

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

*на правах рукописи*

**Иголкина Яна Петровна**

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

**03.01.03 – молекулярная биология**

**Диссертация  
На соискание учёной степени  
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель  
к.б.н. Рар Вера Александровна**

**Новосибирск - 2019**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>12</b>
1.1. История изучения риккетсиозов .....	12
1.2. Морфология риккетсий .....	13
1.3. Классификация риккетсий .....	15
1.4. Организация генома риккетсий .....	18
1.5. Взаимодействие риккетсий с клетками хозяина .....	21
1.6. Иммуитет при риккетсиозах .....	25
1.7. Характеристика риккетсий и вызываемых ими риккетсиозов .....	27
1.7.1. Риккетсии и риккетсиозы группы сыпного тифа .....	27
1.7.2. Риккетсии, переносимые клещами .....	28
1.7.3. Клещи, как переносчики риккетсий .....	35
1.7.4. Роль позвоночных в поддержании очагов клещевых риккетсиозов .....	37
1.7.5. Характеристика распространенных на территории РФ риккетсий, переносимых клещами .....	39
1.7.6. Клещевые риккетсиозы на территории РФ .....	45
1.7.7. Клинические проявления риккетсиозов .....	46
1.7.8. Методы диагностики риккетсиозов .....	49
1.8. Заключение .....	51
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>53</b>
2.1. Материалы .....	53
2.2. Буферы и основные растворы .....	53
2.3. Медико-биологические образцы .....	53
2.3.1. Иксодовые клещи .....	53
2.3.2. Клинические образцы пациентов .....	60
2.4. Выделение ДНК .....	61
2.4.1. Выделение ДНК из иксодовых клещей .....	61
2.4.2. Выделение ДНК из клинических образцов пациентов (крови, ликвора и биоптатов) .....	61
2.5. Выявление ДНК <i>Rickettsia</i> spp. методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)	

.....	62
2.5.1. Синтетические олигонуклеотиды .....	62
2.5.2. Постановка ПЦР .....	62
2.5.3. Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР.....	66
2.5.4. Определения нуклеотидных последовательностей .....	66
2.5.5. Анализ нуклеотидных последовательностей .....	68
2.6. Проведение серологического анализа (ELISA).....	69
2.7. Проведение статистического анализа.....	69
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	70
3.1. Выбор праймеров для родо- и видоспецифичной ПЦР.....	70
3.2. Выявление ДНК риккетсий в клещах .....	70
3.2.1. Выявление ДНК риккетсий в иксодовых клещах, собранных на Дальнем Востоке .....	71
3.2.1.1. Хабаровский край.....	71
3.2.1.2. Амурская область .....	72
3.2.1.3. Камчатский край .....	72
3.2.1.4. Сахалинская область .....	74
3.2.2. Выявление ДНК риккетсий в клещах, собранных на флаг в Западной Сибири.....	74
3.2.2.1. Новосибирская область .....	74
3.2.2.2. Республика Алтай .....	75
3.2.2.3. Омская область .....	78
3.2.3. Выявление ДНК риккетсий в клещах, снятых с мелких млекопитающих в Омской области .....	78
3.3. Генетическая характеристика выявленных в клещах риккетсий.....	79
3.4. Филогенетический анализ кандидатных видов .....	88
3.5. Выявление ДНК риккетсий в образцах пациентов .....	93
3.6. Генотипирование риккетсий, выявленных в клинических образцах пациентов .....	93
3.7. Клинические проявления у пациентов, в клинических образцах которых была выявлена ДНК риккетсий .....	97
3.8. Анализ парных сывороток пациентов на наличие антител к риккетсиям	

методом ELISA .....	98
<b>4. ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>100</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>109</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>112</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>114</b>

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АПЛ – астраханская пятнистая лихорадка

АСТ – аспартатаминотрансфераза

95% ДИ (ДИ) – 95% доверительный интервал

ИДО – индоламин-2,3-диоксигеназой

ИФА – иммуноферментный анализ

КПЛ – клещевая пятнистая лихорадка

ЛПС – липополисахарид

п. н. – пар нуклеотиднов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомальная РНК

РНИФ – реакция непрямой иммунофлуоресценции

РСК – реакцию связывания комплемента

СКТ – сибирский клещевой тиф

СТ – сыпной тиф

Трис – трис-(гидроксиметил)-аминометан

ЭДТА – этилендиамин N,N,N',N'-тетрауксусная кислота

dNTP – дезоксинуклеозид 5'-трифосфат

IgM – иммуноглобулины класса M

IgG – иммуноглобулины класса G

*gltA* – цитратсинтаза

Omp – outer membrane protein (поверхностный белок)

SENLAT/TIBOLA/DEBONEL – scalp eschar and neck lymph adenopathy after a tick bite/  
tick-borne lymphadenopathy/ Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy

Sca – surface cell antigen (поверхностный клеточный антиген)

*Taq* ДНК-полимераза – ДНК-полимераза, выделенная из *Thermus aquaticus*

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

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 пока 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, к которым относятся: высокая температура, макуло-папулезная сыпь, первичный аффект на месте укуса и регионарный лимфаденит. Ни молекулярно-генетические, ни иммунологические методы в клинической практике, как правило, не используются. Более того, в Российской Федерации в настоящее время отсутствуют отечественные лицензированные тест-системы для выявления антител риккетсий в сыворотках пациентов. 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.

### **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 pavlovskyi* 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. pavlovskyi* и межвидовых гибридах *I. persulcatus/I. pavlovskyi* на территории Новосибирской области и республики Алтай в областях симпатрии клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*. 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. pavlovskyi*. Уровень инфицированности межвидовых гибридов *I. persulcatus/I. pavlovskyi* 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 slovacca*, *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 отсеквенированы ~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. pavlovskyi* 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 конференциях: Научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные аспекты природной очаговости болезней», Омск, 12-13 ноября 2014 г.; 14th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-borne Diseases, ICLB2015, Вена, Австрия, 27-30 сентября 2015 г.; Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» Новосибирск, 26-27 сентября 2016 г.; Научно-практическая конференция с международным участием, «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека», посвященная 95-летию ФБУН «Омского НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. Омск, 15-16 ноября 2016 г.; International Symposium on Tick-Borne Pathogens and Disease ITPD 2017 Вена, Австрия, 24-26 сентября 2017 г.; IV Национальный конгресс бактериологов и Международный симпозиум «Микроорганизмы и биосфера» «Microbios-2018» г. Омск, 12-13 сентября 2018 г.; Третья байкальская международная научная конференция по природно-очаговым трансмиссивным инфекциям, посвященная 100-летию образования Иркутского Государственного Медицинского Университета. г. Иркутск 27-29 сентября 2018 г.

### **Публикации по теме диссертации**

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. Было депонировано 159 нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank.

### **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.

### **Личный вклад автора**

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

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. История изучения риккетсиозов

В конце 19 века в США (в Скалистых горах штата Монтана) стали выявлять неизвестное ранее заболевание. У больных регистрировалась высокая температура, сыпь и след от укуса клеща; многие из заболевших погибли [Тарасевич, 2005]. Первые попытки найти причину заболевания не дали результатов. Между 1906 и 1910 годами Говард Риккетс (Howard Taylor Ricketts) в серии блестящих исследований установил, что заражение людей происходит в результате присасывания иксодовых клещей, обнаружил в крови больных людей мелкие микроорганизмы, а также продемонстрировал возможность экспериментального воспроизведения инфекции у морских свинок и обезьян при заражении их кровью больных. Заболевание было названо пятнистая лихорадка Скалистых гор. Позднее Риккетс установил, что возбудитель пятнистой лихорадки Скалистых гор схож с микроорганизмами, выявляющимися в фекалиях вшей и в крови больных с сыпным тифом. К сожалению, в результате заражения сыпным тифом Риккетс умер. В его честь, по предложению бразильского ученого Энрике да Роша Лимы (Henrique da Rocha Lima), открытый им возбудитель пятнистой лихорадки Скалистых гор получил название *Rickettsia rickettsii* [Тарасевич, 2005; Quintal, 1996]. Со временем название «риккетсии» было распространено на целую группу сходных микроорганизмов, среди которых были возбудители как клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ), так и сыпнотифозных (СТ) лихорадок.

Роль вшей в передаче инфекции при сыпном тифе впервые установил в 1908 г. Николай Федорович Гамалея, а в 1909 г. экспериментально этот факт был подтвержден в опытах Charles Nicolle [Лобан, 2002]. В 1913 г. чешский микробиолог Станислав Провачек (Stanislaus von Prowazek), работавший вместе с Роша Лимой, обнаружил в организме и фекалиях вшей микроорганизмы и идентифицировал их как возбудителей сыпного тифа. В честь Провачека, который, так же как и Риккетс, погиб от сыпного тифа, Роша Лима предложил видовое название для возбудителя сыпного тифа — *Rickettsia prowazekii*.

Постепенно авторами из разных стран было описано множество других видов патогенных риккетсий и вызываемых ими риккетсиозов: средиземноморская пятнистая лихорадка (возбудитель *Rickettsia conorii* subsp. *conorii*) в Европе,

японская пятнистая лихорадка (*Rickettsia japonica*) в Японии, квинслендский клещевой тиф (*Rickettsia australis*) в Австралии, африканская пятнистая лихорадка (*Rickettsia africae*) в Африке, сибирский клещевой тиф (*Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica*) в России и др. [Parola, 2013].

В России первые случаи клещевого риккетсиоза были выявлены в 1934-1935 гг. на Дальнем Востоке военным врачом Е. И. Миллем. В 1936 г. Милль описал заболевание под названием «клещевая лихорадка Приморья». В 1936-1937 гг. Н. И. Антоновым и А. Г. Найштатом болезнь была описана под названием «дальневосточная сыпная клещевая лихорадка». Подобного рода болезнь, начиная с 1935 г., была отмечена и в Красноярском крае [Рудаков и Оберт, 2011]. В 1938-1940 гг. экспедиции научных работников (под руководством М. К. Кронтовской, Е. Н. Павловского и О. С. Коршуновой), изучая подобные заболевания в Красноярском и Хабаровском краях, установили их риккетсиозную этиологию. В 1938 г. возбудитель был выделен из крови больных и описан как новый вид *Dermacentor oxenus sibirica* (позднее *Rickettsia sibirica*), а заболевание получило название клещевой сыпной тиф Северной Азии (сибирский клещевой тиф) [Здродовский и Голиневич, 1956; Лобан, 2002]. Исследования Е. М. Голиневич при идентификации алтайского и красноярского штаммов возбудителя в 1948 г. установили его принадлежность к группе пятнистых лихорадок в связи с внутридермальным паразитированием.

Со временем на территории бывшего СССР были описаны и другие клещевые риккетсиозы: в Крыму – марсельская (средиземноморская) лихорадка (возбудитель *R. conorii* subsp. *conorii*), в Астраханской области – астраханская пятнистая лихорадка (возбудитель *R. conorii* subsp. *caspia*) на Дальнем Востоке – дальневосточный клещевой риккетсиоз (возбудитель *Rickettsia heilongjiangensis*). [Еремеева и др., 2014; Медяников и др., 2004; Тарасевич, 2005, 2017].

В настоящее время учение о риккетсиях и риккетсиозах систематизировано благодаря работам многих отечественных и зарубежных ученых.

## 1.2. Морфология риккетсий

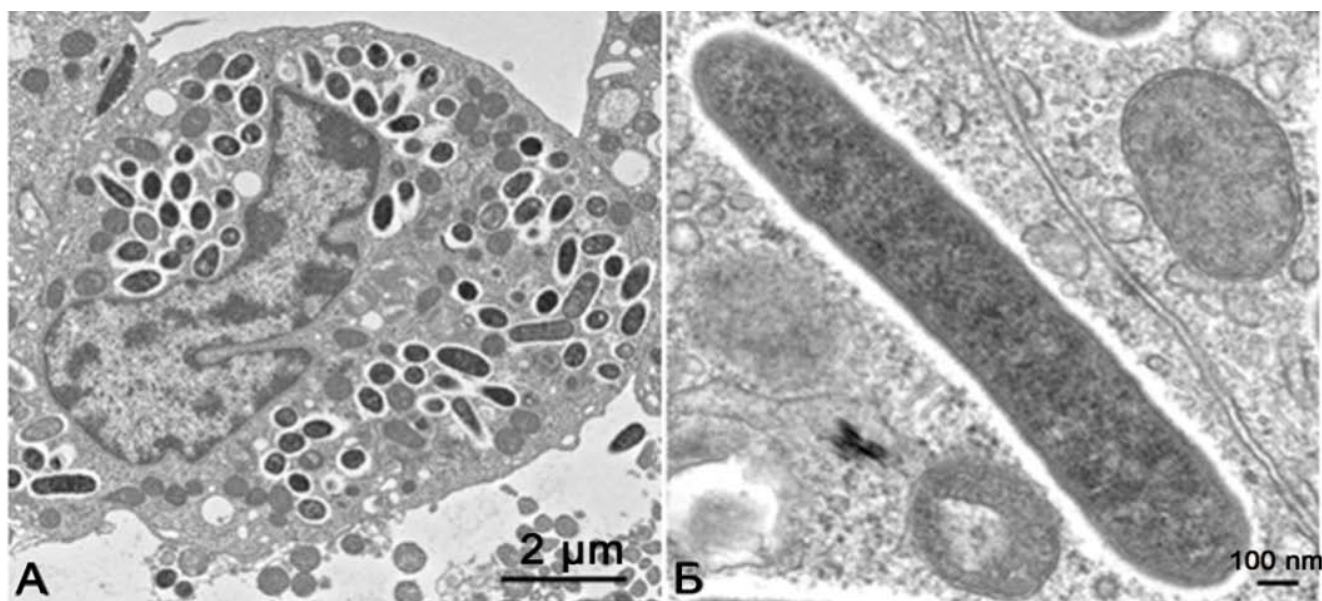
Риккетсии – грамотрицательные бактерии кокковидной, палочковидной и нитевидной формы (Рис. 1-1). Плеоморфизм риккетсий зависит от фазы инфекционного процесса и его интенсивности. Например, кокковидные и

палочковидные формы характерны для интенсивного риккетсиоза и наблюдаются в период максимального размножения возбудителя. Бациллярные и нитевидные формы риккетсий встречаются на ранних стадиях развития возбудителя, а также при скудном росте риккетсий [Здоровский и Голиневич, 1956; Лобан и др., 2002; Паутов и Игумнов, 1968]. Риккетсии - самые мелкие бактерии; их размер 0,3-0,6x0,8-2,0 мкм [Рудаков, 2016; Тарасевич, 2005]. Они окрашиваются основным фуксином по методу D.F. Gimenez и карболовым фуксином в модификации окраски по П. Ф. Здоровскому [Рудаков, 2016].

Риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами и могут размножаться только в клетках живых организмов (риккетсии группы СТ в цитоплазме, а риккетсии группы КПЛ в цитоплазме и в ядре), они не способны расти на питательных средах. Риккетсий культивируют в желточных мешках куриных эмбрионов, в культурах эукариотических клеток, а также в организме восприимчивых животных и в членистоногих.

Риккетсии - медленно растущие микроорганизмы; время их генерации составляет не менее 8-9 часов. Размножаются они путем бинарного деления. По типу дыхания риккетсии относятся к аэробам. Окисление осуществляется по циклу Кребса. Жизненный цикл риккетсий состоит из двух стадий: вегетативной (риккетсии активно размножаются) и покоящейся (имеют дополнительную оболочку) [Рудаков, 2016].

Риккетсии малоустойчивы к нагреванию. При температуре 50-56°C они погибают через 10-30 мин, а кипячение убивает их мгновенно. Они инактивируются различными дезинфицирующими средствами (раствор формалина, раствор фенола) и под действием органических растворителей (спирт, эфир, хлороформ). Длительное пребывание риккетсий в физиологическом растворе и дистиллированной воде ведет к потере ими жизнеспособности. Наиболее длительно риккетсии сохраняются в высушенном состоянии и при низких температурах [Лобан и др., 2002; Рудаков, 2016].

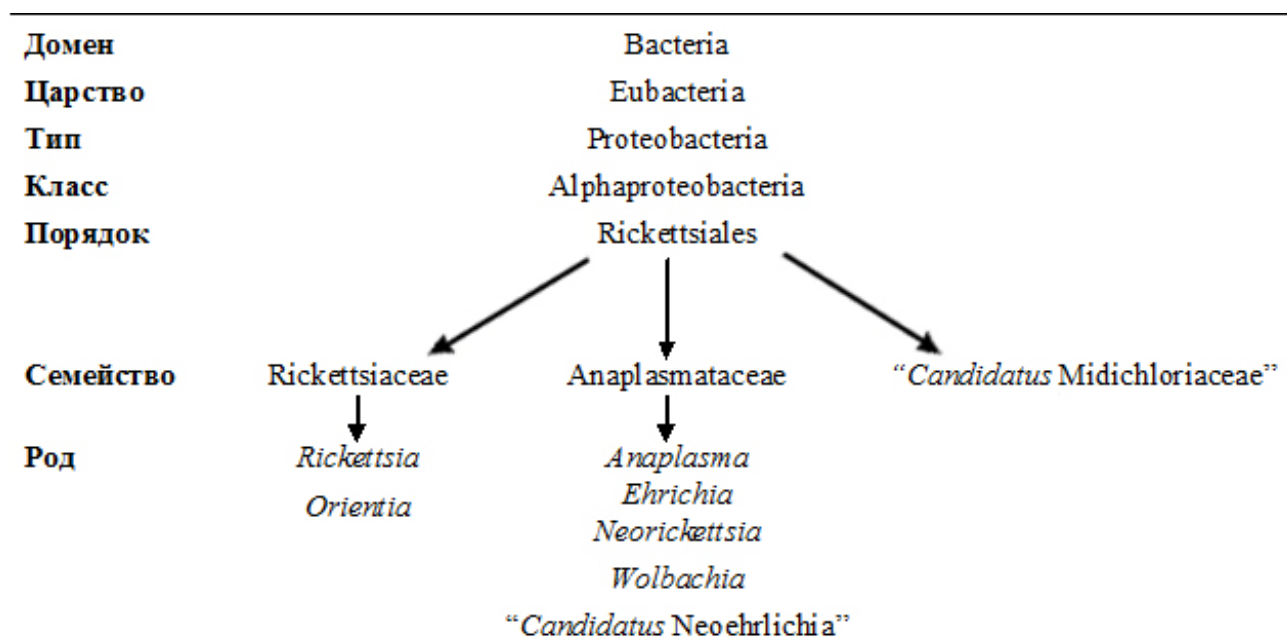


**Рисунок 1-1.** *Rickettsia parkeri* в клеточной культуре Vero E6. А. Многочисленные риккетсии в цитоплазме инфицированной клетки. Б. Бацилярная форма риккетсий. Источник: <http://aem.asm.org/content/76/9/2689/F1>.

### 1.3. Классификация риккетсий

Существующая классификация представителей порядка Rickettsiales является дискуссионной и в нее периодически вносятся изменения по мере получения новых данных.

Изначально таксономическая классификация представителей порядка Rickettsiales основывалась на фенотипических характеристиках. Однако развитие молекулярных методов, в частности, филогенетического анализа на основе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, привело к реклассификации порядка. В настоящее время порядок Rickettsiales включает в себя три семейства: Rickettsiaceae, Anaplasmataceae и Candidatus Midichloriaceae [Ferla, et al., 2013; Martijn et al., 2015, Szokoli et al., 2016]. Семейство Rickettsiaceae включает рода *Rickettsia* и *Orientia* (Рис. 1-2).



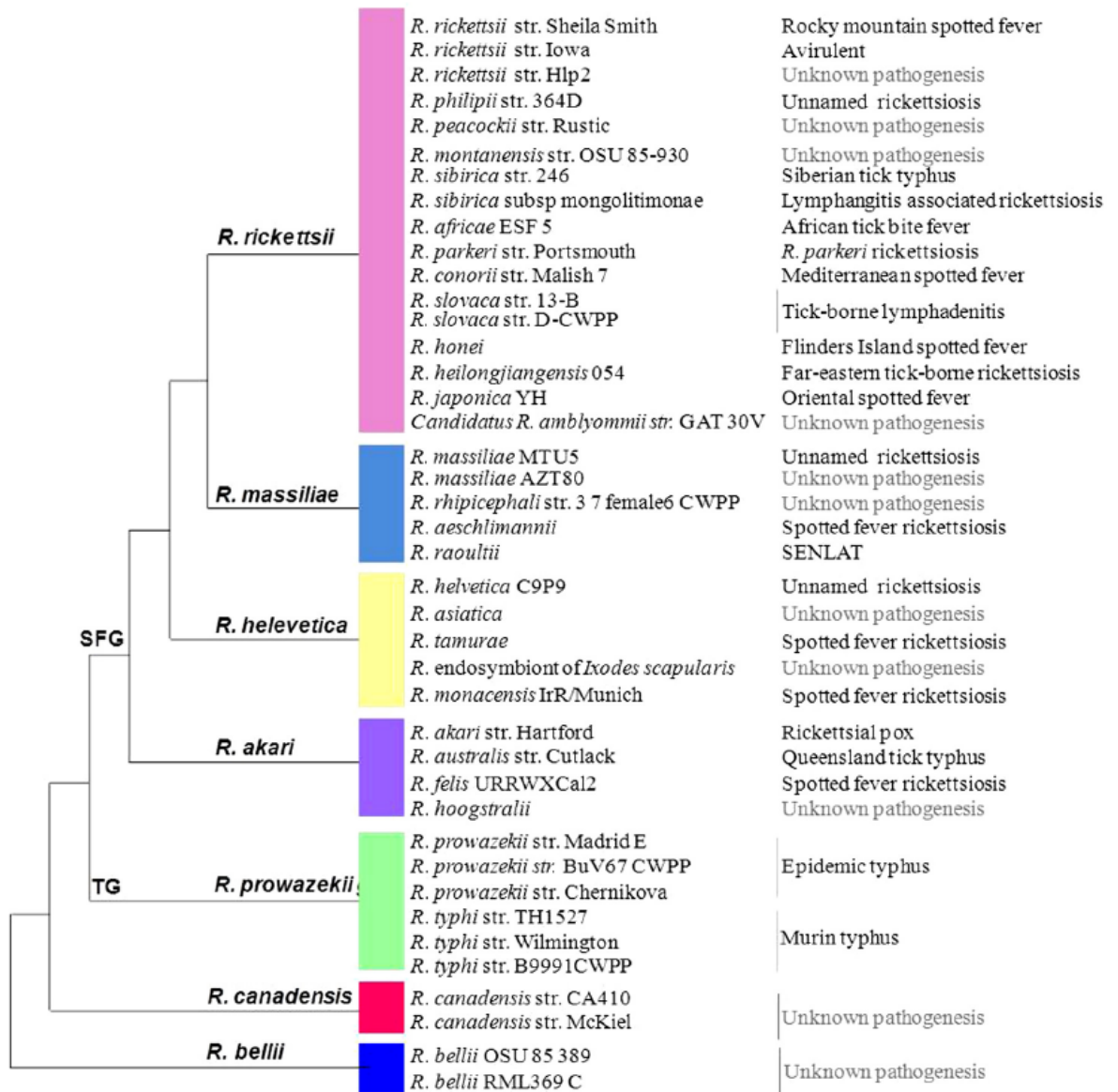
**Рисунок 1-2.** Таксономическое положение риккетсий.

Существует две альтернативные классификации рода *Rickettsia*. Согласно классификации, предложенной Merhej, в роду выделяют группу сыпного тифа (СТ), группу клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ), группу *Rickettsia canadensis* и группу *Rickettsia bellii* [Merhej et al., 2010, 2014]. В группе КПЛ Merhej выделяет подгруппы *R. rickettsii*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia helvetica* и *Rickettsia akari*. Эта классификация основана на филогенетическом анализе последовательностей генов поверхностных белков и цитратсинтазы большинства известных риккетсий (Рис. 1-3). В настоящей работе мы придерживаемся данной классификации.

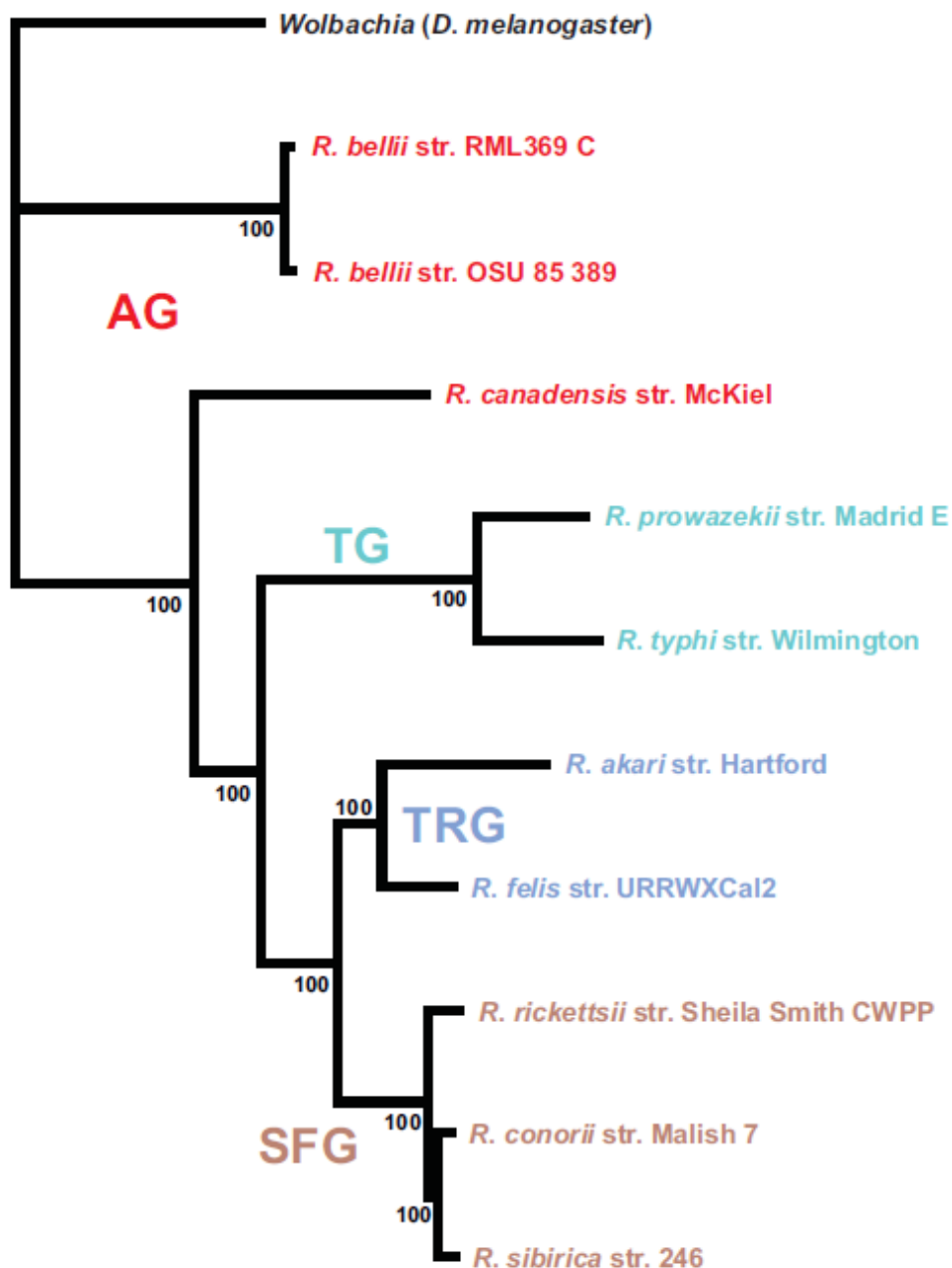
По классификации, предложенной Gillespie, представителей рода *Rickettsia* следует делить на группы СТ, КПЛ, предковую группу (*R. bellii*, *R. canadensis*) и переходную группу (*R. akari*, *R. australis* и *Rickettsia felis*) [Gillespie et al., 2008]. Эта классификация основана на анализе последовательностей генов 731 белка для 10 видов риккетсий (Рис. 1-4).

Кроме риккетсий из обозначенных групп, существует множество неклассифицированных риккетсий, которые выявляются как среди питающихся кровью, так и среди некровососущих членистоногих и являются их эндосимбионтами.





**Рисунок 1-3.** Схематическое изображение филогенетического положения риккетсий, основанное на анализе последовательностей генов поверхностных белков и цитратсинтазы большинства известных видов риккетсий [Merhej et al., 2014]. SFG – spotted fever group (группа КПЛ), TG – typhus group (группа СТ).



