

На правах рукописи



ИГОЛКИНА ЯНА ПЕТРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РИККЕТСИЙ,
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И
ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины
СО РАН

Научный руководитель:

к.б.н.

Рар Вера Александровна

Официальные оппоненты:

Локтев Валерий Борисович, д.б.н., проф.

Федеральное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр вирусологии и
биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, заведующий
отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и
вирусных гепатитов

Козлова Ирина Валерьевна, д.м.н.

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и
репродукции человека», руководитель лаборатории
молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики

Ведущая организация:

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии
и генетики СО РАН

Защита состоится «21» июня 2019 г. в 10-00 часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. 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 « » _____ 2019 г.

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



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Риккетсиозы занимают второе место по распространенности среди бактериальных инфекций, переносимых клещами, на территории азиатской части Российской Федерации. Возбудители риккетсиозов – бактерии, относящиеся к роду *Rickettsia*, выявляются в клещах во многих исследованных регионах страны, и уровень инфицированности может в некоторых видах клещей превышать 70%. Несмотря на это, данные о распространении риккетсий в клещах на территории России весьма ограничены.

За последнее время были получены новые данные, изменившие представление о распространении и патогенности некоторых видов риккетсий и о клинических проявлениях клещевых риккетсиозов. Ряд риккетсий выявляют в клещах и/или регионах, где раньше они не встречались. ДНК некоторых видов риккетсий, которые ранее считались непатогенными, была выявлена в клинических образцах пациентов с признаками инфекционного процесса после укусов клещами. Более того, в клещах регулярно выявляют потенциально новые виды риккетсий (*Candidatus Rickettsia* spp.), патогенность которых пока не изучена.

Широкое распространение *Rickettsia raoultii* и “*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*” затрудняет выявление других видов в случаях одновременного заражения клещей несколькими видами *Rickettsia* spp. В связи с этим представляется актуальным разработка молекулярно-генетических методов для дифференциации разных видов риккетсий.

Сибирский клещевой тиф (СКТ), этиологическим агентом которого является *Rickettsia sibirica*, долгое время считался единственным клещевым риккетсиозом в Сибири и на Дальнем Востоке. Недавно был обнаружен еще один возбудитель, вызывающий риккетсиозы людей в азиатской части России – *Rickettsia heilongjiangensis*, и было описано новое заболевание – дальневосточный клещевой риккетсиоз. Кроме того, на территории азиатской части России в клещах циркулируют другие патогенные виды риккетсий. Тем не менее, заболевания, вызываемые этими риккетсиями, в настоящее время не регистрируются. Следует, однако, отметить, что идентификация этиологических агентов клещевых риккетсиозов молекулярно-генетическими методами была проведена лишь в немногих случаях и преимущественно на территории двух регионов – Алтая и Хабаровского края. Таким образом, вклад различных видов *Rickettsia* spp. в структуру клещевых риккетсиозов изучен недостаточно.

В настоящее время диагноз клещевой риккетсиоз ставится только на основании характерных клинических проявлений. Ни молекулярно-генетические, ни иммунологические методы в клинической практике, как правило, не используются. Однако было показано, что некоторые клещевые риккетсиозы могут протекать с невыраженной или нехарактерной для этих инфекций симптоматикой. В этих случаях с большой вероятностью может быть поставлен неправильный диагноз, что приведет к отсутствию адекватного лечения. Использование молекулярно-генетических методов

может позволить диагностировать клещевые риккетсиозы, протекающие без характерной симптоматики.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение видовой принадлежности и генетического разнообразия риккетсий, выявляемых в иксодовых клещах и в клинических образцах пациентов на территории Западной Сибири и Дальнего Востока.

Для достижения данной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать лабораторный вариант методики для выявления ДНК риккетсий и идентификации наиболее распространенных видов методом видоспецифичной ПЦР.

2. Изучить распространение и генетическое разнообразие риккетсий в клещах родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis* с пастбищно-подстерегающим типом паразитизма, собранных на территории Западной Сибири и Дальнего Востока.

3. Сравнить уровень инфицированности и видовое разнообразие риккетсий в клещах рода *Ixodes* в области симпатрии клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskiy* в Новосибирской области и Республике Алтай.

4. Изучить распространение и генетическое разнообразие риккетсий в клещах *Ixodes trianguliceps* и *Ixodes apronophorus* с гнездово-норным типом паразитизма, собранных в Омской области.

5. Изучить видовую принадлежность и генетическую вариабельность риккетсий в клинических образцах от пациентов на территории Западной Сибири.

Научная новизна работы. Разработан лабораторный вариант методики, основанной на проведении родо- и видоспецифичной ПЦР, для выявления ДНК риккетсий и идентификации наиболее распространенных на территории азиатской части России видов риккетсий.

Проведено широкомасштабное исследование иксодовых клещей разных видов (~4000 особей), обитающих на территории Западной Сибири и Дальнего Востока, на наличие ДНК риккетсий. Впервые были исследованы клещи из отдаленных районов Сахалина и Камчатки. Было показано, что на острове Сахалин, в отличие от других исследованных регионов России, наблюдается высокий уровень инфицированности клещей *I. persulcatus* риккетсиями *Rickettsia helvetica*.

Впервые изучено распространение и генетическое разнообразие риккетсий в клещах *I. pavlovskiy* и межвидовых гибридах *I. persulcatus/I. pavlovskiy* на территории Новосибирской области и республики Алтай в областях симпатрии клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy*. Было показано, что уровень инфицированности клещей *I. persulcatus* риккетсиями “*Candidatus R. tarasevichiae*” достоверно выше, а *R. helvetica* достоверно ниже, чем уровень инфицированности этими видами риккетсий клещей *I. pavlovskiy*. Уровень инфицированности межвидовых гибридов *I. persulcatus/I. pavlovskiy* риккетсиями “*Candidatus R. tarasevichiae*” был промежуточным по сравнению с родительскими видами.

В работе впервые было изучено распространение и генетическое

разнообразие риккетсий в клещах *I. trianguliceps* и *I. apronophorus*, собранных в области симпатрии *I. trianguliceps*, *I. apronophorus* и *I. persulcatus* на территории Омской области. В клещах *I. trianguliceps* обнаружены ранее неизвестные риккетсии, которые были охарактеризованы генетически и на основании критериев для описания новых видов причислены к потенциально новому виду “*Candidatus Rickettsia uralica*”. Было показано, что в *I. trianguliceps* преимущественно выявляется ДНК “*Candidatus R. uralica*”, в клещах *I. apronophorus* – ДНК *R. helvetica*, а в *I. persulcatus* - ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”

Были генетически охарактеризованы по нескольким генам два генетических варианта риккетсий: “*Candidatus Rickettsia principis*” и “*Candidatus Rickettsia rara*” и подтвержден их статус кандидатных видов.

Впервые в азиатской части России в клещах рода *Haemaphysalis* были выявлены *Rickettsia canadensis* и *Rickettsia aeschlimannii*.

Впервые на территории России в образцах пациентов была выявлена ДНК *R. raoultii*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *Rickettsia slovacica*, *R. aeschlimannii*, а также новых геновариантов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ).

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты о видовом и генетическом разнообразии риккетсий в клещах показали взаимосвязь разных видов риккетсий с определенными видами клещей родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis*. В клещах *I. trianguliceps* был выявлен и генетически охарактеризован потенциально новый вид риккетсий – “*Candidatus R. uralica*”.

Полученные в ходе выполнения настоящей работы данные о видовом разнообразии риккетсий, способных инфицировать человека, необходимы для постановки диагноза, а также для оценки эпидемической обстановки в изученных регионах. Правильная и своевременная диагностика клещевых риккетсиозов имеет ключевое значение для проведения адекватного лечения.

В ходе работы были отсекувенированы ~1500 нуклеотидных последовательностей; из них 159 были депонированы в базе данных GenBank.

Положения, выносимые на защиту

1. Разные виды риккетсий преимущественно ассоциированы с определенными видами клещей: в *I. persulcatus* в большинстве регионов доминирует “*Candidatus R. tarasevichiae*”; в клещах рода *Dermacentor* преобладает *R. raoultii*; в клещах *H. concinna* – *R. heilongjiangensis* и “*Candidatus R. rara*”; в клещах *H. japonica* – “*Candidatus R. principis*”; в клещах *I. apronophorus* – *R. helvetica*, а в клещах *I. trianguliceps* – “*Candidatus R. uralica*”.

2. Обнаружен и генетически охарактеризован потенциально новый вид риккетсий “*Candidatus R. uralica*”.

