

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОГЕННОСТИ *COXIELLA BURNETII*

Ю.А. Панферова

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

**Резюме.** Возбудитель Ку-лихорадки, *Coxiella burnetii*, является достаточно необычным внутриклеточным патогеном, обладающим значительно большими транспортными и метаболическими способностями, нежели микроорганизмы со сходной паразитической стратегией. Предполагается, что разные штаммы патогена находятся на разных стадиях процесса патоадаптации и обладают различным вирулентным потенциалом. В обзоре рассматривается структура генома *C. burnetii*, особенности метаболических путей, механизмы взаимодействия с клеткой хозяина и возможные факторы вирулентности. Особое внимание уделяется методам генотипирования коксиелл и возможной корреляции между геномным полиморфизмом различных штаммов и их вирулентным потенциалом.

*Ключевые слова:* *Coxiella burnetii*, геном, патоадаптация, геномные группы, генотипирование.

## MOLECULAR-GENETIC BASIS OF PHYSIOLOGY AND PATHOGENICITY OF *COXIELLA BURNETII*

Panpherova Yu.A.

**Abstract.** The agent of Q-fever *Coxiella burnetii* is unusual intracellular pathogen which is possessed of biggest transporting and metabolic abilities in compare with microorganisms with similar parasitic strategy. It is supposed that different strains of the pathogen exist in various stages of pathological adaption and have different potential of virulence. The structure of *C. burnetii* genome, characteristics of metabolic routes, mechanisms of interaction with host cells and possible virulence factors are discussed in the review. The special attention is paid to *Coxiella* genotyping methods and possible correlations between genomic polymorphism of different strains and their virulence potential. (*Infekc. immun.*, 2012, vol. 2, N 3, p. 615–626)

*Key words:* *Coxiella burnetii*, genome, pathogenic adoption, genomic groups, genotyping.

## Введение

Коксиелла Бернета (*Coxiella burnetii*) — облигатный внутриклеточный паразит эукариот, полиморфная грамтрицательная палочковидная бактерия, вызывающая Ку-лихорадку у человека и коксиеллез животных. Заболевание характеризуется множественностью источников и факторов заражения, а также разнообразием путей заражения [27]. Острая форма Ку-лихорадки проявляется в виде гриппоподобного лихорадочного заболевания, атипичных пневмоний и, в редких случаях, менингоэнцефалитов. Хроническая инфекция наблюдается при иммуносупрессивных состояниях, поздней диагностике, неправильном лечении и чаще

всего ассоциирована с эндокардитом. Летальность при хронической лихорадке Ку достигает 65% [28]. *C. burnetii* может длительно персистировать в организме человека, что объясняет тенденцию к затяжному и хроническому течению лихорадки Ку у некоторых больных. Обострение заболевания во время беременности ведет к выкидышам, преждевременным родам и недоношенности новорожденных. Бессимптомное течение болезни в эндемических очагах происходит довольно часто, о чем свидетельствует обнаружение специфических антител у 6–15% здоровых лиц, у которых в анамнезе нет указаний о перенесенной лихорадке неясного генеза [28]. Патоген обладает тропностью к репродуктивным органам и плоду, поэ-

поступила в редакцию 14.06.2011  
отправлена на доработку 19.06.2011  
принята к печати 21.12.2011

© Панферова Ю.А., 2012

### Адрес для переписки:

Панферова Юлия Александровна,  
научный сотрудник лаборатории  
зооантропонозов ФБУН НИИ  
эпидемиологии и микробиологии  
имени Пастера

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.  
Тел.: (812) 233-21-49.  
E-mail: zoonoses@mail.ru

тому, хотя у животных коксии часто протекают бессимптомно, с ним ассоциированы аборт, недоношенность плода и бесплодие крупного и мелкого рогатого скота; у больных животных происходит активное выделение патогена во внешнюю среду с мочой, последом и фекалиями. Существование природных очагов Ку-лихорадки установлено во всех странах мира, где проводилось изучение этой инфекции [56]. Выраженная биологическая пластичность способствует поддержанию циркуляции возбудителя в стойких природных очагах и вовлечению в цепь его циркуляции широкого круга позвоночных и беспозвоночных животных. В силу высокой инвазивности и высокой устойчивости в условиях внешней среды, коксия Бернета относится ко 2-й группе биологической опасности и имеет военно-эпидемиологическое значение, поскольку может использоваться как агент биотерроризма.

Согласно современной системе классификации прокариотических организмов, основанной на сравнении нуклеотидной последовательности их генов, род *Coxiella* включает единственный на данный момент вид *C. burnetii* и принадлежит к семейству *Legionellaceae*, класса *Gammaproteobacteria*, вместе с близкородственными родами *Legionella*, *Francisella*, *Aquisella* и *Rickettsiella* [47]. Наибольшая степень филогенетического родства относительно коксии отмечена для *Legionella pneumophila*, возбудителя «болезни легионеров» [54].

Коксии адаптированы к функционированию в фагоцитирующих клетках эукариот (и их репликация происходит только в фаголизосомальных вакуолях с кислой средой (рН 4,7–5,2)). Коксия является ацидофильным организмом, метаболизм которого поддерживается низкими значениями рН, однако метаболическая активность наблюдается в диапазоне рН 2,0–9,0 [12]. Единственными организмами, адаптированными к таким же низким значениям рН в фаголизосомальном компартменте, являются *Mycobacterium leprae* и относящаяся к амастиготам *Leishmania sp.* [57]. Такая кислотность важна для процесса ассимиляции возбудителем питательных веществ, необходимых для его метаболизма, синтеза нуклеиновых кислот и аминокислот.

Уникальность взаимоотношения «паразит–хозяин» в случае *C. burnetii* проявляется еще и в прохождении патогеном дифференциации в различные клеточные типы, что достаточно сходно с диморфным жизненным циклом *Chlamydia sp.* Одним из типов является так называемый small cell variant (SCV, малая клеточная форма), обладающий устойчиво-

стью к факторам внешней среды, сравнимой со спорами, и, по-видимому, адаптированной для существования вне клетки хозяина. С этой формой связана высокая инфицирующая способность коксии. В свою очередь, large cell variant (LCV, большая клеточная форма) менее устойчива к физическим и химическим факторам, но является метаболически активной. Важным этапом является процесс образования так называемых спороподобных форм (клеток SCV-типа) из LCV-клеток, напоминающий образование «элементарных телец» хламидий [29]. Функция клеток этого типа заключается в адаптации к условиям окружающей среды, они необходимы для распространения коксии Бернета. Эти клетки обладают чрезвычайной устойчивостью к таким факторам, как температурное воздействие, высушивание, высокие и низкие значения рН, и действию дезинфицирующих веществ.