**Рисунок 1-4.** Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения объединенных последовательностей генов 731 белка для 10 видов риккетсий [Gillespie, 2008]. SFG – spotted fever group (группа КПЛ), TG – typhus group (группа СТ), AG – ancestral group (предковая группа), TRG – transitional group (переходная группа).

#### 1.4. Организация генома риккетсий

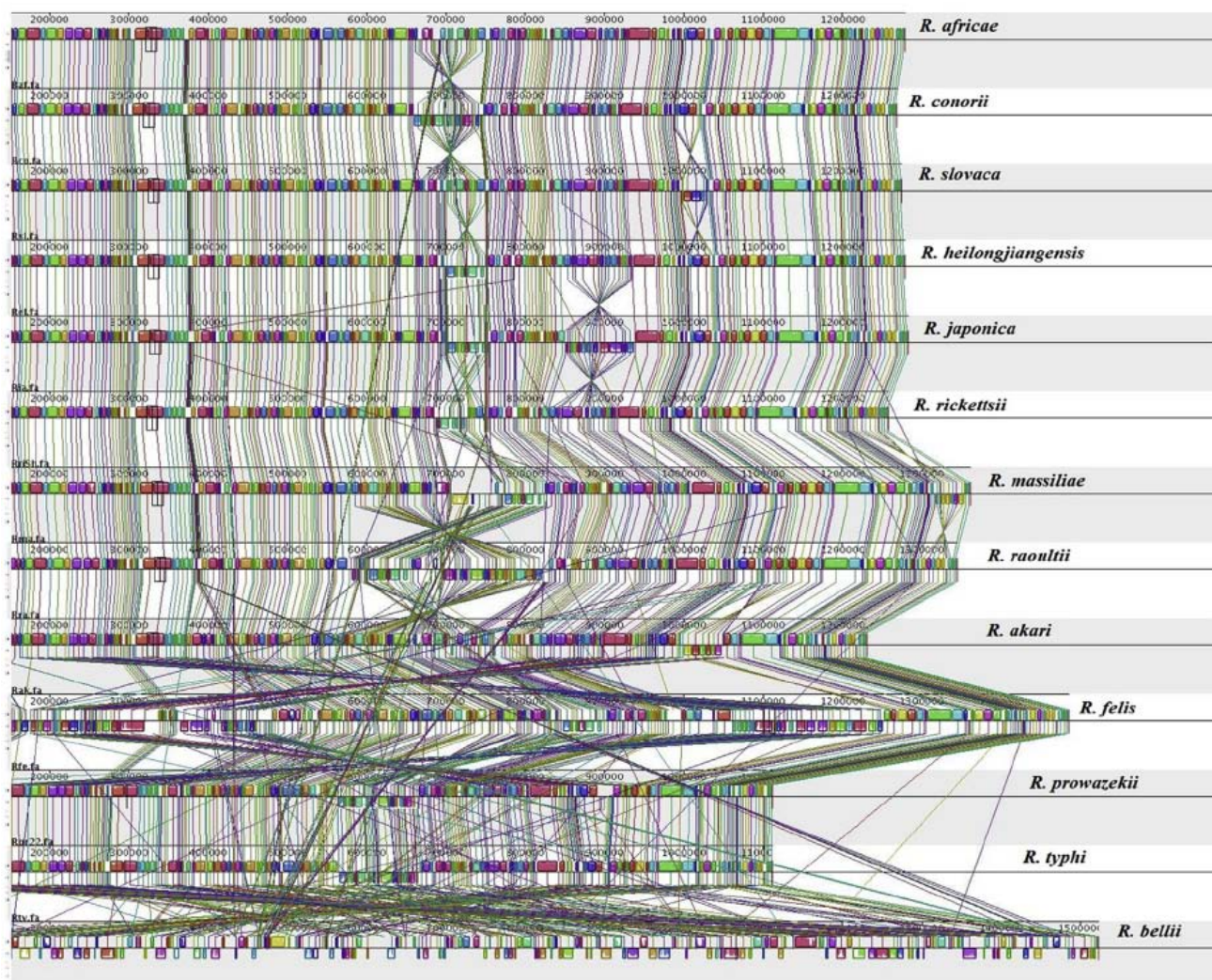
Геном риккетсий, по сравнению с геномами свободноживущих бактерий, имеет ряд особенностей. Геном риккетсий отличается небольшим размером: от 1,1 млн п.н. (*Rickettsia typhi*) до 2,1 млн п.н. (*Rickettsia endosymbiont of Ixodes scapularis*) и низким

G+C составом: от 29% (*R. typhi*) до 33% (*Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes scapularis*). Представлен геном одной кольцевой хромосомой. [Parola et al., 2013]. Количество генов варьирует от 870 (*R. prowazekii* штамм RpGvF24) до 1511 (*R. bellii* штамм OSU 85-389) и может отличаться даже у разных штаммов одного вида [Merhej et al., 2014]. При этом доля псевдогенов и некодирующей ДНК в геноме риккетсий может достигать 16-28% [Merhej and Raoult, 2011]. Выравнивание полногеномных последовательностей 13 видов риккетсий показало, что, за исключением *R. bellii* и *R. felis*, все другие геномы *Rickettsia* spp. демонстрируют высокую степень коллинеарности лишь с небольшим количеством перестроек (Рис. 1-5).

Небольшой размер генома риккетсий связан с его редукцией, что характерно для облигатных внутриклеточных патогенов и эндосимбионтов. В процессе редукции ряд генов превращается в псевдогены, от некоторых остаются лишь фрагменты, а часть генов полностью утрачивается [Merhej et al., 2010]. Чаще всего происходит потеря генов, связанных с метаболизмом аминокислот, АТФ, ЛПС, а также с синтезом компонентов клеточной стенки, что компенсируется за счет клетки хозяина [Blanc et al., 2007].

Потеря некоторых регуляторных генов может коррелировать с патогенностью. Один из самых патогенных видов риккетсий – *R. prowazekii*, имеет самый маленький размер генома среди риккетсий. При этом геном *R. prowazekii* составляет часть генома *R. conorii* – вида, менее патогенного и имеющего больший по размеру геном [Gillespie et al., 2008]. Сравнительный анализ геномов *R. prowazekii* и *R. conorii* показал, что только четыре гена, которые есть в составе генома у *R. prowazekii*, отсутствуют у *R. conorii*. Роль этих генов в патогенезе не показана.

В случае, когда происходит потеря гена, ответственного за патогенез, может произойти снижение патогенности вида. Так, при сравнении двух разных штаммов *R. rickettsii*: патогенного Sheila Smith и непатогенного Iowa было показано, что у последнего ген *ompA* находится в усеченном виде, что ведет к отсутствию у этого штамма поверхностного белка OmpA. [Ellison et al., 2008; Botelho-Nevers et al., 2011].



**Рисунок 1-5.** Выравнивание полногеномных последовательностей *Rickettsia* spp. [Dior et al., 2017].

Наряду с тенденцией к уменьшению размера генома, у риккетсий наблюдается увеличение его размера посредством дубликации генов, перемещения мобильных элементов и приобретения новых генов за счет горизонтального переноса. Дубликация генов играет важную роль в эволюции генома, она может способствовать адаптации риккетсий к изменяющимся условиям и освоению новых ниш. При этом дублицированный ген: 1) может сохраняться в неизменном виде, что увеличивает дозу гена и приводит к увеличению количества продукта гена; 2) может накапливать вредные мутации и становиться нефункциональным (псевдоген); 3) за счет случайных мутаций может приобретать новые полезные функции, отсутствующие у исходного гена.

Два самых часто дублицированных гена у риккетсий: ген АТФ/АДФ-транслоказы (присутствует в нескольких копиях) – кодирующий фермент,

необходимый для использования энергии, продуцируемой клеткой хозяином, и ген *spoT* (количество копий в геноме от 4 до 14) – кодирующий белок, участвующий в ответе микробов на стресс. Кроме того, часто являются дублированными гены, отвечающие за патогенез (например, гены поверхностных белков семейства *sca*) [Merhej and Raoult, 2011].

В составе геномов риккетсий были обнаружены тандемные повторы VNTR (variable number tandem repeat), палиндромы RPE (repeat palendromic elements); анкириновые (Ank) и тетратрикопептидные повторы (TPR); а также мобильные генетические элементы: транспозоны, профаги и плазмиды [Merhej and Raoult, 2011]. Наличие в геноме ряда риккетсий плазмид демонстрирует способность этих бактерий к обмену генетическим материалом посредством конъюгации. В настоящее время известно 20 плазмид у 11 видов риккетсий (некоторые виды имеют до 4 разных плазмид) [Dior et al., 2018; Karkouri et al., 2016; Ogata et al., 2005a]. Однако наличие плазмид, по всей видимости, не коррелирует с патогенностью [Darby et al., 2007]. Показано, что плазмиды присутствуют как у патогенных (*R. africae*, *R. helvetica*, *R. felis*), так и непатогенных (*R. peacockii*, “*Candidatus Rickettsia ambliomii*”) видов риккетсий [Karkouri et al., 2016].

Филогенетический анализ показал, что некоторые из генов были приобретены риккетсиями у других видов риккетсий или других бактерий. Так, были выявлены 165 генов в составе генома *R. felis*, которые могли быть приобретены у *R. bellii*, *R. typhi*, у бактерий других родов, включая *Legionella* spp. и *Francisella* spp., и даже у эукариотов [Merhej et al., 2011]. У *R. bellii* были обнаружены гены, приобретенные, по всей видимости, у внутриклеточных бактерий амёб [Ogata et al., 2006].

### **1.5. Взаимодействие риккетсий с клетками хозяина**

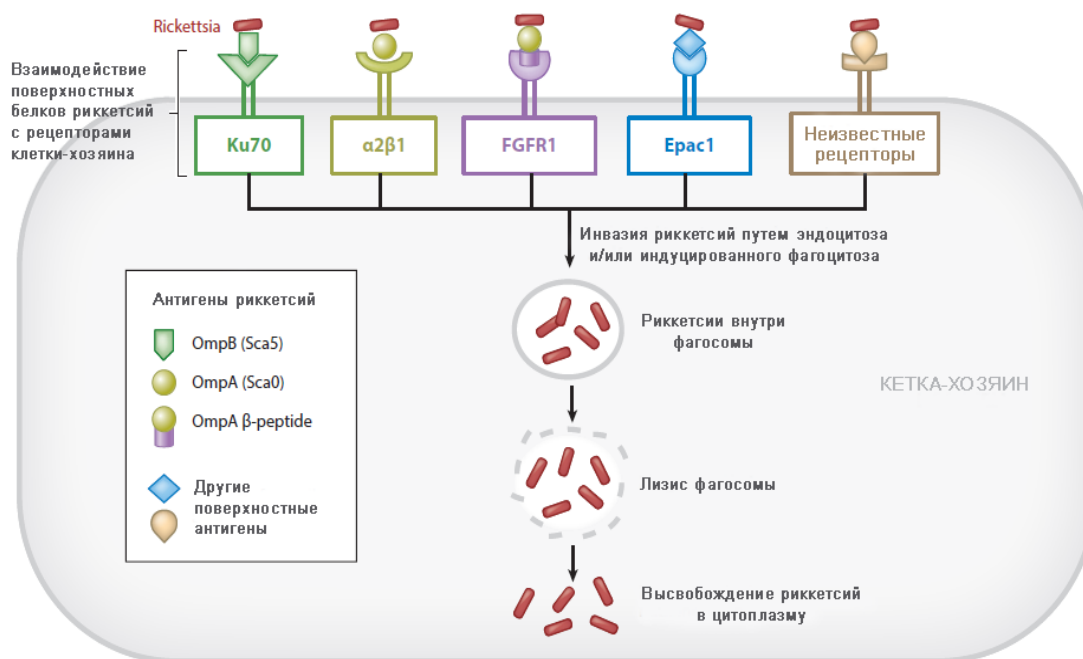
Патогенные риккетсии поражают клетки разных типов: клетки эндотелия мелких и средних сосудов и, в меньшей степени, моноциты, макрофаги, гепатоциты.

Для того, чтобы проникнуть в клетку хозяина, риккетсиям необходимо связаться с рецепторами клетки-мишени. На основании биоинформатического анализа геномов риккетсий были выявлены 17 генов поверхностных белков (*Sca*), которые потенциально могут участвовать в связывании с рецепторами клетки-

хозяина. Из них только для пяти белков было показано участие в адгезии риккетсий с клетками хозяев: Sca0 (OmpA), Sca1, Sca2, Sca4 и Sca5 (OmpB) [Sahni et al., 2018].

