https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-57-68

Молекулярно-эпидемиологический скрининг генома штамма *Coxiella burnetii* NL3262 (Netherlands, 2009) методом формального анализа строя

С. Н. Шпынов*[1], А. С. Гуменюк[2], Н. Н. Поздниченко[2], А. А. Скиба[3]

[1] ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва
[2] Омский государственный технический университет
[3] ООО «Компания Элмис»

Резюме

Актуальность. *Во время массовой вспышки Q лихорадки в Нидерландах в 2007–2010 гг. было зарегистрировано более 4000 случаев острой формы заболевания человека. Штамм Coxiella burnetii NL3262 был выделен во время этой вспышки из абортированной плаценты козы и наиболее полно изучен с помощью комплекса молекулярно-биологических и биоинформационных методов.* ***Цель.*** *Апробация нового биоинформационного подхода – формального анализа строя – для изучения происхождения штаммов, вызвавших массовую вспышку Q лихорадки в Нидерландах на примере штамма C. burnetii NL3262.* ***Материалы и методы.*** *В данной работе новые инструменты формального анализа строя (FOA) «Карта генов» и «Матрица сходства», доступные по адресу http://foarlab.org, были применены для изучения степени сходства генома (хромосомы, плазмиды) штамма NL3262 с геномами других штаммов C. burnetii. Нуклеотидные последовательности хромосом 10 штаммов C. burnetii и 8 плазмид были загружены из GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome.* ***Результаты.*** *Данные, полученные с помощью карты генов, показали, что хромосома штамма NL3262 по показателю характеристики средней удалённости нуклеотидов в хромосоме (g) 1,449640 значительно дистанцировалась от хромосом других штаммов, расположившихся в диапазоне от 1,448295 (Dugway 5J108-111) до 1,448865 (CbRSA331). Это может быть обусловлено присутствием в ней 106 копий гена «транспозазы семейства IS110», связанного с ростом вирулентности, в то время как в хромосомах других штаммов их число было меньше (в пределах от 1 до 48). Данные из матрицы сходства показали, что 84,9% компонентов хромосомы C. burnetii штамма NL3262 имели полную (100%-ую) гомологию с компонентами хромосомы штамма Z3055. Для хромосом других штаммов процент варьировал от 12,06 до 47,14. Плазмиды типа pQpH1 штаммов NL3262 и RSA 331 содержали 50,0% компонентов с полной гомологией, для этого же типа плазмид штамма RSA 493 и его клонов показатель составил от 28,89 до 29,89%, для плазмид других типов – от 5,56 до 6,74%. Показано, что хромосомы штаммов NL3262 и Z3055 имеют наибольший процент компонентов с полной гомологией. Однако по показателю g хромосомы эти штаммы значительно удалены друг от друга, в связи с большим количеством копий IS110 в хромосоме штамма NL3262, вызвавших формирование 21 коллинеарного блока. Это привело к изменению свойств штаммов, вызвавших вспышку Q лихорадки в Нидерландах, и росту их эпидемической значимости, вылившейся в самую масштабную вспышку за всю историю изучения этой инфекции.* ***Заключение.*** *Результаты исследований, полученные на основании применения формального анализа строя, позволили сделать предположение о происхождении штаммов, вызвавших вспышку Q лихорадки в Нидерландах в 2007–2010 гг. Показано, что ведущим мотивом в реорганизации генома C. burnetii является адаптация микроорганизма к новой экологической нише.*

Ключевые слова: *Coxiella burnetii, Q лихорадка, экология, эпидемиология, геном, формальный анализ строя, карта генов, матрица сходства, средняя удалённость нуклеотидов*

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: *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; 17 (6): 57-68. https://doi: 10.31631/2073-3046-2018-17-6-57-68*

Molecular Epidemiological Screening of the Genome of the Strain Coxiella burnetii NL3262 (Netherlands, 2009) Using Formal Order Analysis

S. N. Shynov[1], A. S. Gumenyuk[2], N. N. Pozdnichenko[2], A. A. Skiba[3]*

[1] NF Gamaleya Centre of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow
[2] Omsk State Technical University, Omsk, Russia
[3] ООО «Company Elmis», Omsk, Russia

** Для переписки: Станислав Николаевич Шпынов – д. м. н., руководитель лаборатории экологии риккетсий ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика. Н. Ф. Гамалеи». 18, улица Н. Ф. Гамалеи, Москва, 123098 Россия. 8-499-193-61-85, stan63@inbox.ru. ©Шпынов С. Н. и др.*
** For correspondence: Stanislav N. Shpynov – Dr. Sci. (Med.), head of laboratory of ecology of rickettsiae of N. F. Gamaleya Centre of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation.18, N. F. Gamaleya str., Moscow, 123098 Russia.007-499-193-6185, stan63@inbox.ru. © Shpynov S. N. et al.*

Abstract

Background. *More than 4,000 cases of acute disease in humans were reported during the mass Q fever outbreak in the Netherlands in 2007–2010. The Coxiella burnetii NL3262 strain was isolated during this outbreak from an aborted placenta of a goat and was studied using means of molecular biology and bioinformation techniques.* ***Goals.*** *Approbation of a new bioinformatics approach – formal order analysis – to study the origin of the strains that caused a massive outbreak of Q fever in the Netherlands using the C. burnetii NL3262 strain.* ***Methodology.*** *New tools of the formal order analysis (FOA) «Map of Genes» and «Matrix of Similarity» (available at http://foarlab.org) were used in this work to study the degree of similarity of the genome (chromosome, plasmid) of this strain with the genomes of other strains of C. burnetii. The nucleotide sequences of the chromosomes of 10 C. burnetii strains and 8 plasmids were loaded from GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome.* ***Results.*** *The map of genes data showed that the chromosome of NL3262 strain significantly distanced from the chromosome of other strains by the characteristic of the average remoteness of nucleotides in the chromosome (g) that ranged from 1.448295 (for Dugway 5J108-111) to 1.448865 1.449640 (for CbRSA331). This may be due to the presence of 106 copies of the «transposase family IS110» gene associated with the growth of virulence, while in the chromosomes of other strains their number ranged only from 1 to 48. The similarity matrix showed that 84.9% of C. burnetii NL3262 chromosome components had complete (100%) homology with chromosome components of strain Z3055. The percentage of similar components ranged from 12.06 to 47.14 for chromosomes of other strains. Plasmids of the pQpH1 type of strains NL3262 and RSA 331 contained 50.0% of components with complete homology. For the same type of plasmids of strain RSA 493 and its clones, the index varied from 28.89 to 29.89%, and for plasmids of other types it was from 5.56 to 6.74%. It is shown that the chromosomes of strains NL3262 and Z3055 have the highest percentage of components with complete homology. However, by the g index, chromosomes of these strains are significantly distanced from each other, due to the large number of copies of IS110 in the chromosome of strain NL3262, which caused the formation of 21 collinear blocks. This led to a change in the properties of the Q fever outbreak strains in the Netherlands and the increase in their epidemiological significance, which caused the largest outbreak in the history of the study of this infection.* ***Conclusions.*** *The results of the study, obtained on the basis of the application of formal order analysis, made it possible to make an assumption about the origin of the strains of Q fever in the Netherlands in 2007–2010. It is shown that the leading reason in the reorganization of the C. burnetii genome is the adaptation of the microorganism to a new ecological niche.*

Keywords: *Coxiella burnetii, Q fever, epidemiology, genome, formal order analysis, matrix of similarity, map of genes, average remoteness*

No conflict of interest to declare.