В результате многочисленных исследований штаммы коксии, выделенные от инфицированных животных и пациентов, а также длительно культивировавшиеся в лабораторных условиях, были разделены на группы в зависимости от их антигенной активности. В ходе пассирования коксии на клеточных линиях или в желточных мешках куриных эмбрионов может происходить изменение антигенных характеристик штамма. Было установлено, что для коксии характерна так называемая фазовая изменчивость: бактерии, выделенные от больных людей и животных, от грызунов и клещей относятся к фазе I, при длительном пассировании на куриных эмбрионах происходит переход в фазу II, и этот процесс сопровождается изменением антигенной структуры.

## Особенности организации генома *Coxiella burnetii*

Размер генома у разных штаммов *C. burnetii* варьирует от 1,9 до 2,2 млн п.н. [2]. Для референс-штамма Nine Mile I (RSA493) эта величина составляет 2 млн п.н., генетический аппарат включает в себя кольцевую хромосому (1,995 млн п.н.) и плазмиду (37,4 тыс. п.н.) [44]. Максимальный размер хромосомы и плазмиды (2,16 млн и 54 тыс. п.н. соответственно) отмечен для штамма Dugway 5J108-111 [2]. Было выделено несколько бесплазмидных штаммов, однако функции плазмидных генов у них не потеряны, поскольку коровые участки плазмиды интегрированы в хромосому.

Суммарное содержание пар G+C% в хромосоме разных штаммов незначительно различается и составляет от 42,4 до 43%, в плазм-

миде — с 39,3 до 39,8% [2, 21]. Ген 16S рРНК на хромосоме присутствует в единственной копии. В геноме обнаружено от 1816 (у штамма CbuG Q212) до 2134 (у штамма Nine Mile I) открытых рамок считывания (ОРС), кодирующих белки с известными или гипотетическими функциями. ОРС, кодирующие белки с гипотетическими функциями, составляют 39,2% генома, что характерно и для других представителей гамма-протеобактерий [2, 44].

Геном облигатных внутриклеточных патогенов (*Rickettsia spp.*, *Chlamydia spp.*), как правило, значительно редуцирован; по сравнению со свободноживущими организмами, метаболические и транспортные способности этих патогенов ограничены вследствие утраты генов или большого числа мутаций в них, также для них характерно отсутствие мобильных элементов. Хотя условия обитания и паразитическая стратегия *C. burnetii* в целом сходны с таковыми для выше указанных бактерий, геном коксииеллы отличается по содержанию мобильных элементов, масштабам геномной редукции, метаболической активности и числу клеточных транспортеров.

В геноме большинства облигатных внутриклеточных бактерий нет мобильных генетических элементов либо они содержатся в очень небольшом количестве, в основном из-за крайне ограниченной возможности горизонтального переноса. В геноме *C. burnetii*, напротив, обнаружено от 28 до 59 инсерционных последовательностей (IS), что определяет его пластичность. Они рассеяны по хромосоме и включают элементы семейств IS1111, IS30, IS652, IS4 и ISAs1, а также 3 транспозазы неизвестного типа [7, 18]. IS не образуют кластеров на хромосоме и отсутствуют в плазмидах, за исключением штамма Dugway 5J108–111, на плазмиде которого обнаружена 1 копия IS4. Инсерционный элемент IS1111 расположен рядом с интегрированным в хромосому участком плазмиды у штамма CbuG Q212 [2]. Хотя не обнаружено участков сравнительно недавно приобретенной чужеродной ДНК, в одном случае IS1111 фланкируют группу генов, ассоциированную с генами тРНК серина и напоминающую так называемый «островок патогенности». В данном локусе обнаружен ряд специфических генов, в том числе ген, кодирующий белок, который выполняет функции транспортера, обеспечивающего множественную лекарственную резистентность («multidrug transporter»), ген стеролредуктазы, и многочисленные гипотетические гены [11]. IS-элементы играют важную роль в геномных перестройках *C. burnetii* за счет гомологичной рекомбинации; в образовании

псевдогенов, возникающих после встраивания в интактные гены. Полагают, что связанные с IS-элементами геномные перестройки характерны для патогенов, недавно произошедших от непатогенных форм микроорганизмов и находящихся в процессе патоадаптации [2].

В геноме *C. burnetii* обнаружено 83 псевдогена, что, по мнению ряда авторов, может указывать на тенденцию к редукции генома [44]. Вообще, наличие достаточно большого числа псевдогенов, то есть генов, транскрипция которых нарушена в результате одного или нескольких сдвигов рамки считывания, точковых мутаций или прерывания открытых рамок считывания, характерно для некоторых облигатных внутриклеточных паразитов. Поскольку среда их обитания достаточно постоянна, в процессе редукции генома гены, имевшие ранее важные функции, накапливают мутации или исчезают, поскольку больше не подвергаются строгому селективному давлению. Тот факт, что многие псевдогены образовались в ходе единичного сдвига рамки считывания, свидетельствует о недавнем их происхождении [2]. Кроме того, значительно большая часть генома *C. burnetii* представлена кодирующими последовательностями (89,1%), по сравнению с другими бактериальными видами, которые подверглись значительной геномной редукции (около 76% у *Rickettsia prowazekii* и *Mycobacterium leprae*). Это позволяет предположить, что процесс геномной редукции у коксииеллы начался недавно, или, возможно, он не такой выраженный, как у других видов [2]. В большом числе псевдогенов представлены в специфических группах генов, связанных с продукцией токсинов, устойчивостью к антибиотикам, транспортными и связывающими функциями, а также среди генов с гипотетической либо неустановленной функцией, что предполагает нарушение соответствующих функций. По крайней мере у одного из шести штаммов, полная нуклеотидная последовательность генома которых в настоящее время расшифрована (RSA493 Nine Mile I, MSU Goat Q177, CbuK Q154, CbuG 212, Dugway 5J108-111, RSA 331), отсутствует 1 или несколько из 12 псевдогенов (15,2% от общего числа обнаруженных в геноме псевдогенов). Напротив, у изученных штаммов эксцизии подвержено лишь 6,9% кодирующих ОРС. Таким образом, нефункциональные ОРС являются более частой мишенью для делеции, нежели функциональные. Более того, среди подвергшихся делеции функциональных ОРС большинство обладают функциональной избыточностью (в их числе две из пяти нуклеотидилтрансфераз, 4 из 14 белков с анкириновыми

повторами, 2 из 21 АТФаз, 2 из 5 белков В, обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость) [1].