3. На территории Западной Сибири в клещах *I. persulcatus* достоверно чаще по сравнению с *I. pavlovskyi* выявляются “*Candidatus R. tarasevichiae*” и достоверно реже *R. helvetica*; в межвидовых гибридах *I. persulcatus/I.*

pavlovskiy встречаемость эти видов риккетсий была промежуточной по сравнению с родительскими видами.

4. В клинических образцах от пациентов, госпитализированных с признаками заболеваний, переносимых клещами, помимо ДНК возбудителя сибирского клещевого тифа (*R. sibirica* subsp. *sibirica*) выявляется ДНК других видов риккетсий: *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. aeschlimannii* и “*Candidatus R. tarasevichiae*”.

Апробация работы и публикации. Основные результаты работы были представлены на двух международных конференциях: 14th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-borne Diseases, ICLB2015, Вена, Австрия, 2015 г.; International Symposium on Tick-Borne Pathogens and Disease ITPD 2017, Вена, Австрия, 2017 г.; и пяти российских конференциях.

По теме диссертационной работы было опубликовано 6 статей, из них 5 в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, и 1 в российском рецензируемом журнале.

Методология и методы исследования. В работе использовались стандартные методы выделения ДНК, двухраундовой ПЦР с родо- и видоспецифичными праймерами, секвенирования, филогенетического и статистического анализа данных, выявления антител (ELISA).

Личный вклад автора. Все описанные в работе результаты получены лично автором или при его непосредственном участии.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 132 страницах, содержит 22 рисунка и 17 таблиц. Библиография включает 173 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выбор праймеров для родо- и видоспецифичной ПЦР

Для скрининга клещей и клинических образцов на наличие ДНК риккетсий были выбраны две пары родоспецифичных праймеров из области гена цитратсинтазы (*gltA*). Для генетической характеристики риккетсий были выбраны родоспецифичные праймеры из области генов 16S рРНК, и поверхностных белков (*ompA*, *ompB* и *sca4*). Для наиболее распространенных видов *Rickettsia* spp. были выбраны видоспецифичные праймеры.

2. Выявление ДНК риккетсий в клещах

Всего в работе было исследовано 3849 голодных имаго, собранных на территории Дальнего Востока (N=1665) и Западной Сибири (N=2184), включая *D. reticulatus* (N=131), *D. marginatus* (N=98), *D. silvarum* (N=188), *H. concinna* (N=439), *H. japonica* (N=374), *I. persulcatus* (N=1751), *I. pavlovskiy* (N=577) и межвидовые гибриды *I. persulcatus* / *I. pavlovskiy* (N=291). Также были исследованы 37 нимф и 35 имаго клещей, включая *I. persulcatus* (N=16), *I. trianguliceps* (N=41) и *I. apronophorus* (N=15), снятых с мелких млекопитающих, отловленных в Омской области.

Вид клещей определяли морфологически. Видовая принадлежность близкородственных видов клещей из областей симпатрии дополнительно подтверждалась генетическими методами. Собранные клещи были исследованы на наличие ДНК *Rickettsia* spp. методом двухкрандовой ПЦР с праймерами из области гена *gltA*. Положительные образцы исследовали на наличие одновременного инфицирования разными видами риккетсий методом ПЦР с группо- и видоспецифичными праймерами. Идентификацию выявленных риккетсий проводили секвенированием продуктов ПЦР, а также методом видоспецифичной ПЦР. Данные о встречаемости различных видов риккетсий в клещах приведены в Таблицах 1 и 2.

2.1. Выявление ДНК риккетсий в иксодовых клещах на Дальнем Востоке

Хабаровский край. Голодные имаго 1195 клещей, включая *I. persulcatus* (N=467), *D. silvarum* (N=113), *H. concinna* (N=241) и *H. japonica* (N=374), были собраны с растительности на флаг в 2005-2014 гг. с пяти участков, расположенных на территории Хабаровского края.

В 83,7% (95% ДИ: 80,1-86,8) исследованных клещей *I. persulcatus* была выявлена ДНК *Rickettsia* spp. На всех исследованных участках Хабаровского края в клещах *I. persulcatus* преобладали риккетсии “*Candidatus R. tarasevichiae*” (уровень инфицированности 83,1%; ДИ: 79,4-86,2). ДНК *R. helvetica* выявлена в 2,1% клещей (ДИ: 1,2-3,9); ДНК *R. heilongjiangensis* – в 5,4% (ДИ: 3,7-7,8). В клещах *D. silvarum* преобладали риккетсии *R. raoultii* (58,4%; ДИ: 49,2-67,1).

Риккетсии были выявлены в 23,2% (ДИ: 18,4-29,0) исследованных клещей *H. concinna*. Чаще всего в клещах этого вида выявлялась ДНК *R. heilongjiangensis* (14,5%; ДИ: 10,6-19,5); реже – ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”, “*Candidatus R. gara*”, *R. raoultii*, *R. aeschlimannii* и “*Candidatus R. principis*”. ДНК риккетсий была обнаружена в 16,0% (ДИ: 12,7-20,1) исследованных клещей *H. japonica*. Чаще всего выявлялись “*Candidatus R. principis*” (5,6%; ДИ: 3,7-8,4) и “*Candidatus R. tarasevichiae*” (5,3%; ДИ: 3,5-8,1), реже – *R. heilongjiangensis*, *R. raoultii* и “*Candidatus R. gara*” (Рис.1). Впервые в клещах *H. concinna* и *H. japonica* выявлена *R. aeschlimannii*, и впервые на территории РФ – *R. canadensis*.

Амурская область. Голодные имаго были собраны на флаг в 2011 г. с трех участков, расположенных на территории Амурской области. Всего было собрано 273 клеща, включая *D. silvarum* (N=75) и *H. concinna* (N=198).

В 93,3% (ДИ: 85,3-97,1) клещей *D. silvarum* выявлена ДНК *R. raoultii*, в единичных клещах – “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Риккетсии были выявлены в 11,6% (ДИ: 7,9-16,8) клещей *H. concinna*. Чаще всего выявлялась ДНК *R. heilongjiangensis* (5,6%; ДИ: 3,1-9,7); реже – *R. raoultii*, “*Candidatus R. gara*” и *R. sibirica*.

Камчатский край. Поскольку в Камчатском крае численность клещей очень мала, были исследованы клещи, как собранные с растительности, так и снятые с людей в 2005-2006 гг. на всей территории края. Для исследования было взято 60 клещей *I. persulcatus*.

Таблица 1

Риккетсии, выявленные в клещах на территории Дальнего Востока

Участок	Вид клеща	N	N (%) клещей, содержащих ДНК *	Риккетсии											
				Всех видов	<i>R. longgans-gensis</i>	<i>R. helvetica</i>	<i>R. australis</i>	<i>R. sibirica</i>	<i>Sa.R. tarasevi-clause</i>	<i>R. samadenis</i>	<i>R. schimmani</i>	<i>Sa.R. principis</i>	<i>Sa.R. rara</i>	<i>Rickettsia spp.</i>	
X1	<i>D. silv</i>	83	48 (57,8)	0	0	48 (57,8)	0	1 (1,2)	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. con</i>	38	24 (41,4)	13 (22,4)	0	2 (3,4)	0	14 (24,1)	0	0	0	0	2 (3,4)	0	0
X2	<i>H. jap</i>	206	44 (21,4)	5 (2,4)	0	4 (1,9)	0	17 (8,3)	0	0	0	13 (6,3)	4 (1,9)	1	0
	<i>D. silv</i>	30	18 (60,0)	0	0	18 (60,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. con</i>	3	1 (33,3)	1 (33,3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. jap</i>	42	1 (2,4)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (2,4)	0	0	0
	<i>I. per</i>	100	78 (78,0)	0	0	0	0	78 (78,0)	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. con</i>	153	22 (14,4)	12 (7,8)	0	0	0	0	0	1 (0,7)	0	1 (0,7)	8 (5,2)	0	0
X3	<i>H. jap</i>	109	11 (10,1)	0	0	1 (0,9)	0	2 (1,8)	0	1 (0,9)	0	6 (5,5)	0	0	0
	<i>I. per</i>	31	24 (77,4)	0	1	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. con</i>	27	9 (33,3)	9 (33,3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. jap</i>	17	4 (23,5)	2 (11,8)	0	0	0	1 (5,9)	0	0	0	1 (5,9)	0	0	0
	<i>I. per</i>	100	75 (75,0)	7 (7,0)	0	0	0	74 (74,0)	0	0	0	0	0	0	0
	<i>I. per</i>	236	214 (90,7)	18 (7,6)	9 (3,8)	0	0	213 (90,3)	0	0	0	0	0	0	0
X5	<i>I. per</i>	113	66 (58,4)	0	0	66 (58,4)	0	1 (0,9)	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. con</i>	241	56 (23,2)	35 (14,5)	0	2 (0,8)	0	14 (5,8)	0	1 (0,4)	0	10 (4,1)	0	0	0
X5	<i>H. jap</i>	374	60 (16,0)	7 (1,9)	0	5 (1,3)	0	20 (5,3)	1	1 (0,3)	0	21 (5,6)	4 (1,1)	1 (0,3)	0
	<i>I. per</i>	467	391 (83,7)	25 (5,4)	10 (2,1)	0	0	388 (83,1)	0	0	0	0	0	0	0
Am1	<i>D. silv</i>	75	70 (93,3)	0	0	70 (93,3)	0	2 (2,7)	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. con</i>	22	9 (40,9)	1 (4,5)	0	8 (36,4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Am2	<i>H. con</i>	84	5 (6,0)	1 (1,2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. con</i>	92	9 (10,0)	9 (10,0)	0	0	0	0	1 (1,2)	0	0	0	3 (3,6)	0	0
Am3	<i>D. silv</i>	75	70 (93,3)	0	0	70 (93,3)	0	2 (2,7)	0	0	0	0	0	0	0
	<i>H. con</i>	198	23 (11,6)	11 (5,6)	0	8 (4,0)	0	1 (0,5)	0	0	0	0	3 (1,5)	0	0
Сх	<i>I. per</i>	137	93 (67,9)	0	0	87 (63,5)	0	6 (4,4)	0	0	0	0	0	0	0
	<i>I. per</i>	60	40 (66,7)	0	1 (1,7)	0	0	39 (65,0)	0	0	0	0	0	0	0