For citation: *Shpynov S. N., Gumenyuk A. S., Pozdnichenko N. N., Skiba A. A. Molecular Epidemiological Screening of the Genome of the Strain Coxiella burnetii NL3262 (Netherlands, 2009) Using Formal Order Analysis. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2018; 17 (6): 57-68. (In Russ.). https://doi: 10.31631/2073-3046-2018-17-6-57-68*

Введение

Q лихорадка (Ку лихорадка, коксиеллёз) – широко распространённое зоонозное заболевание, вызываемое *Coxiella burnetii* [1]. Феномен природной очаговости имеет ведущее значение для экологии этого микроорганизма [2]. Заражение человека может происходить посредством различных механизмов, при этом *C. burnetii* является признанным агентом биологического оружия [1, 3]. У инфицированных овец и коз во время окотов и поздних абортов происходит массовое поступление *C. burnetii* в окружающую среду, что приводит к заражению обслуживающего персонала ферм и хозяев животных [1, 4, 5]. В результате вдыхания аэрозоля, содержащего бактерии, обычно развивается острая форма Q лихорадки, которая клинически проявляется преимущественно в виде атипичной пневмонии и гепатита [1, 3]. При хронизации инфекционного процесса, как правило, развивается эндокардит [1, 6–8]. Козы, овцы и крупный рогатый скот (КРС) являются важнейшим резервуаром *C. burnetii*, однако штаммы были выделены от широкого круга диких позвоночных и членистоногих [1, 4]. При пассировании штаммов *C. burnetii in vitro* происходит смена фазового состояния (варианта) антигена от фазы I к фазе II и потеря вирулентности из-за перехода липополисахарида (ЛПС) в усечённую форму, что связано с делецией генов, кодирующих О-антиген [9–11].

С 2007 по 2010 г. в Нидерландах произошла крупная вспышка Q лихорадки. Было зарегистрировано 4026 случаев острой формы заболевания среди людей [12]. Источником вспышки послужили козы показано, что передача *C. burnetii* могла осуществляться в виде аэрозоля, при этом риск заражения населения, проживающего в радиусе 1 км от козьих молочных ферм, был в 46 раз выше, чем на расстоянии 5–10 км [13]. Штамм *C. burnetii* NL3262 был выделен из абортированной плаценты козы во время этой вспышки [5]. Показано, что штаммы, ответственные за вспышку в Нидерландах, и штамм Z3055, выделенный из абортированной плаценты овцы в Германии в 1992 г., являются клональными, так как они в соответствии с результатами мультилокусного секвенирования-типирования имеют один генотип MST33, один VNTR-профиль и содержат плазмиду типа QpH1 [14]. Применение MLVA (Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat – локус с варьирующим числом тандемных повторов) показало преобладающее присутствие генотипа

CbNL01 и в меньшей степени генотипа CbNL12 среди штаммов, выделенных в Нидерландах [11]. С помощью филогенетического анализа выделено четыре клада среди штаммов *C. burnetii*: клады 1a и 1b – генотип CbNL01; клад 2 – генотип CbNL12 и Nine Mile-подобный генотип (NM, RSA331 и др.), к которому отнесён штамм Z3055, являющийся равноудалённым для кладов 1 и 2; клад 3 – Scurry-генотип (бесплазмидые штаммы: CbuG_Q212); некластеризованные штаммы разных генотипов (Shperling, Dugway 5J108-111, CbuK_Q154, MSU Goat Q177 и др.) [16]. Штаммы, выделенные во время вспышки в Нидерландах от козы (NL3262, 602, CbCVIC1) и человека (NLhu3345937, 42785537, NL-Limburg), имели почти одинаковые геномы, кластеризовались вместе на основании результатов филогенетических исследований и анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и были отнесены к генотипу CbNL01. Эти данные подтверждают, что козы являются источником вспышки Q лихорадки у человека в Голландии [15], как и предполагалось ранее на основе генотипирования [15]. Штаммы NL3262 и NL-Limburg – клоны, поскольку разница между их геномами составляет всего 8 точечных мутаций [16]. Оба штамма имеют только одну ДНК-перегруппировку в своих геномах и содержат максимальное количество генов, кодирующих транспозазу (106-112 семейства транспозазы IS110, 3 семейства транспозазы ISAs1 и 12–13 остатков генов транспозазы соответственно). По сравнению с другими облигатными внутриклеточными патогенами (*Rickettsia, Chlamydia, Mycobacterium leprae*) геном *C. burnetii* обладает наибольшим количеством генов транспозазы (IS-элементов), которые, как предполагается, связаны с адаптацией патогена к различным внутриклеточным нишам [17].

Штаммы *C. burnetii* разных генотипов могут с отличающейся эффективностью заражать различные виды хозяев. Штаммы генотипа CbNL01 преимущественно выделяются у коз и людей, штаммы генотипа CbNL12 – от крупного рогатого скота и почти никогда от коз и людей [15, 18, 19]. Это указывает на более высокую восприимчивость людей и коз к штаммам генотипа CbNL01.

Необходимо мобилизовать весь арсенал доступных биоинформационных методов с целью оценки возможного происхождения штаммов, вызвавших массовую вспышку Q лихорадки в Нидерландах. Новый математический подход, дополняющий инструментарий биоинформатики, – формальный анализ строя (FOA) [20], ранее был успешно применён при изучении полноразмерных геномов для систематики представителей семейства Rickettsiaceae [21]. В данной работе предлагается использование новых инструментов FOA: карты генов («Map of genes» – MG) [22] и матрицы сходства («Matrix of similarity» – MS») [23] для изучения сходства геномов (хромосом и плазмид) и их компонентов штамма *C. burnetii* NL3262 с другими штаммами, выделенными от человека, козы, овцы, клеща и крысы.

Целью данного исследования стала апробация новых средств FOA в качестве инструментов молекулярно-эпидемиологического скрининга геномов штамма NL3262 и штаммов других генотипов для установления возможного происхождения штаммов генотипа CbNL01, вызвавших самую массовую из описанных вспышек Q лихорадки, произошедшую в Нидерландах в 2007–2010 гг.

Материалы и методы

Последовательности полноразмерных геномов Coxiella burnetii

Все геномы *C. burnetii* (табл. 1) были загружены из базы данных GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome. Хромосомы 10 штаммов *C. burnetii* (Dugway 5J108-111, CbuK_Q154, Z3055, RSA 493, RSA439, RSA439 clon 4, CbuG_Q212, RSA331, NL3262 и «MSU Goat Q177») и 8 плазмид (Dugway 5J108-111 pQpDG, CbuK_Q154 pQpRS, RSA493 pQpH1, RSA439 pQpH1, RSA439 clon 4 pQpH1, RSA331 QpH1, NL3262 QpH1 и «MSU Goat Q177» pQpRS) были изучены с применением инструментов MG [22] и MS [23].

Инструменты формального анализа строя (FOA)

FOA использовали для анализа геномов штаммов *C. burnetii*, как ранее описано нами [20, 21]. Основы этого подхода были разработаны для изучения символьных последовательностей любой природы и успешно применялись ранее при исследовании лингвистических и музыкальных текстов [24]. В работе используется высокоточное и однозначное численное представление исходного расположения нуклеотидов в последовательности. Для этого были разработаны числовые характеристики строя (средняя удалённость одинаковых нуклеотидов в последовательности (g), глубина нуклеотидной последовательности (G) и т.д.) на основе межсимвольных интервалов (межнуклеотидное расстояние [25, 26]) [20]. В результате применения этого подхода стало возможным последовательность нуклеотидов произвольной длины перекодировать в числовую последовательность фиксированной длины.

Недавно для FOA нами были разработаны новые инструменты – карта генов (MG) [22] и матрица сходства (MS) [23] для более углублённого изучения структуры бактериальных геномов (хромосом и плазмид).