В важных для жизнедеятельности микроорганизма генах были обнаружены генетические элементы, способные к автосплайсингу. В С-терминальном регионе гена *dnaB*, кодирующего ДНК-геликазу, расположен интеин — элемент, осуществляющий аутокаталитический сплайсинг на уровне белка, способный проходить гомологичную рекомбинацию и встраиваться в аналогичный ген, находящийся в плазмиде [34]. Интеин представляет собой специфическую структуру, состоящую из сплайсингового и центрального эндонуклеазного доменов, в составе предшественника функционального белка, которая самовырезается сразу после синтеза, а фланкирующие ее участки (экстеины) лигируются. За счет активации эндонуклеазного домена может происходить хоуминг интеина, то есть встраивания последовательности «интеин-белок» в гомологичный участок хромосомы или плазмиды, таким образом, может обеспечиваться увеличение числа генов, содержащих интеин, в клетке, а также горизонтальный перенос генов. Анализ нуклеотидной последовательности *dnaB* и интеина в составе этого гена выявил значительное сходство данного локуса с гомологичными у экстремофильных гамма-протеобактерий *Alkalimnicola ehrlichei* и *Halorhodospira halophila* [36]; в настоящее время сложно установить, является ли это филогенетическое сходство результатом горизонтального переноса генов в далеком прошлом, до перехода *C. burnetii* во внутриклеточную нишу, либо интеин был приобретен от общего предкового микроорганизма. Ген 23S рРНК в составе оперона 5S-23S-16S рРНК прерывается вставочной последовательностью в виде двух интронов I типа (Cbu.L1917 и Cbu.L1951), обладающих рибозимной активностью и способных к автосплайсингу на уровне предшественника РНК [35]. Необходимая для сплайсинга информация содержится в самом интроне, во входящих в его состав коротких внутренних последовательностях; в результате внутримолекулярного спаривания нуклеотидов интрон приобретает конформацию, благоприятную для аутокаталитического сплайсинга, после которого образуется рРНК и линейная РНК, по размеру чуть менее протяженная, чем сам интрон. Стоит отметить, что наличие даже одного интрона в составе генов прокариот является достаточно редким явлением, поскольку интрон-эксонная структура гена характерна для эукариот. Нуклеотидная последовательность двух интро-

нов консервативна в пределах вида *C. burnetii*, однако филогенетический анализ выявил сходство Cbu.L1917 с интронами *Thermotoga*, *Synechococcus* и *Chlamydomonas*, а Cbu.L1951 — с интронами *Acanthamoeba* и *Chlorella*. Такая структура интронов может свидетельствовать о горизонтальном переносе генов у предка коксии еще до перехода его к облигатному внутриклеточному паразитизму [48, 35]. Было установлено, что период полужизни транскрибируемых с данных интронов РНК различается в зависимости от фазы роста бактериальной культуры, что может быть связано с участием рибозимов в торможении роста микроорганизма, и в период логарифмического роста он значительно меньше, чем на протяжении лаг-фазы. Стабильность этих РНК может быть также связана и с образованием клеток SCV-типа, у которых наблюдается относительно постоянное количество транскрибированного рибозима; в таком случае, позитивная селекция этих так называемых «токсичных» интронов связана с паразитическим образом жизни [36].

Сдвиги рамки считывания отмечены в участках генов, кодирующих белки ComA, ComF, ComE, что может свидетельствовать об отсутствии естественной компетенции у организма [44]. Стоит отметить, что близкородственный коксии организм, *Legionella pneumophila*, обладает естественной компетентностью [49]. В условиях *in vitro* проводилась искусственная трансформация *C. burnetii* путем электропорации, возможность естественной трансформации не установлена [50].

Состав плазмидных генов изучен к настоящему моменту недостаточно. Полное секвенирование генома коксии позволило установить, что многие из них обеспечивают функции рекомбинации, защиты клетки от окислительного стресса, а также участвуют в приспособлении патогена к организму хозяина. На плазмиде QpH1 обнаружен ген *cbbe'*, кодирующий поверхностный белок размером 27 kDa с неизвестной функцией [31], и ген *htpB* [52], кодирующий белок теплового шока [26]. Трансформация *E. coli* типоспецифичным участком плазмиды QpH1 размером 6 тыс. п.н. позволила установить, что данный участок кодирует 7 протеинов, из которых охарактеризованы пока лишь 2: белки QsopA и QsopB. Они гомологичны белкам SopA и SopB, которые участвуют в репликации F-плазмиды *E. coli* [22], и белку ParA, необходимому для репликации плазмиды pTAR *Agrobacterium tumefaciens* [23]. Ген *qsopA* содержит АТ-богатые участки в промотерном регионе, что может свидетельствовать о наличии системы авторегуляции,

с которой может быть связана копияность исследуемой плазмиды [24]. О числе копий плазмид известно, что плазида QpH1 может быть представлена в геноме в количестве 1–3 копий [25, 40]. У бесплазмидных штаммов в хромосоме присутствует последовательность, гомологичная плазмиде QpRS [55]. В составе плазмид всех типов и интегрированных в хромосому плазмидных последовательностей был обнаружен оперон, включающий в себя гены, кодирующие белки с характерными для эукариот структурными мотивами (CpeA, CpeB, CpeF) и, по-видимому, секретирующимися с помощью Icm/Dot-системы. Плазида QpH1 также содержит гены секретируемых белков CpeC, CpeD и CpeE [53]. Было установлено, что продукты этих генов локализуются в различных компартментах клетки хозяина, что может быть связано с модуляцией функций хозяина.

### Паразитическая стратегия *Coxiella burnetii* и связанные с ней физиолого-биохимические свойства

Стоит отметить, что *C. burnetii* занимает уникальную для бактериального мира нишу, поскольку активация метаболизма и репликации данного патогена происходит внутри зрелых фаголизосом. Низкое значение рН внутри фагосомы после слияния ее с лизосомами, как правило, подавляет метаболизм бактерий и, напротив, активирует энзиматические лизосомальные комплексы клетки хозяина, после чего происходит лизис белков и липидов бактерий. Катионные антимикробные пептиды (СAMP) и свободные кислородные и азотные радикалы приводят к повреждению мембран и генетического аппарата патогенов, поэтому стратегия выживания большинства внутриклеточных патогенов сводится к блокировке слияния фагосом с лизосомами либо к выходу из фагосомы; коксиелла же избегает расщепления лизосомальными ферментами. Субстраты и питательные вещества в полностью сформированной, закисленной фаголизосоме представлены продуктами деградации фагосомального содержимого, малыми пептидами, аминокислотами, которые патоген активно использует для роста и репликации [6].

Особенности комплекса генов, связанных с транспортом и метаболизмом коксиеллы, в значительной степени обусловлены обитанием патогена в фаголизосоме внутри клетки хозяина. Многие внутриклеточные патогены избегают слияния с фаголизосомой, однако коксиелла, напротив, способна

персистировать в этой специализированной нише в условиях окислительного и осмотического стресса. Защита от низких значений рН может осуществляться основными протеинами. У коксиеллы чрезвычайно высокое число основных протеинов, среднее значение изоэлектрической точки для всех белков организма составляет 8,25. Аналогичные показатели характерны лишь для *Helicobacter pylori* [44]. Более того, почти 45% белков коксиеллы имеют изоэлектрическую точку выше 9, а 26% всех белков — выше 10, что не характерно для прочих гамма-протеобактерий и подавляющего большинства внутриклеточных патогенов. У коксиеллы обнаружено 4 обменных помпы  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , играющие важную роль в поддержании рН. Устойчивость к осмотическому шоку обеспечивают 3 механочувствительных ионных канала и 3 транспортера осмопротекторов. Присутствует большое число ферментов, связанных с детоксификацией фаголизосомной вакуоли: Fe/Mn- и Cu/Zn-супероксиддисмутазы, глутатредоксины, тиоредоксин, тиоредоксин-пероксидаза, тиоредоксин-редуктаза, рубредоксин и рубредоксин-редуктаза, а также две пероксидсвязывающие алкилгидропероксид-редуктазы Ahp, которые могут обеспечивать слабую каталазную активность [2, 44]. Стоит заметить, что у разных штаммов наблюдаются вариации: так, из-за сдвига рамок считывания у Nine Mile I и CbuG Q212 не функционирует один из Ahp-белков, у Dugway — Cu/Zn-супероксиддисмутазы [2].

