

На правах рукописи



ПАР ВЕРА АЛЕКСАНДРОВНА

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПЕРЕНОСИМЫХ ИКСОДОВЫМИ
КЛЕЩАМИ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА ANAPLASMATACEAE НА
ТЕРРИТОРИИ АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

Научный руководитель:

д.х.н., профессор, академик РАН
Власов Валентин Викторович

Официальные оппоненты:

д.б.н., доцент **Карпенко Лариса Ивановна**

к.б.н. **Филипенко Максим Леонидович**

Ведущая организация:

Омский научно-исследовательский институт
природноочаговых инфекций
Роспотребнадзора

Защита состоится « 28 » декабря _____ 2011 г. в 11³⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: Новосибирск 630090, пр-кт акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « 22 » ноября _____ 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Иксодовые клещи являются переносчиками не только возбудителей клещевого энцефалита (КЭ) и иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ), но и возбудителей так называемых вновь возникших инфекций (emergence infections), типичными представителями которых являются эрлихиозы, вызываемые бактериями семейства Anaplasmataceae. Широкий интерес к изучению данных заболеваний возник после обнаружения среди представителей семейства Anaplasmataceae патогенных для людей видов. В настоящее время известно 5 видов семейства Anaplasmataceae, вызывающих эрлихиоз человека - *Neorickettsia sennetsu*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* и *Ehrlichia canis*. Кроме того, инфекцию у людей могут вызвать бактерии кандидатного вида “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”. За исключением бактерий *N. sennetsu*, остальные возбудители эрлихиозов человека передаются в результате присасывания инфицированных иксодовых клещей (Rikihisa, 1991).

Подавляющее большинство случаев эрлихиозов (несколько тысяч) зарегистрировано в США, при этом летальность составляла 1-3%. В Европе отмечены десятки случаев заболеваний, вызванных *A. phagocytophilum* и единичные случаи заболеваний, вызванных “*Candidatus N. mikurensis*” (Thomas et al., 2009; von Loewenich et al., 2010). В России серологически подтвержденные случаи эрлихиозов были отмечены в различных областях (Афанасьева и др., 2006; Борисов и др., 2010).

Жизненный цикл эрлихий и анаплазм включает стадии размножения в служащих специфичными переносчиками иксодовых клещах и в являющихся резервуарными хозяевами позвоночных животных (Parola et al, 2005). К настоящему времени опубликовано большое количество работ, посвященных изучению распространения, видовой и внутривидовой variability эрлихий и анаплазм, циркулирующих на территории США, Европы, Китая, Кореи и Японии, а также установлению их резервуарных хозяев. На территории России в таежных клещах *Ixodes persulcatus* молекулярными методами были выявлены три вида из семейства Anaplasmataceae - *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia muris* и, в единичных случаях, “*Candidatus N. mikurensis*” (Шпынов и др., 2004; Ereemeeva et al., 2006; Нефедова и др., 2008). Однако распространение бактерий семейства Anaplasmataceae в различных видах позвоночных хозяев и в различных видах клещей, а также генетическая гетерогенность *A. phagocytophilum* и других представителей семейства Anaplasmataceae, распространенных на территории России, практически не изучена.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось проведение молекулярно-генетического анализа представителей семейства

Anaplasmataceae, выявленных в клещах и мелких млекопитающих на территории азиатской части России.

Для достижения данной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить распространение и видовое разнообразие бактерий из семейства Anaplasmataceae в иксодовых клещах и мелких млекопитающих на территории Урала, Сибири и Дальнего Востока.

2. Провести молекулярно-генетический анализ выявленных бактерий из семейства Anaplasmataceae на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и *groESL* оперона.

3. Изучить возможность участия возбудителей гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека в патогенезе переносимых клещами инфекций на территории Новосибирской области.

Научная новизна и практическая значимость работы. Было впервые проведено комплексное исследование распространения и генетического разнообразия бактерий семейства Anaplasmataceae в иксодовых клещах и мелких млекопитающих на территории азиатской части России. Показано, что возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) *A. phagocytophilum*, предполагаемый возбудитель моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) *E. muris* и, в единичных случаях, патогенные для людей бактерии “*Candidatus N. mikurensis*” распространены в различных частях ареала таежного клеща, что свидетельствует о возможном участии данных возбудителей в патогенезе переносимых клещами инфекций на территории исследуемых областей. Показано, что выявленные образцы *E. muris* и “*Candidatus N. mikurensis*” строго консервативны по гену 16S рРНК и *groESL* оперону, а выявленные образцы *A. phagocytophilum* на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и *groESL* оперона подразделяются на три группы, которые различаются также по тропизму к позвоночным хозяевам. На территории Хабаровского края в клещах *Haemaphysalis* spp. и в мелких млекопитающих были обнаружены два новых генетических варианта *Ehrlichia* spp., которые не могут быть отнесены ни к одному из известных видов. Кроме того, в клещах *Ixodes* spp., *Haemaphysalis concinna* и *Dermacentor silvarum* была обнаружена ДНК 11 новых генетических вариантов бактерий из семейства Anaplasmataceae, которые на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК не могут быть отнесены ни к одному из родов семейства.

Показано, что на территории Новосибирской области около 2% случаев острых лихорадочных состояний у пациентов, возникающих после присасывания клеща, могут быть верифицированы как случаи гранулоцитарного анаплазмоза и/или моноцитарного эрлихиоза.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 статей. Результаты работы были представлены на трех

российских и двух международных конференциях: «Современная ситуация и перспективы борьбы с клещевыми инфекциями в XXI веке», Томск, 2006; 3rd International Conference “Basic Science for Medicine”, Новосибирск, 2007; Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы региональной инфекционной патологии», Иркутск, 2007; 4-я Межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы неврологии и инфекционных болезней», Новосибирск, 2008; X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Weimar (Germany), 19-21 марта 2009 г.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 128 страницах, содержит 10 рисунков и 15 таблиц. Библиография включает 190 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выявление ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae в иксодовых клещах

На наличие ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae методом двухраундовой ПЦР в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена 16S рРНК были исследованы образцы от 4559 голодных имаго иксодовых клещей, собранных в лесных биотопах на территории Свердловской, Челябинской, Новосибирской, Иркутской областей и Хабаровского края в 2003-2010 годах. На территории всех исследованных областей были собраны таежные клещи *I. persulcatus*. Кроме того, на территории Новосибирской области были собраны клещи близкородственного вида *I. pavlovskyi*, а на территории Хабаровского края – клещи *Dermacentor silvarum*, *Haemaphysalis concinna* и *H. japonica*.

ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae была обнаружена в 371 из 3867 исследованных образцов от клещей рода *Ixodes*. При последующем проведении 2-ого раунда ПЦР в присутствии видоспецифичных праймеров, а также посредством определения нуклеотидных последовательностей в 114 образцах была обнаружена ДНК *A. phagocytophilum*, в 234 образцах – ДНК *E. muris*, в 11 образцах - ДНК как *A. phagocytophilum*, так и *E. muris* и в 9 образцах - ДНК “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” (Табл. 1). В трех клещах была выявлена ДНК бактерий, которые на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК не могли быть отнесены ни к одному из известных родов семейства Anaplasmataceae.