Пары числовых значений характеристик строя хромосом (плазмид) и их компонентов {<gj, Gi>} отображаются в столбцы точек на MG. Компоненты, представляющие отдельную хромосому (плазмиду), размещаются вертикально. Точки, располагающиеся на одной горизонтали, представляют похожими (гомологичными/одинаковыми) компонентами в разных хромосомах (плазмидах) (рис. 1). Инструментарий MG позволяет интерактивно

Таблица 1.
Характеристики геномов штаммов Coxiella burnetii и показатель средней удаленности нуклеотидов (g)
Table 1. Genome characteristics of Coxiella burnetii strains and the average remoteness (g)

№	*Coxiella burnetii* штаммы strains	Клад Clade	Источник Origin	Номер доступа в GenBank GenBank access number	Средняя удаленность Average remoteness (g)	Размер генома Genome size (п.н.)	G + C%	Количество генов Number of genes	Плазмида Plasmid		Копии Copies IS110
									Тип Type	Размер (п.н.) The size	
	NL3262	1a	Коза Goat	NZ_CP013667.1/ CP013668	1.4496407330	2093477	42.84	2401	QpH1	37,320	106
	CbRSA331	2	Человек Person	NC_010117.1	1.4488653471	2016427	42.74	2272	QpH1	37,317	44
	CbuG_Q212	3	Человек Person	NC_011527.1	1.4487365584	2008870	42.60	2208	integrated		28
	NMRSA493 (phase I)	2	Клещ Tick	NC_002971.4	1.4485974740	1995281	42.64	2085	QpH1	37,319	1
	Z3055	1/2	Овца Sheep	NZ_LK937696.1	1.4484246347	1995463	42.60	2197	QpH1		11
	NMRSA 439 (phase II)	2	Культура клеток	NZ_CP020616.1	1.4484206459	1969224	42.64	2217	pQpH1	37,319	20
	NMRSA439 (phase II, clone 4)	2	Человек Person	NZ_CP018005.1	1.4484095625	1969245	42.64	2219	pQpH1	37,319	20
	MSU Goat Q177	*	Коза Goat	NZ_CP018150.1	1.4483845927	2090565	42.64	2305	QpRS	39,281	48
	CbuK_Q154	*	Человек Person	NC_011528.1	1.4483811070	2063100	42.64	2302	QpRS	39,280	36
	Dugway 5J108-111	*	Грызуны Rodent	NC_009727.1	1.4482959721	2158758	42.34	2358	QpDG	54,179	2

*Примечание: *некластеризованные штаммы, представляющие разные генотипы [Kuley et al., 2017].*
*Note: *nonclustered strains representing different genotypes [Kuley et al., 2017].*

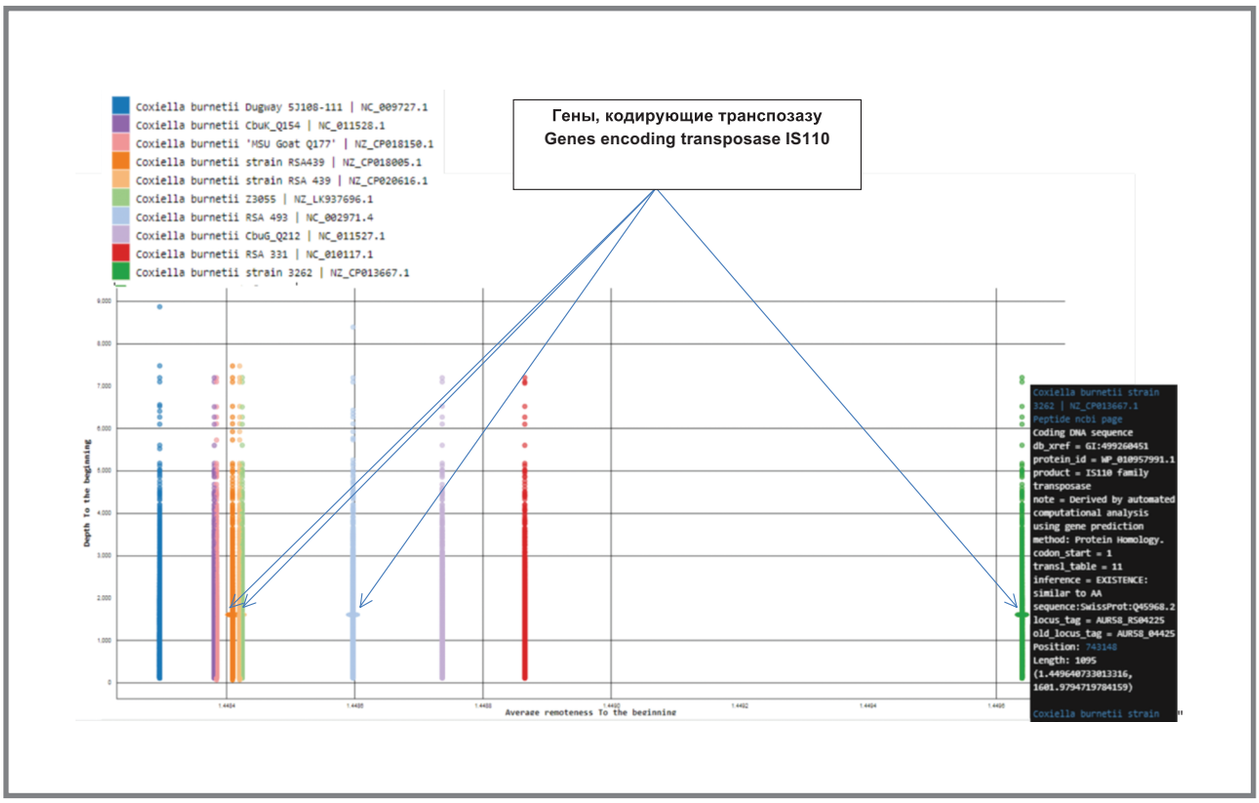
получить подробное описание любого компонента генома. Также возможна автоматическая идентификация совпадающих компонентов.

Для каждой пары из множества проанализированных хромосом (плазмид) MS представляет значения меры подобия. Сходство пары хромосом (плазмид) определяется путём сравнения значений выбранной характеристики строя их компонентов. В данном исследовании для сравнения использовались характеристики глубины G и средней удалённости g. Инструментарий MS позволяет интерактивно формировать список только похожих компонентов для любой пары хромосом (плазмид). Также возможно получать пару графиков функций локальных характеристик строя (вычисленных скользящим окном) для выбранной пары совпадающих компонентов. Последнее позволяет детально исследовать сходство отдельных компонентов.

Сравнение кодирующих и некодирующих последовательностей (компонентов) в хромосомах (плазмидах) разных штаммов *C. burnetii* возможно с использованием инструментария MG, который также может быть полезен при анализе геномов с целью дифференциации генов, имеющих полную (100%-ую) гомологию с ортологами. С помощью MG можно идентифицировать различия между хромосомами (плазмидами) штаммов внутри вида *C. burnetii*. Хромосомы (плазмиды) и их компоненты представлены на плоскости карты генов в виде множества точек. Хромосомы (плазмиды) помещаются (классифицируются) по индексу средней удалённости (g) по оси X, а их компоненты (кодирующие и некодирующие последовательности) располагаются по индексу глубины (G) по оси Y. Совпадающие по характеристикам последовательности имеют полную гомологию. Геномы штаммов одного вида демонстрируют высокую степень гомологии их компонентов. Для сравнения геномов разных видов бактерий необходимо ввести дополнительные меры сходства для идентификации компонентов со степенью гомологии менее 100%. Используя этот подход, можно провести выборочный анализ всех компонентов геномов индивидуально или путем их группировки по заданному признаку. Каждый компонент может быть идентифицирован (визуализирован) среди всех сравниваемых организмов по его названию в аннотации, что позволяет проверять его наличие в каждом геноме.

Все геномы (хромосомы, плазмиды) были проанализированы с использованием FOA [20].

Рисунок 1.
Расположение хромосом штаммов Coxiella burnetii на «Карте генов» на основании показателя средней удалённости нуклеотидов (ось X) и копий генов, кодирующих транспозазу IS110 с полной гомологией по показателю глубины соответствующему значению – 1601,9794719784159 (ось Y), легенда в сокращённой демоверсии
Figure 1. The location of the chromosomes of the Coxiella burnetii strains on the «Gene Map» based on the average remoteness (X axis) and copies of the genes encoding IS110 transposase with complete homology in depth index of the corresponding value – 1601.9794719784159 (Y axis), the legend in the abbreviated demos



Программное обеспечение для исследований доступно в интернете по адресу http://foarlab.org.

Результаты и обсуждение

Применение MG позволило представить позицию (классифицировать) штаммов *C. burnetii* (рис. 1) друг относительно друга в соответствии с показателем средней удаленности их хромосом (по оси X) в диапазоне от 1,4482959721 (Dugway 5J108-111) до 1,4496407330 (NL3262). Анализ и сравнение компонентов хромосом в соответствии с величиной индекса глубины – G (ось Y), показали высокий процент (более 80%) компонентов хромосом штаммов *C. burnetii* Z3055 и NL3262, имеющих полное совпадение нуклеотидов (100%-ая гомология). С помощью MG в хромосоме штамма NL3262 было выявлено 106 копий «транспозазы семейства IS110», в то время как хромосома штамма *C. burnetii* Z3055 содержала 11 копий, в хромосомах других штаммов их число варьировалось от 1 (RSA 493) до 48 («MSU Goat Q177») (табл. 1).