Система транспорта органических питательных субстратов у коксиеллы развита лучше, чем у представителей облигатных внутриклеточных патогенов *Chlamydia sp.* и *Rickettsia sp.*, однако редуцирована по сравнению со свободноживущими бактериями. Обнаружены протон-движущие системы транспорта глюкозы и ксилозы; в геноме присутствуют гены отдельных элементов фосфотрансферазной системы, однако сами транспортеры не обнаружены. По-видимому, эти элементы играют в данном случае регуляторную роль [44]. Присутствие 15 транспортеров аминокислот и 3-х транспортеров пептидов указывает на то, что эти вещества являются основными источниками углерода для микроорганизма. В отличие от риккетсий и хламидий, обменники АТФ/АДФ у *C. burnetii* не найдены, что свидетельствует о том, что функция «энергетического паразитизма», характерная для названных выше организмов, ей не доступна.

По сравнению с другими облигатными внутриклеточными паразитами, метаболи-

ческая активность которых ограничена в результате повышенной зависимости от субстратов клетки хозяина, *C. burnetii* обладает значительными способностями к биосинтезу *de novo*. У коксиеллы обнаружены ферменты системы гликолиза, пути Энтнера–Дудорова, электрон-транспортной цепи, цикла трикарбоновых кислот [44]. Отсутствует глиоксилатный шунт, возможно, по причине использования коксиеллой экзогенных аминокислот, так как при этом не требуется перезарядки цикла трикарбоновых кислот посредством синтеза интермедиатов аминокислотного синтеза [32]. Кроме того, экзогенные аминокислоты могут деградировать до промежуточных соединений, необходимых для прохождения цикла трикарбоновых кислот, если это является необходимым. Не нарушены пути синтеза пурина, пиримидина, жирных кислот и фосфолипидов, кофакторов (биотина, убихинона, фолиевой кислоты). Идентифицированы компоненты мевалонатного пути для синтеза изопренилдифосфата или изопреноидов. Поскольку глицеральдегидтрифосфат — пируватный путь синтеза изопренилдифосфата, характерный для грамотрицательных бактерий, у *C. burnetii* отсутствует, можно предположить, что в данном случае идет лишь мевалонатный путь синтеза, характерный для грамположительных бактерий и архей [44]. По-видимому, эта система была приобретена путем горизонтального переноса генов [2].

Коксиелла является ауксотрофом по 11 аминокислотам. Пути синтеза некоторых из них отсутствуют полностью, в других нет лишь ключевых энзимов [44]. Однако эта недостаточность полностью восполняется наличием транспортеров аминокислот, позволяющих использовать субстраты клетки хозяина. Подобно *Chlamydia sp.* и *Rickettsia sp.*, у коксиеллы отсутствуют ферменты конечных этапов синтеза лизина. Триптофановый оперон имеет несколько мутаций, включая множественные сдвиги рамки считывания и слияние генов, кодирующих некоторые ферменты (фосфорибозил-антранилатизомеразы и триптофансинтазы), что нарушает начальные этапы биосинтеза. Учитывая, что терминальные этапы цепи не нарушены, биосинтез триптофана может происходить за счет интермедиатов, заимствуемых из клетки хозяина; такая адаптивная система характерна также для хламидий [9]. Полиморфизм генов метаболических путей также может быть связан с вирулентным потенциалом штамма. Так, в процессе острой инфекции происходит активация макрофагов  $\gamma$ -интерфероном, при этом рост

бактерий может ограничиваться за счет синтеза индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), разрушающей L-триптофан до L-кинуренина. (Штамм Dugway менее устойчив к действию этого фермента, поскольку не имеет вышеуказанных мутаций и является прототрофом по триптофану [2]).

Анализ генома свидетельствует о наличии путей утилизации нескольких сахаров (глюкозы, галактозы и ксилозы) и глицерола (хотя транспортер для транспорта экзогенного глицерола не обнаружен) [44]. Возможно, в кислой среде фаголизосомы, содержащей большое количество ферментов, эти сахара становятся легко доступными. Принимая во внимание способность коксиеллы персистировать во внеклеточной среде в течение длительного периода, отсутствие путей синтеза и накопления таких соединений, как гликоген, трегалоза и полигидроксибутират, напротив, является неожиданным. Хотя гены синтеза липида А и 2-кето-3-деоксиоктулоновой кислоты — компонентов липополисахаридов расположены в разных участках хромосомной ДНК, гены синтеза олигосахаридного кора ЛПС и внешних повторяющихся единиц — О-антигенных полисахаридных цепей, напротив, были локализованы в компактных кластерах в двух регионах, которые содержат большое число генов метаболизма углеводов, вовлеченных в полимеризацию сахаров при образовании О-антигенных цепей [19].

Была выявлена дифференциальная экспрессия ряда белков в клетках разных метаболических типов (SCV и LCV). Так, 48 белков экспрессируются преимущественно у LCV-типа, 6 белков — преимущественно у SCV-типа [5]. В первой группе обнаружены белки, связанные с процессом деления, синтеза РНК, синтеза и процессинга протеинов, белок строгого ответа SspA, шапероны (GroEL, HtpG). В клетках SCV-типа синтезируются белки TolB (связан со стабилизацией наружной мембраны), гомолог белка Era (необходим для контроля клеточного цикла и клеточной дифференциации), MetC, ScvA и Hq1, связанные с изменением метаболизма и конденсацией хроматина [5].

Для клеток SCV-типа характерно наличие ДНК-связывающего протеина Hq1, первичная структура которого сходна со структурой эукариотических гистонов [15], и белка ScvA, структурирующего и компактизирующего хроматин, и некоторых других белков, состав которых изменяется на разных стадиях развития коксиеллы, за счет чего происходит изменение структуры нуклеоида [16].

Электронноплотный материал, обнаруженный у клеток SCV-типа в периплазматическом пространстве, представлен белками и пептидогликанами и может быть связан с повышенной устойчивостью их во внешней среде. Пептидогликаны в периплазматическом пространстве клеток LCV-типа не выявляются; по-видимому, содержание этих структурных компонентов в клетках данного типа очень невелико [15, 29].