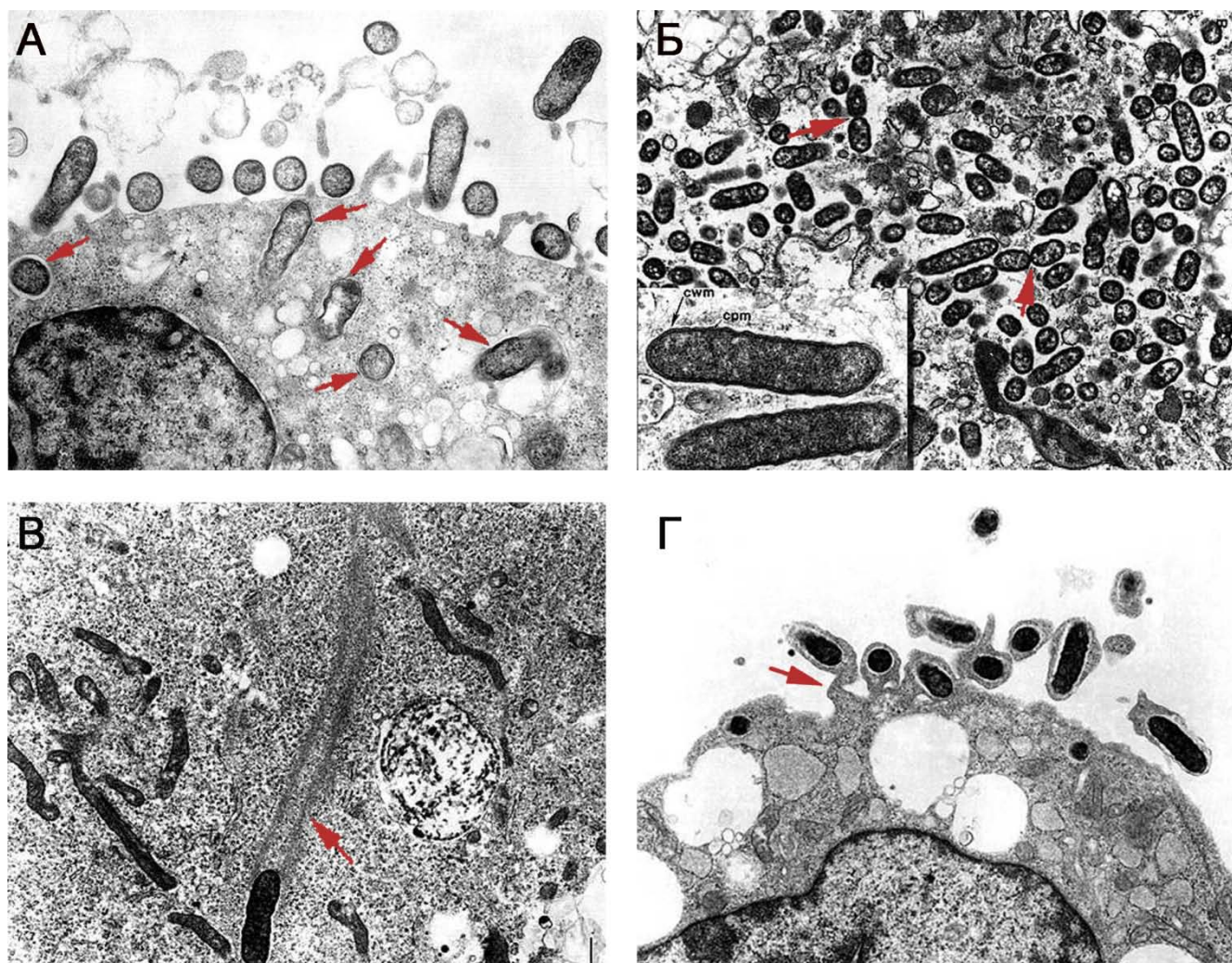
Поверхностные белки OmpA и OmpB, как полагают, являются самыми важными в патогенезе риккетсий [Uchiyama, 2012a]. Эти два высокомолекулярных белка являются основными антигенными детерминантами, вызывающими иммунный ответ у пациентов, инфицированных риккетсиями.

Ген белка OmpA есть у многих, но не у всех риккетсий. Он представлен как псевдоген у *R. felis* и *R. akari*, как фрагмент гена у *R. bellii* и отсутствует у *R. helvetica* и у риккетсий группы СТ [Sahni et al., 2018]. Взаимодействие OmpA с  $\alpha2\beta1$  интегрином активирует инвазию риккетсий в клетку (Рис. 1-6). Ген поверхностного белка OmpB присутствует у всех риккетсий [Walker et al., 2015]. Белок OmpB риккетсий связывается с клеточным рецептором Ku70 (субъединица ядерной ДНК-зависимой протеинкиназы), что способствует проникновению риккетсий внутрь клетки. Ген белка Sca1 есть у всех риккетсий, но у некоторых видов (*R. prowazekii* и *R. canadensis*) он представлен как псевдоген [Ngwamidiba et al., 2006]. Белок Sca1 тоже принимает участие в прикреплении риккетсий к клетке хозяина, но для него не показана роль в инвазии. Ген белка Sca2 представлен как псевдоген у *R. helvetica* и *R. canadensis* и как фрагмент гена у риккетсий группы СТ. Белок Sca2 принимает участие в связывании риккетсий с клеткой хозяина и в актин-обусловленной подвижности бактерий [Merhej and Raoult, 2011]. Белок Sca4 способствует распространению риккетсий в другие клетки за счет связывания с винкулином - белком цитоскелета клетки хозяина, который участвует в формировании контактов с другими клетками и межклеточным матриксом [McClure et al., 2017]. Было показано, что *Rickettsia parkeri* с мутацией в гене *sca4*, приводящей к синтезу усеченного белка, теряли способность к межклеточному передвижению [Lamason et al., 2016].



**Рисунок 1-6.** Схематическое изображение проникновения риккетсий в клетку млекопитающего. Поверхностные белки риккетсий связываются с рецепторами клетки хозяина, что приводит к интернализации риккетсий в клетку путем эндоцитоза и/или индуцированного фагоцитоза [Sahni et al., 2018].

Связавшись с рецепторами клетки-мишени, риккетсии индуцируют фагоцитоз. Внутри фагосомы риккетсии секретируют фосфолипазу D и гемолизин C, с их помощью разрушается фагосомальная мембрана, бактерии выходят в цитоплазму клетки (до слияния фагосомы с лизосомами), и, таким образом, избегают лизиса. В цитоплазме клетки хозяина риккетсии размножаются. Риккетсии могут передвигаться внутри клетки, а также проходить через клеточную мембрану в соседние клетки и в межклеточное пространство, стимулируя полимеризацию актина клетки-хозяина (Рис. 1-7). Полимеризация осуществляется вследствие активации Arp2/3 комплекса белком RickA риккетсий. Кроме того, поверхностный белок Sca2 способен стимулировать полимеризацию актина без участия Arp2/3 комплекса [Ireton et al., 2013; Sahni et al., 2018]. Способность риккетсий использовать актин для распространения от клетки к клетке была показана для нескольких видов риккетсий группы КПЛ: *R. conorii*, *R. rickettsii*, *R. montanensis*, *R. parkeri*, *R. australis* и *R. monacensis* [Balraj et al, 2009; Gouin et al., 2004; Heinzen et al., 1993; Ogata et al., 2005b; Sahni et al., 2018].



**Рисунок 1-7.** А. Связывание риккетсий с поверхностью эндотелиальной клетки и последующая интернализация (вход) внутрь клетки. Фагоцитоз, разрушение фагосомальной мембраны (стрелки) и высвобождение риккетсий в цитоплазму клетки. Б. Высвободившись из фагосомы, риккетсии размножаются в клетке путем бинарного деления (стрелка). В. Риккетсии передвигаются внутри клетки, стимулируя полимеризацию актина клетки-хозяина. Г. Выпячивание мембраны нитями актина с образованием филоподий (стрелка) предшествуют высвобождению риккетсий с поверхности клетки или их распространению в соседние эндотелиальные клетки. (<http://www.microbiologybook.org/mayer/rickettsia.htm>)

Риккетсии группы СТ не способны к актин-обусловленной подвижности. Они, как правило, накапливаются в цитоплазме, что приводит к лизису клетки. Риккетсии группы КПЛ быстро распространяются от клетки к клетке, и внутри клеток их накапливается значительно меньше, чем сыпнотифозных риккетсий.



## 1.6. Иммуитет при риккетсиозах

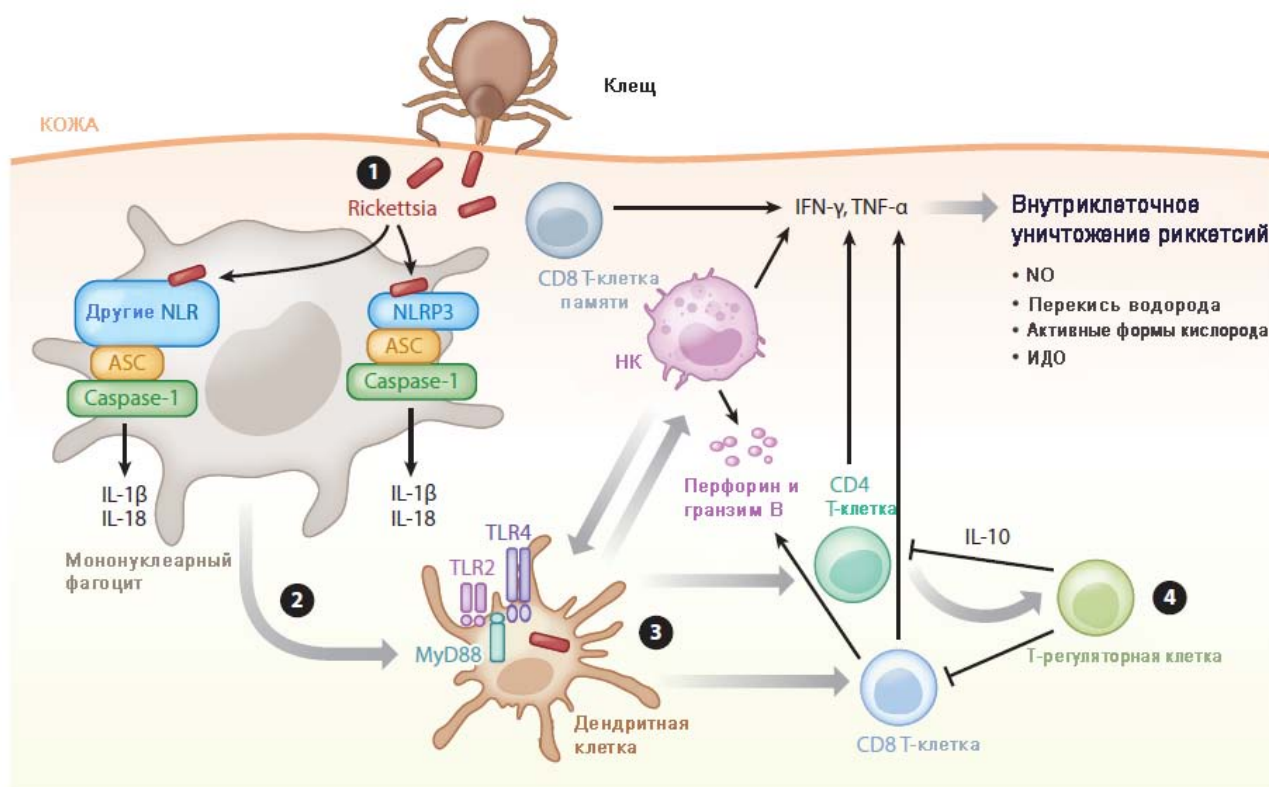
В иммунном ответе на риккетсиальную инфекцию участвуют дендритные клетки, макрофаги, натуральные киллеры (NK), CD8 Т-клетки, CD4 Т-клетки, эндотелиальные клетки, антитела и воспалительные цитокины и хемокины [Sahni et al., 2018].

Развитие риккетсиальной инфекции начинается с проникновения бактерий в организм из места укуса клеща (группа КПЛ) или посредством загрязнения фекалиями вшей или блох поврежденных участков кожи (группа СТ). Первую линию защиты на пути патогенов составляет врожденная иммунная система [Sahni et al., 2018; Walker, 2007; Walker and Ismail, 2008]. Иммунные клетки распознают молекулярные структуры характерные для целого класса микробов, так называемые PAMP (pathogen-associated molecular patterns) (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП)). В узнавании PAMP участвуют паттерн-распознающие рецепторы (PPR, PRR), в частности трансмембранные Toll-like receptors (TLRs) и цитоплазматические NOD-like receptors (NLRs) клеточные рецепторы, которые распознают микробные компоненты и инициируют активацию внутриклеточных сигнальных путей, в результате чего происходит экспрессия генов цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\alpha/\beta$  и других), костимуляторных молекул и некоторых других генов (Рис. 1-8).

Клетками-мишенями для риккетсий в основном служат эндотелиальные клетки мелких и средних сосудов и, в меньшей степени, моноциты, макрофаги и гепатоциты. Эндотелиальные клетки и макрофаги человека, активированные IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и RANTES, запускают внутриклеточное уничтожение риккетсий, которое может осуществляться за счет: индуцируемого синтеза оксида азота (NO), производства перекиси водорода и активных форм кислорода и ограничения доступности триптофана путем его деградации индоламин-2,3-диоксигеназой (ИДО) [Mansueto et al., 2012; Sahni et al., 2018].

На ранней стадии инфекции активируются натуральные киллеры, которые ингибируют рост риккетсий путем продукции интерферона (IFN- $\gamma$ ). Цитотоксичные CD8 Т-лимфоциты элиминируют зараженные клетки, индуцируя в них апоптоз; при этом запускается перфорин/гранзимВ зависимый механизм. Поскольку апоптоз инфицированных клеток является важным механизмом защиты хозяина для

ограничения распространения инфекции, вирусы и внутриклеточные бактерии используют различные стратегии для ингибирования апоптоза. Так было показано, что *R. rickettsii* в эндотелиальных клетках способны активировать транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, который ингибирует апоптоз.



**Рисунок 1-8.** Схематическое изображение взаимодействия риккетсий группы КПЛ с различными компонентами иммунной системы. После укуса клеща, проникнувшие риккетсии поражают мононуклеарные фагоциты (1) и активируют дендритные клетки (2). Дендритные клетки представляют риккетсиальные антигены и происходит активация натуральных киллеров (НК), CD4 Т-клеток (Т-лимфоцитов), CD8 Т-клеток (3). В то же время, CD4+CD25+ Т-регуляторные клетки (Т-супрессоры) продуцируют IL-10, приводя к супрессии иммунного ответа (4). Сокращения: ИДО - Индоламин-2,3-диоксигеназа; NLR – NOD-like receptor; TLR – Toll-like receptor [Sahni et al., 2018].

Еще один механизм, который запускается для внутриклеточной деградации риккетсий – это аутофагия. Было показано, что эндотелиальные клетки, активированные IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , разрушаются в структурах, напоминающих аутофаголизосомы. В ряде экспериментов было установлено, что при заражении клеток млекопитающих слабопатогенными риккетсиями вида *R. montanensis* рост

бактерий был ограничен за счет уничтожения их путем аутофагии. Однако при одновременном инфицировании с более патогенными риккетсиями вида *R. japonica*, происходило ослабление процесса аутофагии, и оба вида успешно размножались. По-видимому, *R. japonica* секретирует какие-то неизвестные факторы, ингибирующие аутофагию [Bell et al., 1963; Uchiyama et al., 2012b].

При попадании в организм небольшого количества микробов, обладающих низкой вирулентностью, реакции неспецифических гуморальных факторов и фагоцитирующих клеток может быть достаточно для эффективного элиминирования патогена. При проникновении в организм высоковирулентных бактерий или большой дозы микробов на помощь неспецифическим факторам защиты приходят иммунные механизмы.