Для проведения углублённого анализа компонентов геномов штаммов *C. burnetii* была применена MS. Хромосома штамма *C. burnetii* NL3262 содержала максимальный процент компонентов (84,9%), имеющих полную гомологию с компонентами хромосомы штамма *C. burnetii* Z3055, в меньшей степени с *C. burnetii* RSA 331 (47,14%), *C. burnetii* RSA 439 (33,54%), RSA439 clon 4 (33,0%) и *C. burnetii* RSA 493 (32,22%) (табл. 2).

Хромосома штамма *C. burnetii* RSA 493, с ЛПС, находящимся в фазе I, имела высокий процент компонентов с полной гомологией с компонентами хромосом своих клонов, в которых ЛПС содержится в фазе II – RSA439 clone 4 (86,89%) и *C. burnetii* RSA439 (85,56%). Между хромосомами клонов RSA439 clone 4 и RSA 439 процент компонентов с полной гомологией составил 98,16. Минимальный процент гомологичных компонентов по показателю MS – 12,06 продемонстрировали хромосомы штамма NL3262 и «MSU Goat Q177», другого штамма, выделенного от козы. В отличие от этого, штаммы *C. burnetii*, содержащие плазмиду QpRS, выделенные от пациента с эндокардитом CbuK_Q154 и от козы «MSU Goat Q177», имели высокий процент гомологичных компонентов хромосом (76,55%). Применение MS для анализа плазмид показало, что плазмида pQpH1 штамма NL3262 содержала 50,0% компонентов, имеющих полную гомологию с компонентами того же типа плазмиды штамма RSA331. По отношению к плазмиде штамма RSA493 фаза I этот показатель равнялся 29,89%, для плазмид её клонов RSA439 фаза II и RSA 439 clon 4 фаза II составил 29,55 и 28,89 соответственно. Для плазмид других штаммов процент компонентов с полной гомологией варьировался от 5,56 до 6,74 (табл. 3). Плазмиды pQpRS_K_Q154 и QpRS «MSU Goat Q177» продемонстрировали самый высокий процент компонентов с полной гомологией, составивший 95,75%, в отличие от плазмиды pQpH1 штамма *C. burnetii* RSA 493 и плазмид ее клонов RSA439, RSA439 clon 4, у которых этот показатель составил 48,35 и 73,12% соответственно.

В результате беспрецедентной вспышки Q лихорадки, произошедшей в Нидерландах вначале XXI века, были изолированы и изучены штаммы *C. burnetii,* выделенные из клапанов сердца пациентов с хронической формой заболевания, а также из абортированной плаценты коз и овец [16]. Проведён генетический анализ этих штаммов и штаммов, изолированных ранее из абортированной плаценты коз и КРС во Франции, от больных Q лихорадкой из других стран мира и предварительно генотипированных в MLVA [15, 16].

Применение MG-анализа при изучении геномов 10 штаммов *C. burnetii* показало, что в соответствии со значением показателя средней удалённости хромосома «козьего» штамма NL3262 (g – 1,4496407330) генотипа CbNL01 значительно отличалась от хромосом штаммов (g – 1,4482959721 – 1,4488653471), отнесённых к остальным кладам. Эти различия в значительной степени могут быть обусловлены выраженными изменениями структуры хромосомы штамма NL3262, произошедшими в результате появления наибольшего количества (106 копий) элементов IS110 среди хромосом всех исследованных штаммов (см. табл. 1). При этом хромосома штамма CbRSA331 (NM-подобный генотип), содержащая 44 элемента IS110 (см. табл. 1), расположилась наиболее близко по отношению к хромосоме штамма NL3262 (1,4488653471). Выраженное отличие хромосомы штамма NL3262 по структуре от хромосом других штаммов, установленное на основании значения показателя средней удалённости (см. рис. 1) подтверждается результатами геномного анализа, который показал большое количество перегруппировок генома NL3262 при сравнении с геномами штаммов Z3055 (21 перегруппировка), Cbuk_Q154 (31 перегруппировка), CbuG_Q212 (21 перегруппировка) и Dugway (23 перегруппировки) [16]. Предполагается, что значительно возросшее количество транспозонов в геномах штаммов со вспышки в Нидерландах могло привести к значительной перегруппировке генома в ответ на неблагоприятные факторы, связанные с изменением экологии возбудителя, в том числе обусловленные сменой хозяина. Такие перегруппировки могли привести к вставкам/делециям ДНК, формированию полиморфизмов и псевдогенов или модулировать экспрессию гена посредством перегруппировок генных порядков, что способствует накоплению и выживаемости *C. burnetii* в разных экологических нишах [16, 17, 27–29].

Комплексный подход в FOA, основанный на дополнительном применении MS, позволил установить, что хромосомы «козьего» NL3252 и «овечьего» Z3055 штаммов имеют максимальный процент (84,9%) компонентов с полной гомологией.

Таблица 2.
Степень гомологии компонентов хромосом штаммов Coxiella burnetii с использованием «Матрицы сходства»
Table 2. The degree of homology of the components of the chromosomes of Coxiella burnetii strains using the «Matrix of similarity»

Штаммы Strains *Coxiella burnetii* | Номер доступа в Access number GenBank	**Dugway 5J108-111 | NC_009727.1**	**CbuK_Q154 | NC_011528.1**	**‹MSU Goat Q177› | NZ_ CP018150.1**	**RSA439 clone 4 NZ_CP018005.1**	**RSA 439 | NZ_ CP020616.1**	**Z3055 | NZ_ LK937696.1**	**RSA 493 | NC_002971.4**	**CbuG_Q212 | NC_011527.1**	**RSA 331 | NC_010117.1**	**NL3262 | NZ_ CP013667.1**
Dugway 5J108-111| NC_009727.1	100.00%	22.20%	18.73%	19.98%	19.89%	17.60%	20.44%	18.11%	18.93%	17.15%
CbuK_Q154 | NC_011528.1	22.20%	100.00%	76.55%	15.45%	15.36%	14.14%	15.73%	15.01%	14.94%	13.66%
‹MSU Goat Q177› | NZ_CP018150.1	18.73%	76.55%	100.00%	18.58%	18.63%	12.12%	17.79%	13.00%	12.91%	12.06%
RSA439 clone 4 NZ_CP018005.1	19.98%	15.45%	18.58%	100.00%	98.16%	33.95%	86.89%	18.71%	37.33%	33.54%
RSA 439 | NZ_ CP020616.1	19.89%	15.36%	18.63%	98.16%	100.00%	33.49%	85.56%	18.58%	36.84%	33.00%
Z3055 | NZ_ LK937696.1	17.60%	14.14%	12.12%	33.95%	33.49%	100.00%	32.87%	16.43%	46.15%	84.90%
RSA 493 | NC_002971.4	20.44%	15.73%	17.79%	86.89%	85.56%	32.87%	100.00%	19.05%	36.05%	32.24%
CbuG_Q212 | NC_011527.1	18.11%	15.01%	13.00%	18.71%	18.58%	16.43%	19.05%	100.00%	17.40%	16.00%
RSA 331 | NC_010117.1	18.93%	14.94%	12.91%	37.33%	36.84%	46.15%	36.05%	17.40%	100.00%	47.14%
NL3262 | NZ_ CP013667.1	17.15%	13.66%	12.06%	33.54%	33.00%	84.90%	32.24%	16.00%	47.14%	100.00%

Хромосомы всех других штаммов значительно отличаются по этому показателю от хромосом штаммов NL3262 (клад 1a – генотип CbNL01) и Z3055 (клад 1b – в границах генотипа CbNL01) из-за высокого процента генов с однонуклеотидным полиморфизмом. С применением MS было установлено, что штаммы Z3055 и RSA 493 имеют только 32,89% компонентов с полной гомологией (см. табл. 2), несмотря на предположение о клональности их происхождения [14]. Это подтверждается выявлением различий между хромосомами штамма Z3055 и эталонного штамма NMI (RSA 493), связанных с наличием только точечных мутаций и вставок/делеций (INDEL). В общей сложности было установлено 2917 SNP между хромосомами штаммов Z3055 и NMI, включая 2507 SNP в межгенных областях, 410 в кодирующих областях и 228 несинонимичных SNP, что соответствует 119 мутированным генам [14]. Таким образом, MS-индекс, определяющий процент компонентов с полной гомологией между сравниваемыми хромосомами, является не менее информативным по сравнению с другими методами (анализ SNP) и может быть использован как дополнительный инструмент при анализе и сравнении хромосом различных штаммов. Этот подход, основанный на применении FOA, учитывающий расположение нуклеотидов в анализируемых геномах, по своей сути является геномосистематикой и может быть эффективно применен при анализе геномов и адресно реализован в систематике на уровне субтаксономической категории штамма.

