи эритроциты получают сами. Кровь, взятую из яремной вены барана, дефибрируют во флаконе со стеклянными бусами, процеживают через стерильную марлю и хранят в холодильнике при температуре от 0 до +4 °С. Перед опытом дефибрированную кровь многократно отмывают при центрифугировании физиологическим раствором (до исчезновения следов гемолиза) и готовят взвесь эритроцитов.

Таблица 5. Схема титрования гемолитической сыворотки

Ингредиенты опыта	Разведение гемолитической сыворотки									
	1:1000	1:1200	1:1600	1:2000	1:2400	1:2800	1:3000	1:3200	1:3600	1:4000
Гемолитическая сыворотка	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
3% взвесь бараньих эритроцитов	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент в разведении 1:10	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Оценка результатов опыта	-	-	-	-	++	++++	++++	++++	++++	++++
Титр гемолитической сыворотки 1: 2000										

Титрование комплемента. Постановке основного опыта РСК предшествует титрование комплемента с целью определения его рабочей дозы. Титрование комплемента ведут в присутствии антигена.

Из основного разведения комплемента 1:5 или 1:10 рассчитывают его дозы в 1 мл (Табл. 6).

Таблица 6. Схема разведения комплемента

Ингредиенты реакции	Дозы комплемента								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Комплемент в разведении 1:10 (мл)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Физиологический раствор (мл)	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1

Затем ставят опыт титрования комплемента (Табл. 7).

Таблица 7. Опыт титрования комплемента

Ингредиенты реакции	Дозы комплемента								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Комплемент в различных дозах	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Антиген	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физиологический раствор	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Гемолитическая система	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Оценка результатов	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-

Оттитрованный комплемент ставят в термостат при 37 °С на 1 ч. Через час добавляют гемолитическую систему (выдержанную в термостате в течение 30 мин) и через 30 мин производят учёт результатов.

Оценка результатов титрования комплемента заключается в определении степени задержки гемолиза: отсутствие гемолиза (полная его задержка) обозначается четырьмя крестами (++++); почти полная задержка (следы гемолиза) обозначается тремя, крестами (+++); частичная задержка гемолиза оценивается двумя крестами (++) и, наконец, следы задержки (почти полный гемолиз) – одним крестом (+).

Единицей комплемента считают то наименьшее его количество, которое вызывает полный гемолиз, эритроцитов. В приведённом примере эта единица соответствует 5-й дозе. За полную единицу комплемента принимают вторую пробирку полного гемолиза, в данном примере – 6-я доза. Под рабочей дозой комплемента понимают его количество, содержащееся во второй пробирке с полным гемолизом, т.е. одна полная единица комплемента при проведении связывания в термостате при 37 °С в течение 1 часа.

Постановка основного опыта. Испытуемые, сыворотки, инактивированные при 56 °С 30 мин, разводят физиологическим раствором и разливают в пробирки (или в лунки полистироловых панелей) по 0,1 мл. К различным разведениям исследуемых сывороток добавляют 0,1 мл антигена и 0,1 мл комплемента в его рабочей дозе. После тщательного встряхивания пробирки ставят в термостат при 37 °С на 1 ч или в холодильник при +4 °0 на 16-20 ч (I-я фаза реакции).

Каждый опыт должен сопровождаться следующими контролями:

1) контроль всех испытуемых сывороток (0,1 мл сыворотки в исходном разведении + 0,1 мл комплемента в рабочей дозе + 0,1 мл физиологического раствора);

2) контроль антигена (0,1 мл антигена + 0,1 мл комплемента в рабочей дозе + 0,1 мл физиологического раствора);

3) контроль комплемента (0,1 мл комплемента в рабочей дозе + 0,2 мл физиологического раствора);

4) контроль гемолитической системы (к 0,3 мл физиологического раствора добавляет 0,2 мл гемолитической системы).

Кроме того, необходимо в качестве контроля вводить в опыт заведомо положительную и отрицательную сыворотки с их контролями. Положительную сыворотку разводят до её титра.

На втором этапе в каждую пробирку или лунку панелей добавляют по 0,2 мл гемолитической системы, предварительно выдержанной в термостате при 37°C 30 мин. Пробирки или панели тщательно встряхивают и ставят в термостат на 20-30 мин в зависимости от гемолиза эритроцитов в контролях (табл. 8).