В ходе проведения данной работы ДНК *A. phagocytophilum* и *E. muris* была обнаружена в клещах, собранных на всех исследованных

территориях, при этом доля клещей, содержащих ДНК *A. phagocytophilum*, варьировала от 0,2% до 6,3%, а доля клещей, содержащих ДНК *E. muris* - от 2,0% до 14,1% (Табл. 1), что соответствует литературным данным о распространении данных возбудителей в других частях ареала таежного клеща (Alekseev et al., 2001; Cao et al., 2003; Шпынов и др., 2004). Полученные результаты подтверждают предположение о повсеместном распространении *A. phagocytophilum* и *E. muris* в ареале *I. persulcatus*.

Таблица 1. Выявление ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae в клещах *I. persulcatus* / *I. pavlovskiy* методом двуххрундовой ПЦР

Мест и время сбора клещей	Число исследованных клещей	Число (%) клещей, содержащих ДНК				
		<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. muris</i>	<i>A. phagocytophilum</i> и <i>E. muris</i>	<i>Candidatus N. mikurensis</i>	<i>Anaplasma-taceae</i>
Свердловская область (Северный Урал), 2004-2010	496	1 (0,2)	30 (6,0)	0	0	0
Свердловская область (Средний Урал), 2007-2008	145	5 (3,4)	11 (7,6)	1 (0,7)	0	0
Челябинская область, 2004	79	1 (1,3)	5 (6,3)	0	0	0
Новосибирская область, 2003-2010	1688	38 (2,3)	29 (1,7)	1 (0,06)	6 (0,4)	2 (0,1)
Иркутская область, 2006-2009	928	27 (2,9)	126 (13,6)	5 (0,5)	1 (0,1)	0
Хабаровский край, 2006-2009	730	42 (5,8)	46 (6,3)	4 (0,5)	2 (0,3)	1 (0,1)
Всего	3867	114 (2,9)	234 (6,1)	11 (0,3)	9 (0,2)	3 (0,1)

В отличие от *A. phagocytophilum* и *E. muris*, данных о распространении “*Candidatus N. mikurensis*” в клещах рода *Ixodes* очень мало. В ходе проведения данной работы ДНК “*Candidatus N. mikurensis*” была обнаружена в девяти клещах, собранных на территории Новосибирской, Иркутской областей и Хабаровского края, однако частота выявляемости “*Candidatus N. mikurensis*” ни в одной из областей не превышала 0,4% (Табл. 1). Можно предположить, что подобно *A. phagocytophilum* и *E. muris*, бактерии “*Candidatus N. mikurensis*” распространены в различных частях ареала *I. persulcatus*. Показано, что бактерии “*Candidatus N. mikurensis*” способны вызывать возвратные лихорадки в тяжелых формах (von Loewenich et al., 2010), поэтому выявление данного вида бактерий свидетельствует о возможном участии “*Candidatus N. mikurensis*” в патогенезе инфекций, переносимых иксодовыми клещами, на территории

азиатской части России.

На наличие ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae были проанализированы образцы от 91 клеща *H. concinna*, 380 *H. japonica* и 221 *D. silvarum*, собранных на территории Хабаровского края на тех же участках, что и *I. persulcatus*. ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae были обнаружены в 2 (2,2%) *H. concinna*, 37 (9,7%) *H. japonica* и в 9 (4,1%) *D. silvarum*. Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК показал, что выявленные в *H. japonica* бактерии относятся к роду *Ehrlichia*, но не могут быть отнесены ни к одному из известных видов, а бактерии, выявленные в *H. concinna* и *D. silvarum*, не могут быть отнесены ни к одному из известных родов семейства Anaplasmataceae.

Выявление ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae в мелких млекопитающих

На наличие ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae были также проанализированы образцы тканей и/или крови от 1698 мелких млекопитающих, отловленных в лесных биотопах на территории Свердловской, Новосибирской областей и Хабаровского края. ДНК как *A. phagocytophilum*, так и *E. muris* была обнаружена в образцах от млекопитающих на территории всех исследованных областей (Табл. 2). На Северном Урале (Свердловская область) у 16,6% мелких млекопитающих была обнаружена ДНК *A. phagocytophilum* и у 7,0% - ДНК *E. muris*. На территории остальных исследованных областей частота выявляемости *A. phagocytophilum* и *E. muris* не превышала 3,9%. В пяти образцах от грызунов из Новосибирской области и Хабаровского края была выявлена ДНК "*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*", а в ряде образцов от грызунов из Хабаровского края – ДНК нового генетического варианта эрлийи, названного *Ehrlichia* sp. Khabarovsk (Табл. 2). Проведение ПЦР в присутствии праймеров, специфичных для данного варианта, позволило выявить ДНК *Ehrlichia* sp. Khabarovsk в 171 (15%) образце от мелких млекопитающих в Хабаровском крае. Следует подчеркнуть, что, несмотря на высокий уровень инфицирования мелких млекопитающих бактериями *Ehrlichia* sp. Khabarovsk, данный генетический вариант бактерий не был обнаружен ни в одном из четырех видов иксодовых клещей, распространенных на исследуемой территории Хабаровского края.

Как *A. phagocytophilum*, так и *E. muris* были выявлены среди представителей большинства исследованных видов, а именно в образцах от полевок рода *Myodes* и *Microtus*, обыкновенных бурозубок (*Sorex araneus*), восточноазиатских мышей (*Apodemus peninsulae*) и бурундуков (*Tamias sibiricus*) (Табл. 2). В отличие от *A. phagocytophilum* и *E. muris*, для бактерий *Ehrlichia* sp. Khabarovsk характерна специфичность к определенным видам хозяев. Так, ДНК *Ehrlichia* sp. Khabarovsk была обнаружена в образцах тканей у 18-22% полевок и бурозубок, но лишь в 1

из 359 проанализированных образцов от восточно-азиатских мышей и не была обнаружена ни в одном из 18 образцов от бурундуков.

Таблица 2. Выявление ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae методом двухраундовой ПЦР в образцах крови/тканей мелких млекопитающих

Область, вид животных	Общее число особей	Число (%) мелких млекопитающих, у которых была выявлена ДНК			
		<i>A. phagocy- tophilum</i>	<i>E. muris</i>	<i>Candidatus N.mikurensis</i>	<i>Ehrlichia</i> sp. Khabarovsk
Северный Урал (Свердловская область), всего	199	33 (16,6)	14 (7,0)	-	-
<i>Myodes rutilus</i>	99	23 (23,2)	9 (9,1)	-	-
<i>M. rufocanus</i>	7	1 (14,3)	-	-	-
<i>M. glareolus</i>	37	4 (10,1)	2 (5,4)	-	-
<i>Sorex araneus</i>	48	5 (10,4)	2 (4,2)	-	-
<i>Sorex</i> spp.	5	-	-	-	-
<i>Microtus</i> spp.	3	-	1 (33,3)	-	-
Средний Урал (Свердловская область), всего	50	1 (2,0)	-	-	-
<i>M. rutilus</i>	23	-	-	-	-
<i>M. rufocanus</i>	8	-	-	-	-
<i>S. araneus</i>	16	1 (6,3)	-	-	-
<i>Apodemus agrarius</i>	3	-	-	-	-
Новосибирская область, всего	307	10 (3,3)	12 (3,9)	1 (0,3)	-
<i>M. rutilus</i>	53	4 (7,5)	3 (5,7)	-	-
<i>M. rufocanus</i>	66	4 (6,1)	5 (7,6)	-	-
<i>M. glareolus</i>	24	-	-	-	-
<i>S. araneus</i>	73	-	4 (5,5)	-	-
<i>Microtus</i> spp.	38	1 (2,6)	-	1 (2,6)	-
<i>Ap. agrarius</i>	11	-	-	-	-
<i>Sicista betulina</i>	36	-	-	-	-
<i>Tamias sibiricus</i>	6	1 (16,7)	-	-	-
Хабаровский край, всего	1142	44 (3,9)	43 (3,8)	4 (0,4)	171 (15,0)
<i>M. rutilus</i>	14	1 (7,1)	-	-	3 (21,4)
<i>M. rufocanus</i>	695	36 (5,2)	31 (4,5)	1 (0,1)	157 (22,6)
<i>S. araneus</i>	56	-	-	-	10 (17,9)
<i>Apodemus peninsulae</i>	359	2 (0,6)	10 (2,8)	3 (0,8)	1 (0,3)
<i>T. sibiricus</i>	18	5 (27,8)	2 (11,1)	-	-