Применяя инструменты FOA, нам удалось показать, что штамм NL3262, представляющий штаммы генотипа CbNL01, который вызвал вспышку лихорадки Q в Нидерландах в 2007–2010 гг., является клональным по отношению к штамму Z3055, поскольку их геномы содержат высокий процент компонентов (84,9%) с полной гомологией. Значительная реорганизация генома, произошедшая у штамма NL3262 (и других из клада CbNL01, Нидерланды) вследствие выраженного увеличения количества элементов IS110 могла привести к росту его вирулентности и возрастанию эпидемической значимости. При этом было установлено, что хромосомы двух штаммов (NL3262 и «MSU Goat Q177»), выделенных от одного вида хозяина (коза), с разными историями происхождения, имели минимальный процент компонентов с полной гомологией по показателю MS – 12,06. Это обоснованно с позиции данных анализа генных ортологов, показавших 98%-ое перекрытие между хромосомами штаммов одного генотипа, которое выше, чем перекрытие между штаммами, имеющими происхождение от хозяина одного вида [16]. Показано, что штаммы одного генотипа имеют клональное происхождение с высококонсервативным содержанием генов. Среди штаммов, выделенных во время вспышки в Нидерландах, и других генотипов (CbNL12, Henzerling и Heizberg) не было идентифицировано уникальных генов, хотя и были определены гены, специфичные для генотипа. Поиск генов и точечных мутаций, специфичных для хозяина дал отрицательные результаты, указывая, что гены, специфичные для вида хозяина и мутации отсутствовали. Таким образом, в геномах штаммов чётко выявлялись специфические изменения свойственные генотипу, тогда как специфические изменения в геномах штаммов, изолированных от одного вида хозяина не наблюдались [16].

На основании значений показателя средней удалённости нуклеотидов было установлено, что хромосома штамма Z3055 (11 копий IS110) заняла позицию между хромосомой штамма RSA 493 NMI (1 копия IS110) и хромосомами его клонов RSA439 clone 4 NMII и RSA 439 NMII (по 20 копий IS110) (см. рис. 1). При сравнительном анализе хромосом *C. burnetii* были выявлены перегруппировки (коллинеарные блоки) в 0, 21, 6 и 13 местах хромосомы штамма RSA 493 NMI по сравнению с хромосомами штаммов Z3055, Cbuk_Q154, CbuG_Q212 и Dugway соответственно [28]. Таким образом, группирование хромосом штаммов RSA 493 NMI и Z3055, полученное с помощью MG, подтверждает данные об отсутствии перегруппировок (коллинеарных блоков) в их хромосомах [16].

Увеличение копий IS110 с одной в хромосоме оригинального штамма RSA 493 NMI (клещ) до 20 копий в хромосомах его клонов RSA439 clone 4 NMII (человек) и RSA 439 NMII (культура клеток) могло привести к более выраженным изменениям структуры их хромосом (включая образование коллинеарных блоков), по сравнению с хромосомой штамма Z3055, содержащей всего 11 копий IS110. Изменения в структуре хромосом штамма RSA 493 NMI и его клонов связаны со сменой экологии микроорганизма (клещ, человек, культура клеток), вызвавшей переход фазового состояния ЛПС антигена, который сопровождается увеличением копий IS110, что было выявлено с помощью MG. Единственный элемент IS110 хромосомы RSA 493 NMI (1095 н. п.) имел полную гомологию с 13 элементами IS110 хромосомы RSA439 clone 4 NMII и только с двумя элементами IS110 хромосомы RSA 439 NMII. Данные полученные с помощью MS показали, что переход из состояния фазы I в фазу II сопровождался снижением доли компонентов с полной гомологией для хромосом клонов RSA 439 NMII и RSA439 clone 4 NMII до 85,56 и 86,89% соответственно. Доказано, что для RSA439 clone 4 NMII переход к фазе II связан с хромосомной делецией ~ 26 kb, которая устраняет несколько генов, осуществляющих биосинтез ЛПС, и связана с образованием сильно усеченного ЛПС по отношению к оригинальному штамму RSA 493 NMI [30]. При этом делеция соответствующая части гена CBU_0691, участвующего в синтезе виренозы (сахар, присутствующий только в структуре ЛПС-фазы I *C. burnetii* [31]), приводит к смещению

рамки считывания, блокируя кодирование ферментов, участвующих в её синтезе. Предполагается, что именно эта делеция 355 н. п. может вызвать начало фазового сдвига в штаммах CbNL01 [16]. Отличия в плазмидах клонов, полученных на культуре клеток и выделенных от человека, носили более выраженный характер. Клон RSA 439 содержал всего 48,35% компонентов плазмиды с полной гомологией по отношению к плазмиде оригинального штамма, а RSA439 clon 4 – 73,12%. Применение новых инструментов FOA позволило установить, что у *C. burnetii* при переходе из фазы I в фазу II происходит увеличение количества элементов IS110 и снижение процента компонентов, имеющих полную гомологию в хромосомах и плазмидах клонов.

Термин «клональный» применяется различными группами исследователей при изучении характеристик сравниваемых геномов *C. burnetii* и подчёркивает близость происхождения изолятов [14, 28, 30]. Клональными считаются штаммы, выделенные во время вспышки в Нидерландах от козы (NL3262) и человека (NL-Limburg) [16], а также штамм Z3055, выделенный ранее в Германии от овцы, по отношению к вышеуказанным [14]. Более объективным является применение этого термина в отношении вирулентного штамма NMI (RSA 493), выделенного из иксодового клеща *Dermacentor andersonii и его* клонов, полученных в лабораторных условиях RSA439 clone 4 NMII и RSA 439 NMII, ассоциированных с человеком и культурой клеток соответственно [30]. Во всех приведённых случаях феномен «клональности» связан со сменой экологической ниши *C. burnetii*. В случае со штаммом NMI (RSA 493) и его клонами был показан молекулярный механизм перехода фазового состояния ЛПС антигена из фазы I в фазу II [30]. Применение инструментов FOA продемонстрировало тесную связь между штаммами, выделенными от разных видов хозяев (коза, овца), в хромосомах которых произошла выраженная перегруппировка в связи с возрастанием количества инсерционных элементов, сохранив при этом высокий процент компонентов, имеющих полную гомологию (84,9%). При этом реорганизация генома оригинального штамма *C. burnetii* RSA 493 NMI, выделенного от клеща, которая связана с изменением фазового состояния из фазы I в фазу II его клонов в результате перехода микроорганизма к человеку и на культуру клеток, показало аналогичный процент компонентов хромосом имеющих полную гомологию (85,56–86,89%). В обоих случаях ведущим мотивом в реорганизации генома является адаптация микроорганизма к новой экологической нише.

Высокий процент компонентов хромосом с полной гомологией (76,55%) был выявлен у штаммов, выделенных у пациента с эндокардитом CbuK_Q154 и от козы «MSU Goat Q177», которые, по данным филогенетических исследований и MLVA, расположились рядом друг с другом в группе некластеризованных штаммов [16].