Риккетсии путем механизма, вовлекающего TLR4 и MyD88, активируют дендритные клетки, которые, как профессиональные антиген-представляющие клетки, играют важную роль связующего звена между врожденным и адаптивным иммунными ответами. Дендритные клетки фагоцитируют риккетсий, процессируют антиген и представляют его на своей поверхности в комплексе с МНС I или МНС II. Т-клетки распознают антиген и стимулируют иммунный ответ системы приобретённого иммунитета. Антитела не играют важной роли в противомикробном иммунитете при первичном заражении риккетсиями, они больше необходимы для защиты при повторном заражении, причем показано наличие перекрестного иммунитета к другим риккетсиям группы КПЛ (а не только этиологического агента, вызвавшего заболевание) [Возианова, 2001; Walker, 2007].

## **1.7. Характеристика риккетсий и вызываемых ими риккетсиозов**

### **1.7.1. Риккетсии и риккетсиозы группы сыпного тифа**

К группе СТ относятся два вида риккетсий: *Rickettsia prowazekii* – возбудитель эпидемического (вшивого) сыпного тифа и *Rickettsia typhi* – возбудитель эндемического (блошиного, крысиного) сыпного тифа.

Эпидемический сыпной тиф — острая инфекционная болезнь, характеризуется циклическим течением с лихорадкой, сыпью, острым поражением нервной и сердечно-сосудистой систем [Лобан и др., 2002]. Это заболевание является эпидемическим антропонозом, поскольку источником инфекции является больной

человек, а переносчик инфекции — платяная или головная вошь. Заражение людей эпидемическим тифом происходит вследствие втирания фекалий инфицированных вшей в кожу при расчесах, возможно заражение через слизистые оболочки глаз, верхних дыхательных путей [Рудаков, 2016]. Через укусы вшей инфекция не передается, поскольку возбудитель размножается лишь в эпителиальных клетках кишечника вшей, но не попадает в слюнные железы [Лобан и др., 2002]. Рецидивная форма сыпного тифа, получившая название болезни Брилля-Цинссера, возникает через длительное время у лиц, ранее перенесших сыпной тиф, вследствие истощения иммунитета или в связи с воздействием каких-либо стресс-факторов и активацией при этом сохранившихся в организме *Rickettsia prowazekii* [Лобан и др., 2002].

Эпидемии сыпного тифа, вспыхивавшие во время войн, унесли миллионы людей. Так в период Первой мировой войны заболело, по разным данным, от 10 млн до 25 млн человек, из которых погибли около 10% [Лобан и др., 2002].

Очаги эпидемического тифа в настоящее время существуют в Южной и Центральной Америке, Африке – в странах с низким уровнем жизни и отсутствием средств гигиены [Тарасевич, 2008].

Эндемический сыпной тиф – спорадическая острая инфекционная болезнь, характеризуется циклическим течением с появлением на коже розеолезно-папулезной сыпи; протекает в основном доброкачественно, летальность незначительная. Эндемический сыпной тиф является зоонозной инфекцией, резервуарами являются мышевидные грызуны (крысы, домовые мыши). Переносчики *R. typhi* — блохи, а также три вида вшей и несколько видов гамазовых клещей. Передача человеку возбудителя крысиного тифа, происходит фекально-ингаляционно-контактным путем [Лобан и др., 2002].

Крысиный сыпной тиф распространен на всех континентах, кроме Антарктиды [Тарасевич, 2008].

### **1.7.2. Риккетсии, переносимые клещами**

Подавляющее большинство риккетсий, переносимых клещами, относится к группе КПЛ. В настоящее время известно более 26 видов риккетсий этой группы; по крайней мере, для 16 видов показана способность вызывать инфекции у людей, для

остальных (в том числе и новых видов) патогенность для человека не доказана (Табл. 1-1 и 1-2).

Переносчики риккетсий группы КПЛ – иксодовые клещи. Риккетсии инфицируют многие органы и ткани клещей, включая слюнные железы и яичники. В связи с этим, риккетсии группы КПЛ могут эффективно передаваться в клещах трансвариально (от самки яйцу) и трансфазово (от личинки нимфе, от нимфы имаго) [Рудаков, 2016; Macaluso et al., 2001; Valbuena and Walker, 2009]. Таким образом, клещи являются как переносчиками, так и резервуарами для риккетсий группы КПЛ.

Заболевания, возбудителями которых являются риккетсии группы КПЛ, называют клещевыми риккетсиозами или клещевыми пятнистыми лихорадками. Передача возбудителя человеку происходит при присасывании зараженного клеща. Симптомы клещевых риккетсиозов обычно включают высокую температуру, головную и мышечную боль, розеолезно-папулезную сыпь, региональный лимфаденит и первичный аффект на месте укуса [Рудаков, 2016].

Самыми известными и значимыми клещевыми риккетсиозами в мире являются пятнистая лихорадка скалистых гор (возбудитель *R. rickettsii*), средиземноморская пятнистая лихорадка (возбудитель *R. conorii* subsp. *conorii*), сибирский клещевой тиф (возбудитель *R. sibirica* subsp. *sibirica*), квинслендский клещевой тиф (*R. australis*), японская пятнистая лихорадка (*R. japonica*).

Регистрируются клещевые риккетсиозы во многих регионах мира: в Америке, Европе, России, Средней Азии, Монголии, Китае, Пакистане, Индии, Таиланде, Африке и др.

К группе КПЛ также относится вид *R. felis*, который, несмотря на то, что переносится блохами и по антигенной структуре ближе к группе СТ, филогенетически является наиболее близким к риккетсиям, переносимым клещами – *R. akari* и *R. australis*. *Rickettsia felis* является возбудителем Калифорнийского блошиного риккетсиоза (риккетсиоз кошачьих блох); переносчик – кошачья блоха *Stenoccephalides felis*, резервуар – кошки. Клинические проявления включают первичный аффект на месте укуса блохи (как у группы КПЛ), сыпь, неврологические нарушения [Рудаков, 2016]; заболевание распространено в Евразии, Америке, Африке.

Таблица 1-1

## Патогенные риккетсии, переносимые клещами, и вызываемые ими риккетсиозы

Вид риккетсий	Название заболевания	Степень тяжести*	Особенности клиники	Клещи переносчики	Географическое распространение риккетсий	Ссылки
<i>R. rickettsii</i>	Пятнистая лихорадка скалистых гор	+++++	В ~97% случаев нет первичного аффекта	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Amblyomma</i> spp., <i>Haemaphysalis leporispalustris</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Америка	Chapman et al., 2006; Dantas-Torres et al., 2007; Estripeaut et al. 2007; Hun et al., 2008
<i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	Средиземноморская пятнистая лихорадка	+++	В ~50% случаев нет первичного аффекта	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Haemaphysalis</i> spp.	Европа, Африка, Турция	Rovero et al., 2008; Parola et al., 2013; Kuloglu et al., 2012
<i>R. conorii</i> subsp. <i>caspia</i>	Астраханская пятнистая лихорадка	N	-	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Европа, европейская часть России, Африка	Tarasevich et al., 1991; Renvoisé et al., 2012
<i>R. conorii</i> subsp. <i>indica</i>	Индийский клещевой тиф	N	Первичный аффект выявляется редко	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Европа, Индия	Torina et al., 2012 Parola et al., 2013; Jayaseelan et al., 1991; Sentausa 2012
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	Сибирский клещевой тиф	++	-	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Haemaphysalis concinna</i>	Азиатская часть России, Китай, Монголия	Рудаков, 2016; Parola et al., 2013
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolotimonae</i>	LAR (lymphangitis-associated rickettsiosis)	N	В ~55% случаев увеличены лимфоузлы	<i>Hyalomma</i> spp., <i>Rhipicephalus pusillus</i>	Европа, Китай, Монголия Африка	Fournier et al., 2005; Nogueras et al., 2015
<i>R. africae</i>	Африканская клещевая лихорадка	++	В ~50% случаев нет сыпи, в ~54% случаев выявляется несколько первичных аффектов.	<i>Amblyomma</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Hyalomma impeltatum</i>	Африка, Северная и Центральная Америка, Турция	Walker et al., 2015; Raoult et al., 2001

<i>R. japonica</i>	Японская пятнистая лихорадка	++	-	<i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Ixodes ovatus</i> , <i>Dermacentor taiwanensis</i>	Япония, Южная Корея, Китай	Fournier et al., 2002; Uchida et al., 1989, 1992; Lu et al., 2015
<i>R. australis</i>	Квинслендский клещевой тиф	++	-	<i>Ixodes</i> spp.	Австралия	Parola et al., 2013
<i>R. heilongjiangensis</i>	Дальневосточный клещевой риккетсиоз	++	-	<i>Haemaphysalis</i> spp., <i>D. silvarum</i>	Азиатская часть России, Китай, Южная Корея, Япония	Mediannikov et al., 2008
<i>R. akari</i>	Везикулезный риккетсиоз	++	Везикулезная сыпь	Гамазовые клещи: <i>Allodermanyssus sanguineus</i> , <i>Liponyssoides sanguineus</i>	Северная Америка, Африка	Denison, 2014; Garavelli et al., 2005
<i>R. parkeri</i>	Нет названия	++	-	<i>Ambliomma</i> spp.	Америка	Paddock et al., 2004; Beati et al., 1997
<i>R. honei</i>	Пятнистая лихорадка острова Флиндерс	++	В 58-75% случаев нет первичного аффекта	<i>Aponomma hydrosauri</i>	Австралия, Азия	Stenos et al., 1998
<i>R. helvetica</i>	Нет названия	+	В ~87% случаев нет первичного аффекта, сыпь выявляется редко, описан случай перимиокардита	<i>Ixodes</i> spp.	Европа, Россия, Северная Африка	Nilsson et al., 1999, 2002, 2010; Shpynov et al., 2006; Kartashov et al., 2014;
<i>R. aeschlimannii</i>	Нет названия	+	-	<i>Hyalomma marginatum</i> sp.	Африка, Европа, Россия	Germanakis et al., 2013; Raoult et al., 2002; Pretorius, 2002 Mokrani et al., 2008,
<i>R. massiliae</i>	Нет названия	+	-	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Южная Америка, Европа	Bitam et al., 2006 Boudebouch et al., 2009; Карташов, 2017
<i>R. monacensis</i>	Нет названия	+	В ~67% случаев нет первичного аффекта	<i>Ixodes</i> spp.	Европа, Африка, европейская часть России	Madeddu et al., 2012; Jado et al., 2007

<i>R. slovacca</i>	SENLAT/TIBOLA/ DEBONEL	+	В ~95% случаев нет сыпи, часто увеличены шейные и/или ушные лимфоузлы	<i>Dermacentor</i> spp.	Европа, Азия, европейская часть России	Parola et al., 2009; Sekeyova et al., 2012; Mechai et al., 2009; de Sausa et al., 2013; Ibarra et al., 2006, Silva-Pinto et al., 2014
<i>R. raoultii</i>	Нет названия	N	От бессимптомных случаев до заболеваний разной степени тяжести, часто без сыпи и первичного аффекта	<i>Dermacentor</i> spp.	Европа, Азия, Россия	Jia et al., 2013; Li et al., 2018

\* - сведения из статьи [Fang et al., 2017]; N- не определено в статье



Таблица 1-2

## Некоторые непатогенные и кандидатные виды риккетсий

Вид риккетсий	Клещи переносчики	Географическое распространение риккетсий	Ссылки
<i>R. canadensis</i>	<i>H. leporispalustris</i>	Северная и Центральная Америка	Parola et al., 2013
<i>R. asiatica</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Япония	Fujita et al., 2006
<i>R. montanensis</i>	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Amblyomma americanum</i>	Америка	Dergousoff et al., 2009
<i>R. peacockii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	Америка	Dergousoff et al., 2009
<i>R. amblyommatis</i>	<i>Amblyomma</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp.	Америка	Clay et al., 2008; Heise et al., 2010
<i>R. rhipicephali</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Dermacentor</i> spp	Азия	Wikswow et al., 2008
“ <i>Candidatus R. tarasevichiae</i> ”	<i>I. persulcatus</i>	Россия, Китай, Япония	Shpynov et al., 2003, 2006; Liu et al., 2016; Cheng et al., 2016; Inokuma et al., 2007
“ <i>Candidatus R. rara</i> ”	<i>H. concinna</i>	Дальний Восток	DQ365805
“ <i>Candidatus R. principis</i> ”	<i>H. japonoca</i>	Дальний Восток	Mediannikov et al., 2006

Среди риккетсий, переносимых клещами, есть виды, которые не относятся к группе КПЛ: *R. bellii*, *R. canadensis*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”.

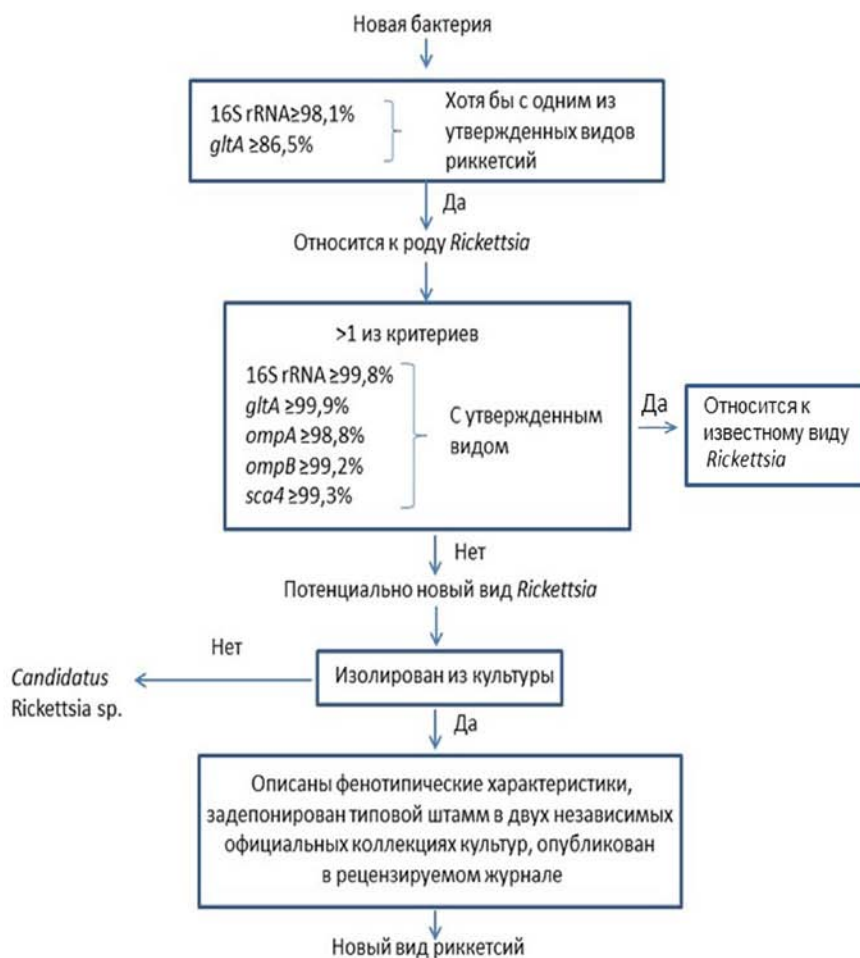
Патогенность *R. bellii* для человека не установлена; однако было показано, что при введении *R. bellii* кроликам и морским свинкам у них формируется первичный аффект [Ogata et al., 2006]. На основании данных, полученных иммунологическими методами, *R. canadensis* предположительно может вызывать заболевания у людей, однако подтвержденные случаи данной инфекции отсутствуют [Parola et al., 2013]. Филогенетически наиболее близкий к *R. canadensis* вид риккетсий – “*Candidatus R. tarasevichiae*” в последнее время был обнаружен в образцах пациентов, заболевших после укусов клещами.