Изучение сезонной динамики частоты встречаемости инфицированных эрлихиями и анаплазмами мелких млекопитающих на территории Хабаровского края

В Хабаровском крае отлов мелких млекопитающих проводили в течение 4 лет в период с февраля по ноябрь. За одним исключением, ДНК *A. phagocytophilum*, *E. muris* и “*Candidatus N. mikurensis*” была обнаружена только в образцах тканей животных, отловленных после начала периода активности иксодовых клещей - с апреля по ноябрь. Среди обнаруженных на Дальнем Востоке бактерий семейства Anaplasmataceae *Ehrlichia* sp. Khabarovsk является единственным видом, для которого не был установлен вероятный переносчик, и только ДНК *Ehrlichia* sp. Khabarovsk выявлялась в мелких млекопитающих в течение всего периода сбора материала – с февраля по ноябрь Эти результаты могут свидетельствовать о возможном участии других членистоногих, помимо иксодовых клещей, в переносе *Ehrlichia* sp. Khabarovsk позвоночным хозяевам.

Молекулярно-генетический анализ бактерий из семейства Anaplasmataceae

Выявленные в ходе выполнения данной работы бактерии из семейства Anaplasmataceae были охарактеризованы посредством анализа нуклеотидных последовательностей двух генетических локусов - гена 16S рРНК и *groESL* оперона белков теплового шока. Определенные нуклеотидные последовательности были зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами GU358686-GU358692, FJ966349-FJ966366, JN581367- JN581373, HM366567-HM366590 и HQ630614-HQ630620.

Изучение генетической вариабельности *E. muris* и новых генетических вариантов *Ehrlichia* spp.

В ходе выполнения данной работы нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК и *groESL* оперона *E. muris* длиной соответственно 1299 и 1315 н.о. были определены для образцов от 16 клещей и 8 мелких млекопитающих, отловленных на территории различных областей. Все определенные последовательности фрагмента гена 16S рРНК были идентичны друг другу (Рис. 1) и совпадали либо отличались 1-2 нуклеотидными заменами от других известных последовательностей гена 16S рРНК *E. muris* (Wen et al., 1995). Определенные нуклеотидные последовательности *groESL* оперона *E. muris* различались между собой одной нуклеотидной заменой и отличались 1-2 нуклеотидными заменами от единственной доступной в базе данных GenBank последовательности *groESL* оперона *E. muris* (Kawahara et al., 1999) (Рис. 2).

Как было написано выше, в 37 клещах *H. japonica* была обнаружена ДНК нового генетического варианта эрлихий, названного *Ehrlichia* sp. Kh-Hj27. Из числа этих положительных образцов у 16 были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена 16S рРНК и *groESL*

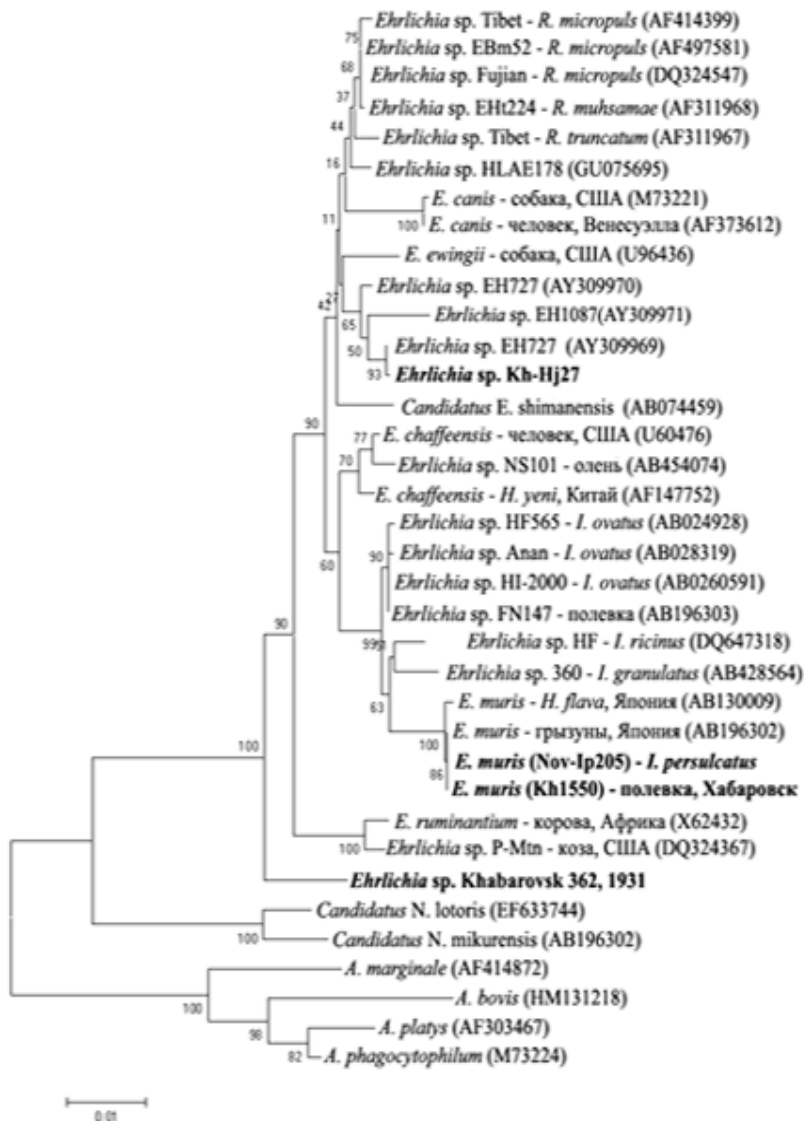


Рис.1. Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей (длиной 1297 н.о.) фрагмента гена 16S рРНК Anaplasmataceae, построенная с использованием метода NJ. Шкала представляет 1% дивергенции. Жирным шрифтом выделены последовательности образцов *E. muris* от *I. persulcatus* (Nov-Ip205) и от полевки (Kh-1550), а также новых генетических вариантов эрлихий (*Ehrlichia* sp. Kh-Hj27 и *Ehrlichia*.sp. Khabarovsk 362, 1931).