Существенные различия были выявлены между двумя штаммами, выделенными от козы NL3262 и «MSU Goat Q177», на основании низкой доли компонентов с полной гомологией в их хромосомах – 12,06%. Эти различия дополнялись выраженной дистанцией между их хромосомами по значению показателя средней удалённости, составившем 1,4496407330 и 1,4483845927 соответственно. При этом хромосомы обоих «козьих» штаммов обладали наибольшим количеством копий IS110. Полученные данные могут указывать на различное происхождение данных изолятов в отличие от штаммов, выделенных во время вспышки в Нидерландах, и штамма Z3055, выделенного от овцы в Германии [14].

Таким образом, с помощью FOA было продемонстрировано, что хромосомы штаммов, имеющих клональное происхождение, но выделенных от разных видов хозяев, могут иметь большую степень сходства по сравнению с образцами, полученными от одного вида хозяина.

Проведённое ранее генотипирование с помощью MLVA показало преобладание генотипа CbNL01 над CbNL12 среди штаммов, выделенных во время вспышки в Нидерландах [15]. Генотип CbNL01 был идентифицирован главным образом среди штаммов, выделенных от коз и пациентов, что указывает на коз как источник вспышки Q лихорадки в Нидерландах. Это подтверждает эпидемиологическую связь между увеличением числа случаев Q лихорадки человека с высоким уровнем абортов у коз [12, 15, 16, 32, 33]. Генотип CbNL12 был представлен главным образом штаммами, выделенными от КРС, редко – штаммами от коз, овец и людей [15, 18, 19] и был вторым по распространённости после генотипа CbNL01. Хотя штаммы генотипов CbNL12 и CbNL01 принадлежат к различным генотипам MLVA, основные различия между ними были основаны на точечных мутациях (в среднем 2400) и количестве генов, кодирующих транспозазу. Поскольку штаммы генотипа CbNL12 не были выделены от человека, но имели распространение во многих европейских странах, предполагается, что человек менее восприимчив к штаммам генотипа CbNL12, в связи с чем снижается риск его заражения [16]. Возможно, штаммы этого генотипа могут представлять значительный ресурс для рассмотрения их в качестве потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы.

Различие между последовательностями геномов «голландских» штаммов и эталонным штаммом NMI (RSA 493) было основано на точечных мутациях, небольших делециях в части генов и нескольких делециях полных генов в геномах штаммов генотипа CbNL01 [16]. При этом новые гены, потенциально связанные с повышенной вирулентностью, отсутствовали в геномах штаммов этого генотипа. Это говорит о том, что модификации существующих

Таблица 3.
Степень гомологии компонентов плазмид штаммов Coxiella burnetii с использованием «Матрицы сходства»
Table 3. The degree of homology of the components of the plasmid Coxiella burnetii strains using the «Matrix of similarity»

Штамм Strain/ плазмида plasmid Coxiella burnetii Номер доступа в Access number GenBank	**RSA493 plasmid pQpH1 | NC_004704.2**	**RSA439 plasmid QpH1| NZ_CP020617.1**	**RSA439 clone 4 plasmid QpH1 | NZ_CP018005.1**	**3262 plasmid QpH1 | NZ_CP013668.1**	**RSA331 plasmid QpH1 | NC_010115.1**	**CbuK_Q154 plasmid pQpRS_K_Q154 | NC_011526.1**	**MSU Goat Q177 plasmid QpRS | NC_010258.1**	**Dugway 5J108-111 plasmid pQpDG | NC_009726.1**
RSA493 plasmid pQpH1 | NC_004704.2	100.00%	48.35%	73.12%	29.89%	34.48%	10.87%	10.87%	7.21%
RSA439 plasmid QpH1| NZ_CP020617.1	48.35%	100.00%	76.60%	29.55%	43.18%	8.60%	8.60%	8.93%
RSA439 clone 4 plasmid QpH1 | NZ_CP018005.1	73.12%	76.60%	100.00%	28.89%	35.56%	10.53%	10.53%	8.77%
3262 plasmid QpH1 | NZ_CP013668.1	29.89%	29.55%	28.89%	100.00%	50.00%	6.74%	6.74%	5.56%
RSA 331 plasmid QpH1 | NC_010115.1	34.48%	43.18%	35.56%	50.00%	100.00%	8.99%	8.99%	7.41%
CbuK_Q154 plasmid pQpRS_K_Q154 | NC_011526.1	10.87%	8.60%	10.53%	6.74%	8.99%	100.00%	95.75%	8.85%
MSU Goat Q177 plasmid QpRS | NC_010258.1	10.87%	8.60%	10.53%	6.74%	8.99%	95.75%	100.00%	8.85%
Dugway 5J108-111 plasmid pQpDG | NC_009726.1	7.21%	8.93%	8.77%	5.56%	7.41%	8.85%	8.85%	100.00%

генов привели к усилению вирулентных особенностей штаммов вспышки, а не к приобретению новых генетических факторов *C. burnetii*. Было установлено большое количество мутаций в генах, кодирующих мембранные белки штаммов генотипа CbNL01, относительно штаммов CbNL12 [16].

Применение MS показало, что хромосома штамма NL3262 содержит 84,9% компонентов, имеющих полную гомологию с компонентами хромосомы штамма Z3055, что в 1,8–7,0 раз превышает гомологию с компонентами хромосом других штаммов *C. burnetii* (см. табл. 2). Анализ показателя средней удаленности в MG позволил установить выраженную реорганизацию хромосомы штамма NL3262 по отношению к хромосоме штамма Z3055, связанную со значительным увеличением коллинеарных блоков в результате роста количества IS110, что могло привести к увеличению вирулентности штаммов *C. burnetii*, вызвавших вспышку Q лихорадки в Нидерландах.

Описанная в данной работе взаимосвязь штаммов полностью соответствует филогенетическим взаимоотношениям между геномами *C. burnetii,* установленная на основе анализа однонуклеотидных полиморфизмов [16], за исключением бесплазмидного штамма CbuG_Q212, в котором плазмида интегрирована в хромосому и потому не вписывается в общий порядок.

Предлагается комплексный подход, основанный на применении двух новых средств FOA – карты генов и матрицы сходства в качестве дополнительного инструмента для анализа геномов *C. burnetii* с целью изучения происхождения штаммов во время вспышек и возможной оценки их эпидемической значимости.

На основании применения MS можно выделить шесть групп штаммов *C. burnetii*:

- штаммы NL3262 и Z3055 (генотип CbNL01), имеющие 84,9% компонентов хромосом с полной гомологией, но содержащие отличия по структуре хромосом в связи с их перегруппировкой, которая связана с появлением большого количества IS110 в результате смены экологической ниши (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, возможно, объясняет равноудалённую позицию штамма Z3055, по данным Kuley с соавт. [16];
- 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%); и 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 компонентами хромосом других штаммов от 13 до 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 отделённой 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).

Крупнейшая вспышка Q лихорадки, зоонозной инфекции с феноменом природной очаговости, могла стать возможной при ослаблении ветеринарного контроля, что способствовало созданию условий для эпизоотического процесса среди животных и формированию очагов коксиеллёза с последующим заражением и вовлечением в эпидемический процесс обслуживающего персонала ферм по производству козьего сыра. В основе вспышки лежит эпизоотологической процесс, приведший к смене экологической ниши *C. burnetii* при переходе «овечьего» Z3055-подобного штамма к «козьему» – NL3262. Об этом свидетельствует высокий процент компонентов хромосом с полной гомологией, что сопровождалось резким увеличением количества копий IS110, вызвавшем рост вирулентности, с дальнейшим формированием эпидемически значимых штаммов человека (NLhu3345937, 42785537 и NL-Limburg).

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

Массовость вспышки могла быть обусловлена высоким риском заражения населения при аэрогенном механизме передачи возбудителя – *C. burnetii*.

Выводы

1. Применение инструментов формального анализа строя, в первую очередь матрицы сходства, позволило за счёт более тонкой

дифференциации структуры геномов выделить шесть групп штаммов *C. burnetii*.

2. Результаты исследований, полученные на основании FOA, позволили сделать предположение о происхождении штаммов, вызвавших вспышку Q лихорадки в Нидерландах в 2007–2010 гг. Показано, что ведущим мотивом в реорганизации генома *C. burnetii* является адаптация микроорганизма к новой экологической нише.