Группа КПЛ постоянно расширяется, пополняясь как новыми видами, так и кандидатными видами (*Candidatus Rickettsia* sp.), претендующими на статус самостоятельного вида. Большинство новых риккетсий, выявленных за последнее

время, были обнаружены благодаря молекулярно-генетическим методам.

Некоторые риккетсии, описанные как новые виды, при дальнейшем анализе были отнесены к подвидам уже известных риккетсий: так *Rickettsia israeliensis* и *Rickettsia indica* стали подвидами *Rickettsia conorii* (*Rickettsia conorii* subsp. *israeliensis* и *Rickettsia conorii* subsp. *indica*), а *Rickettsia mongolotimonae* – подвидом *R. sibirica* (*R. sibirica* subsp. *mongolotimonae*).

Fournier и Raoult с соавторами предложили критерии для описания новых видов и новых кандидатных видов риккетсий группы КПЛ [Fournier et al., 2003; Raoult et al., 2005]. Согласно критериям, для получения статуса нового кандидатного вида новый изолят должен удовлетворять не менее чем 4 из 5 условий: уровень гомологии генов 16S rRNA, цитратсинтазы *gltA* и поверхностных белков *ompA*, *ompB* и *sca4* с известными видами не должен превышать 99,8%, 99,9%, 98,8%, 99,2% и 99,3%, соответственно (Рис. 1-9).



**Рисунок 1-9.** Схема установления таксономического статуса риккетсий [Raoult et al., 2005].

### 1.7.3. Клещи, как переносчики риккетсий

Клещи относятся к классу паукообразных Arachnida, к подклассу Acari. Из большого числа представителей этого подкласса в качестве переносчиков клещевых риккетсиозов особо важное значение имеют иксодовые клещи (семейство Ixodidae из отряда Parasitiformes), и, в первую очередь, виды, относящиеся к родам *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* и *Rhipicephalus* [Здродовский и Голиневич 1956, Якименко и др., 2013]. Иксодовые клещи являются временными паразитами и периодически паразитируют на животных.

Для жизненного цикла клещей характерно сложное превращение. Из яиц, отложенных самкой, вылупляются личинки, которые после линьки превращаются в нимфы, а нимфы перелинивают в имаго (взрослых особей) (Рис. 1-10). Хотя большую часть жизни иксодовые клещи проводят вне тела хозяина во внешней среде, кровососание является необходимым условием для перехода паразита к очередной стадии жизненного цикла и для яйцекладки [Здродовский и др., 1956, Якименко и др., 2013]. Длительность жизненного цикла для разных видов иксодовых клещей в условиях Западной Сибири может составлять от одного весенне-летнего сезона (*D. reticulatus*) до 3-4 лет (*I. persulcatus*) [Якименко и др., 2013].

По числу сменяемых хозяев жизненные циклы клещей делятся на однохозяинный цикл (три питания и две линьки проходят на теле одного хозяина), двуххозяинный цикл (два питания и линька на теле одного хозяина, одна линька в почве и одно питание на теле второго хозяина) и треххозяинный цикл (каждая фаза развития клеща питается на разных хозяевах). Развитие иксодовых клещей в большинстве случаев проходит со сменой хозяина на каждой стадии. Чаще всего личинки и нимфы нападают на мелких животных, имаго нападают на крупных животных (в том числе и человека) [Балашов, 1998]. После завершения питания клещ отпадает во внешнюю среду, проходя дальнейшее развитие в почве, растительной подстилке или норах (гнездах) хозяев. Для иксодовых клещей характерны два типа паразитизма: пастбищно-подстерегающий (голодные особи нападают на хозяев вне убежищ, подстерегая их среди растительности) и гнездово-норный (голодные особи нападают на хозяев прокормителей в норах и гнездах, где протекает их дальнейшее развитие) [Якименко и др., 2013].

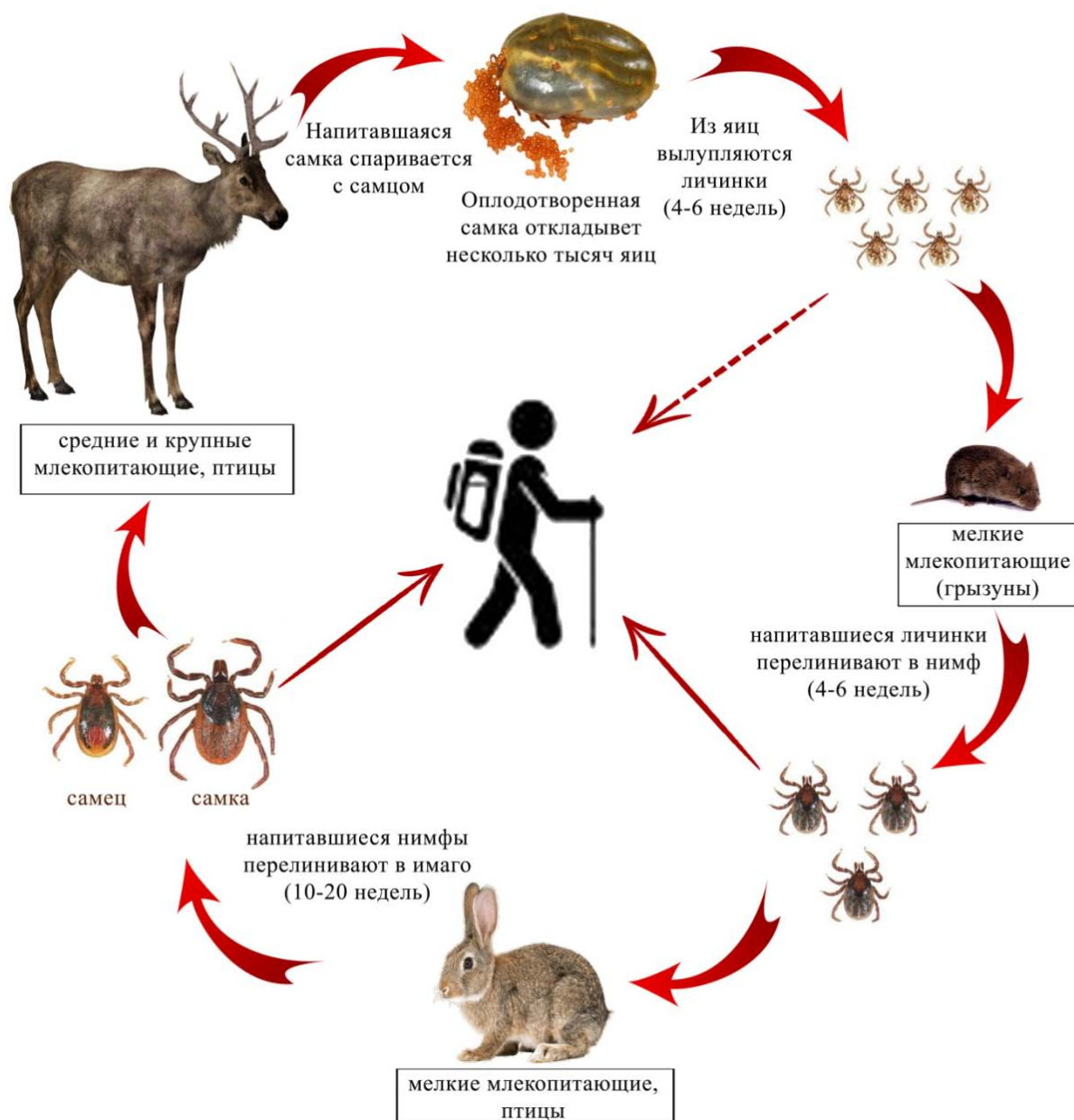
Большинство иксодовых клещей являются полигостальными, т.е. они имеют широкий круг хозяев, которые могут быть филогенетически далеки друг от друга [Якименко и др., 2013; Балашов, 1998].

Иксодовые клещи могут приобретать риккетсий при питании на инфицированных животных и сохранять бактерий на всех стадиях развития. В результате, как нимфы, так и имаго способны передавать риккетсии животным и человеку при кровососании. Риккетсии хорошо адаптированы к организму клещей, и паразитирование в них протекает бессимптомно [Лобан и др., 2002]. Кроме того, риккетсии трансвариально передаются самкой следующему поколению.

Феномен трансвариальной передачи показан для многих видов риккетсий из группы КПЛ, в частности для *R. rickettsii*, *R. conori*, *R. sibirica*, *R. raoultii*, *R. helvetica* и др., а также для *R. canadensis* [Burgdorfer and Brinton, 1975; Samoilenko et al., 2003; Socolovschi et al., 2009; Wright et al., 2015a]. Для всех исследованных видов риккетсий эффективность трансвариальной передачи была высокой, а для некоторых видов достигала 100%.

Разные виды клещей могут иметь разную восприимчивость к одному и тому же виду риккетсий. В эксперименте Labruna личинок клещей трех разных видов, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* и *Rhipicephalus sanguineus*, являющихся переносчиками *R. rickettsii*, кормили на инфицированных морских свинках [Labruna et al., 2008]. После прошедшего метаморфоза нимф анализировали на наличие ДНК риккетсий. Нимфы *A. aureolatum* и *R. sanguineus* были более восприимчивы к *R. rickettsii* (80-100% инфицированных нимф), по сравнению нимфами *A. cajennense* (10-60%).

В аналогичном эксперименте было показано, что 93% самок *A. aureolatum* и только 15% самок *A. sculptum* приобрели *R. rickettsii* после кормления на инфицированных животных [Martins et al., 2017].



**Рисунок 1-10.** Жизненный цикл иксодовых клещей

#### 1.7.4. Роль позвоночных в поддержании очагов клещевых риккетсиозов

Роль позвоночных как природных резервуаров риккетсий, переносимых клещами, недостаточно изучена. Для того, чтобы животное служило резервуаром инфекции, необходимо, чтобы оно было восприимчиво к инфекции и было способно к относительно длительной бактериемии. При этом уровень бактериемии должен быть достаточно высоким. Не у всех млекопитающих, на которых прокармливаются инфицированные клещи, развивается высокая степень риккетсиемии [Burgdorfer et al., 1996; McDade et al., 1986]. Так, в результате лабораторного заражения различных

видов животных *R. rickettsii* у колумбийской земляной белки (*Uroditellus columbianus*), золотоспинного суслика (*Callospermophilus lateralis*), бурундука (*Tamias* spp.) и серой полевки (*Microtus* spp.) наблюдалась высокая степень риккетсиемии; у американского зайца-беляка (*Lepus americanus*) – более слабая риккетсиемия, а у пышнохвостой крысы (*Neotoma cinerea*) риккетсиемия была недостаточной для инфицирования личинок *D. andersoni* риккетсиями [Burgdorfer et al., 1966].

Чаще всего у животных инфекция вызывает кратковременную риккетсиемию. Было показано, что у обезьян *Ceropithecus pygerythrus* при введении подкожно или внутривенно риккетсий *R. conorii*, *R. helvetica* или *R. massiliae* развивается риккетсиемия и отмечается сероконверсия, хотя никаких клинических (гематологических и биохимических) проявлений инфекции не наблюдается [Beati et al., 1999]. В другом эксперименте в результате инъекционного заражения домашних собак *Canis familiaris* риккетсиями *R. conorii* subsp. *conorii* и *R. conorii* subsp. *israelensis*, развивались симптомы заболевания (лихорадка, орахнит). При последующем кормлении личинок и нимф *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato на инфицированных собаках успешно проходило заражение клещей риккетсиями. Способность заражать клещей сохранялась, по крайней мере, в течение месяца; таким образом, собаки могут служить резервуаром риккетсий [Levin et al., 2012]. В ряде экспериментов по инфицированию капибар *Hydrochoerus hydrochaeris*, опоссумов *Didelphis aurita* и домашних собак другим видом риккетсий - *R. rickettsii* была показана способность данных видов животных к риккетсиемии, а также к передаче риккетсий клещам *R. sanguineus* s. l. При этом риккетсиемия сохранялась у капибары около 10 дней, у собак – 3-13 дней и у опоссумы - 26 дней [Horta et al., 2009; Piranda et al., 2011; Sousa et al., 2009]. Для мелких млекопитающих способность к риккетсиемии в настоящее время не показана.

В редких случаях клещи могут быть инфицированы при совместном питании на одном животном в непосредственной близости друг к другу (трансптиальная передача) при отсутствии риккетсиемии, при этом возможна прямая передача риккетсий от инфицированного клеща неинфицированному. Способность к трансптиальной передаче показана лишь для нескольких видов риккетсий: *R. conorii* subsp. *israelensis* между клещами *Rhipicephalus sanguineus* [Zemtsova et al., 2010] и *R. parkeri* между клещами *Amblyomma* spp. [Wright et al., 2015b].

Несмотря на то, что многие животные восприимчивы к риккетсиальным инфекциям, способны к риккетсиемии и демонстрируют клиническую симптоматику, роль позвоночных как резервуаров риккетсий в поддержании зоонозного очага инфекций требует дальнейшего изучения. По-видимому, значение млекопитающих, в первую очередь грызунов, ограничено ролью временного резервуара инфекции. Однако млекопитающие имеют большое значение для поддержания циркуляции риккетсий, так как обеспечивают прокормление иксодовых клещей – основных резервуаров инфекции [Балашов и Дайтер, 1973].