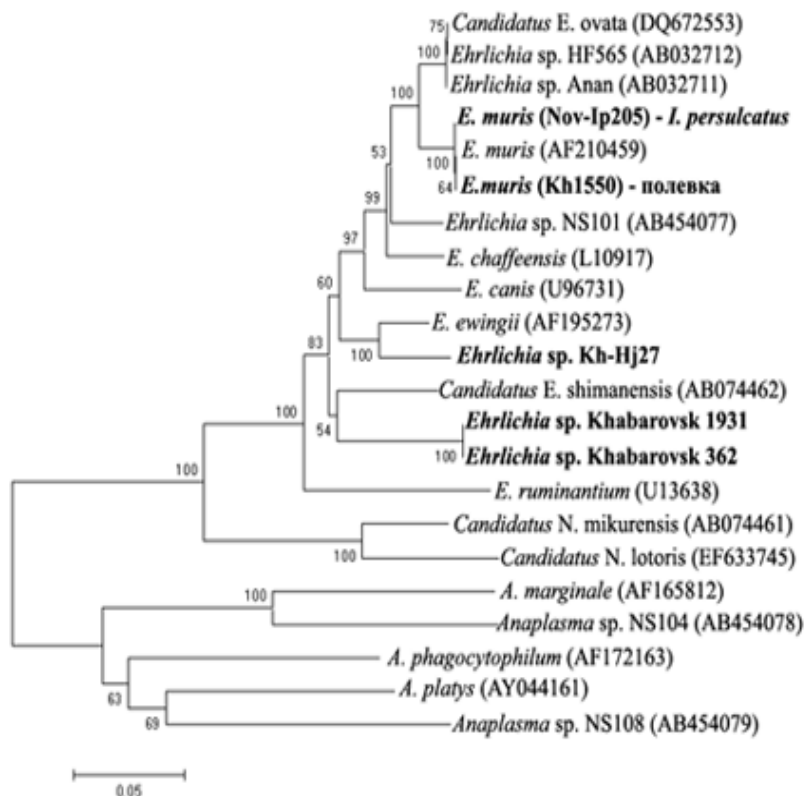


Рис.2. Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей (длиной 1236 н.п.) фрагмента *groESL* оперона Anaplasmataceae, построенная с использованием метода NJ. Шкала представляет 5% дивергенции. Жирным шрифтом выделены последовательности образцов *E.muris* от *I. persulcatus* (Nov-Ip205) и от полевки (Kh-1550), а также новых генетических вариантов эрлийи (*Ehrlichia* sp. Kh-Hj27, *Ehrlichia*.sp. Khabarovsk 362 и *Ehrlichia*.sp. Khabarovsk 1931).

оперона длиной соответственно 1295 и 1293 н.о. Все определенные последовательности гена 16S рРНК были идентичны друг другу и наиболее схожи с нуклеотидными последовательностями гена 16S рРНК генетических вариантов эрлийи (*Ehrlichia* sp. EHf669 и *Ehrlichia* sp. EH727), обнаруженных в клещах *Haemaphysalis* spp. в Японии (Inokuma et al., 2004), отличаясь от них соответственно двумя и семью нуклеотидными заменами (99,8% и 99,5% гомологии) (Рис. 1). Определенные в образцах от *H. japonica* нуклеотидные последовательности *groESL* оперона также были идентичны друг другу, но существенно отличались от известных последовательностей *Ehrlichia* spp. Наибольшее сходство (93,8%

гомологии) было отмечено с последовательностью *groESL* оперона *E. ewingii*, уровень гомологии с другими известными последовательностями *Ehrlichia* spp. не превышал 91,4% (Рис. 2). Таким образом, проведенный анализ нуклеотидных последовательностей по двум локусам показал, что выявленные в *H. japonica* бактерии не могут быть отнесены ни к одному из известных видов и представляют собой новый генетический вариант эрлихий, филогенетически схожий с генетическими вариантами, обнаруженными в клещах *Haemaphysalis* spp. в Японии.

Для восьми образцов, представляющих еще один новый генетический вариант эрлихий, *Ehrlichia* sp. Khabarovsk, были также определены нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рПНК и *groESL* оперона длиной 1300 н.о. и 1296 н.о., соответственно. Все определенные последовательности фрагмента гена 16S рПНК были идентичны друг другу и наиболее схожи (97,1% гомологии) с соответствующей последовательностью “*Candidatus Ehrlichia shimanensis*” (Рис. 1). Для семи образцов *Ehrlichia* sp. Khabarovsk последовательности *groESL* оперона также были идентичны друг другу (типичная последовательность *Ehrlichia* sp. Khabarovsk 362), а последовательность восьмого образца *Ehrlichia* sp. Khabarovsk 1931 отличалась от них инсерцией одного нуклеотида в межгенной области оперона (Рис. 2). Нуклеотидные последовательности *groESL* оперона *Ehrlichia* sp. Khabarovsk также существенно отличались от известных последовательностей и были наиболее схожи (89,5% гомологии) с нуклеотидными последовательностями “*Candidatus Ehrlichia ovata*” и “*Candidatus E. shimanensis*”. Таким образом, проведенный анализ последовательностей гена 16S рПНК и *groESL* оперона показал, что бактерии *Ehrlichia* sp. Khabarovsk не могут быть отнесены ни к одному из известных видов эрлихий (Рис. 1, 2).

Филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей гена 16S рПНК, показывает, что большинство видов и генетических вариантов эрлихий могут быть отнесены к одной общей группе внутри кластера, образованного бактериями рода *Ehrlichia* (Рис. 1). Из общепризнанных видов эрлихий только бактерии *E. ruminantium* не относятся к данному кластеру, образуя вместе с близкородственными бактериями *Ehrlichia* sp. P-Mtn отдельную ветвь на дендрограмме. Вторая отдельная ветвь на филогенетическом дереве образована бактериями *Ehrlichia* sp. Khabarovsk.

Изучение генетической variability “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”

Нуклеотидные последовательности гена 16S рПНК и *groESL* оперона “*Candidatus N. mikurensis*” были определены для образцов от двух восточноазиатских мышей, отловленных на территории Хабаровского края и от четырех *I. persulcatus*, собранных на территории различных областей.

Все определенные последовательности фрагмента гена 16S рРНК (1294 н.о.) и *groESL* оперона (1297 н.о.) были идентичны друг другу (Рис. 3).