## Факторы, определяющие вирулентность *Coxiella burnetii*. Феномен фазовой варибельности и механизмы взаимодействия с клеткой хозяина

У *C. burnetii* отмечена варибельность поверхностных антигенов, сходная с так называемой «smooth-rough»-варибельностью, характерной для бактерий сем. *Enterobacteriaceae*. Фазовые вариации связаны в основном с мутациями липополисахаридов [13]. *C. burnetii* фазы I обладают высокой вирулентностью, что связано с наличием в мембране липополисахаридов, аналогичных ЛПС энтеробактерий S-типа (smooth — гладкий). *C. burnetii* фазы II обладают значительно меньшей вирулентностью, наблюдаются только в лабораторных условиях после достаточно длительного культивирования коксиелл в системах с отсутствием иммунной компетентности. Для *C. burnetii* фазы II характерны ЛПС усеченной структуры, как у бактерий R-типа (rough — шероховатый) типа, и отсутствие некоторых белков — детерминант клеточной поверхности. Состав сахаров, входящих в ЛПС, также различается: в составе ЛПС фазы I обнаружены уникальные сахара — вириноза (6-дезоксид-3-С-метил-d-гулоза), дигидрогидроксистрептоза (3-С-гидроксиметилликсоза) и галактозамин-уронил-(1,6)-глюкозамин, отсутствующие в ЛПС фазы II. Для ЛПС фазы II характерно наличие 2-кето-3-деоксиоктулонозойной кислоты, d-глицеро-d-манногептозы, а также сложной смеси жирных кислот, многие из которых имеют разветвленную структуру [14]. Различия наблюдаются и в длине углеводных O-антигенных цепей: у клеток фазы II эти цепи укорочены или редуцированы, ЛПС содержат липид А и некоторые сахара мембранного кора, но не содержат O-антиген, молекулярная масса этих ЛПС около 2,5 kDa, в то время как у штаммов фазы I — 19, 15 и 14,3 kDa. Выявлено различие в составе фосфолипидов у I и II фазы; у фазы II отсутствуют фосфатидилинозитолы [8].

Прошедшие меньшее число пассажей на куриных эмбрионах штаммы, а также штаммы фазы II после введения их в организм восприимчивых лабораторных животных относятся к промежуточному типу; таков, например, штамм Nine Mile Crazy. Для этих клеток характерно наличие липополисахаридов с начальной стадией редукции углеводной цепи, молекулярная масса таких ЛПС составила 14,3 kDa [13]. Существует определенный порог, до наступления которого возможен обратный переход фазы II в фазу I в случае пассирования маловирулентного варианта штамма (фазы II) в организме животных.

Было установлено, что *C. burnetii* фазы II проникают в клетки моноцитарно-макрофагального ряда с вовлечением интегриновых рецепторов CR3. У более вирулентной фазы I заблокировано интернализация с участием CR3, патогены фазы I связываются с комплексами LRI (интегрин лейкоцитарного ответа) и IAP (интегрин-ассоциированный белок). Коксиеллы фазы I медленнее проникают в моноциты и макрофаги, но могут долго выживать в этих клетках. Напротив, коксиеллы фазы II быстро проникают в клетки, но значительно чаще подвергаются деградации в фаголизосомах [30].

Таким образом, описано три различных хемотипа ЛПС и установлена потенциальная связь между хемотипом и вирулентностью патогена. Предпринимались различные попытки объяснить причину фазовой варибельности *C. burnetii*. Некоторые авторы полагали, что причиной этого феномена является потеря хромосомной ДНК, в частности, плазмиды QpN1. Было показано, что данная плаزمида сохраняется в клетке при фазовом переходе и ее нуклеотидная последовательность не изменяется. Предполагалось, имеет место контроль экспрессии хромосомных генов, ответственных за фазовые вариации, со стороны плазмиды [41].

В хромосоме штамма Nine Mile фазы II обнаружены значительные хромосомные делеции (26 тыс. п.н.), с которыми, по-видимому, и связаны антигенные фазовые вариации [19]. Интересно, что у переходной формы (Nine Mile Crazy) также отмечена хромосомная делеция, размеры которой несколько больше, чем у штамма Nine Mile фазы II и составляют 32 тыс. п.н. В делетированном участке, затрагивающем 20 и 24 ОРС у штаммов Nine Mile II и Nine Mile Crazy, соответственно, обнаружены гомологи генов синтеза ЛПС (гены, кодирующие эпимеразы, дегидратазы, гликозилтрансферазы нуклеотидных сахаров). Однако штамм Au, прошедший 177 пассажей на куриных эм-

брионах и идентифицированный как изолят фазы II, то есть продуцирующий ЛПС той же длины, что и Nine Mile II, не обладал этими делециями, что указывает на то, что крупные делеции не являются единственной причиной фазовой вариации ЛПС [19]. Возможно, в данном случае фазовый переход связан с мутациями, нарушающими начальные этапы синтеза ЛПС, однако это предположение требует дополнительного анализа.

О генах, связанных с вирулентностью микроорганизма, в частности, с инвазией в ткани и внутриклеточной персистенцией, известно немного. Полноразмерные ЛПС, характерные для клеток *C. burnetii* фазы I, являются единственными хорошо изученными факторами вирулентности данного патогена. Стоит отметить, что проводившиеся ранее исследования генома различных штаммов коксиелл методом макрорестрикционного анализа позволило выделить шесть геномных групп; позднее было выделено еще две геномных группы, и в настоящее время их число достигает восьми [1, 17]. В моделях *in vitro* и *in vivo* были установлены различия в патогенном потенциале штаммов, выделенных от больных острой и хронической лихорадкой Ку и из природных источников [37]. В связи с этим широко применяется условное разделение как отдельных штаммов, так и геномных групп на «острые» и «хронические», согласно форме заболевания, которая преимущественно наблюдается у людей, пораженных коксиеллами этих групп [17, 40]. Однако при исследовании полиморфизмов, ассоциированных с IS1111, штамм Qiu1, выделенный от больного хроническими коксиеллезным эндокардитом, был идентифицирован как изолят геномной группы I («острой»). Таким образом, требуется проведение дополнительных исследований для ассоциации геномных групп с формой вызываемого заболевания [1]. Разные штаммы микроорганизма находятся на разных этапах патoadaptации [2], что отражается в наличии многочисленных геномных полиморфизмов.

У «хронических» изолятов группы V отсутствуют две ОРС, кодирующие протеины, высокогомологичные регулятору чувства кворума LuxR, однако отсутствие каких-либо иных полиморфизмов, связанных с чувством кворума, позволяет предположить, что продукты этих генов у коксиелл выполняют какие-то другие регуляторные функции. Возможно, отсутствие этих ОРС приводит к замедлению роста у «хронических» изолятов и, соответственно, провоцирует возникновение иммунного ответа замедленного типа [1]. Существует предположение, что медленный рост патогена, наблю-

даемый при значительной геномной редукции, возможно, является одним из факторов, определяющих способность к хронической инфекции для ряда патогенов, как в случае *Mycobacterium leprae* [57].