В пробирках с заведомо положительной сывороткой и в контроле гемолитической системы должна наблюдаться задержка гемолиза.

Оценка главного опыта заключается в определении степени задержки гемолиза в пробирках с испытуемыми сыворотками по сравнению с соответствующими контролями, в которых возник полный гемолиз. Титром сыворотки считают наибольшее её разведение, характеризующееся задержкой гемолиза на четыре или три креста. При резко положительных результатах феномен задержки гемолиза сохраняется на протяжении ряда часов.

Результаты реакции считают достоверными, если в контролях испытуемых сывороток и контроле антигена и комплемента имеется полный гемолиз, а в контроле гемолитической системы гемолиз отсутствует.

Таблица 8. Схема постановки основного опыта РСК

Ингредиенты	Разведения сывороток							Контроль сыворотки	Контроль антигена	Контроль комплемента	Контроль гемолитической системы
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640				
Сыворотка	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-
Антиген	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	-
Комплемент	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
Физиологический раствор	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,2	-
при 37°C на час											
Гемолитическая система	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
при 37°C на 20-30 мин											

В связи с тем, что комплементсвязывающие антитела редко обнаруживаются в первые две недели заболевания, РСК мало пригодна для ранней диагностики. Наиболее высокие титры наблюдаются на 4-5-й неделе от начала лихорадки. После перенесения болезни комплементсвязывающие антитела в невысоких титрах (1:10-1:20) сохраняются в крови на протяжении ряда лет, что обеспечивает возможность ретроспективной диагностики лихорадки Ку с помощью этой пробы.

Комплементсвязывающие антитела в сыворотках больных и реконвалесцентов не являются однородными: в острой стадии заболевания образуются антитела к *S. burnetii* II-й фазы, а позднее, по мере выздоровления, в сыворотке больных появляются антитела и к I-й фазе кокциелл.

При дифференцировании положительных результатов РСК анамнестического характера от реакций, наблюдаемых при остром заболевании, учитывают высоту титров, наличие или отсутствие динамики накопления комплементсвязывающих антител, а при возможности и соотношения IgM и IgG антител. Эти критерии следует принимать во внимание при постановке других серологических проб.

2.4.4. Реакция агглютинации

Реакцию ставят в пробирках в объёме 0,4 мл. К восходящим разведениям прогретой сыворотки, начиная с 1:5 в объёме 0,2 мл, добавляют равный объём антигена [8]. Каждый опыт сопровождают контролем исследуемой сыворотки (к 0,2 мл основного её разведения добавляют 0,2 мл физиологического раствора). Рекомендуется в качестве контроля исследовать также заведомо положительную и отрицательную сыворотки. Реакцию проводят в термостате при 37 °С в течение 18-20 ч. Результаты её учитывают через 2 ч после выдерживания при комнатной температуре. Положительные реакции характеризуются возникновением агглютината на дне пробирки.

Учёт результатов РА осуществляют обязательно с помощью агглютиноскопа. Оценку интенсивности положительных реакций проводят по следующей условной шкале: полное просветление надосадочной жидкости и компактные агглютинаты обозначают

три крестами (+++); неполное просветление при наличии четких агглютинатов - двумя крестами (++) ; слабо выраженные агглютинаты оцениваются одним крестом (+). При заключении о титре сыворотки слабоположительные реакции (\pm) не принимают в расчёт. Контроль антигена – равномерная мутная взвесь, контроль сыворотки должен быть прозрачным.

В качестве антигена используют производственные серии диагностикума, предназначенного для РСК II-й фазы (при наличии антигена из I-й фазы реакцию лучше ставить с обоими антигенами), так как он является корпускулярным, что необходимо для РА. В данной реакции этот антиген используют обычно в удвоенной концентрации (в ампулу с сухим антигеном добавляют физиологический: раствор в объёме в 2 раза меньшем, чем указано на этикетке).

Для подтверждения острого заболевания, как и при использовании других реакций, необходимо учитывать нарастание концентраций антител в динамике.

2.4.5. Реакция непрямой иммунофлюоресценции

Эта реакция демонстративна благодаря феномену флюоресценции и не уступает по специфичности и чувствительности другим серологическим тестам. С помощью этой пробы можно выявить антитела на более ранних сроках, чем в РСК.