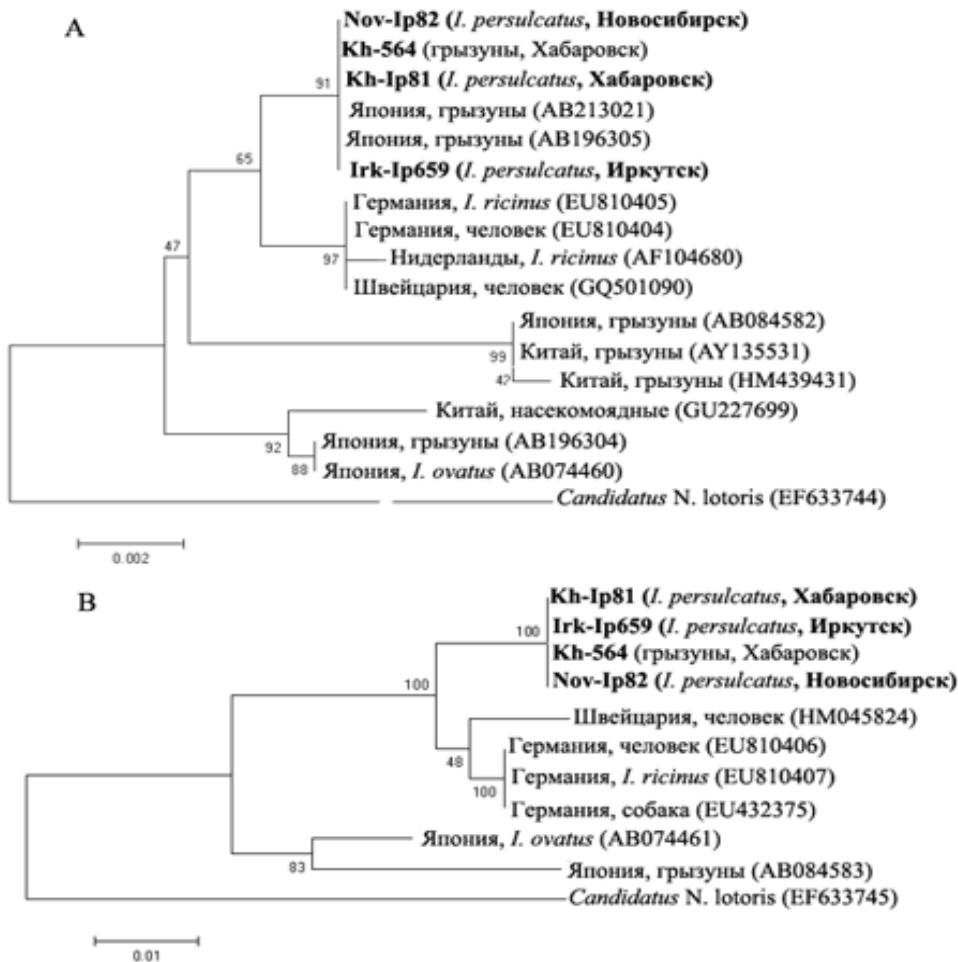


Рис. 3. Дендрограммы сходства нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК длиной 1299 н.о. (А) и *groEL* гена длиной 941 н.о. (В) “*Candidatus N. mikurensis*”, построенные с использованием метода NJ. Жирным шрифтом выделены последовательности образцов, выявленные в *I. persulcatus* (Nov-Ip82, Kh-Ip81, Irk-Ip659) и в восточноазиатской мыши (Kh-564). В качестве внешней последовательности использована последовательность *Candidatus N. lotoris*.

Проведенный филогенетический анализ по обоим локусам показывает территориальную кластеризацию последовательностей “*Candidatus N.*

mikurensis”, которая, вероятно, ассоциирована с различными видами клещей переносчиков. Действительно, определенные в данной работе нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК “*Candidatus N. mikurensis*” из различных частей ареала *I. persulcatus* были идентичны друг другу и соответствующие последовательности изолятов “*Candidatus N. mikurensis*” из ареала *I. ricinus* (страны Европы) также были высококонсервативны (Рис. 3А). Аналогично, нуклеотидные последовательности *groESL* оперона изолятов “*Candidatus N. mikurensis*” из России и Германии были высококонсервативны и образовывали отдельные кластеры на дендрограмме (Рис. 3В). Напротив, для изолятов “*Candidatus N. mikurensis*” из Японии и Китая была показана высокая вариабельность по обоим локусам, что, вероятно, связано с участием разных видов иксодовых клещей в переносе данного инфекционного агента мелким млекопитающим.

Изучение генетической вариабельности нетипичных бактерий семейства Anaplasmataceae

В 14 образцах от иксодовых клещей разных видов – двух *I. persulcatus* / *I. pavlovskiy* из Новосибирской области, а также от одного *I. persulcatus*, двух *H. concinna* и девяти *D. silvarum* из Хабаровского края была обнаружена ДНК нетипичных бактерий из семейства Anaplasmataceae. Ни для одного из этих 14 образцов не удалось амплифицировать фрагмент *groESL* оперона. И только для двух образцов из *D. silvarum* (Kh-Ds37, Kh-Ds195) и для одного образца из клеща *Ixodes sp.* из Новосибирской области (Nov-Ip19) удалось определить последовательность гена 16S рРНК длиной 1270-1301 н.о. У остальных образцов были определены только нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК длиной 456-553 н.о.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК образцов Kh-Ds37, Kh-Ds195 и Nov-Ip19 показал, что эти последовательности наиболее схожи (92,4-93,8% гомологии) с соответствующей последовательностью бактерии из семейства Anaplasmataceae IS136 (GenBank AB190771) из Японии; уровень гомологии с другими известными последовательностями гена 16S рРНК не превышал 92%. Проведенный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК длиной 456 н.о. от всех выявленных нетипичных бактерий показал, что все эти образцы принадлежат к семейству Anaplasmataceae, но не могут быть отнесены к родам *Ehrlichia*, *Anaplasma*, или к кластеру “*Candidatus Neoehrlichia*”. Всего в 14 образцах было выявлено 11 различных вариантов нуклеотидных последовательностей, которые образуют гетерогенную группу (с уровнем гомологии внутри группы 92,9 - 100%) и не формируют отдельный кластер на дендрограмме (Рис. 4).

Изучение генетической вариабельности *A. phagocytophilum*

В ходе проведения данной работы нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК и *groESL* оперона *A. phagocytophilum* были определены в

образцах от 65 клещей *I. persulcatus* / *I. pavlovskyi*, а также от 25 мелких млекопитающих, относящихся к *Myodes* spp., *S. araneus* и *Tamias sibiricus*, собранных на территории различных областей.

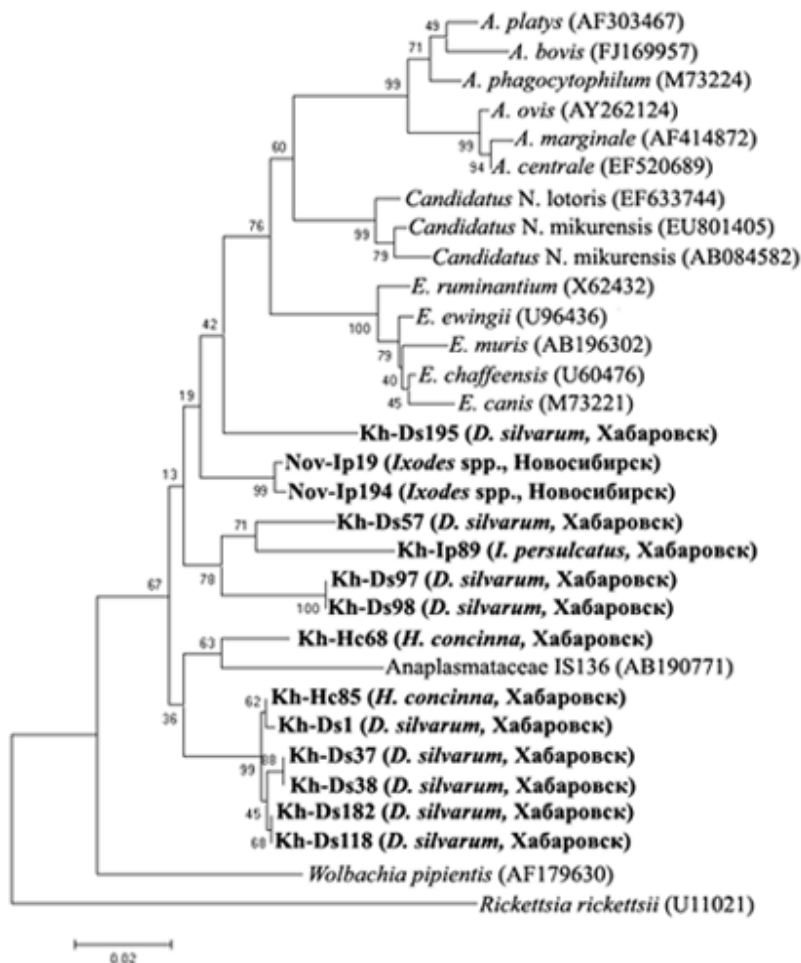


Рис. 4. Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей (длиной 456 н.о.) фрагмента гена 16S рРНК бактерий Anaplasmataceae, построенная с использованием метода NJ. Жирным шрифтом выделены последовательности образцов, выявленные в *I. persulcatus* (Nov-Ip19, Nov-Ip194, Kh-Ip89), *H. concinna* (Kh-Hc68, Kh-Hc85) и *D. silvarum* (Kh-Ds1, Kh-Ds37, Kh-Ds38, Kh-Ds57, Kh-Ds97, Kh-Ds98, Kh-Ds118, Kh-Ds182, Kh-Ds195). В качестве внешней последовательности использована последовательность *Rickettsia rickettsii*.