* Включая случаи одновременного инфицирования двумя разными видами риккетсий

N - количество клещей

ДНК *Rickettsia* spp. была выявлена в 66,7% (ДИ: 54,1-77,2) клещей. ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” была обнаружена в 65,0% (ДИ: 52,4-75,8) клещей. В одном клеще была выявлена ДНК *R. helvetica*.

Сахалинская область. Голодные имаго *I. persulcatus* (N=137) были собраны на флаг в 2011 г. на одном участке Сахалинской области. ДНК *Rickettsia* spp. была выявлена в 67,9% (ДИ: 59,7-75,1) клещей. Доминирующим видом в клещах *I. persulcatus* был вид *R. helvetica*: он был обнаружен в 63,5% (ДИ: 55,2-71,1) исследованных клещей. Риккетсии “*Candidatus R. tarasevichiae*” были выявлены лишь в 4,4% (ДИ: 2,0-9,2) клещей *I. persulcatus*.

Объединяя результаты по всем исследованным областям Дальнего Востока, следует отметить, что уровень инфицированности клещей *Haemaphysalis* spp. был значительно ниже (12-23%) по сравнению с клещами родов *Ixodes* и *Dermacentor* (58-93%). Также интересно, что на острове Сахалин клещи *I. persulcatus* были достоверно более часто ($P < 0.001$) инфицированы *R. helvetica* по сравнению с “*Candidatus R. tarasevichiae*”, тогда как во всех остальных исследованных регионах *I. persulcatus* были достоверно более часто ($P < 0.001$) инфицированы “*Candidatus R. tarasevichiae*” по сравнению с другими видами риккетсий. Кроме того, ДНК *R. raoultii* достоверно чаще ($P < 0.001$) выявлялась в клещах *D. silvarum*, чем в клещах рода *Haemaphysalis*. ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” была выявлена достоверно чаще в клещах *I. persulcatus*, чем в клещах родов *Haemaphysalis* и *Dermacentor*. Клещи *H. concinna* достоверно чаще ($P < 0,001$) были инфицированы *R. heilongjiangensis*, чем клещи *H. japonica*. “*Candidatus R. principis*” выявлялась чаще в клещах *H. japonica*, чем в клещах *H. concinna*.

2.2. Выявление ДНК риккетсий в иксодовых клещах в Западной Сибири

Новосибирская область. Голодные имаго были собраны с растительности на флаг в 2010-2015 гг. с пяти участков, расположенных на территории Новосибирской области (участки Н1-Н5). Всего было собрано 966 клещей, включая *I. persulcatus* (N=149), *I. pavlovskyi* (N=453), *I. persulcatus/I. pavlovskyi* (N=233), *D. reticulatus* (N=131).

Клещи *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* были собраны в областях симпатрии этих видов. На всех исследованных участках, помимо *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*, были обнаружены их межвидовые гибриды. Риккетсии были выявлены в 65,1% (ДИ: 57,2-72,3) исследованных клещей *I. persulcatus*. На всех исследованных участках в *I. persulcatus* преобладал вид “*Candidatus R. tarasevichiae*” (61,7%; ДИ: 53,7-69,2); реже обнаруживалась ДНК *R. raoultii*, *R. sibirica*, *R. helvetica* и новых геновариантов риккетсий группы КПЛ (Рис. 2).

В 7,9% (ДИ: 5,8-10,8) клещей *I. pavlovskyi* были выявлены риккетсии, включая *R. raoultii* (3,3%; ДИ: 2,0-5,4), *R. helvetica* (2,2%; ДИ: 1,2-4,0), “*Candidatus R. tarasevichiae*” (2,0%; ДИ: 1,1-3,7) и *R. heilongjiangensis* 4 (0,9%; ДИ: 0,3-2,3). Риккетсии были выявлены в 26,2% (ДИ: 21,0-32,2) гибридных клещей *I. persulcatus/I. pavlovskyi*. Преобладающим был вид “*Candidatus R. tarasevichiae*”; уровень инфицированности составил 24,5% (ДИ: 19,4-30,4).

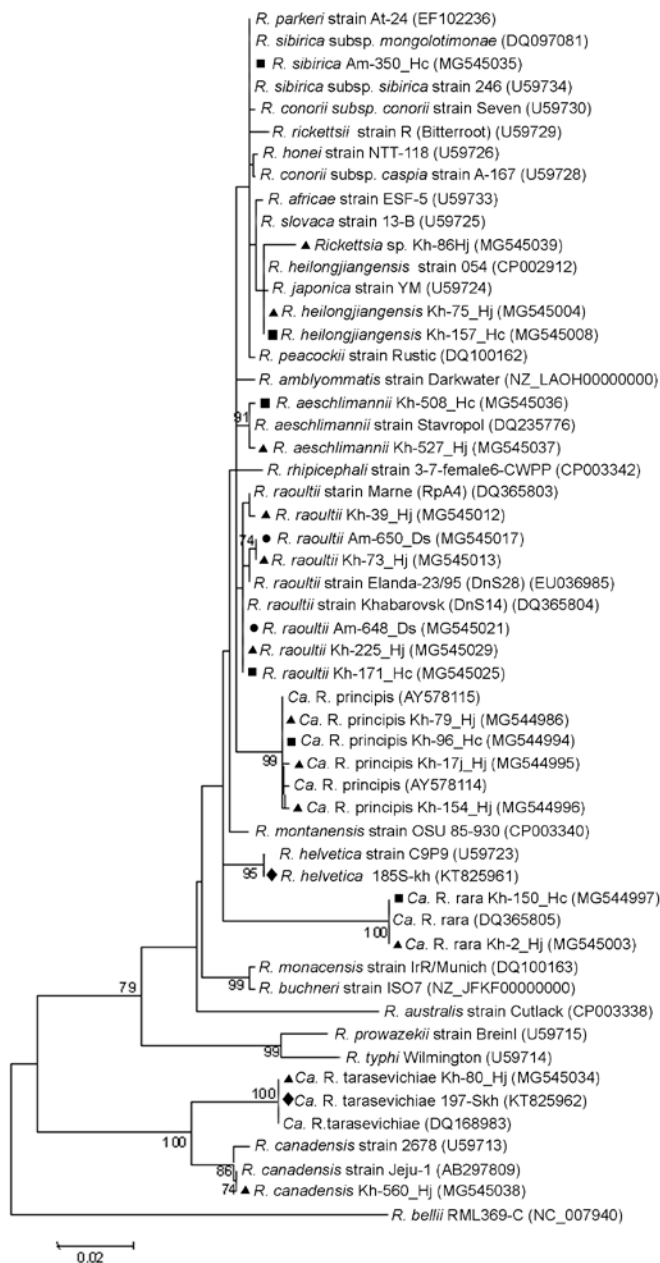


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная ML методом на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gItA* (555 п.н.) риккетсий, выявленных на территории Дальнего Востока. В узлах дендрограммы указаны индексы поддержки. Полученные в данной работе последовательности отмечены: ● *D. silvarum*; ▲ *H. japonica*; ■ *H. concinna*; ◆ *I. persulcatus*

Реже выявлялась ДНК *R. raoultii* и *R. sibirica*.