#### **1.7.5. Характеристика распространенных на территории РФ риккетсий, переносимых клещами**

На территории Российской Федерации циркулируют несколько видов риккетсий: *R. sibirica* subsp. *sibirica*, *R. conorii* subsp. *caspia*, *R. heilongjiangensis*, *R. slovacica*, *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. aeschlimannii*, *R. monacensis*, а также кандидатные виды “*Ca. R. tarasevichiae*”, “*Ca. R. principis*” и “*Ca. R. rara*” (Рис. 1-11) [Карташов, 2017; Mediannikov et al., 2006; Shpynov et al., 2006b; Tarasevich et al., 1991]. Некоторые виды уже давно известны как этиологические агенты клещевых риккетсиозов (*R. sibirica* и *R. conorii*), вид *R. heilongjiangensis* только недавно был описан как возбудитель клещевого риккетсиоза, остальные виды риккетсий (патогенные и непатогенные) на территории России выявлены только в клещах.

##### ***R. sibirica* subsp. *sibirica***

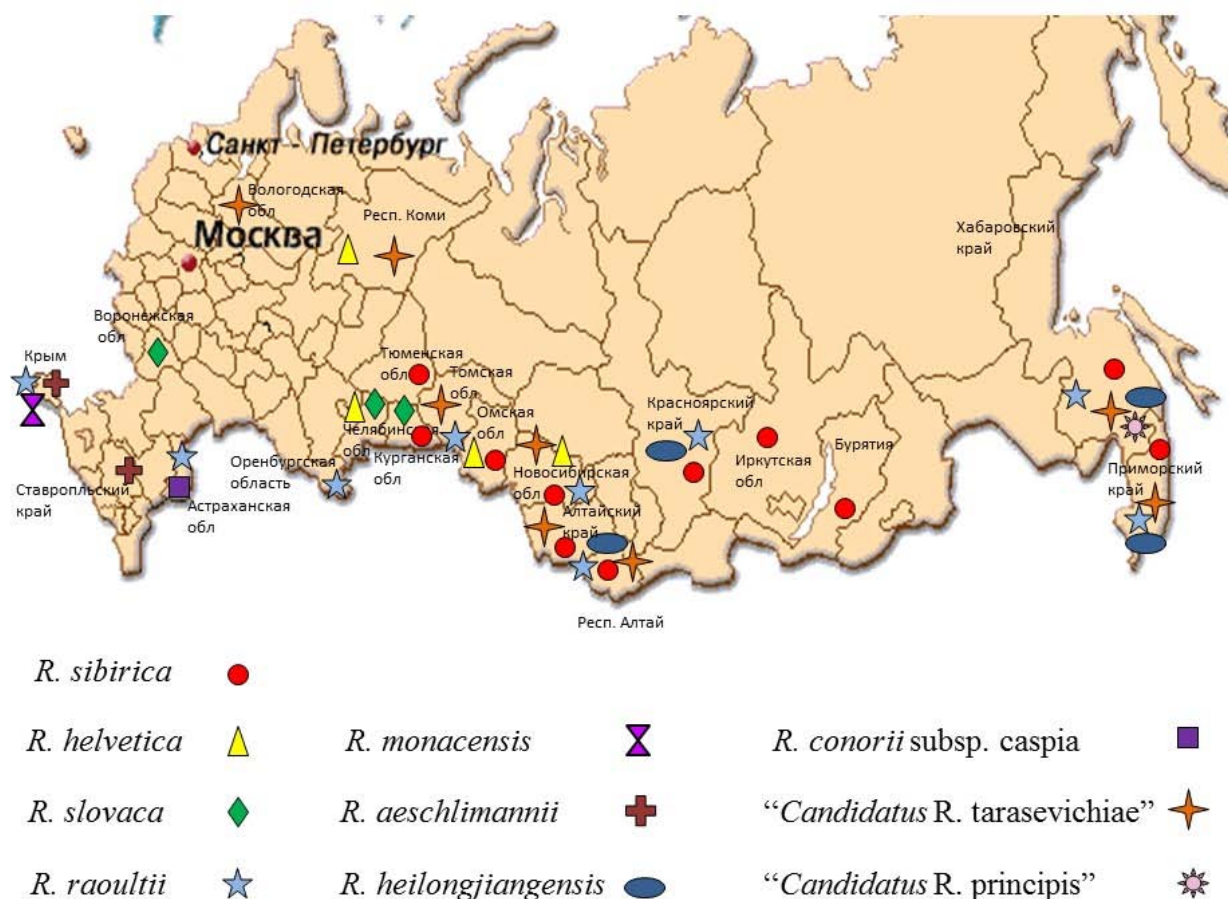
*R. sibirica* subsp. *sibirica* – этиологический агент сибирского клещевого тифа (СКТ). Основными переносчиками *R. sibirica* subsp. *sibirica* являются клещи рода *Dermacentor* и *H. concinna*. В единичных случаях этот вид выявляется в клещах *I. persulcatus*. В России *R. sibirica* subsp. *sibirica* был обнаружен в клещах в Сибири (Новосибирская, Иркутская, Омская, Кемеровская, Тюменская области, Алтайский и Красноярский края, республики Бурятия, Хакасия, Коми) и на Дальнем Востоке (Хабаровский и Приморский края) [Бондаренко и др., 2014; Рудаков, 2016; Ereemeeva et al., 1993; Shpynov et al., 2006b].

Клинические проявления СКТ типичные для клещевых риккетсиозов: лихорадка, пятнисто-папулезная сыпь, первичный аффект на месте укуса, головная и мышечная боль, лимфаденит и лимфоаденопатия. Пик заболеваемости приходится на

апрель-май.

### *R. conorii*

На территории России выявляют два подвида *R. conorii*: *R. conorii* subsp. *conorii* и *R. conorii* subsp. *caspia*. *R. conorii* subsp. *conorii* – возбудитель марсельской (средиземноморской) пятнистой лихорадки. Основные переносчики – клещи *Rhipicephalus sanguineus*. Заболевание ранее регистрировалось в Севастополе, на Черноморском и Каспийском побережьях Кавказа, в Закавказье [Рудаков, 2016]. В последнее время на территории России данное заболевание не отмечается [Еремеева и др., 2014]. Заболевание широко распространено во многих странах Европы, выявлены случаи в Африке. Клиническая картина марсельской пятнистой лихорадки схожа с клиникой других клещевых риккетсиозов.



**Рисунок 1-11.** Распространение риккетсий, переносимых клещами, на территории Российской Федерации по литературным данным.



*R. conorii* subsp. *caspia* является этиологическим агентом астраханской пятнистой лихорадки (АПЛ). Переносчики – клещи *Rhipicephalus pumilio*. Первые случаи заболевания были отмечены в конце 1970-х – начале 1980-х гг. в Астраханской области. Возбудитель был выделен и идентифицирован в 1991 г. Заболеваемость АПЛ регистрируется преимущественно в Астраханской области, а в клещах *R. conorii* subsp. *caspia* выявляется также в Калмыкии и Вологодской области. Симптоматика типичная для клещевых риккетсиозов, но первичный аффект выявляется редко (в ~20% случаях) [Самойленко и др., 2014].

### ***R. heilongjiangensis***

Впервые *R. heilongjiangensis* были изолированы из клещей *D. silvarum* в Китае в провинции Heilongjiang в 1982 г. [Mediannikov et al., 2004]. В 1992 г. были описаны случаи заболеваний людей в этой провинции, связанные с укусами клещей и по симптоматике схожие с клещевыми риккетсиозами [Рудаков, 2016]. В 2004 г. были впервые описаны случаи риккетсиозов, вызванных *R. heilongjiangensis* в Хабаровском Крае [Mediannikov et al., 2004]. Заболевание получило название дальневосточный клещевой риккетсиоз. На территории России циркуляция этого возбудителя в клещах установлена на территории Сибири (Алтайский и Красноярский края) и Дальнего Востока (Приморский и Хабаровский края) [Mediannikov, 2006; Shrynov et al., 2004, 2006b]. Основным переносчиком *R. heilongjiangensis* являются клещи *H. concinna*. Реже это вид выявляется в клещах *D. silvarum*, *H. japonica* и *Haemaphysalis flava*; в единичных случаях в *I. persulcatus* [Cheng et al., 2016; Mediannikov et al., 2004; Shrynov et al., 2006a]. В Китае *R. heilongjiangensis* были выявлены в диких крысах (*Rattus edwardsii*, *Rattus fulvescens*, *Rattus nivivente* and *Berylmys bowersi*) [Zhang et al., 2009] и в козлах (*Capra aegagrus hircus*) [Liang et al., 2012].

Симптоматика дальневосточного клещевого риккетсиоза схожа с СКТ, однако пик заболеваемости смещен на июль [Mediannikov et al., 2004].

### ***R. slovaca***

Впервые *R. slovaca* была выявлена в 1969 г. в Чехословакии и первое время считалась непатогенной [Foldvari et al., 2013]. Позднее этот вид риккетсий был обнаружен у пациентов с синдромом SENLAT/TIBOLA/DEBONEL (scalp eschar and neck lymph adenopathy after a tick bite/ tick-borne lymphadenopathy/ Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy). Переносчиками *R. slovaca* являются клещи рода

*Dermacentor* (основной переносчик *D. marginatus*). Случаи риккетсиоза, вызванные *R. slovaca*, были описаны в Европе (Чехословакия, Испания, Польша, Франция, Португалия, Хорватия, Венгрия, Армения) [Ibarra et al., 2006; Mechai et al., 2009; Parola et al., 2009; de Sausa et al., 2013; Sekeyova et al., 2012; Silva-Pinto et al., 2014]. На территории России этот вид был выявлен только в клещах в Воронежской области и в Ставропольском Крае [Шпынов и др., 2003]. Клиническая картина имеет ряд особенностей: в большинстве случаев наблюдается увеличение затылочных и/или шейных лимфоузлов (по-видимому, это связано с тем, что укусы клещей *D. marginatus* часто отмечены на голове); лихорадка и сыпь выявляются редко, в некоторых случаях наблюдается эритема на месте укуса [Ibarra et al., 2006, Silva-Pinto et al., 2014].

### ***R. raoultii***

В 1999 году в Астраханской области и в республике Алтай были выявлены в клещах три новых генетических варианта риккетсий: *Rickettsia* sp. RpA4, *Rickettsia* sp. DnS14 и *Rickettsia* sp. Dns28 [Rydkina, 1999]. В 2008 г. на основании генетических и серологических характеристик было показано, что эти геноварианты относятся к одному виду, который в честь французского риккетсиолога Didier Raoult был назван *R. raoultii* [Mediannikov, 2008]. В настоящее время показано, что этот вид риккетсий распространен в клещах в Европе (Франция, Германия, Испания), в Азии, в Северной Африке [Foldvari et al., 2013; Ibarra et al., 2006; Kohn et al., 2018; Parola et al., 2009]. В России этот вид риккетсий был выявлен в клещах в Новосибирской, Омской, Амурской областях, Алтайском, Хабаровском, Приморском краях [Mediannikov et al., 2008; Shryunov et al., 2004, 2006b]. Основными переносчиками *R. raoultii* являются клещи рода *Dermacentor*, причем уровень инфицированности может превышать 75% [Shryunov et al., 2006b]. Кроме того, этот вид риккетсий выявляется в *Rhipicephalus pumilio*, а в единичных случаях - в клещах *H. concinna* и *I. persulcatus* [Shryunov et al., 2006b].

До недавнего времени этот вид риккетсий считался непатогенным. Начиная с 2014 г., было описано несколько случаев обнаружения ДНК *R. raoultii* в образцах пациентов, госпитализированных после укуса клещами в Китае [Jia et al., 2014; Li et al., 2018]. Кроме того, возможная роль *R. raoultii* как этиологического агента клещевых риккетсиозов была показана в ряде работ европейских и российских

ученых. Так, серологическими методами были выявлены антитела к антигенам *R. raoultii* у пациентов в Польше, Франции и России [Рудаков и др., Parola et al., 2013; Rudakov et al., 2015; Switaj et al., 2012]. ДНК *R. raoultii* была выявлена в клещах, снятых с пациентов с синдромом (TIBOLA) во Франции, а также в клещах, снятых с пациентов с лимфаденитом и с пациента с эритематозной реакцией в России [Parola et al., 2013; Rudakov et al., 2015].

По опубликованным данным, риккетсиоз, вызванный *R. raoultii*, в некоторых случаях протекает бессимптомно, но может происходить развитие инфекции разной степени тяжести. Клиническая симптоматика также варьирует; может наблюдаться синдром SENLAT/TIBOLA/DEBONEL, а также неспецифические проявления: сыпь вокруг места укуса, эритематозная реакция, менингеальные проявления. Макуло-папулезная сыпь и первичный аффект выявляется лишь в единичных случаях. [Jia et al., 2014; Li et al., 2018; Parola et al., 2009].

### ***R. helvetica***

Впервые *R. helvetica* была обнаружена в клещах *I. ricinus* в Швейцарии [Beati et al., 1993]. Позднее риккетсии этого вида были выявлены в клещах *I. ricinus* во многих европейских странах, в некоторых странах Африки и Азии, а также в клещах *I. persulcatus* в России, Эстонии и Японии [Kartashov et al., 2014; Katargina et al., 2015; Shpynov et al., 2006]. На территории России *R. helvetica* была обнаружена в Омской области и Республике Коми [Kartashov et al., 2014; Shpynov et al., 2006]. ДНК *R. helvetica* была также выявлена в образцах тканей диких животных в Европе (ежи, ящерицы, мыши, олени, диких кабаны) [de Sousa et al., 2012; Sprong et al., 2009].

Первое время *R. helvetica* считали непатогенной, однако позднее у пациентов в Швеции были отмечены случаи заболеваний, связанных с этим видом риккетсий. Для риккетсиоза, вызванного *R. helvetica*, характерен широкий спектр клинических проявлений: лихорадка чаще без сыпи, описаны случаи перимиокардита, менингита и саркоидоза [Fournier et al., 2000, 2004; Nilsson et al., 1999, 2002, 2010; Oteo and Portillo, 2012].