Всего было выявлено 6 различных вариантов последовательности гена 16S рРНК, различающихся между собой 1-5 нуклеотидными заменами (Табл. 3), но только вариант 1 соответствовал последовательности, доступной в базе данных GenBank (номер доступа AF093788) и выявленной в крови больных людей (Chae et al., 2000). Этот вариант был обнаружен в 17 образцах *A. phagocytophilum* от клещей из различных областей и в 11 образцах от *Myodes* spp. из Новосибирской области и Хабаровского края. В 43 образцах *A. phagocytophilum* от клещей из всех исследованных областей и в 4 образцах от бурундуков из Новосибирской области и Хабаровского края (вариант 4) нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК были наиболее схожи с последовательностью генетического варианта *A. phagocytophilum* (GenBank DQ342324), выявленного ранее только на территории Китая в *I. persulcatus* и мелких млекопитающих (Cao et al., 2006). Варианты 2 и 3 отличались единичными заменами в консервативной области гена от соответствующих последовательностей варианта 1, а варианты 5 и 6 - от соответствующих последовательностей варианта 4.

Таблица 3. Конденсированное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК *A. phagocytophilum*

Генетические варианты по гену 16S рРНК	Типичные для каждого варианта образцы, последовательности из базы данных GenBank	Вариабельные позиции нуклеотидов*							
		32	33	36	178	395	1013	1039	1172
	GenBank AF093788	A	A	A	A	C	T	G	C
1 вариант	Nov- <i>Ip</i> 456 ^a Nov- <i>vole</i> 144 ^b	A	A	A	A	C	T	G	C
2 вариант	<i>Irk-<i>Ip</i></i> 625 ^a	A	A	A	A	T	T	G	C
3 вариант	<i>Sv-<i>vole</i></i> 8 ^b	A	A	A	A	C	C	G	C
	GenBank DQ342324	G	G	G	A	C	T	A	C
4 вариант	<i>Kh-<i>Ip</i></i> 80 ^a <i>Kh-<i>chipmunk</i></i> 177 ^c	G	G	G	A	C	T	G	C
5 вариант	<i>Irk-<i>Ip</i></i> 662 ^a	G	G	G	G	C	T	G	C
6 вариант	<i>Sv-<i>Ip</i></i> 854 ^a	G	G	G	A	C	T	G	T

* по последовательности гена 16S рРНК *A. phagocytophilum* (GenBank AF093788)

^a – образцы от клещей, ^b – образцы от полевок, ^c – образцы от бурундуков

Определенные в ходе выполнения данной работы последовательности *groESL* оперона *A. phagocytophilum* отличались более высоким разнообразием по сравнению с последовательностями гена 16S рРНК. Всего было выявлено десять различных вариантов последовательностей *groESL* оперона, которые с высоким уровнем поддержки могут быть отнесены к трем различным группам (Рис. 5). Уровень гомологии между

последовательностями *groESL* оперона из разных групп составил 94,8-98,3%, а внутри групп – 99,7-100%. Образцы из разных групп различались также по последовательностям гена 16S рРНК (Табл. 4).

A. phagocytophilum из группы I были обнаружены в образцах от 19 клещей из всех исследованных областей и от 11 полевков из Новосибирской области и Хабаровского края. Все определенные последовательности были идентичны друг другу и наиболее схожи (98,2% гомологии) с соответствующей последовательностью *A. phagocytophilum* из рыжей полевки из Швейцарии (GenBank AF192796), уровень гомологии с другими известными последовательностями *groESL* оперона не превышал 95,5%.

A. phagocytophilum из группы II были обнаружены только в образцах от полевков и бурозубок из Свердловской области. Все определенные последовательности *groESL* оперона также были идентичны друг другу и наиболее схожи с соответствующей последовательностью *A. phagocytophilum* из рыжей полевки (GenBank AF192796), отличаясь от нее 3 из 1246 нуклеотидных остатков (99,8% гомологии); уровень гомологии с другими последовательностями *A. phagocytophilum* не превышал 95,4%.

A. phagocytophilum из группы III были обнаружены в образцах от 46 клещей из всех исследованных областей и 4 бурундуков из Новосибирской области и Хабаровского края. В отличие от первых двух групп, третья группа последовательностей *groESL* оперона была гетерогенной и объединяла 8 вариантов последовательностей. Эти последовательности различались между собой 1-4 нуклеотидными заменами и были схожи (99,2-99,4% гомологии) с нуклеотидными последовательностями *groESL* оперона ряда изолятов *A. phagocytophilum*, выявленных в Европе в образцах от клещей *I. ricinus* и косуль. (Petrovec et al., 2002; von Loewenich et al., 2003).

В ряде работ было показано, что подавляющее большинство последовательностей *groESL* оперона *A. phagocytophilum* подразделяются на два кластера, при этом к первому кластеру относятся последовательности от различных видов клещей и позвоночных хозяев, а также от больных людей, а ко второму - только от косуль и *I. ricinus* (Alberti et al., 2005; Rymaszewska, 2008). Среди определенных в ходе выполнения данной работы последовательностей *groESL* оперона не было обнаружено последовательностей, относящихся к первому кластеру. В то же время последовательности *groESL* оперона из группы III, выявленные у большинства образцов *A. phagocytophilum* от клещей и у всех образцов от бурундуков, относились ко второму кластеру, образуя в нем отдельную ветвь (Рис. 5). Последовательности *groESL* оперона *A. phagocytophilum* из групп I и II, выявленные во всех исследованных образцах от полевков и бурозубок и в ряде образцов от клещей, не могут быть отнесены ни к одному из ранее описанных кластеров и с высоким уровнем поддержки

образуют вместе с единственной известной последовательностью *groESL* оперона *A. phagocytophilum* от мелких грызунов в Европе (Liz et al., 2000) новый кластер на филогенетическом дереве (Рис. 5).