Адгезия и инвазия являются важными этапами, определяющими успешную колонизацию клетки хозяина. Все изоляты *C. burnetii* содержат компоненты секреторной системы II типа — пилей IV типа, которые являются важным фактором вирулентности, обеспечивающим адгезию и секрецию. Однако это касается только коровых генов биосинтеза пилей (препилинов, пептидазы-метилазы, секретина, трансмембранного белка), поскольку отсутствует гомолог АТФазы PilT, необходимой для сборки пилей при участии их в подтягивающем типе движения; при этом коровые компоненты могут образовывать секреторную систему, что было показано ранее для *Francisella novicida* [2]. Активная секреция белков в клетку хозяина часто связана с внутриклеточным передвижением и вирулентностью. У коксиелл выявлены компоненты секреторных систем I и IV типа, отсутствуют аутотранспортёры, характерные для секреторной системы V и недавно открытой секреторной системы VI [2]. Секреторная система IV типа коксиелл сходна с Icm/Dot-системой *Legionella pneumophila* и представляет собой так называемый В-подтип, характерный только для этих двух видов [43, 45]. Анализ кодирующего ее региона выявил большое число инверсий, инсерций и делеций, что имеет определенное сходство с организацией *icm/dot*-кластера легионеллы. В перестройках может участвовать расположенная в этом кластере транспозаза, ассоциированная с IS1111-элементом [20]. В отличие от легионеллы, у которой гены *icm/dot*-кластера расположены в двух отдельных локусах, гомологичные гены *C. burnetii* собраны в одном локусе [43]. Гомолог *icmF* расположен вне указанного оперона и в нем присутствует точковая мутация. Не обнаружены гомологи генов *icmM*, *icmR*, *dotJ* и *dotV* [44], однако среди белков комплекса присутствует протеин, не гомологичный IcmR, однако выполняющий сходные функции [10]; кроме того, отсутствие ряда компонентов может быть связано с тем, что *C. burnetii* и *L. pneumophila* обитают в разных внутриклеточных нишах [2]. Экспрессия генов данного кластера происходит в течение инфекционного цикла, перед формированием LCV-формы из SCV-клеток [44]. Всего через секреторную систему 4 типа у *C. burnetii* секретруется более 30 белков, функции большинства из них не установлены [3]. Методами протеомного анализа были выявлены секретлируемые

бактерией щелочные белки, активная экспрессия которых происходит на начальном этапе инфекционного процесса, когда происходит образование фаголизосом и начинается репликация патогена. Возможно, часть из них является субстратами секреторной системы 4-го типа коксиилл [39].

У коксииллы также отмечено наличие значительного числа генов, сходных с эукариотическими, которые могут участвовать в модуляции ответа хозяина, что является важной стратегией вирулентности. Обнаружены две стерол-редуктазы, вовлеченные в синтез холестерина. Одна из них не имеет гомологов среди прокариот, другая сходна со стерол-редуктазой «*Candidatus Protochlamydia amoebophila*», что, по-видимому, связано со способностью двух бактерий обитать в вакуолях с эндосомальными характеристиками и, возможно, с горизонтальным переносом генов у предковых форм этих микроорганизмов [1]. Обнаружено 3 белка, сходных с эукариотными серин-треонин-протеинкиназами, которые могут напрямую влиять на передачу сигналов в клетке хозяина; подобные белки описаны у *Mycobacterium tuberculosis*, они необходимы для репликации внутри макрофагов [2].

У *C. burnetii* обнаружены белки, в составе которых есть анкириновые повторы, которые могут быть вовлечены в процесс прикрепления к клетке хозяина [1]. Это спектрин-связывающие белки, определяющие характер взаимодействия мембранного цитоскелета с мембраной. Белки с анкириновыми доменами выявлены у *Legionella pneumophila*, *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia ruminantum*, *Wolbachia pipientis*, *Rickettsia spp.* Предполагается, что они участвуют в модуляции хозяйских функций. Так, анкириновые домены обнаружены в некоторых регуляторах транскрипции, где они могут участвовать в процессе индукции экспрессии генов хозяина, что происходит, например, у представителей рода *Anaplasma* [33]. Хотя наличие анкириновых доменов у коксииллы не является уникальным признаком, число их (15) значительно выше, чем у других известных микроорганизмов. Число белков с анкириновыми доменами различается у штаммов разных геномных групп. У «острых» штаммов (групп I, II и III) 14 ОРС данной группы, однако лишь 5 из них интактны и кодируют соответствующие белки; у «хронических» (группы IV и V) — 10 ОРС; у штамма Dugway, обладающего значительно меньшим вирулентным потенциалом, экспрессируются 11 белков [1, 2]. Эти вариации могут свидетельствовать о том, что не все белки с анкириновыми доменами обязательны для модуляции хозяйских функ-

ций и, по крайней мере, часть их может быть избыточной. Также возможно, что те или иные белки определяют различия в вирулентном потенциале штаммов.

Помимо белков с анкириновыми доменами, у коксиилл есть белки с тетра трикопептидными повторами, также характерные для эукариот, у которых они функционируют как адапторные белки сигнальных комплексов. У разных изолятов обнаружено 11 различных белков; как и в случае анкирин-содержащих белков, максимальное число белков с тетра трикопептидными повторами продуцирует штамм Dugway (в том числе 3 уникальных варианта, один из которых кодируется плазмидным геном) [2]. Геном коксииллы содержит несколько последовательностей, кодирующих белки с интегрин-связывающим мотивом RGD и сигнальной последовательностью, а также гомолог гена *enhC L. pneumophila*, продукт которого связан с проникновением внутрь клетки хозяина за счет изменения сигнальных путей [44]. Полагают, что в процессе внедрения коксиилл в клетку важную роль играет перестройка элементов цитоскелета. Они могут запускаться с помощью фосфорилированного по остатку тирозина ГТФазного регулятора, аналогичного VipA энтеропатогенных *E. coli* [4].

В геноме *C. burnetii* присутствует ген, кодирующий белок с лейцин-богатыми повторами, однако полная форма его представлена только у штаммов Dugway и CbuK Q154 [2]. У всех штаммов обнаружены белки, которые сходны по структуре со SNARE-белками эукариот, контролирующими слияние везикул и в данном случае служащими для нормального биогенеза паразитофорной вакуоли [2].

## Заключение

Несмотря на значительный прогресс в исследовании молекулярной биологии *C. burnetii* и механизмов взаимодействия патогена с клеткой хозяина, до настоящего времени остается открытым вопрос, какие факторы являются определяющими тип инфекции, определяется ли он за счет различий в вирулентном потенциале штаммов (детерминированные в том числе на уровне генома), особенностями иммунного ответа макроорганизма или же взаимодействием двух групп факторов — «хозяйских» и бактериальных.