РНИФ может быть использована для диагностики лихорадки Ку у больных, для ретроспективного исследования переболевших, а также для определения инфицированности *C. burnetii* крупного и мелкого рогатого скота [8].

Постановка РНИФ.

1-й этап. Сухой антиген, из *C. burnetii* II-й фазы, используемый для серодиагностики лихорадки Ку в РСК, является корпускулярным, поэтому он может быть использован в РНИФ.

В ампулу с сухим антигеном за день до приготовления препаратов добавляют 1 мл дистиллированной воды с целью насыщения корпускул *C. burnetii* влагой. На следующий день из этого основного разведения готовят рабочее разведение в физиологическом растворе до концентрации, обеспечивающей в каждом поле зрения примерно 200-300 бактериальных клеток при ис-

следовании препаратов, обработанных по прямому методу флуоресцирующих антител.

На предметные стекла, хорошо вымытые и обезжиренные, наносят капли антигена в соответствующем рабочем разведении. На каждое стекло наносят 4-8 мазков. Этого количества достаточно для испытания одной или двух сывороток.

Мазки хорошо высушивают на воздухе, фиксируют спиртом или ацетоном в течение 20 мин и сохраняют до использования при температуре от 0 до +4 °С. Препараты необходимо оберегать от увлажнения. Такие мазки пригодны для работы в течение месяца.

Из испытуемых сывороток, предварительно прогретых в течение 30 мин при 56°С, готовят двукратные разведения в физиологическом растворе (от 1:10 до 1:80, а при необходимости и выше).

2-й этап. Каждую каплю антигена, прежде чем нанести испытуемую сыворотку, обводят восковым карандашом, чтобы создать ориентир (облегчающий микроскопирование) и барьер, препятствующий растеканию испытуемой сыворотки, а на втором этапе – флуоресцирующего антивидового конъюгата. Разведения сыворотки наносят на мазки антигена и выдерживают 45 мин во влажной камере при 37 °С. Затем препарат промывают фосфатным буферным раствором (рН 7,2-7,4) в течение 10 мин и высушивают на воздухе.

3-й этап. После высушивания на мазки наносят антивидовой (соответствующий испытуемой сыворотке) люминесцирующий гамма-глобулин в рабочем разведении (разведение указано на этикетке каждой ампулы), мазки вновь выдерживают во влажной камере 30 мин при 37 °С. В качестве антивидовых препаратов применяют люминесцирующие сыворотки против гамма-глобулина человека, коровы, овцы и т.д. (в зависимости от видовой принадлежности испытуемых сывороток).

Далее препараты промывают в двух порциях буфера в течение 10 мин и высушивают на воздухе.

В качестве контроля в каждый опыт, вводят заведомо положительную и отрицательную сыворотки. Контроль люминесцирующей антивидовой сыворотки: антиген обрабатывают непосредственно антивидовой люминесцирующей сывороткой.

4-й этап. Учёт результатов реакции. Препараты исследуют в люминесцентном микроскопе объектив 90х, окуляр 8х. Применя-

ют светофильтры, которые обычно используют для препаратов, обработанных конъюгатами изотиоцианата флуоресцеина.

Просматривают не менее 20 полей зрения. Оценку результатов титрования сывороток проводят на основании яркости флуоресценции *S. burnetii* в антигене. Для этого используют условную систему обозначения при помощи крестов.

++++ – яркая, сверкающая флуоресценция;

+++ – отчетливо выраженная, достаточно яркая флуоресценция с характерным для данного флуорохрома цветом (в данном случае зелёный). Морфология *S. burnetii* выявляется хорошо, у отдельно лежащих корпускул видны чёткие колечки (ободки) за счёт более яркого свечения комплекса антител с поверхностным антигеном;

++ – флуоресценция слабая, морфология клеток и цвет люминесценции выявляются достаточно чётко;

+ – флуоресценция очень слабая, морфология *S. burnetii* различима плохо, неопределённый;

- – флуоресценция отсутствует.

Титром сыворотки считают то наибольшее её разведение, которое обуславливает свечение кокциелл на ++.

Контроль флуоресцирующей антивидовой сыворотки – свечение *S. burnetii* отсутствует при обработке антигена флуоресцирующей антивидовой сывороткой в рабочем разведении.