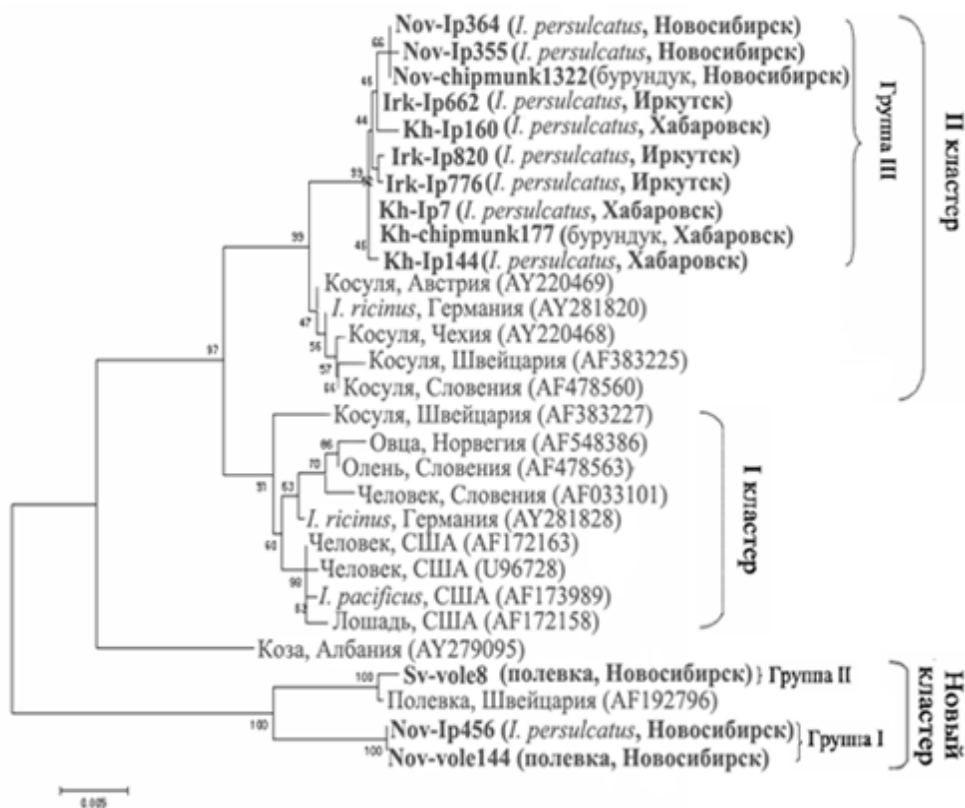


Рис.5. Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей (длиной 1245 н.о.) фрагмента *groESL* оперона *A. phagocytophilum*, построенная с использованием метода NJ. Шкала представляет 0,5% дивергенции. Жирным шрифтом выделены последовательности образцов *A. phagocytophilum* от *I. persulcatus* (Nov-Ip456, Nov-Ip355, Nov-Ip364, Irk-Ip662, Irk-Ip776, Irk-Ip820, Kh-Ip7, Kh-Ip144, Kh-Ip160), полевок (Nov-vole144, Sv-vole8) и бурундуков (Nov-chipmunk1322 и Kh-chipmunk177), представляющие различные генетические варианты.

В данной работе ДНК *A. phagocytophilum* была обнаружена в 33 из 199 (16,6%) исследованных мелких млекопитающих и только в одном из 496 имаго *I. persulcatus*, собранных в одном и том же районе Северного Урала. Представляется вероятным, что клещи *I. persulcatus* не являются эффективными переносчиками для генетического варианта

A. phagocytophilum, типичного для мелких млекопитающих на Северном Урале, и что другие виды иксодовых клещей могут участвовать в переносе данного генетического варианта мелким млекопитающим.

Таблица 4. Встречаемость различных вариантов *A. phagocytophilum* в клещах и мелких млекопитающих на территории различных областей

Группы по <i>groESL</i> оперону	Варианты по гену 16S рПНК	Типичные образцы для каждого варианта	Число образцов с различными вариантами <i>A. phagocytophilum</i>						
			клещи				полевки,	полевки,	бурундуки
			Свердловск	Новосибирск	Иркутск	Хабаровск	бурозубки, Свердловск	Новосибирск, Хабаровск	
I	1	Nov- <i>Ip</i> 456 Nov- <i>vole</i> 144	2	7	5	3	-	11	-
I	2	<i>Irk-<i>Ip</i></i> 625	-	-	2	-	-	-	-
II	3	<i>Sv-<i>vole</i></i> 8	-	-	-	-	10	-	-
III	4	Nov- <i>Ip</i> 364 <i>Kh-chip-<i>munk</i></i> 177	-	12	6	25	-	-	4
III	5	<i>Irk-<i>Ip</i></i> 662	-	-	1	-	-	-	-
III	6	<i>Sv-<i>Ip</i></i> 854	2	-	-	-	-	-	-

Таким образом, на территории азиатской части России были выявлены три генетические группы *A. phagocytophilum*, одна из которых ассоциирована с полевками из Сибири и Дальнего Востока, другая с полевками и бурозубками с Урала и третья с бурундуками. Специфичный переносчик для генетического варианта *A. phagocytophilum*, выявленного в мелких млекопитающих на Урале, к настоящему времени не установлен.

Выявление антител к возбудителям ГАЧ и МЭЧ в крови пациентов на территории Новосибирской области.

Выявление на территории азиатской части России и, в частности, на территории Новосибирской области в клещах и мелких млекопитающих возбудителя ГАЧ *A. phagocytophilum* и других представителей семейства Anaplasmataceae свидетельствует о потенциальной опасности развития эрлихиозов у людей вследствие присасывания инфицированных клещей.

На наличие антител к возбудителям ГАЧ и МЭЧ были исследованы методом ИФА парные сыворотки крови 205 пациентов с лихорадочным состоянием и присасыванием клещей в анамнезе, госпитализированных в 2007 г. с подозрением на КЭ, а также сыворотки 92 клинически здоровых людей контрольной группы, отрицающих присасывание клещей за последние три года. Работа проводилась с одобрения этического комитета Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

(протокол № 3). В группе лихорадящих больных антитела к возбудителям ГАЧ и МЭЧ были обнаружены у 12 пациентов, а в контрольной группе - только у одного пациента. У трех из двенадцати серопозитивных пациентов наблюдалась сероконверсия антител к возбудителю ГАЧ, у одного пациента - возрастающий в восемь раз титр антител в парных сыворотках, а у остальных восьми пациентов титры антител были постоянными или различались в 2 раза. В соответствии с принятыми критериями (Brouqui et al., 2004) лишь у первых четырех пациентов диагноз ГАЧ являлся серологически подтвержденным.

Во всех рассмотренных случаях у пациентов с серологически подтвержденным ГАЧ в острой фазе болезни наблюдались изменения в гематограмме (лейкопения, тромбоцитопения), характерные для данного заболевания. При этом показатели крови в течение 8 дней приходили в норму. У трех из четырех пациентов наблюдалась острая лихорадка с температурой выше 39,0⁰С, у одного пациента была отмечена сыпь и повышенный уровень аминотрансфераз. Титры антител класса IgG достигали показателей 1:800 – 1:1600, а титры антител класса IgM были существенно ниже (1:200). Во всех рассмотренных случаях ГАЧ протекал в виде смешанной инфекции: у одного пациента наблюдалась сероконверсия антител к возбудителям ГАЧ и МЭЧ, у одного пациента был диагностирован КЭ и обнаружены антитела к боррелиям, и у двух пациентов были обнаружены антитела к боррелиям.

В отличие от пациентов с серологически подтвержденным ГАЧ, лишь у 2 из 8 пациентов с постоянными титрами антител наблюдалась лейкопения; незначительная тромбоцитопения наблюдалась у 4 из 8 пациентов. Полученные результаты подтверждают данные из различных регионов о высоком уровне серопозитивности (Afanasieva et al., 2006; Борисов и др., 2010). Можно предположить, что наличие постоянного титра антител обусловлено более ранним контактом с возбудителем ГАЧ либо с непатогенным для людей генетическим вариантом *A. phagocytophilum*.

Таким образом, около 2% случаев острых лихорадочных состояний, возникающих после присасывания клеща, могут быть верифицированы как случаи ГАЧ и/или МЭЧ.