В клещах *D. reticulatus* был выявлен единственный вид риккетсий – *R. raoultii*, уровень инфицированности составил 45,0% (ДИ: 36,8-53,6).

Таблица 2

Риккетсии, выявленные в клещах на территории Западной Сибири

Участок	Вид клеща	N	N (%) клещей, содержащих ДНК*						Ca.R.tarasovichiae	Rickettsia spp.
			Всех видов	<i>R.heilongjiangensis</i>	<i>R.helvetica</i>	<i>R.raoultii</i>	<i>R.sibirica</i>			
Н1	<i>I. persulcatus</i>	22	17 (77,3)	0	1 (4,5)	4 (18,2)	0	13 (59,0)	0	
	<i>I. pavlovskiyi</i>	316	14 (4,4)	2 (0,6)	9 (2,8)	0	0	5 (1,6)	0	
	<i>I. per/I. pav</i>	47	1 (2,1)	0	0	0	0	1 (2,1)	0	
Н2	<i>I. pavlovskiyi</i>	22	14 (63,6)	2 (9,1)	1 (4,5)	11 (50,0)	0	0	0	
	<i>I. per/I. pav</i>	5	2 (40,0)	0	0	2 (40,0)	0	0	0	
Н3	<i>I. persulcatus</i>	110	70 (63,6)	0	0	2 (1,8)	2 (1,8)	69 (62,7)	1 (0,9)	
	<i>I. pavlovskiyi</i>	79	3 (3,8)	0	0	0	0	3 (3,8)	0	
	<i>I. per/I. pav</i>	152	46 (30,3)	0	0	0	1 (0,7)	45 (29,6)	0	
Н4	<i>I. persulcatus</i>	14	9 (64,3)	0	0	0	0	9 (64,3)	0	
	<i>I. pavlovskiyi</i>	22	1 (4,5)	0	0	0	0	1 (4,5)	0	
	<i>I. per/I. pav</i>	24	12	0	0	1 (4,2)	0	11 (45,8)	0	
	<i>D. reticulatus</i>	80	34 (42,5)	0	0	34 (42,5)	0	0	0	
Н5	<i>I. persulcatus</i>	3	1 (33,3)	0	0	1 (33,3)	0	1 (33,3)	0	
	<i>I. pavlovskiyi</i>	14	4 (28,6)	0	0	4 (28,6)	0	0	0	
	<i>I. per/I. pav</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>D. reticulatus</i>	51	25 (49,0)	0	0	25 (49,0)	0	0	0	
Всего Н1-Н5	<i>I. persulcatus</i>	149	97 (65,1)	0	1 (0,7)	7 (4,7)	2 (1,3)	92 (61,7)	1 (0,7)	
	<i>I. pavlovskiyi</i>	453	36 (7,9)	4 (0,9)	10 (2,2)	15 (3,3)	0	9 (2,0)	0	
	<i>I. per/I. pav</i>	233	61 (26,2)	0	0	3 (1,3)	1 (0,4)	57 (24,5)	0	
	<i>D. reticulatus</i>	131	59 (45,0)	0	0	59 (45,0)	0	0	0	
А1	<i>I. persulcatus</i>	33	26 (78,8)	0	0	1 (3,0)	0	26 (78,8)	0	
	<i>I. pavlovskiyi</i>	11	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>I. per/I. pav</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	
А2	<i>I. persulcatus</i>	152	136 (89,5)	1 (0,7)	0	12 (7,9)	6 (3,9)	135 (88,8)	1 (0,7)	
	<i>I. pavlovskiyi</i>	113	11 (8,9)	1 (0,9)	10 (8,8)	0	0	1 (0,9)	0	
	<i>I. per/I. pav</i>	52	29 (55,8)	0	4 (7,7)	3 (5,8)	1 (1,9)	26 (50,0)	0	
А3	<i>D. marginatus</i>	98	65 (66,3)	0	0	49 (50,0)	15 (15,3)	4 (4,1)	0	
Всего А1-А3	<i>I. persulcatus</i>	185	162 (87,6)	0	0	13 (7,0)	6 (3,2)	161 (87,0)	1 (0,5)	
	<i>I. pavlovskiyi</i>	124	11 (8,9)	1 (0,8)	10 (8,1)	0	0	1 (0,8)	0	
	<i>I. per/I. pav</i>	58	29 (50,0)	0	4 (6,9)	3 (5,2)	1 (1,7)	26 (44,8)	0	
	<i>D. marginatus</i>	98	65 (66,3)	0	0	49 (50,0)	15 (15,3)	4 (4,1)	0	
О1	<i>I. persulcatus</i>	136	122 (89,7)	0	0	0	0	122 (89,7)	0	
О2	<i>I. persulcatus</i>	221	177 (80,1)	0	0	0	0	177 (80,1)	0	
О3	<i>I. persulcatus</i>	396	328 (82,8)	3 (0,8)	1 (0,3)	0	0	328 (82,8)	0	
Всего О1-О3	<i>I. persulcatus</i>	753	627 (83,3)	3 (0,4)	1 (0,1)	0	0	627 (83,3)	0	

* Включая случаи одновременного инфицирования двумя разными видами риккетсий. N- количество клещей. *I. per/I. pav* – гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskiyi*. Участки Н1-Н5 – Новосибирская область, А1-А3 – Республика Алтай, О1-О3 – Омская область.

Республика Алтай. Голодные имаго были собраны с растительности на флаг в 2012-2015 гг. с трех участков на территории республики Алтай. Всего было собрано 465 клещей: *I. persulcatus* (N=185), *I. pavlovskiyi* (N=124), *I. persulcatus/I. pavlovskiyi* (N=58), *D. marginatus* (N=98).

Клещи *I. persulcatus*, *I. pavlovskiyi* и их гибриды были собраны в областях их симпатрии. Риккетсии были выявлены в 87,6% (ДИ: 82,0-91,6) клещей *I.*

persulcatus. На всех исследованных участках в этих клещах преобладал вид “*Candidatus R. tarasevichiae*” (87,0%; ДИ: 81,4-91,1). Реже выявлялась ДНК *R. sibirica*, *R. raoultii*, *R. heilongjiangensis* и новых геновариантов *Rickettsia* sp.

ДНК *Rickettsia* spp. была обнаружена в 8,9% (ДИ: 5,0-15,2) исследованных клещей *I. pavlovskiy*. Среди выявленных риккетсий преобладающим видом была *R. helvetica* (8,1%; ДИ: 4,4-14,2). В единичных клещах была обнаружена ДНК *R. heilongjiangensis* и “*Candidatus R. tarasevichiae*”.

Риккетсии были выявлены в 50,0% (ДИ: 37,5-62,5) гибридов *I. persulcatus/I. pavlovskiy*. Наиболее часто выявлялись “*Candidatus R. tarasevichiae*” (44,8%; ДИ: 32,8-57,6); реже была выявлена ДНК *R. helvetica*, *R. raoultii* и *R. sibirica*.

ДНК риккетсий была выявлена в 66,3% (ДИ: 56,5-74,9) проанализированных клещей *D. marginatus*. Самым распространенным видом риккетсий в этих клещах был вид *R. raoultii*, он был обнаружен в 50,0% (ДИ: 40,3-59,7) клещей. В *D. marginatus* была также выявлена ДНК *R. sibirica* и “*Candidatus R. tarasevichiae*”.

Объединяя результаты по Новосибирской области и Республике Алтай, следует отметить, что клещи *I. pavlovskiy* были инфицированы *Rickettsia* spp. достоверно реже, чем клещи *I. persulcatus* ($P < 0.001$). Клещи *I. persulcatus* были достоверно чаще ($P < 0.001$) инфицированы “*Candidatus R. tarasevichiae*” и достоверно реже ($P = 0.002$) инфицированы *R. helvetica* по сравнению с *I. pavlovskiy*.

Омская область. Голодные имаго *I. persulcatus* (N=753) были собраны с растительности на флаг в 2011-2018 гг. с трех участков, расположенных на территории Омской области. ДНК *Rickettsia* spp. была обнаружена в 83,3% (ДИ: 80,4-85,8) клещей. На всех участках Омской области в клещах *I. persulcatus* превалировал вид “*Candidatus R. tarasevichiae*”, уровень инфицированности клещей составлял 80,1-89,7%. Кроме того, была выявлена ДНК *R. heilongjiangensis* и *R. helvetica*.