2.4.6. Определение класса антител к *S. burnetii* в диагностике лихорадки Ку

Упомянутые выше серологические тесты позволяют дифференцировать иммунологический ответ, возникающий в результате «острого» инфекционного процесса при лихорадке Ку, от следовых реакций, как правило, только при использовании парных сывороток, что обуславливает позднее распознавание природы болезни и не всегда рациональное лечение больных. Дифференцирование антител по классам иммуноглобулинов расширяет возможности серологических реакций и позволяет в ряде случаев диагностировать лихорадку Ку без обязательного исследования сывороток в динамике. Этот метод, может быть, с успехом использован в крупных лабораториях.

Метод основан на том, что редуцирующие вещества, содержащие сульфгидрильные группы (этантиол, цистеин, меркамин – и др.)

разрушают дисульфидные связи, соединяющие субъединицы макроиммуноглобулинов, в результате чего эти иммуноглобулины теряют антительную активность. С целью дифференцирования антител, исследуемые сыворотки, разведённые 1:5 в свежеприготовленном физиологическом растворе, смешивают с равным, объёмом редуцента - этантиола (в конечном разведении последнего 0,06 М), пробирки тщательно закрывают резиновыми пробками. Контрольные порции сывороток (без этантиола) смешивают с физиологическим раствором [8]. Опытные и контрольные пробы выдерживают при комнатной температуре 3 ч, после чего, прогревают 30 мин при 56 °С. Работа с этантиолом должна проводиться в вытяжном шкафу, так как этот препарат обладает большой летучестью и неприятным запахом. Контрольные и опытные порции сывороток исследуют в РСК по вышеописанной методике. Если концентрация антител в обработанных и необработанных сыворотках совпадает, их определяют как IgG антитела. Четырёхкратное и более снижение титров антител в сыворотках, подвергшихся воздействию этантиола, по сравнению с контрольными, рассматривают как преобладание в сыворотке IgM антител. Обнаружение IgM антител является показателем «свежести» иммунологического ответа при лихорадке Ку и подтверждает диагноз без обязательного повторного серологического обследования больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Шапошникова Л.И., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Варфоломеева Н.Г., Куличенко А.Н. Мониторинг природно-очаговых инфекций на юге европейской части России в 2016 году // Здоровье населения и среда обитания. 2018. № 1 (298). С. 30-32.
2. Горбачев Е.Н., Токаревич Н.К., Вербов В.Н. и др. Иммуноферментный метод индикации антигенов коксиелл Бернета. // Журн. микробиол. 1991. № 2. С. 56-60.
3. Здродовский П.Ф., Голиневич Е.М. Учение о риккетсиях и риккетсиозах. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1972. – 496 с.
4. Злобин В.И., Рудаков Н.В., Малов И.В. Клещевые трансмиссивные инфекции. Наука, 2015. – 224 с.
5. Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL». Утверждена приказом Росздравнадзора от 26.09.2012 № 1619-Пр/12.
6. Клинические рекомендации «Лихорадка Ку у взрослых». Рассмотрены и рекомендованы к утверждению Профильной комиссией Минздрава России по специальности «инфекционные болезни» на заседании 25 марта 2014 года и 8 октября 2014 года.
7. Краева Л.А., Токаревич Н.К., Лаврентьева И.Н., Рощина Н.Г., Кафтырева Л.А., Кунилова Е.С., Курова Н.Н., Стоянова Н.А., Антипова А.Ю., Сварваль А.В., Зуева Е.В., Порин А.А., Рогачева Е.В., Желтакова И.Р., Хамитова И.В., Тимофеева Е.В., Беспалова Г.И. Инфицированность трудовых мигрантов из Средней Азии и постоянных жителей Санкт-Петербурга возбудителями различных инфекционных заболеваний и восприимчивость к ним. // Инфекция и иммунитет. 2018. № 1. С. 61-70.
8. Методические рекомендации «Лабораторная диагностика лихорадки Ку». Ленинград, 1980.
9. Методические рекомендации «Серологические методы диагностики риккетсиозов». Москва, 1998.

10. Методические рекомендации «Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика лихорадки Ку». МР 3.1.0281-22. Москва, 2022.

11. Методические указания «Серологическая диагностика лихорадки Ку у животных Минсельхоза СССР». 1984.