ВЫВОДЫ

1. В результате комплексного изучения распространения бактерий из семейства Anaplasmataceae на территории азиатской части России в иксодовых клещах и мелких млекопитающих была выявлена ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, “*Candidatus* Neohrlichia mikurensis”, *Ehrlichia muris*, двух новых генетических вариантов *Ehrlichia* spp., а также нетипичных бактерий, которые не могут быть отнесены ни к одному из

родов семейства Anaplasmataceae.

2. Показано, что возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека *A. phagocytophilum* распространен в клещах *Ixodes persulcatus* /*Ixodes pavlovskiy* и в различных видах мелких млекопитающих на территории всех исследуемых областей. На основании анализа последовательностей *groESL* оперона и гена 16S рРНК образцы *A. phagocytophilum* подразделяются на три генетические группы, которые различаются также по тропизму к позвоночным хозяевам. Бактерии *A. phagocytophilum* из первой группы выявлялись в клещах *Ixodes* spp. и в полевках на территории Сибири и Дальнего Востока, *A. phagocytophilum* из второй группы – только в полевках и бурозубках на территории Урала, а *A. phagocytophilum* из третьей группы - в клещах *Ixodes* spp. во всех исследованных областях и в бурундуках на территории Сибири и Дальнего Востока. Показано, что образцы *A. phagocytophilum* из первой и второй группы образуют новый филогенетический кластер, ассоциированный с мелкими млекопитающими.

3. Показано, что патогенные для людей бактерии “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” распространены в клещах *Ixodes persulcatus* /*Ixodes pavlovskiy* и в мелких млекопитающих на территории Сибири и Дальнего Востока, однако частота выявляемости не превышает 0,5%. Впервые показано, что образцы “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”, выявленные в ареале *Ixodes persulcatus*, строго консервативны по гену 16S рРНК и *groESL* оперону и кластеризуются по *groESL* оперону отдельно от изолятов “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” из других стран Европы и Азии.

4. Показано, что предполагаемый возбудитель моноцитарного эрлихиоза человека *Ehrlichia muris* распространен в клещах *Ixodes persulcatus* /*Ixodes pavlovskiy* и в различных видах мелких млекопитающих на территории всех исследуемых областей и является высококонсервативным на основании анализа последовательностей гена 16S рРНК и *groESL* оперона.

5. Два новых генетических варианта *Ehrlichia* spp. обнаружены на территории Хабаровского края - *Ehrlichia* sp. Kh-Hj27 в клещах *Haemaphysalis japonica* и *Ehrlichia* sp. Khabarovsk в образцах печени/селезенки мелких млекопитающих. Бактерии *Ehrlichia* sp. Kh-Hj27 филогенетически схожи с генетическим вариантом эрлихий, выявленном в клещах *Haemaphysalis* spp. в Японии, а бактерии *Ehrlichia* sp. Khabarovsk существенно отличаются от других известных генетических вариантов и видов эрлихий. В отличие от *A. phagocytophilum* и *E. muris*, бактерии *Ehrlichia* sp. Khabarovsk выявлялись в образцах от животных, отловленных до начала периода активности клещей.

6. В клещах *Ixodes* spp., *Dermacentor silvarum* и *Haemaphysalis concinna*

на территории Хабаровского края и Новосибирской области обнаружена ДНК нетипичных бактерий из семейства Anaplasmataceae, которые не могут быть отнесены ни к одному из родов данного семейства. Эти бактерии существенно отличаются друг от друга по последовательностям гена 16S рРНК и не образуют отдельную генетическую группу.

7. Показано, что на территории Новосибирской области около 2% случаев острых лихорадочных состояний у людей, возникающих после присасывания клеща, могут быть верифицированы как случаи гранулоцитарного анаплазмоза и/или моноцитарного эрлихиоза на основании наблюдающейся сероконверсии антител к возбудителям данных инфекций.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. **Rar V.A.**, Fomenko N.V., Dobrotvorsky A.K., Livanova N.N., Rudakova S.A., Fedorov E.G., Astanin V.B., Morozova O.V. Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Russia // *Emerging Infectious Diseases*. – 2005. - V.11. – P. 1708-1715.

2. Ливанова Н.Н., **Рар В.А.**, Ливанов С.Г., Иголкина Я.П. Разнообразие паразитарных систем с участием мелких млекопитающих и *Ixodes persulcatus* Shulze на Северном Урале // *Сибирский экологический журнал*. – 2005. - №6. - С. 1079-1084.

3. **Рар В.А.**, Ливанова Н.Н., Панов В.В., Астанин В.Б., Ливанов С.Г., Морозова О.В. Изучение генетического разнообразия анаплазм и эрлихий в паразитарных системах юга Западной Сибири и Урала // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2006. - Том 5. - Приложение 1. - С. 116-120.

4. **Рар В.А.**, Пуховская Н.М., Высочина Н. П., Зайнулина З.У., Гуляко Л.Ф., Иванов Л.И.. Распространение и генетическое разнообразие эрлихий и анаплазм в таежных клещах и мелких млекопитающих на территории Хабаровского края // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. -.2007. - №3 (Приложение). - С. 156-159.

5. Фоменко Н.В., **Рар В.А.**, Епихина Т.И., Мельникова О.В., Черноусова Н.Я.. Выявление антител к *Borrelia burgdorferi* sensu lato и *Anaplasma phagocytophilum* у больных госпитализированных с диагнозом клещевой энцефалит // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. - 2007. - №3 (Приложение). – С. 177-180.

6. **Rar V.A.**, Livanova N.N., Panov V.V., Kozlova I.V., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Tkachev S.E., Ivanov L.I. Prevalence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals from different regions of Asian part of Russia // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2008. - V. 298 – Supplement 1.- P. 222-230.

7. Tkachev S.E., Fomenko N.V., **Rar V.A.**, Igolкина Y.P., Kazakova Y.V., Chernousova N.Y. Molecular-genetic analysis of tick-transmitted pathogens

revealed in patients of Novosibirsk region, Russia // International Journal of Medical Microbiology. – 2008. - V. 298S1. - P. 365-367.

8. **Рар В.А.**, Фоменко Н.В., Мельникова О.В., Черноусова Н.Я. Выявление антител к возбудителям гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека в крови пациентов из Новосибирской области // Бюллетень сибирской медицины. - 2008. - Том 7. - Приложение 1. - С. 73-77.

9. Ливанова Н.Н., Ливанов С.Г., **Рар В.А.**, Ткачев С.Е. Зоологические предпосылки существования на Северном Урале инфекций человека, передающихся иксодовыми клещами // Национальные приоритеты России. – 2009. - Спец. выпуск. №2. - С. 53-55.

10. **Rar V.A.**, Livanova N.N., Panov V.V. , Doroschenko E.K., Pukhovskaia N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I. Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in Asian part of Russia // Ticks and Tick-borne Diseases. – 2010. - V.1. - P. 57-65.

11. **Рар В.А.**, Епихина Т.И., Ливанова Н.Н., Панов В.В., Дорощенко Е. К, Пуховская Н.М., Высочина Н.П., Иванов Л.И. Изучение гетерогенности гена 16S рРНК и *groESL* оперона в образцах ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris* и “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”, выявленных в таежных клещах на территории Урала, Сибири и Дальнего Востока // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2011. - №2. - С.17-23.

12. **Rar V.A.**, Epikhina T.I., Livanova N.N., Panov V.V. , Doroschenko E.K., Pukhovskaia N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I. Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2011. – V. 11. – P. 1013-1021.