Таким образом, доступность применения методов секвенирования нового поколения позволит сделать предложенный подход востребованным для профилактической медицины и позволит осуществлять молекулярно-эпидемиологический скрининг штаммов *C. burnetii* в очагах Q лихорадки и образцах клинического материала. Другим аспектом применения новых методов может стать проведение ретроспективного изучения штаммов, выделенных от человека, животных и других источников, а также штаммов, которые хранятся в коллекциях бактериальных культур, для молекулярного скрининга геномов *C. burnetii* с целью поиска штаммов-продуцентов вакцин и возможного моделирования рекомбинантных конструкций.

Литература

1. Maurin M., Raoult D. Q fever // Clin Microbiol Rev. 1999. N12. P. 518–553.
2. Дайтер А.Б. Эпидемиологические аспекты болезней с природной очаговостью. Л.; 1986.
3. Tissot-Dupont H., Raoult D. Q Fever // Infect Dis Clin N Am. 2008. N22. P. 505–514.
4. Arricau Bouvery N., Souriau A., Lechopier P., et al. Experimental Coxiella burnetii infection in pregnant goats: excretion routes // Vet Res. 2003. N 3. P. 423–433.
5. Roest H.-J., van Gelderen B., Dinkla A., et al. Q Fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of Coxiella burnetii // PLoS ONE. 2012. N7. P. e48949.
6. Raoult D., Etienne J., Massip P., et al. Q fever endocarditis in the south of France. J Infect Dis. 1987. N 155. P. 570–573.
7. Raoult D., Marrie T., Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever // Lancet Infect Dis. 2005. Vol. 5, N 4. P. 219–226.
8. Parker N.R., Barralet J.H., Bell A.M. Q fever // Lancet. 2006. Vol. 367, N 9511. P. 679–688.
9. Hoover T.A., Culp D.W., Vodkin M.H. et al. Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the Coxiella burnetii nine mile strain // Infect. Immun. 2002. N70. P. 6726–6733.
10. Denison A.M., Massung R.F., Thompson H.A. Analysis of the O-antigen biosynthesis regions of phase II isolates of Coxiella burnetii // FEMS Microbiol. Lett. 2007. N 267. P. 102–107.
11. Kuley R., Smith H.E., Frangoulidis D., et al. Cell-Free Propagation of Coxiella burnetii does not affect its relative virulence // PLoS ONE. 2015. N10. P. 121661.
12. Kuley R., Smith H.E., Janse I., et al. First Complete Genome Sequence of the Dutch Veterinary Coxiella burnetii Strain NL3262, Originating from the Largest Global Q Fever Outbreak, and Draft Genome Sequence of Its Epidemiologically Linked Chronic Human Isolate NLhu3345937 // Genome Announc. 2016. Vol.4, N2. P. e00245-16.
13. 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.
14. D'Amato F., Rouli L., Edouard S., et al. The genome of Coxiella burnetii Z3055, a clone linked to the Netherlands Q fever outbreaks, provides evidence for the role of drift in the emergence of epidemic clones // Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2014. Vol. 37, N 5–6. P. 281–288.
15. Roest H.I., Ruuls R.C., Tilburg J.J., et al. Molecular epidemiology of Coxiella burnetii from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands // Emerg Infect Dis. 2011. N 17. P. 668–675.
16. 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.
17. Seshadri R., Paulsen I.T., Eisen J.A., et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen Coxiella burnetii // Proc Natl Acad Sci. 2003. N100. P.5455–5460.
18. Tilburg J.J., Roest H.J., Buffet S., et al. Epidemic Genotype of Coxiella burnetii among Goats, Sheep, and Humans in the Netherlands // Emerg Infect Dis. 2012. N18. P. 887–889.
19. Mori M., Boarbi S., Michel P., et al. In vitro and in vivo infectious potential of Coxiella burnetii: a study on Belgian livestock isolates // PLoS ONE. 2013. N8. P. e67622.
20. Гуменюк А.С., Поздниченко Н.Н., Родионов И.Н., и др. О средствах формального анализа строя нуклеотидных цепей // Математическая биология и биоинформатика. 2013. Т. 8, № 1. С. 373–397.
21. Shpynov S, Pozdnichenko N, Gumenuk A. Approach for classification and taxonomy within family Rickettsiaceae based on the Formal Order Analysis // Microbes Infect. 2015. Vol.17, N 11–12. P. 839 – 844.
22. Гуменюк А.С., Поздниченко Н.Н., Скиба А.А., Шпынов С.Н. Программа ЭВМ «Карта генов». Свидетельство о Государственной регистрации программы ЭВМ в Реестре программ ЭВМ № 2017616730 от 13.06.2017.
23. Гуменюк А.С., Поздниченко Н.Н., Скиба А.А., Шпынов С.Н. Программа ЭВМ «Матрица сходства нуклеотидных последовательностей по их компонентам». Свидетельство о Государственной регистрации программы ЭВМ в Реестре программ ЭВМ № 2017616679 от 09.06.2017.
24. Gumenyuk A., Kostyshin A., Simonova S. An approach to the research of the structure of linguistic and musical texts // Glottometrics. 2002. N3. P. 61–69.
25. Afreixo V., Bastos C.A., Pinho A.J., et al. Genome analysis with inter-nucleotide distances // Bioinformatics. 2009. Vol. 25, N 23. P. 3064–3070.
26. Achuth S., Achuthsankar S. Nair, Mahalakshmi T. Visualization of genomic data using inter-nucleotide distance signals. Proceedings of IEEE Genomic Signal Processing. Romania: Bucharest; 2005.
27. Hall B.G. Is the occurrence of some spontaneous mutations directed by environmental challenges? // New Biol. 1991. N 3. P. 729–733.
28. Beare P.A., Unsworth N., Andoh M., et al. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus Coxiella // Infect Immun. 2009. N 77. P. 642–656.
29. Pallen M.J., Wren B.W. Bacterial pathogenomics // Nature. 2007. N 449. P. 835–842.
30. Millar J.A., Beare P.A., Moses A.S., et al. Whole-Genome Sequence of Coxiella burnetii Nine Mile RSA439 (Phase II, Clone 4), a Laboratory Workhorse Strain // Genome Announc. 2017. Vol. 5, N 23. P: e00471–17.
31. Toman R., Škultéty L., Ftác˘ek P., et al. NMR study of virenose and dihydrohydroxystreptose isolated from Coxiella burnetii phase I lipopolysaccharide // Carbohydr. Res. 1998. N306. P. 291–296.
32. Enserink M. Questions abound in Q-Fever explosion in the Netherlands // Science. 2010. N327. P. 266–267.
33. van der Hoek W., Dijkstra F., Schimmer B., et al. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures // Euro. Surveill. 2010. N. 15. P. 19520.

References

1. Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev. 1999; 12: 518–553.
2. Dayter A.B. Epidemiological aspects of diseases with natural foci. L., 1986 (In Russ.)
3. Tissot-Dupont H, Raoult D. Q Fever. Infect Dis Clin N Am. 2008;22:505–514.
4. Arricau Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, et al. Experimental Coxiella burnetii infection in pregnant goats: excretion routes. Vet Res. 2003; 3: 423–433. doi: 10.1051/vetres:200301
5. Roest H-J, van Gelderen B, Dinkla A, et al. Q Fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of Coxiella burnetii. PLoS ONE. 2012;7:e48949. doi: 10.1371/journal.pone.0048949
6. Raoult D, Etienne J, Massip P, et al. Q fever endocarditis in the south of France. J Infect Dis. 1987; 155: 570–573.
7. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. Lancet Infect Dis. 2005; 5 (4): 219–226.
8. Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. Lancet. 2006;Vol.367,9511:679–688.
9. Hoover TA, Culp DW, Vodkin MH, et al. Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the Coxiella burnetii nine mile strain. Infect. Immun. 2002; 70: 6726–6733. doi: 10.1128/IAI.70.12.6726-2733.2002