12. Методические указания «Сбор, учёт и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций» МУ 3.1.1027-01. 2001.

13. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» МУ 1.3.2569-09. Москва. 2009.

14. Методические указания «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях» МУК 4.2.2942–11. Москва. 2011.

15. Методические указания «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний». МУК 4.2.3115–13. Москва. 2014.

16. Панферова Ю.А., Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Карпенко С.Ф., Галимзянов Х.М. Сравнение диагностической эффективности методов детекции *Coxiella burnetii* в крови больных лихорадкой Ку на основе амплификации фрагментов гена 16S рРНК (стандартная ПЦР) и гена groEL (ПЦР в режиме реального времени) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 3. С. 70-74.

17. Рудаков Н.В., Фетисова Н.Ф., Сыскова Т.Г. Коксиеллез в Российской Федерации // Здоровье населения и среда обитания. 1994. №. 2. С. 10-12.

18. Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика инфекционных болезней. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Коксиеллез (лихорадка Ку)» СП 3.1.095-96. ВП 13.3.1221-96. 1996.

19. Санитарные правила и нормы «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» СанПиН 3.3686-21. Москва. 2021.

20. Токаревич Н.К., Фрейлихман О.А. Коксиеллезы // В кн.: Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. Долгов В.В., Меньшиков В.В. 2012. Том 2. С. 335-341.

21. Учебное пособие «Применение молекулярно-биологических методов исследования в микробиологии». Учебное пособие УМО №17-28/304 от 02.0.08. – Омск: изд-во ОмГМА, 2008. – 89 с.

22. Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Кондрашова В.Д. Лабораторные методы диагностики Ку-лихорадки и генотипирование *Coxiella burnetii*. // Инфекционные болезни. 2017. № 2. С. 49-60.

23. Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Фаизов Т.Х., Фахрутдинов Н.А., Камалдинов И.Н., Усольцев К.В. Генетические маркеры возбудителей особо опасных заболеваний, характеризующихся природной очаговостью // Ветеринарный врач. 2020. № 1. С. 67-73.

24. Шпынов С.Н., Гуменюк А.С., Поздниченко Н.Н., Скиба А.А. Молекулярно-эпидемиологический скрининг генома штамма *Coxiella burnetii* NL3262 (Netherlands, 2009) методом формального анализа строя // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2018. № 6. С.57-69. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-6-57-69>.

25. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Зеликман С.Ю. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Российской Федерации в период с 1957 по 2019 год. Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 3. С. 141-146. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-3-141-146>.

26. Яковлев Э.А., Борисевич С.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. Заболеваемость лихорадкой Ку в Российской Федерации и странах Европы: реалии и проблемы. Проблемы особо опасных инфекций, вып. 4, 2015, С. 49-54.

27. Amitai Z., Bromberg M., Bernstein M. et al. A Large Q Fever Outbreak in an Urban School in Central Israel. Clin. Infect. Dis. 2010; 11(50): 1433–8.

28. Anderson A.D., Kruszon-Moran D., Loftis A.D. et al. Sero-prevalence of Q fever in the United States, 2003–2004. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009; 4 (81): 691–4.

29. Arricau-Bouvery N., Hauck Y., Bejaoui A., Frangoulidis D., Bodier C.C., Souriau A., Meyer H., Neubauer H., Rodolakis A., Vergnaud G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing // BMC Microbiol. 2006. Vol.6. P.38.