Выявление ДНК риккетсий в клещах, снятых с мелких млекопитающих в Омской области.

Нимфы и имаго *I. persulcatus*, *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* были сняты с мелких млекопитающих, отловленных на двух участках, расположенных в Омской области (O1-O2). В исследование были взяты 16 нимф *I. persulcatus*, 16 нимф и 25 имаго *I. trianguliceps*, 5 нимф и 10 имаго *I. apronophorus*.

В 87,5% (ДИ: 64,0-96,5) клещей *I. persulcatus* была выявлена ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”; в 12,2% (ДИ: 5,3-25,5) - ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” и в 4,9% (ДИ: 1,4-16,1) – ДНК *R. helvetica*. Кроме того, в 41,5% (ДИ: 27,8-56,6) клещей *I. trianguliceps* был выявлен новый генетический вариант риккетсий из группы КПЛ, который в данной работе был генетически охарактеризован и назван “*Candidatus Rickettsia uralica*”. В 80,0% (ДИ: 54,8-93,0) клещей *I. apronophorus* была выявлена ДНК *R. helvetica*, в одном клеще – ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”.

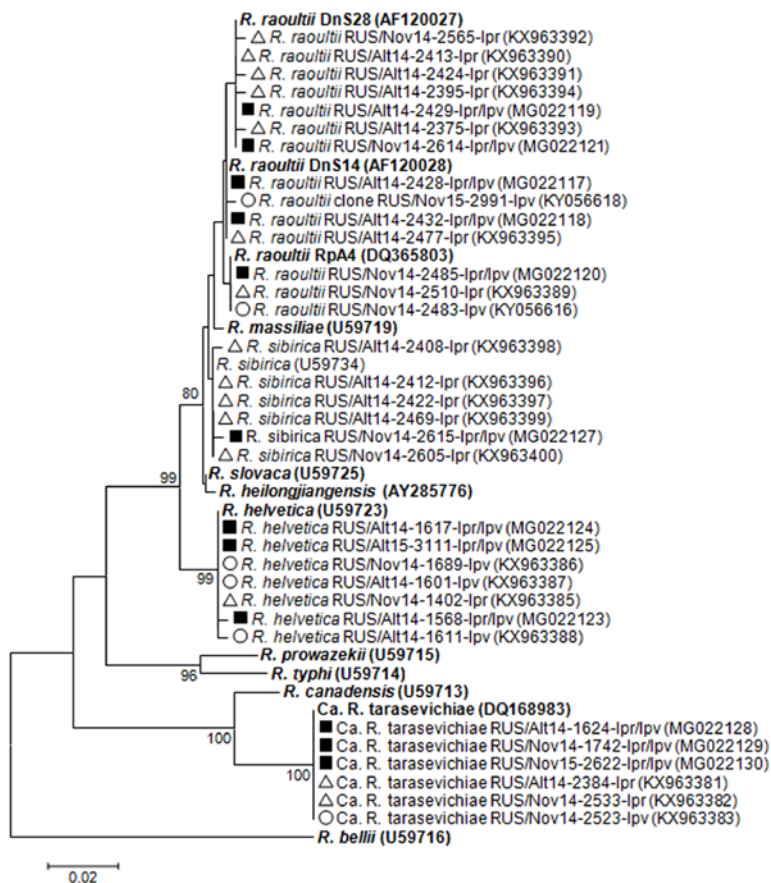


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная ML методом на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gltA* (474 п.н.) риккетсий в клещах *Ixodes* spp. на территории Новосибирской области и Республики Алтай. Жирным шрифтом выделены последовательности известных штаммов. В узлах дендрограммы указаны индексы поддержки. Полученные в данной работе последовательности отмечены: Δ *I. persulcatus*; \circ *I. pavlovskyi*; \blacksquare гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi*.

2.3. Выявление микст-инфицирования клещей *Rickettsia* spp.

В 74 иксодовых клещах разных видов было выявлено микст-инфицирование одновременно разными видами *Rickettsia* spp. В большинстве случаев “*Candidatus R. tarasevichiae*” выявлялась одновременно с другими видами риккетсий: *R. heilongjiangensis* (n=27), *R. raoultii* (n=24), *R. helvetica* (n=16), “*Candidatus R. uralica*” (n=3), *R. sibirica* (n=1) и *Rickettsia* spp. (n=2). Кроме того, в одном клеще *D. marginatus* одновременно выявлялась ДНК *R. raoultii* и *R. sibirica*.

3. Генетическая характеристика выявленных в клещах риккетсий

Риккетсии, выявленные в данной работе, были охарактеризованы по

гену *gltA*, а некоторые образцы были также охарактеризованы по гену 16S рРНК и генам поверхностных белков (*ompA*, *ompB* и *sca4*). Все определенные последовательности фрагментов генов *gltA* и 16S рРНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” соответствовали известным последовательностям (AF503168, DQ168983). В данной работе впервые была определена последовательность гена *ompB* для “*Candidatus R. tarasevichiae*”.

Остальные выявленные виды риккетсий были генетически вариабельны. Определенные последовательности фрагментов генов *gltA*, 16S rRNA, *ompA* и *ompB* для большинства образцов *R. sibirica* соответствовали последовательности *R. sibirica* subsp. *sibirica* штамма 246 (AABW01000001). Однако для четырех образцов из *I. persulcatus* (KY019069, KX963397, KX963398 и KX963400) и двух образцов из гибридов *I. persulcatus/I. pavlovskiyi* (MG022126 и MG022127) последовательности фрагмента гена *gltA* отличались 1-2 заменами от последовательности штамма 246.

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *gltA*, 16S рРНК, *ompA*, *ompB* и *sca4* для большинства образцов *R. heilongjiangensis* соответствовали последовательностям *R. heilongjiangensis* штамма 054 (CP00291). Последовательности фрагмента гена *gltA* для двух образцов из *I. persulcatus* (KT825957 и KT825958) и одного образца из *I. pavlovskiyi* (KX963404) отличались между собой и от известной последовательности 1-2 заменами.

Последовательность фрагмента гена *gltA* *R. canadensis* из клеща *H. japonica* была идентична последовательности *R. canadensis* Jeju-1 из клеща *Haemaphysalis flava* из Южной Кореи (AB297809); последовательность гена 16S рРНК соответствовала последовательности *R. canadensis* штамма McKiel, а последовательность гена *ompB* отличалась шестью заменами от соответствующей последовательности этого же штамма.

Две последовательности гена *gltA* образцов *R. aeschlimannii* отличались между собой и от известной последовательности *R. aeschlimannii* штамма Stavropol (DQ235776) единичными заменами.

Среди обнаруженных видов риккетсий, *R. helvetica* и *R. raoultii* были наиболее вариабельными. Все выявленные генетические варианты *R. helvetica* на основании анализа последовательностей генов *gltA*, *ompB* и *sca4* отличались от известных изолятов. Было обнаружено три наиболее часто встречающихся генетических варианта *R. helvetica*, которые были связаны с определенными видами клещей, а также несколько генетических вариантов, обнаруженных в единичных клещах (Табл. 3).

Для геноварианта *R. helvetica* Var-Iper (выявленного преимущественно в клещах *I. persulcatus* и *I. pavlovskiyi*) последовательности гена *gltA* были идентичны последовательностям *R. helvetica* штамма С9P9, изолированного из клеща *I. ricinus* (U59723), и *R. helvetica* из клеща *I. persulcatus* из Новосибирской области (KM288466). Последовательности гена *sca4* соответствовали последовательности изолята *R. helvetica* IP-1 из Японии (FJ358501), а последовательности гена *ompB* отличались 1-2 заменами от всех известных последовательностей *R. helvetica*. Для геноварианта *R. helvetica*

Var-Itr (выявленного преимущественно в *I. trianguliceps*) определенные последовательности гена *ompB* были идентичны известным последовательностям *R. helvetica* (KP866151), тогда как гены *gltA* и *sca4* отличались 1-2 нуклеотидными заменами от известных последовательностей (KF859958, U59723, FJ358501). Генетический вариант *R. helvetica* Var-Iapr (выявленный в клещах *I. apronophorus*) отличался 1-4 заменами по генам *gltA*, *ompB* и *sca4* от соответствующих известных последовательностей *R. helvetica* (KF859958, U59723, KJ572382, FJ358501). Кроме того были выявлены четыре геноварианта *R. helvetica*, отличающиеся по гену *gltA* от всех известных последовательностей единичными заменами (Табл. 3).