При исследовании традиционными методами микробиологического анализа практически невозможно выделить специфические особенности фенотипа отдельных штаммов *C. burnetii* или их групп (за исключением, пожалуй, феномена фазовой вариабельности), кроме того,

их применение затрудняется чрезвычайно высокой контагиозностью патогена, специфической внутриклеточной нишей, в которой микроорганизм обитает в естественных условиях, и сложной процедурой культивирования. В то же время установлено, что отдельные штаммы и изоляты в значительной мере различаются по степени вирулентности в модельных экспериментах. Показано, что отдельные группы штаммов *C. burnetii* способны вызывать острую форму коксиеллеза у восприимчивых к инфекции животных, причем степень выраженности инфекционного процесса варьирует, в то время как инфицирование животных штаммами других групп приводило лишь к иммунологическим изменениям [38]. Проводилось также исследование устойчивости разных штаммов к антибиотикам [46], однако подобного рода исследования сопряжены со значительными трудностями, поскольку необходимо избегать внутрилабораторной контаминации и распространения устойчивых к антибиотикам штаммов в окружающей среде.

Идентификация отдельных изолятов коксиелл и их групп с помощью молекулярно-биологических методов является важнейшим инструментом в изучении как эпидемиологических вопросов, например, при возникновении вспышек Ку-лихорадки, так и в решении фундаментальных задач, направленных на изучение становления этого микроорганизма как достаточно необычного патогена [51]. Поскольку не представляется возможным провести направленный мутагенез детерминант, которые могут быть связаны с вирулентностью коксиелл, оценка варибельности нуклеотидной структуры предполагаемых факторов вирулентности, их дифференциальной экспрессии в различных условиях, установление функций их продуктов могут служить основным инструментом для исследования патогенеза коксиеллезной инфекции на молекулярном уровне [42]. Наряду с детальным исследованием механизма «хозяйского» ответа на инфекцию, сравнение вышеуказанных характеристик с биологическими свойствами изолята или клиническими данными, характерными для течения заболевания, вызванного тем или иным штаммом, позволит оценить вклад каждой группы факторов в течение инфекции.

## Список литературы

1. Beare P., Samuel J., Howe D., Virtaneva K., Porcella S., Heinzen R. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons // *J. Bacteriol.* — 2006. — Vol. 188. — P. 2309–2324.
2. Beare P., Unsworth N., Andoh M., Voth D., Omsland A., Gilk S., Williams K., Sobral B., Kupko J., Porcella S., Samuel J., Heinzen R. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella* // *J. Infect. Immun.* — 2009. — Vol. 77. — P. 642–656.
3. Chen C., Banga S., Mertens K., Weber M., Gorbashlieva I., Tan Y., Luo Z., Samuel J. Large-scale identification and translocation of type IV secretion substrates by *Coxiella burnetii* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — Vol. 107, N 50. — P. 21755–21760.
4. Cirillo S., Lum J., Cirillo J. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila* // *Microbiology.* — 2000. — Vol. 146. — P. 1345–1359.
5. Coleman S., Fischer E., Cockrell D., Voth D., Howe D., Mead D., Samuel J., Heinzen R. Proteome and antigen profiling of *Coxiella burnetii* developmental forms // *J. Infect. Immun.* — 2007. — Vol. 75. — P. 290–298.
6. Colombo M., Gutierrez M., Romano P. The two face of autophagy: *Coxiella* and *Mycobacterium* // *Autophagy.* — 2006. — Vol. 2, N 3. — P. 162–164.
7. Denison A., Thompson H., Massung R. IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates // *BMC Microbiol.* — 2007. — Vol. 7. — P. 91.
8. Domingues P., Palkovic P., Toman R. Analysis of phospholipids from *Coxiella burnetii* by fast atom bombardment mass spectrometry. A rapid method for differentiation of virulent phase I and low virulent phase II cells // *Acta Virol.* — 2002. — Vol. 46. — P. 121–124.
9. Fehlner-Gardiner C., Roshick C., Carlson J., Hughes S., Belland R., Caldwell H., McClarty G. Molecular basis defining human *Chlamydia trachomatis* tissue tropism: a possible role for tryptophan synthase // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277, N 30. — P. 893–903.
10. Feldman N., Zusman T., Hagag S., Segal G. Co-evolution between nonhomologous but functionally similar proteins and their conservative patterns in the *Legionella* pathogenesis system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102, N 34. — P. 12206–12211.
11. Hacker J., Blum-Oehler G., Hochhut B., Dobrindt U. The molecular basis of infectious diseases: pathogenicity islands and other mobile genetic elements // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* — 2003. — Vol. 50. — P. 321–330.
12. Hackstadt T., Williams J. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1981. — Vol. 78. — P. 3240–3244.
13. Hackstadt T., Peacock M., Hitchcock P., Cole R. Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: intrastain heterogeneity in structure and antigenicity // *J. Infect. Immun.* — 1985. — Vol. 48. — P. 359–365.
14. Hackstadt T. The role of lipopolysaccharides in the virulence of *Coxiella burnetii* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1990. — Vol. 590. — P. 27–32.