10. Denison AM, Massung RF, Thompson HA. Analysis of the O-antigen biosynthesis regions of phase II isolates of Coxiella burnetii. FEMS Microbiol. Lett. 2007; 267: 102–107. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00544.x
11. Kuley R, Smith HE, Frangoulidis D, et al. Cell-Free Propagation of Coxiella burnetii does not affect its relative virulence. PLoS ONE. 2015;10:121661. doi: 10.1371/journal.pone.0121661.
12. Kuley R, Smith HE, Janse I, et al. First Complete Genome Sequence of the Dutch Veterinary Coxiella burnetii Strain NL3262, Originating from the Largest Global Q Fever Outbreak, and Draft Genome Sequence of Its Epidemiologically Linked Chronic Human Isolate NLhu3345937. Genome Announc. 2016;4(2): e00245-16. doi: 10.1128/genomeA.00245-16
13. Ladbury GA, Van Leuken JP, 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; 15: 372. doi: 10.1186/s12879-015-1083-9
14. D'Amato F, Rouli L, Edouard S, et al. The genome of Coxiella burnetii Z3055, a clone linked to the Netherlands Q fever outbreaks, provides evidence for the role of drift in the emergence of epidemic clones. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2014; 37 (5–6): 281–288. doi: 10.1016/j.cimid.2014.08.003
15. Roest HI, Ruuls RC, Tilburg JJ, et al. Molecular epidemiology of Coxiella burnetii from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2011;17:668–675. doi: 10.3201/eid1704.101562
16. Kuley R, Kuijt E, Smits MA, et al. Genome Plasticity and Polymorphisms in Critical Genes Correlate with Increased Virulence of Dutch Outbreak-Related Coxiella burnetii Strains. Front Microbiol. 2017; 8: 1526. doi: 10.3389/fmicb.2017.01526
17. Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen Coxiella burnetii. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 5455–5460. doi: 10.1073/pnas.0931379100
18. Tilburg JJ, Roest HJ, Buffet S, et al. Epidemic Genotype of Coxiella burnetii among Goats, Sheep, and Humans in the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2012;18:887–889. doi: 10.3201/eid1805.111907
19. Mori M., Boarbi S., Michel P., et al. In vitro and in vivo infectious potential of Coxiella burnetii: a study on Belgian livestock isolates. PLoS ONE. 2013;8:e67622. doi: 10.1371/journal.pone.0067622.
20. Gumenyuk AS, Pozdnichenko N, Rodionov I, et al. About the means of formal analysis system of nucleotide chains. Mat bio bioinform. 2013; 8 (1): 373–397. (In Russ.)
21. Shpynov S, Pozdnichenko N, Gumenuk A. Approach for classification and taxonomy within family Rickettsiaceae based on the Formal Order Analysis. Microbes Infect. 2015;17(11–12):839–844.
22. Gumenuk AS, Pozdnichenko NN, Skiba AA, Shpynov SN. Computer Program «Map of genes». Certificate of State Registration of the Computer Program in the Register of Computer Programs № 2017616730, 13.06.2017a. (In Russ.)
23. Gumenuk AS, Pozdnichenko NN, Skiba AA, Shpynov SN. Computer Program «Matrix of similarity of nucleotide sequences by their components». Certificate of State Registration of the Computer Program in the Register of Computer Programs № 2017616679, 09.06.2017b. (In Russ.).
24. Gumenyuk A, Kostyshin A, Simonova S. An approach to the research of the structure of linguistic and musical texts. Glottometrics. 2002; 3: 61–69.
25. Afreixo V, Bastos CA, Pinho AJ, et al. Genome analysis with inter-nucleotide distances. Bioinformatics. 2009; 25 (23): 3064–3070.
26. Achuth S, Achuthsankar S Nair, Mahalakshmi T. Visualization of genomic data using inter-nucleotide distance signals. Proceedings of IEEE Genomic Signal Processing. Romania: Bucharest; 2005.
27. Hall BG. Is the occurrence of some spontaneous mutations directed by environmental challenges? New Biol. 1991; 3: 729–733.
28. Beare PA, Unsworth N, Andoh M, et al. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus Coxiella. Infect Immun. 2009; 77: 642–656. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01141-08
29. Pallen MJ, Wren BW. Bacterial pathogenomics. Nature. 2007;449:835–842. doi: 10.1038/nature06248
30. Millar JA, Beare PA, Moses AS, et al. Whole-Genome Sequence of Coxiella burnetii Nine Mile RSA439 (Phase II, Clone 4), a Laboratory Workhorse Strain. Genome Announc. 2017; 8: 5 (23): e00471–17. doi: 10.1128/genomeA.00471-17
31. Toman R, Škultéty L, Ftác ˇek P, et al. NMR study of virenose and dihydrohydroxystreptose isolated from Coxiella burnetii phase I lipopolysaccharide. Carbohydr. Res. 1998; 306: 291–296. doi: 10.1016/S0008-6215(97)10037-4
32. Enserink M. Questions abound in Q-Fever explosion in the Netherlands. Science. 2010;327:266–267. doi: 10.1126/science.327.5963.266-a.
33. van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, et al. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. Euro. Surveill. 2010; 15: 19520.

Об авторах

- **Станислав Николаевич Шпынов** – д. м. н., руководитель лаборатории экологии риккетсий ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика. Н. Ф. Гамалеи». Адрес: 18, улица Н. Ф. Гамалеи, Москва, 123098 Россия. 8-499-193-61-85, stan63@inbox.ru.
- **Александр Степанович Гуменюк** – к. т. н., доцент кафедры информатики и вычислительной техники Омского государственного технического университета. Адрес: пр. Мира, д. 11, 644050, г. Омск, 8-960-991-33-97, gumas45@mail.ru
- **Николай Николаевич Поздниченко** – старший преподаватель кафедры информатики и вычислительной техники Омского государственного технического университета. Адрес: пр. Мира, д. 11, 644050, г. Омск, 8-960-982-30-10, nick670@yandex.ru
- Артемий Андреевич Скиба – инженер-программист ООО «Компания Элмис». Адрес: ул. Маяковского, д. 14, 644046, г. Омск, 8-965-985-77-54, skiba.artem@inbox.ru

Поступила: 1.07.2018. **Принята к печати:** 11.09.2018.

About the Authors

- **Stanislav N. Shpynov** – Dr. Sci. (Med.), head of laboratory of ecology of rickettsiae of NF Gamaleya Centre of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation.18, N.F. Gamaleya str., Moscow, 123098 Russia. 007-499-193-6185, stan63@inbox.ru.
- **Alexander S. Gumenyuk** – Cand. Sci. (Techn.), docent of informatics and computer engineering department of Omsk State Technical University, Omsk, Russia prospect Mira 11, 644050, Omsk, 8-960-991-33-97, gumas45@mail.ru
- **Nikolay N. Pozdnichenko** – senior lecturer of informatics and computer engineering department of Omsk State Technical University, Omsk, Russia prospect Mira 11, 644050, Omsk, 8-960-982-30-10, nick670@yandex.ru
- **Artemiy A. Skiba** – software developer, Ltd «Company Elmis», Omsk, Russia, Myakovskogo str., 14, 644046, Omsk, 8-965-985-77-54, skiba.artem@inbox.ru

Received: 1.07.2018. **Accepted:** 11.09.2018.

ERRATA

В предыдущем номере пять на странице 113 таблица № 2 должна выглядеть следующим образом:

Кратность и сроки иммунизации против пневмококковой инфекции Number and timing of immunization against pneumococcal infection													
Однократная иммунизация Single immunization		Двухкратная иммунизация Two-time immunization		Полный курс иммунизации (2 вакцинации и ревакцинация) Complete immunization schedule (2 vaccinations and revaccination		Непривитые Unvaccinated		Первая иммунизация проведена в возрасте The first immunization was performed at the age of					
								0–5 мес. 0–5 month		6 мес. – 1 год 6 month – 1 year		1 год 1 мес. – 2 года 1 year 1 month – 2 years	
Абс. Abs.	M ± m, %	Абс. Abs.	M ± m, %	Абс. Abs.	M ± m,%	Абс. Abs.	M ± m,%	Абс. Abs.	M ± m,%	Абс. Abs.	M ± m,%	Абс. Abs.	M±m,%
59	21,7 ± 2,5	14	5,1 ± 1,3	0	–	199	73,1 ± 2,7	1	1,4 ± 1,3	3	4,1 ± 2,3	20	27,4 ± 5,2