30. Bae M., Jin C.E., Park J.H., Kim M.J., Chong Y.P., Lee S.O., Choi S.H., Kim Y.S., Woo J.H., Shin Y., Kim S.H. Diagnostic usefulness of molecular detection of *Coxiella burnetii* from blood of patients with suspected acute Q fever // *Medicine (Baltimore)*. 2019. Vol.98. e15724. doi: 10.1097/MD.00000000000015724.
31. Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers // *J Microbiol Methods*. 2003. Vol. 55. P. 541–555. doi:10.1016/j.mimet.2003.08.009.
32. Boden K., Wolf K., Hermann B., Frangoulidis D. First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell-free medium (ACCM2) // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015. Vol. 34. P. 1017–1022. doi:10.1007/s10096-015-2321-1.
33. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.R., Garrity G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed, Vol 2, Proteobacteria, Part B (The Gammaproteobacteria). Springer, New York. 2005; 1 – 1136.
34. Buysse M., Plantard O., McCoy K., Duron O., Menard C. Tissue localization of *Coxiella*-like endosymbionts in three European tick species through fluorescence in situ hybridization // *Ticks Tick Borne Dis*. 2019. Vol. 10. P. 798-804. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.03.014.
35. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanska S. Q fever outbreaks in Poland during 2005–2011. *Med. Sci. Monit*. 2013; 19: 1073–9.
36. Cisak E., Chmielewska-Badora J., Mackiewicz B. et al. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among farming population in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med*. 2003; 10: 265–7.
37. De Alarcon A., Villanueva J.L., Viciano P., Lopez-Cortes L. et al. Q fever: epidemiology, clinical features and prognosis. A study from 1983 to 1999 in the South of Spain. – *J. Infect*. 2003; 47: 110–6.
38. Dijkstra F., van der Hoek W., Wijers N. et al. The 2007–2010 Q fever epidemic in the Netherlands: characteristics of notified acute Q fever patients and the association with dairy goat farming. *FEMS Immunol. – Med Microbiol*, 2012. – 64: 3–12.
39. Eldin C., Angelakis E., Renvoisé A., Raoult D. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France // *Am J Trop Med Hyg*. 2013. Vol. 88. P. 765-769. doi: 10.4269/ajtmh.12-0212.
40. Eldin C., Mélenotte C., Mediannikov O., Ghigo E., Million M., Edouard S., Mege J.L., Maurin M., Raoult D. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. // *Clin Microbiol Rev*. 2017. Vol.30. P. 115-190. doi: 10.1128/CMR.00045-16.

41. Freylikhman O., Kiselev A., Kazakov S., Sergushichev A., Panferova Y., Tokarevich N., Kostareva A. Draft Genome Sequence of *Coxiella burnetii* Historical Strain Leningrad-2, Isolated from Blood of a Patient with Acute Q Fever in Saint Petersburg, Russia // *Genome Announc.* 2018. Vol. 18;6(3). doi: 10.1128/genomeA.01464-17.
42. Glazunova O., Roux V., Freylikman O., Sekeyova Z., Fournous G., Tyczka J., Tokarevich N., Kovacava E., Marrie T.J., Raoult D. *Coxiella burnetii* genotyping // *Emerg Infect Dis.* 2005 Vol. 11. P. 1211-1217.
43. Gouriet F., Fenollar F., Patrice J.-Y., 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. Vol. 43. P. 4993–5002. doi: 10.1128/JCM.43.10.4993-5002.2005.
44. Gottlieb, Y., Lalar, I., and Klasson, L. "Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks." *Genome Biol. Evol.* (2015) 7:1779-1796.
45. Hemsley C.M., O'Neill P.A., Essex-Lopresti A., Norville I.H., Atkins T.P., Titball R.W. Extensive genome analysis of *Coxiella burnetii* reveals limited evolution within genomic groups // *BMC Genomics.* 2019. Vol. 20. P. 441. doi: 10.1186/s12864-019-5833-8.
46. Kuley R., Kuijt E., Smits M.A., et al. Genome Plasticity and Polymorphisms in Critical Genes Correlate with Increased Virulence of Dutch Outbreak-Related *Coxiella burnetii* Strains // *Front Microbiol.* 2017. N 8. P. 1526.
47. Ladbury G.A., Van Leuken J.P., Swart A., et al. Integrating interdisciplinary methodologies for One Health: goat farm re-implicated as the probable source of an urban Q fever outbreak, the Netherlands, 2009 // *BMC Infect Dis.* 2015. N 15. P. 372.
48. Madariaga M. G., Rezai K., Trenholme G. M., Weinstein R. A. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis.* 2003 Nov;3(11):709-21.
49. Maurin M., Raoult D. Q fever // *Clin Microbiol Rev.* 1999. Vol.12. P.518-553.
50. 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. Vol. 12. e0189910. doi: 10.1371/journal.pone.0189910.

51. Mioni MSR., Sidi-Boumedine K., Morales Dalanezi F., Fernandes Joaquim S., Denadai R., Reis Teixeira W.S., Bahia Labruna M., Megid J. New Genotypes of *Coxiella burnetii* Circulating in Brazil and Argentina // Pathogens. 2019. Vol. 9. pii: E30. doi: 10.3390/pathogens9010030.