Таблица 3

Распространение разных геновариантов *R. helvetica* в разных видах клещей

Вид клеща	N клещей с ДНК <i>R. helvetica</i>	N генотипированных изолятов	N изолятов принадлежащих геноварианту			
			Var-Iper	Var-Itr	Var-Iapr	Новые генотипы
<i>I. persulcatus</i>	99	49	48	-	-	1
<i>I. pavlovskiy</i>	20	16	15	-	-	1
<i>I.per/I.pav</i>	4	4	3	-	-	1
<i>I. trianguliceps</i>	2	2	-	2	-	-
<i>I. apronophorus</i>	12	12	1	1	9	1

N – количество клещей; *I.per/I.pav* – гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskiy*.

В литературе описано три основных геноварианта *R. raoultii*: RpA4 (штамм Marne), DnS14 (штамм Khabarovsk) и DnS28 (штамм Elanda 23/95). Эти три геноварианта были выявлены в большинстве исследованных нами клещей. Помимо известных, были выявлены 11 новых генетических вариантов *R. raoultii*, один из которых (Var-Ds) был широко распространен на территории Дальнего Востока, а остальные встречались в единичных клещах (Табл. 4). Для геноварианта Var-Ds последовательность гена *gltA* отличалась одной заменой от последовательности *R. raoultii* DnS28 (EU036985); последовательность гена *sca4* отличалась тремя заменами от известной последовательности (DQ365808), а последовательности генов *ompA* и *ompB* были идентичны известным последовательностям *R. raoultii* (CP010969 и FN651772, соответственно).

Таблица 4

Распространение разных геновариантов *R. raoultii* в разных видах клещей

Вид клеща	N клещей с ДНК <i>R. raoultii</i>	N генотипированных изолятов	N изолятов принадлежащих геноварианту				Новые генотипы
			RpA4	DnS14	DnS28	Var-Ds	
<i>D. reticulatus</i>	59	20	20	-	-	-	-
<i>D. marginatus</i>	49	22	10	-	8	3	1
<i>D. silvarum</i>	70	58	-	38	-	20	-
<i>H. concinna</i>	10	9	-	8	-	1	-
<i>H. japonica</i>	5	5	-	2	-	2	1
<i>I. persulcatus</i>	20	14	2	2	6	-	4
<i>I. pavlovskiy</i>	15	9	5	2	-	-	2
<i>I.per/I.pav</i>	6	6	1	2	1	-	2

N – количество клещей; *I.per/I.pav* – гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskiy*.

4. Филогенетический анализ кандидатных видов риккетсий

В данной работе в клещах *I. trianguliceps* впервые был выявлен потенциально новый вид риккетсий “*Candidatus R. uralica*”. Кроме того, в клещах *H. concinna* и *H. japonica* были выявлены “*Candidatus R. rara*” и “*Candidatus R. principis*”, которые ранее были отнесены к кандидатным видам на основании последовательностей гена *gltA*. Для генетической характеристики этих трех кандидатных видов были определены последовательности генов *gltA*, 16S рРНК и генов поверхностных белков.

Для ряда образцов “*Candidatus R. uralica*” были определены последовательности фрагментов генов *gltA* (1002 п.н.), 16S рРНК (1067 п.н.), *ompA* (1256 п.н.), *ompB* (1274 п.н.), and *sca4* (782 п.н.). Все определенные последовательности генов были идентичны между собой, но отличались от последовательностей из базы данных GenBank. Было показано, что фрагменты генов *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* “*Candidatus R. uralica*” имеют уровень сходства не более чем 99,6%, 98,2%, 97,8% и 98,2% с ближайшими видами риккетсий группы КПЛ, соответственно.

Для ряда образцов “*Candidatus R. principis*” были определены последовательности фрагментов генов *gltA* (805 н.п.), 16S рРНК (700 п.н.), *ompA* (884 п.н.), *ompB* (777 п.н.) и *sca4* (772 п.н.). Последовательности фрагмента гена *gltA* для большинства образцов “*Candidatus R. principis*” соответствовали известной последовательности данного кандидатного вида (AY578115), а для трех образцов – отличались единичными заменами. Последовательности фрагментов генов 16S рРНК, *ompA*, *ompB* и *sca4* были идентичны между собой, но отличались от известных последовательностей из базы данных GenBank. Было показано, что фрагменты генов 16S рРНК, *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* “*Candidatus R. principis*” имеет уровень сходства не более чем 99,3%, 98,9%, 96,3%, 97,2% и 98,1% с ближайшими видами риккетсий группы КПЛ, соответственно.

Для генетической характеристики “*Candidatus R. rara*” были отсеквенированы фрагменты генов *gltA* (754 п.н.), 16S rRNA (643 п.н.), *ompB* (833 п.н.) и *sca4* (799 п.н.); фрагмент гена *ompA* не удалось амплифицировать. Последовательности фрагмента гена *gltA* соответствовали известной последовательности данного кандидатного вида (DQ365805), последовательности остальных генов отличались от последовательностей из базы данных GenBank. Уровень сходства выявленных последовательностей “*Candidatus R. rara*” с последовательностями ближайших видов риккетсий группы КПЛ для фрагментов генов 16S рРНК, *gltA*, *ompB* и *sca4* не превышал 99,2%, 95,1%, 87,6% и 87,5%, соответственно.

Таким образом, “*Candidatus R. uralica*”, “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*” на основании существующих критериев можно отнести к новым кандидатным видам. Дендрограммы, построенные на основе объединенных последовательностей гена *gltA* и генов поверхностных белков, демонстрируют, что эти кандидатные виды относятся к группе КПЛ (Рис 3).

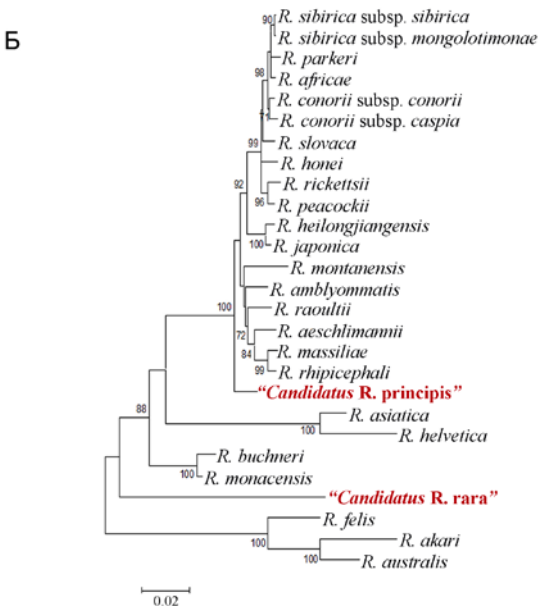
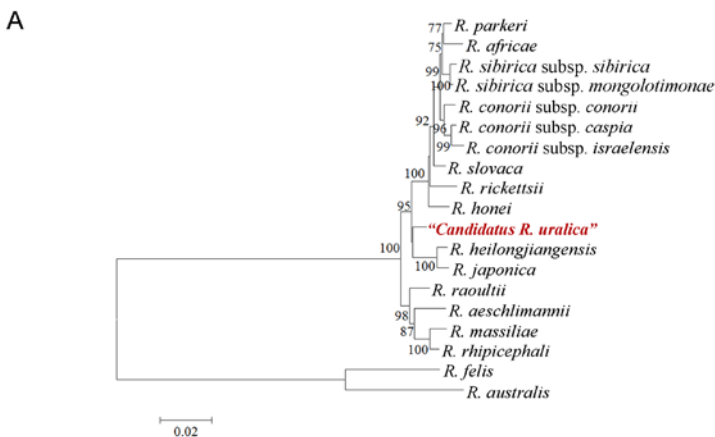


Рисунок 3 Дендрограмма, построенная методом ML на основе объединенных последовательностей фрагментов генов риккетсий из группы КПЛ: **А** – *gltA-ompA-ompB-sca4* (4151 п.н.); **Б** – *gltA-ompB-sca4* (2262 п.н.). Показано филогенетическое положение “*Candidatus R. uralica*”, “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*”.

5. Выявление ДНК риккетсий в образцах пациентов

На наличие ДНК риккетсий были исследованы клинические образцы от 604 пациентов, госпитализированных в городскую инфекционную клиническую больницу №1 г. Новосибирска (ГИКБ №1) в 2016 и 2017 гг. На

основании клинических проявлений, включающих розеолезно-папулезную сыпь, наличие первичного аффекта и высокую температуру, диагноз клещевой риккетсиоз был поставлен 26 из 604 (4,3%) пациентов. Среди них 16 пациентов отмечали присасывание клеща в Новосибирской области и 10 пациентов – в Алтайском крае и Республике Алтай.