15. Heinzen R., Hackstadt T. A developmental stage-specific histone H1 homolog of *Coxiella burnetii* // *J. Bacteriol.* — 1996. — Vol. 178. — P. 5049–5052.
16. Heinzen R., Howe D., Mallavia L., Rockey D., Hackstadt T. Developmentally regulated synthesis of an unusually small, basic peptide by *Coxiella burnetii* // *J. Mol. Microbiol.* — 1996. — Vol. 22. — P. 9–19.
17. Hendrix L., Samuel J., Mallavia L. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE // *J. Gen. Microbiol.* — 1991. — Vol. 137. — P. 269–276.
18. Hoover T., Vodkin M., Williams J. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence // *J. Bacteriol.* — 1992. — Vol. 174. — P. 5540–5548.
19. Hoover T., Culp D., Vodkin M., Williams J., Thompson H. 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. — Vol. 70. — P. 6726–6733.
20. Juhas M., Crook D., Hood D. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence // *J. Cell Microbiol.* — 2008. — Vol. 10. — P. 2377–2386.
21. Lautenschläger S., Willems H., Jäger C., Baljer G. Sequencing of the cryptic plasmid QpRS from *Coxiella burnetii* // *Plasmid.* — 2000. — Vol. 44. — P. 85–88.
22. Lin Z., Mallavia L. Identification of partition region carried by the plasmid QpH1 of *Coxiella burnetii* // *J. Molec. Microbiol.* — 1994. — Vol. 13. — P. 515–523.
23. Lin Z., Mallavia L. The partition region of plasmid QpH1 is a member of a family of two trans-acting factors as implied by sequence analysis // *J. Gene.* — 1995. — Vol. 160. — P. 69–74.
24. Lin Z., Mallavia L. Functional analysis of the active partition region of the *Coxiella burnetii* plasmid QpH1 // *J. Bacteriol.* — 1999. — Vol. 181, N 6. — P. 1947–1952.
25. Mallavia J., Frazier M., Mallavia L. Stability of plasmid sequences in an acute Q-fever strain of *Coxiella burnetii* // *J. Gen. Microbiol.* — 1988. — Vol. 134. — P. 1795–1805.
26. Mallavia, L., Samuel J., Frazier M. The genetics of *Coxiella burnetii*: etiologic agent of Q fever and chronic endocarditis // *Q fever: The biology of Coxiella burnetii.* — Eds. J.C. Williams, H.A. Thompson. — Boca Raton, FL, 1991. — P. 259–284.
27. Marrie T. Q fever — a review // *Can. Vet. J.* — 1990. — Vol. 31, N 8. — P. 555–563.
28. Maurin M., Raoult D. Q fever // *Clin. Microbiol. Rev.* — 1999. — Vol. 12, N 4. — P. 518–553.
29. McCaul T., Williams J. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations // *J. Bacteriol.* — 1981. — Vol. 147. — P. 1063–1076.
30. Mege J., Maurin M., Capo C., Raoult D. *Coxiella burnetii*: the 'query' fever bacterium. A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism // *FEMS Microbiol. Rev.* — 1997. — Vol. 19, N 4. — P. 209–217.
31. Minnick M., Heinzen R., Frazier M., Mallavia L. Characterization and expression of the *cbbE'* gene of *Coxiella burnetii* // *J. Gen. Microbiol.* — 1990. — Vol. 136, N 6. — P. 1099–1107.
32. Omsland A., Cockrell D., Fischer E., Heinzen R. Sustained axenic metabolic activity by the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii* // *J. Bacteriol.* — 2008. — Vol. 190, N 9. — P. 3203–3212.
33. Park, J., Kim K., Choi K., Grab D., Dumler J. *Anaplasma phagocytophilum* AnkaA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins // *J. Cell. Microbiol.* — 2005. — Vol. 6. — P. 743–751.
34. Pietrokovski S. Molecular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domain // *Protein Sci.* — 1988. — Vol. 7. — P. 64–71.
35. Raghavan R., Miller L., Hicks L., Minnick M. The unusual 23S rRNA gene of *Coxiella burnetii*: two self-splicing group I introns flank a 34-base-pair exon, and one element lacks the canonical omegaG // *J. Bacteriol.* — 2007. — Vol. 189, N 18. — P. 6572–6579.
36. Raghavan R., Hicks L., Minnick M. Toxic introns and parasitic intein in *Coxiella burnetii*: legacies of promiscuous past // *J. Bacteriol.* — 2008. — Vol. 190, N 17. — P. 5934–5943.
37. Roman M., Crissman H., Samsonoff W., Hechemy K., Baca O. Analysis of *Coxiella burnetii* isolates in cell culture and the expression of parasite-specific antigens on the host membrane surface // *Acta Virol.* — 1991. — Vol. 35, N 6. — P. 503–510.
38. Russell-Lodrigue K., Andoh M., Poels M., Shive H., Weeks B., Zhang G., Tersteeq C., Maseqi T., Hotta A., Yamaguchi T., Fukushi H., Hirai K., McMurray D., Samuel J. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever // *J. Infect. Immun.* — 2009. — Vol. 77, N 12. — P. 5640–5650.
39. Samoilis G., Aivaliotis M., Vranakis I., Papadioti A., Tselentis Y., TsyLOTIS G., Psaroulaki A. Proteomic screening for possible effector molecules secreted by the obligate intracellular pathogen *Coxiella burnetii* // *J. Proteome Res.* — 2010. — Vol. 5. — P. 1619–1626.
40. Samuel J., Frazier E., Mallavia L. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii* // *J. Infect. Immun.* — 1985. — Vol. 49. — P. 775–779.
41. Samuel J., Frazier E., Mallavia L. Stability of plasmid sequences in an acute Q-fever strain of *Coxiella burnetii* // *J. Gen. Microbiol.* — 1988. — Vol. 134, N 7. — P. 1795–1805.
42. Samuel J., Kiss K., Varghees S. Molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in a genomics era // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2003. — Vol. 990. — P. 653–663.
43. Segal G., Feldman M., Zusman T. The Icm/Dot type IV secretion system of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii* // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2005. — Vol. 29. — P. 65–81.
44. Seshadri R., Paulsen I.T., Eisen J.A., Read T.D., Nelson K.E., Nelson W.C., Ward N.L., Tettelin H., David-

- sen T.M., Beanan M.J., Deboy R.T., Daugherty S.C., Brinkac L.M., Madupu R., Dodson R.J., Khouiri H.M., Lee K.H., Carty H.A., Scanlan D., Heinen R.A., Thompson H.A., Samuel J.E., Fraser C.M., Heidelberg J.F. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100, N 9. — P. 5455–5460.
45. Sexton J., Vogel J. Type IVB secretion by intracellular pathogens // *Traffic.* — 2002. — Vol. 3. — P. 178–185.
46. Spyridaki I., Psaroulaki A., Aransay A., Scoulica E., Tselentis Y. Diagnosis of quinolone-resistant *Coxiella burnetii* strains by PCR-RFLP // *J. Clin. Lab. Anal.* — 2000. — Vol. 14. — P. 59–63.
47. Stein A., Saunders N., Taylor A., Raoult D. Phylogenetic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing // *FEMS Microbiol Lett.* — 1993. — Vol. 113. — P. 339–344.
48. Stein A., Kruszezwska D., Gouvernet J., Raoult D. Study of the 16S-23S ribosomal DNA internal spacer of *Coxiella burnetii* // *Eur. J. Epidemiol.* — 1997. — Vol. 13. — P. 471–475.
49. Stone B., Kwaik Y. Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili // *J. Bacteriol.* — 1999. — Vol. 181. — P. 1395–1402.
50. Suhan M., Chen S., Thompson H. Transformation of *Coxiella burnetii* to ampicillin resistance // *J. Bacteriol.* — 1996. — Vol. 178. — P. 2701–2708.
51. 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.
52. Vodkin M., Williams J. A heat shock operon in *Coxiella burnetii* produces a major antigen homologous to a protein in both mycobacteria and *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* — 1988. — Vol. 170. — P. 1227–1234.
53. Voth D.E., Beare P.A., Howe D., Sharma U.M., Samoilis G., Cockrell D.C., Omsland A., Heinen R.A. The *Coxiella burnetii* cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion systems substrate // *J. Bacteriol.* — 2011. — Vol. 193, N 7. — P. 1493–1503.
54. Weisburg W.G., Dobson M.E., Samuel J.E., Dasch G.A., Mallavia L.P., Baca O., Mandelco L., Sechrest J.E., Weiss E., Woese C.R. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae // *J. Bacteriol.* — 1989. — Vol. 171. — P. 4202–4206.
55. Willems H., Ritter M., Thiele D. Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmidless *Coxiella burnetii* Scurry Q217 // *J. Bacteriol.* — 1997. — Vol. 179. — P. 329–337.
56. Woldehiwet Z. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis // *J. Res. Vet. Sci.* — 2004. — Vol. 77. — P. 93–100.
57. Young D. Prospects for molecular epidemiology of leprosy // *J. Lepr. Rev.* — 2003. — Vol. 74. — P. 11–17.