52. Musso D., Raoult D. *Coxiella burnetii* blood cultures from acute and chronic Q-fever patients. J Clin Microbiol. 1995. Vol. 33. P. 3129–3132.

53. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. Vol. 28. P.1166-1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.

54. Omsland A., Beare P.A., Hill J., Cockrell D.C., Howe D., Hansen B., Samuel J.E., Heinzen R.A. Isolation from animal tissue and genetic transformation of *Coxiella burnetii* are facilitated by an improved axenic growth medium // Appl Environ Microbiol. 2011. Vol.77. P. 3720-3725. doi: 10.1128/AEM.02826-10.

55. Pradeep J., Stephen S., Ambroise S., Gunasekaran D. Diagnosis of Acute Q Fever by Detection of *Coxiella burnetii* DNA using Real-Time PCR, Employing a Commercial Genesig Easy Kit // J Clin Diagn Res. 2017. Vol.11. DC10-DC13. doi: 10.7860/JCDR/2017/31005.10606.

56. Santos A.S., Tilburg J.J., Botelho A., Barahona M.J., Nuncio M.S., Nabuurs-Franssen M.H., Klaassen C.H. Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA typing // Int J Med Microbiol. 2012. Vol. 302. P. 253-256. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.08.003.

57. Shpynov S.N., Tarasevich I.V., Skiba A.A., Pozdnichenko N.N., Gumenuk A.S. Comparison of genomes of *Coxiella burnetii* strains using formal order analysis // New Microbes New Infect. 2018. Vol.23. P. 86-92. doi: 10.1016/j.nmni.2018.02.011.

58. Svraka S., Toman R., Skultety L., Slaba K., Homan W. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii* // FEMS Microbiol. Lett. 2006. Vol. 254. P. 268–274.

59. Tissot-Dupont H., Raoult D. Q fever. // Infect Dis Clin North Am. 2008. Vol.22. P. 505-514.

60. Tokarevich N.K., Freilykhman O.A., Titova N.M., Zheltakova I.R., Ribakova N.A., Vorobeychikov E.V. Anthropogenic effects on changing Q fever epidemiology in Russia. // Annals of the

New York Academy of Sciences. 2006. Vol. 1078. P. 120-123. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.11.020.

61. Tokarevich N.K., Panferova Y.A., Freylikhman O.A., Blinova O.V., Medvedev S.G., Mironov S.V., Grigoryeva L.A., Tretyakov K.A., Dimova T., Zaharieva M.M., Nikolov B., Zehtindjiev P., Najdenski H. *Coxiella burnetii* in ticks and wild birds // Ticks Tick Borne Dis. 2019. Vol.10. P. 377-385.

62. Vincent G.A., Graves S.R., Robson J.M., Nguyen C., Hussain-Yusuf H., Islam A., Fenwick S.G., Stenos J. Isolation of *Coxiella burnetii* from serum of patients with acute Q fever // J Microbiol Methods. 2015. Vol. 119. P. 74-78. doi: 10.1016/j.mimet.2015.10.008.

Научное издание

Рудаков Николай Викторович,
Шпынов Станислав Николаевич,
Токаревич Николай Константинович,
Носков Алексей Кимович,
Панферова Юлия Александровна,
Красоткина Светлана Юрьевна,
Пичурина Наталья Львовна,
Сокиркина Елена Николаевна,
Симакова Диана Игоревна,
Чемисова Ольга Сергеевна

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ КУ

Практическое руководство

Научный редактор – д.м.н., профессор Н.В. Рудаков

Вёрстка – ООО «Издательский центр КАН»

Подписано к печати 04.04.2023

Формат бумаги 60x90, 1/32

Печать оперативная. Гарнитура Times New Roman

усл. печ. л. 2,625. Заказ № 1180

Тираж 300

Отпечатано в ООО «Издательский центр КАН»

644122, г. Омск, ул. Красный Путь, 30.

Тел.: (3812)24-70-79; 8-904-585-98-84

E-mail: pc_kan@mail.ru

vk.com/ic_kan.ru www.kan55.ru

Лицензия ПЛД № 58-47 от 21.04.97