ДНК риккетсий была выявлена в образцах 37 (6,1%) из 604 пациентов. 34 из этих 37 пациентов отмечали присасывание клещей в Новосибирской области и три пациента – в Алтайском крае. При этом диагноз клещевой риккетсиоз на основании клинических признаков был поставлен только 15 из 37 пациентов, в образцах которых была выявлена ДНК *Rickettsia* spp.

ДНК *R. sibirica* subsp. *sibirica* была выявлена в образцах 14 пациентов (13 образцов крови, 1 ликвор и 1 биоптат), ДНК *R. raoultii* – в образцах 15 пациентов (10 образцов крови, 5 ликворов и 1 биоптат). В образцах трех пациентов (два образца крови, один биоптат) была выявлена ДНК других видов риккетсий: “*Candidatus R. tarasevichiae*” (биоптат), *R. slovacica*, *R. aeschlimannii*. Кроме того, в образцах крови пяти пациентов была обнаружена ДНК новых генетических вариантов риккетсий из группы КПЛ.

6. Генотипирование риккетсий, выявленных в клинических образцах пациентов

Определенные нуклеотидные последовательности фрагментов гена *gltA* в клинических образцах 14 пациентов соответствовали последовательности *R. sibirica* (GenBank U59734). Для части образцов были определены последовательности генов 16S рРНК, *ompA* и *ompB*. Полученные последовательности были идентичны известным последовательностям *R. sibirica* subsp. *sibirica* (AABW01000001). Последовательности фрагментов гена *gltA* в образцах от двух пациентов были идентичны последовательности *R. raoultii* DnS14 (AF120028); от пяти пациентов – были идентичны последовательности *R. raoultii* RpA4 (DQ365803), а последовательности от восьми пациентов отличались между собой и от известных последовательностей *R. raoultii* 1-4 заменами. Ни для одного из клинических образцов *R. raoultii* не были амплифицированы фрагменты генов 16S рРНК, *ompA* и *ompB*, вероятно из-за малого количества ДНК риккетсий в образцах.

Последовательности фрагментов генов *gltA* и *ompB* “*Candidatus R. tarasevichiae*” были идентичны известной последовательности *gltA* гена (DQ168983) и определенным нами последовательностям гена *ompB* “*Candidatus R. tarasevichiae*”, выявленных в клещах. Последовательности фрагментов гена *gltA* для образцов *R. slovacica* и *R. aeschlimannii* были идентичны известным последовательностям (CP002428 и DQ235776, соответственно). Последовательности фрагментов гена *gltA* риккетсий для образцов от пяти пациентов отличались несколькими заменами от последовательностей *R. slovacica*, *R. aeschlimannii* и *R. sibirica* (Рис. 4).

7. Клинические проявления у пациентов, в клинических образцах которых была выявлена ДНК риккетсий.

Данные о клинических проявлениях у пациентов были любезно предоставлены сотрудниками ГИКБ №1 г. Новосибирска.

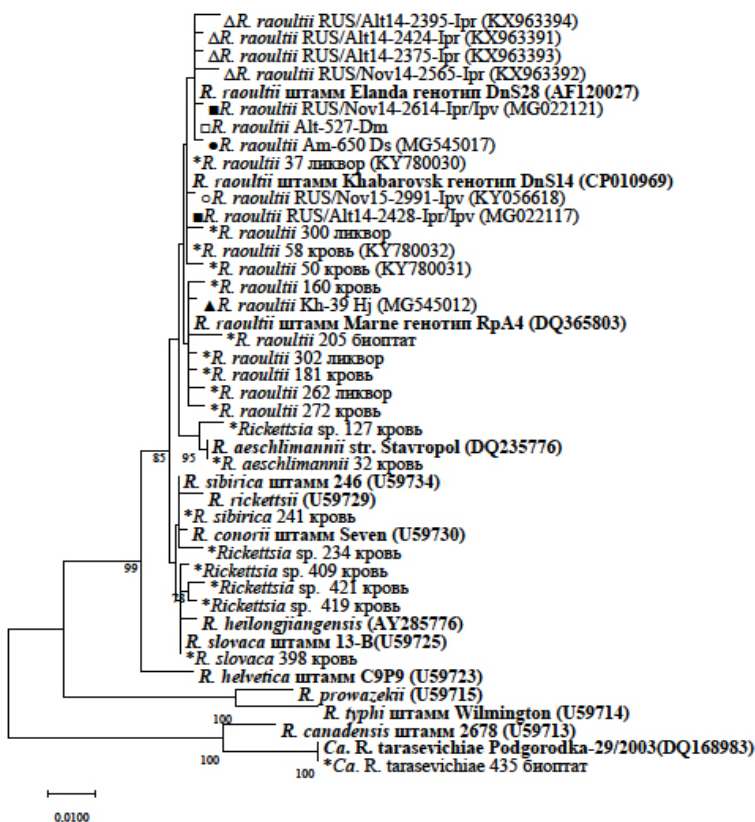


Рисунок 4 Дендрограмма, построенная методом ML на основе последовательностей фрагмента гена *gltA* (589 п.н.) *Rickettsia* spp. из образцов пациентов и из клещей. Полученные в данной работе последовательности отмечены: * клинические образцы пациентов; Δ *I. persulcatus*; \circ *I. pavlovskiyi*; \blacksquare гибриды *I. persulcatus*/*I. pavlovskiyi*; \bullet *D. silvarum*; \square *D. marginatus*; \blacktriangle *H. japonica*.

У всех 37 пациентов, в клинических образцах которых обнаружена ДНК риккетсий, наблюдалось повышение температуры. У большинства пациентов с СКТ (*R. sibirica*) отмечалась сыпь (у 10 из 14), при этом у 9 пациентов одновременно с сыпью выявлялся первичный аффект на месте укуса. У одного пациента наблюдался первичный аффект без сыпи. У девяти пациентов отмечено повышение уровня трансаминаз АЛТ и АСТ разной степени выраженности.

У большинства пациентов, в клинических образцах которых выявлена ДНК других видов и геновариантов риккетсий, не наблюдалась типичная для клещевых риккетсиозов симптоматика. Сыпь выявлялась лишь у двух, а первичный аффект у трех пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы была разработана лабораторная версия методики для выявления риккетсий и идентификации наиболее распространенных в клещах видов *Rickettsia* spp. Данная методика, основанная на проведении двухраундовой ПЦР с родо- и видоспецифичными праймерами, позволяет выявлять разные виды риккетсий, в том числе в случаях смешанного инфицирования. Было проанализировано около 4000 клещей родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis*, собранных на территории Западной Сибири и Дальнего Востока, а также клинические образцы от 604 пациентов из Западной Сибири на наличие ДНК *Rickettsia* spp.

Была показана взаимосвязь между определенными видами риккетсий и клещей. Так, клещи *I. persulcatus* в большинстве исследованных регионов наиболее часто инфицированы “*Candidatus R. tarasevichiae*” (61,7-87,0%), а на острове Сахалин – *R. helvetica* (63,5%). Предполагается, что это различие связано с географической изоляцией острова. Кроме того, в клещах *I. persulcatus* была выявлена ДНК *R. raoultii*, *R. heilongjiangensis*, *R. sibirica* и новых геновариантов *Rickettsia* spp.

Исследование клещей *Ixodes* spp., обитающих в области симпатрии клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy* на территории Западной Сибири, показало, что в *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy* и их межвидовых гибридах выявляются одни и те же виды риккетсий, но различается уровень инфицированности этих клещей. “*Candidatus R. tarasevichiae*” значительно чаще выявлялись в *I. persulcatus* (61,7-87,0%) по сравнению с *I. pavlovskiy* (0,8-2,0%), а *R. helvetica* чаще выявлялись в *I. pavlovskiy* (2,2-8,1%) чем в *I. persulcatus* (0-0,7%). Эти различия были статистически значимыми. Уровень инфицированности межвидовых гибридов “*Candidatus R. tarasevichiae*” (24,5-44,8%) был промежуточным по сравнению с родительскими видами; наблюдаемые различия также являлись статистически значимыми.

Впервые на наличие риккетсий были исследованы клещи *I. trianguliceps* и *I. apronophorus*. В клещах *I. trianguliceps* была обнаружена ДНК новых риккетсий, которые на основании молекулярно-генетического анализа были отнесены к новому кандидатному виду, названному “*Candidatus R. uralica*”. Кроме того, в *I. trianguliceps* была обнаружена ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica*. Интересно, что новый кандидатный вид выявлялся в клещах *I. trianguliceps* гораздо чаще, чем другие виды риккетсий. Клещи *I. apronophorus* чаще всего были инфицированы *R. helvetica*, в одном клеще была также обнаружена ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Следует отметить, что в клещах *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* были выявлены два новых генетических варианта *R. helvetica*, отличающиеся от геноварианта, обнаруженного в клещах *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy* и их гибридах на территории Западной Сибири и Дальнего Востока.

Было показано, что клещи рода *Dermacentor* (*D. silvarum*, *D. reticulatus* и *D. marginatus*) преимущественно инфицированы *R. raoultii* (уровень инфицированности 45-93%). В *D. marginatus* был также выявлен возбудитель

СКТ (*R. sibirica*), а в единичных клещах *D. silvarum* и *D. marginatus* - "*Candidatus R. tarasevichiae*".

Уровень инфицированности клещей *Haemaphysalis* spp. был относительно низким (12-23%), однако видовое разнообразие риккетсий в клещах данного рода было наиболее высоким. В клещах *H. concinna* чаще всего выявлялась *R. heilongjiangensis*, реже выявлялись *R. raoultii*, "*Candidatus R. tarasevichiae*", *R. sibirica*, *R. aeschlimannii*, "*Candidatus R. principis*" и "*Candidatus R. rara*". В клещах *H. japonica* выявлялись *R. heilongjiangensis*, *R. raoultii*, "*Candidatus R. tarasevichiae*", *R. aeschlimannii*, *R. canadensis*, "*Candidatus R. principis*" и "*Candidatus R. rara*". Следует отметить, что "*Candidatus R. principis*" и "*Candidatus R. rara*" в данной работе впервые были охарактеризованы по генам поверхностных белков и 16S рРНК. Анализ полученных последовательностей подтвердил принадлежность этих риккетсий к новым кандидатным видам. Важно подчеркнуть, что в данной работе описаны первые случаи обнаружения *R. aeschlimannii* в клещах *H. concinna* и *H. japonica*. Кроме того, впервые на территории России в клещах была выявлена *R. canadensis*. Это может свидетельствовать о расширении ареала данных видов риккетсий.

Официально на территории Западной Сибири из клещевых риккетсиозов регистрируется только СКТ. Выявление в клещах других патогенных риккетсий: *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. raoultii* и "*Candidatus R. tarasevichiae*", свидетельствует о потенциальной опасности инфицирования людей этими инфекционными агентами. При анализе клинических образцов была выявлена ДНК не только *R. sibirica*, но и *R. raoultii*, "*Candidatus R. tarasevichiae*", *R. aeschlimannii*, *R. slovaca* и новых генетических вариантов *Rickettsia* spp., не относящихся к известным видам. У большинства пациентов, в образцах которых была выявлена ДНК *R. sibirica*, наблюдались типичные для СКТ признаки. Однако у нескольких пациентов, инфицированных *R. sibirica*, и у большинства пациентов, в клинических образцах которых обнаружена ДНК других видов риккетсий, отсутствовали такие характерные для СКТ проявления, как сыпь и первичный аффект; у ряда пациентов наблюдалась нетипичная симптоматика (эритематозная реакция, сыпь вокруг места укуса клеща, менингеальные проявления).

Значительное число исследованных в данной работе клещей было инфицировано несколькими видами риккетсий, что свидетельствует о возможности одновременного инфицирования людей несколькими риккетсиальными агентами. Разработанная в данной работе лабораторная методика может быть использована для диагностики риккетсиозов, в том числе в случаях клещевых риккетсиозов, протекающих без характерной симптоматики, и в случаях микст-инфекций разными *Rickettsia* spp.

ВЫВОДЫ

1. Разработан лабораторный вариант методики, позволяющий выявлять ДНК *Rickettsia* spp., а также идентифицировать различные виды риккетсий, включая случаи смешанного инфицирования.

2. В клещах родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis* с пастбищно-подстерегающим типом паразитизма, собранных на территории Западной Сибири и Дальнего Востока, была выявлена ДНК риккетсий: *R. sibirica*, *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. aeschlimanii*, *R. canadensis*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*”. Показано, что:

а) в клещах рода *Dermacentor* (*D. reticulatus*, *D. marginatus* и *D. silvarum*) на всех исследованных участках Западной Сибири и Дальнего Востока превалирует вид *R. raoultii* (45,0-93,3%);

б) в клещах *Ixodes persulcatus* в большинстве исследованных регионов преобладает “*Candidatus R. tarasevichiae*” (66,7-89,5%), а на острове Сахалин – *R. helvetica* (63,5%);

в) на территории Дальнего Востока в клещах *Haemaphysalis concinna* преимущественно выявляются *R. heilongjiangensis* (10,5%) и “*Candidatus R. rara*” (3,0%), а в клещах *Haemaphysalis japonica* – “*Candidatus R. principis*” (5,6%).

г) впервые на территории России выявлена *R. canadensis*.

3. В областях симпатрии клещей *I. persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi* в Новосибирской области и Республике Алтай ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” достоверно чаще ($p < 0,001$) выявлялась в клещах *I. persulcatus*, чем в *I. pavlovskyi* (75,7% и 1,7%, соответственно), тогда как ДНК *R. helvetica* достоверно чаще ($p < 0,01$) выявлялась в клещах *I. pavlovskyi*, чем в *I. persulcatus* (3,5% и 0,3%, соответственно); в межвидовых гибридах встречаемость “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica* была промежуточной по сравнению с родительскими видами (28,5% и 1,4%, соответственно).

4. Впервые в клещах *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* с гнездово-норным типом паразитизма, собранных в Омской области, выявлена ДНК риккетсий:

а) в клещах *I. trianguliceps* обнаружена ДНК потенциально нового вида “*Candidatus R. uralica*” (41,5%), а также ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” (12,2%) и *R. helvetica* (4,9%).

б) В клещах *I. apronophorus* выявлена ДНК *R. helvetica* (80,0%) и “*Candidatus R. tarasevichiae*” (6,7%).

5. В клинических образцах от 37 пациентов, госпитализированных в г. Новосибирске с признаками заболеваний, переносимых клещами, была обнаружена ДНК риккетсий:

а) ДНК возбудителя сибирского клещевого тифа (*R. sibirica* subsp. *sibirica*) выявлена в образцах 14 пациентов;

б) впервые на территории Российской Федерации в клинических образцах пациентов выявлена ДНК *R. raoultii* (n=15), “*Candidatus R. tarasevichiae*” (n=1), *R. slovacica* (n=1), *R. aeschlimanii* (n=1) и новых геновариантов *Rickettsia* spp. (n=5); у большинства из этих пациентов (20/23) не наблюдалась характерная для клещевых риккетсиозов симптоматика.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. Пуховская Н.М., Рар В.А., Иванов Л.И., Высочина Н.П., **Иголкина Я.П.**, Фоменко Н.В., Зарайченкова Н.В., Плашкова В.В., Орешкина С.Г., Мальцева И.П., Чистов В.А., Чечикова В.А. Выявление методом ПЦР возбудителей природно-очаговых инфекций, переносимых клещами, на полуострове Камчатка. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – №4. – С. 36-39.
2. **Igolkina Y.P.**, Rar V.A., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Tikunov A.Y., Epikhina T.I., Tikunova N.V. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia: Identification of a new *Candidatus* Rickettsia species. // Infect. Genet. Evol. – 2015. – V.34. – P. 88-93.
3. **Igolkina Y.**, Bondarenko E., Rar V., Epikhina T., Vysochina N., Pukhovskaya N., Tikunov A., Ivanov L., Golovljova I., Ivanov M., Tikunova N. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus* ticks from continental and island areas of the Russian Far East. // Ticks Tick Borne Dis. – 2016. – V.7(6). – P. 1284-1289.
4. Rar V., Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Y., **Igolkina Y.**, Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I., Tikunova N. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia. // Parasit. Vectors. – 2017. – V.10(1). – P. 258.
5. **Igolkina Y.**, Krasnova E., Rar V., Savelieva M., Epikhina T., Tikunov A., Khokhlova N., Provorova V., Tikunova N. Detection of causative agents of tick-borne rickettsioses in Western Siberia, Russia: identification of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia sibirica* DNA in clinical samples. // Clin. Microbiol. Infect. – 2018. – V.24(2). – P. 199.e9-199.e12.
6. **Igolkina Y.**, Rar V., Vysochina N., Ivanov L., Tikunov A., Pukhovskaya N., Epikhina T., Golovljova I., Tikunova N. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Dermacentor* and *Haemaphysalis* ticks from the Russian Far East. // Ticks Tick Borne Dis. – 2018. – V.9(6). – P. 1594-1603.