### ***R. aeschlimannii***

В 1997 г. *R. aeschlimannii* была впервые выявлена в клещах *Hyalomma marginatum marginatum* в Марокко [Beati et al., 1997]. В 2002 г. был описан первый случай заболевания, вызванного *R. aeschlimannii* у туриста, вернувшегося из Африки

[Raoult, 2002]. В настоящее время заболевание регистрируется в Африке (Марокко, Алжир) и в Европе (Греция) [Germanakis et al., 2013; Raoult et al., 2002; Bitam et al., 2006; Pretorius et al., 2002; Mokrani et al., 2008]. Кроме того, *R. aeschlimannii* выявляется в клещах *Haemaphysalis punctata* в Казахстане (Алма-атинская область) и в клещах *H. marginatum marginatum* в Ставропольском крае и в Крыму [Карташов 2017; Shryunov et al., 2009a]. Симптоматика заболевания, вызванного *R. aeschlimannii*, типична для клещевых риккетсиозов, однако были описаны случаи без сыпи [Germanakis et al., 2013; Pretorius et al., 2002; Raoult et al., 2002].

### ***R. monacensis***

*R. monacensis* выявляется в клещах *I. ricinus* в Европе (Испании, Португалии, Италии, Швейцария, Люксембург, Германия и др.), Турции и Северной Африке [Maioli et al., 2012; Parola et al., 2013]. В России этот вид обнаружен в европейской части России: в клещах *I. ricinus* в Калининградской области и в клеще *H. punctata* на полуострове Крым [Карташов, 2017; Movila et al., 2011]. Случаи инфекций, вызванных с *R. monacensis* были описаны у пациентов в Испании и Италии. Заболевание сопровождалось типичными для клещевых риккетсиозов признаками, хотя выявлялись и случаи без первичного аффекта или без сыпи [Jado et al., 2007; Madeddu et al., 2012].

### **“*Candidatus R. tarasevichiae*”**

“*Candidatus R. tarasevichiae*” были впервые выявлены в клещах *I. persulcatus* в 2003 г. на территории России (Южный Урал, Западная и Восточная Сибирь) [Shryunov et al., 2003]. В настоящее время показано широкое распространение этого вида риккетсий в клещах *I. persulcatus* во многих изученных регионах России. “*Candidatus R. tarasevichiae*” распространены в Челябинской, Омской, Новосибирской, Тюменской, Красноярской, Томской областях, в Красноярском, Алтайском, Хабаровском и Приморском краях и Республика Коми [Kartashov et al., 2017; Shryunov et al., 2006;]. Уровень инфицированности варьирует и может достигать в некоторых областях 60% [Shryunov et al., 2006].

До недавнего времени “*Candidatus R. tarasevichiae*” считались непатогенными, однако недавно ДНК данного вида риккетсий была обнаружена в образцах 61 пациента в Китае [Jia et al., 2013; Liu et al., 2016]. Было описано несколько летальных случаев инфекции. Как правило, при риккетсиозе, вызванном “*Candidatus R.*

tarasevichiae”, отсутствует характерная для клещевых риккетсиозов симптоматика: первичный аффект и лимфаденопатия выявляются очень редко, сыпь – в единичных случаях, у некоторых пациентов описаны менингеальные проявления.

#### “*Ca. R. principis*” и “*Ca. R. rara*”

Два новых кандидатных вида “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*” были впервые выявлены в Хабаровском крае в 2006 г., в клещах *H. japonica* и *H. concinna*, соответственно [Mediannikov et al., 2006; (DQ365805)]. Позднее “*Candidatus R. rara*” был обнаружен в клещах *H. concinna*, *Dermacentor nuttalli* и *Dermacentor silvarum* в Китае (KP965740; KM386688; KT037688). Патогенность этих кандидатных видов пока не изучена.

### 1.7.6. Клещевые риккетсиозы на территории РФ

Клещевые риккетсиозы широко распространены на территории азиатской части России: в Западной и Восточной Сибири и на Дальнем Востоке. Больше всего случаев риккетсиозов зарегистрировано в Республике Алтай и Алтайском Крае: 70-88 и 21-27 случаев на 100 тыс. населения, соответственно (данные за 2014-2016 гг. (<http://www.rospotrebnadzor.ru/>)). В Новосибирской области количество официально зарегистрированных случаев клещевого риккетсиоза вырос за последние несколько лет с 3.3 до 9.5 случаев на 100 тыс. населения (<http://www.rospotrebnadzor.ru/>).

До недавнего времени считалось, что единственным клещевым риккетсиозом, распространенным на территории азиатской части России, является СКТ, этиологическим агентом которого является *R. sibirica* [Rudakov et al., 2006]. Однако в большинстве случаев этиологические агенты клещевых риккетсиозов не были идентифицированы молекулярно-генетическими методами. Насколько нам известно, только для трех штаммов *R. sibirica*, изолированных в 1954-1966 гг. от пациентов с СКТ из Новосибирской области и с Алтая, видовая принадлежность была подтверждена секвенированием [Shrynov et al., 2006a]. Кроме того, ДНК *R. sibirica* была выявлена в образцах крови и первичных аффектов 44 пациентов из Алтайского края [Dedkov et al., 2017; Shrynov et al., 2009].

За последнее десятилетие было показано, что *R. heilongjiangensis* также является возбудителем клещевых риккетсиозов в России [Mediannikov et al., 2004]. ДНК *R. heilongjiangensis* была выявлена в образцах крови и первичных аффектов 17

пациентов из Хабаровского края [Mediannikov et al., 2004, 2006]; кроме того, штаммы *R. heilongjiangensis* были изолированы из шести клинических образцов [Mediannikov et al., 2009]. Основываясь на данных Медяникова за 2004-2009 гг., можно предположить, что дальневосточный клещевой риккетсиоз является основным риккетсиозом у людей на Дальнем Востоке [Mediannikov et al., 2006]. Однако СКТ также может быть диагностирован у людей на этой территории. Так, при анализе 40 образцов крови пациентов, госпитализированных в 2012 г. на той же территории, ДНК *R. sibirica* была обнаружена в двух образцах, тогда как ДНК *R. heilongjiangensis* – только в одном образце [Бондаренко и др., 2014]. Позднее ДНК *R. heilongjiangensis* была выявлена в образце крови пациента в Алтайском крае [Granitov et al., 2015]. Поскольку клинические проявления риккетсиозов, вызванных *R. sibirica* и *R. heilongjiangensis* схожи, то идентификация возбудителя заболевания возможна лишь при использовании молекулярно-генетических методов.

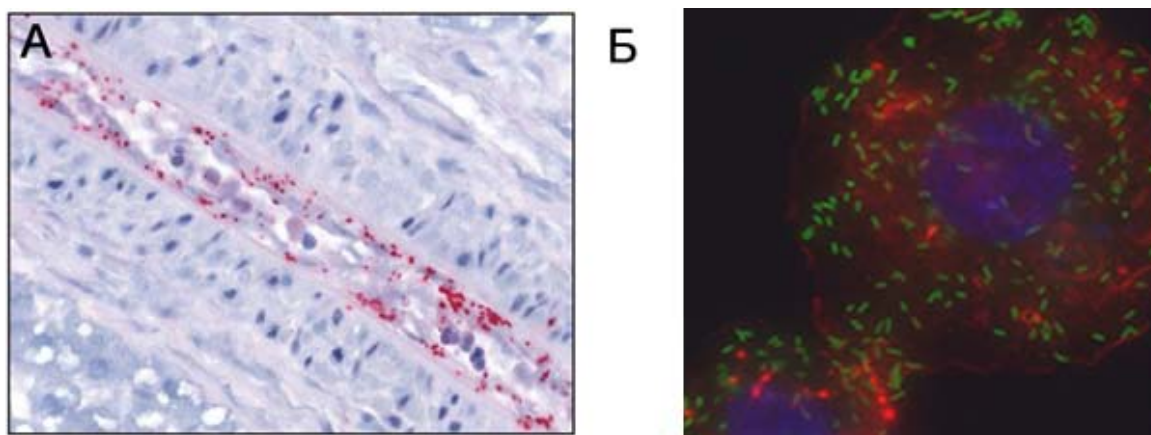
В европейской части России регистрируют АПЛ, в основном, в Астраханской области. В 2011 г. показатель заболеваемости составил 21,5 на 100 тыс. населения [Рудаков, 2016].

### **1.7.7. Клинические проявления риккетсиозов**

Симптомы клещевых риккетсиозов обычно включают высокую температуру, головную и мышечную боль, розеолезно-папулезную сыпь, региональный лимфаденит и первичный аффект на месте укуса [Рудаков, 2016]. Однако клинические проявления могут отличаться в зависимости от вида возбудителя, вызывающего заболевание. Так, например, при пятнистой лихорадке скалистых гор практически не бывает первичного аффекта; некоторые риккетсиозы чаще всего протекают без сыпи (риккетсиозы, вызванные “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. raoultii*, *R. slovaca*), а некоторые сопровождаются нетипичными для риккетсиозов признаками, такими, как перимиокардит, менингит, саркоидоз (риккетсиоз, вызванный *R. helvetica*) [Nilsson et al., 1999, 2002, 2010].

Заражение клещевыми риккетсиозами происходит вследствие присасывания зараженного клеща, когда риккетсии со слюной попадают в организм человека. Большинство риккетсий группы КПЛ сначала размножаются в месте укуса (из-за этого образуется корочка – первичный аффект), затем риккетсии лимфогенно

попадают в региональные лимфоузлы (формируется лимфаденит, лимфаденопатия), а потом попадают в кровь [Рудаков, 2016]. Риккетсии преимущественно поражают клетки эндотелия кровеносных сосудов органов и тканей, но могут поражать макрофаги и гепатоциты (Рис. 1-12).



**Рисунок 1-12.** А. *R. rickettsii* (красным) в клетках эндотелия сосуда (US Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention (2016) (<https://mechpath.com/2017/12/11/rickettsia-rickettsii/>)). Б. *R. conorii* (зеленым) в макрофагах [Curto et al., 2016].

Процесс заселения риккетсиями организма теплокровных животных сопровождается генерализованным поражением эндотелия сосудов, что обуславливает последующее многообразие клинических проявлений болезни. Развиваются различной выраженности эндovasкулиты и тромбангииты. Повышение проницаемости сосудов приводит к отеку жизненно важных органов. По мере внутриклеточного размножения риккетсий и разрушения инфицированных клеток развивается инфекционно-токсический синдром. Появляются и нарастают лихорадочная реакция, симптомы токсикоза, нарушается функция сердечно-сосудистой системы, на слизистых оболочках и на коже формируется сыпь различной выраженности и продолжительности, резко нарушается субъективное состояние больного. При отсутствии специфического лечения (антибиотикотерапии) некоторые риккетсиозы могут в 5-20% закончиться летальным исходом [Лобан и др., 2002].

Самым распространенным клещевым риккетсиозом на территории РФ является СКТ. Для СКТ характерно доброкачественное течение заболевания, поскольку *R.*

*sibirica* поражает преимущественно клетки эндотелия сосудов кожи [Рудаков и Оберт, 2011]. Инкубационный период составляет в среднем от 3 до 7 дней. Одним из первых признаков СКТ является первичный аффект в месте укуса и региональный лимфаденит (Рис. 1-13). Заболевание сопровождается подъемом температуры, головной и мышечной болью. Сыпь появляется позже, в среднем на 2 -5 день заболевания [Злобин и др., 2015]. Вначале появляются розеолезные элементы, позже выявляются папулы, на 4-5 день сыпь становится пурпурно-красной, потом становится бурой и переходит в пигментацию. Исчезает сыпь на 12-16-й день заболевания, но длительное время сохраняется пигментация [Рудаков, 2016].



**Рисунок 1-13.** Характерные симптомы клещевых риккетсиозов: А. Первичный аффект [Kirschner et al., 2005]. Б. Лимфаденопатия [Lakos, 2002]. В. Сыпь [Parola et al., 2013].

Изменения со стороны периферической системы крови у больных, страдающих от риккетсиозов, довольно разнообразные [Рудаков, 2016; Drancourt et al., 1990]. Число лейкоцитов обычно близко к норме, что отличает риккетсиозы от других бактериальных инфекций, сопровождающихся лейкоцитозом [Jensenius et al., 2003a]; однако в ряде случаев отмечены изменения со стороны периферической крови [Рудаков и Оберт, 2011]. Уровень ферментов печени (аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы), как правило, увеличен. Кроме того, у значительного числа пациентов отмечается повышенное содержание С-реактивного белка в сыворотке [Jensenius et al., 2003b].

Иногда заболевание может протекать без одного из главных симптомов болезни – сыпи. Отсутствие сыпи может быть объяснено сниженной вирулентностью риккетсий, либо гибелью основного количества риккетсий в месте их внедрения в



организм, вследствие чего развивается незначительная риккетсиемия. Кроме того, выявляются случаи, при которых не удается обнаружить первичный аффект и регионарный лимфаденит. Однако отсутствие этих признаков не исключает наличия заболевания [Возианова 2001].

Лечение клещевых риккетсиозов проводится антибиотиками тетрациклинового ряда (доксциклин). Также показана чувствительность риккетсий к левомицетину, рифампицину, фторхинолам [Рудаков, 2016].

У переболевших риккетсиозами группы КПЛ вырабатывается стойкий иммунитет, причем не только к возбудителю, вызвавшему заболевание, но и к другим видам риккетсий группы КПЛ. Рецидивов не наблюдается [Еремеева и др., 2014].

### **1.7.8. Методы диагностики риккетсиозов**

Диагностика риккетсиозов при наличии специфичной симптоматики не вызывает затруднений. Однако наличие нетипичной симптоматики в ряде случаев (отсутствие сыпи, необильная или нехарактерная сыпь, отсутствие первичного аффекта) может приводить к постановке ошибочного диагноза [Sexton and Corey, 1992].

Для диагностики клещевых риккетсиозов существуют иммунологические и молекулярные-генетические методы.

Иммунологические методы являются наиболее традиционными подходами к диагностике риккетсиозов. В соответствии с отечественными рекомендациями для группоспецифической идентификации риккетсиозов используют реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) и иммуноферментный анализ (ИФА). Однако в настоящее время лицензированные наборы для выявления антител к риккетсиям не выпускаются [Рудаков, 2015].

В течение долгого времени выявление специфических антител у больных клещевым риккетсиозом в России осуществлялось с помощью метода РСК. В России для диагностики риккетсиозов группы КПЛ использовали РСК с растворимым антигеном *R. sibirica*, поскольку самым распространенным риккетсиозом является СКТ. Следует заметить, что использование РСК не обеспечивает четкую видовую дифференциацию внутри групп СТ и КПЛ, хотя титры антител обычно бывают выше к гомологичному антигену. Кроме того, метод недостаточно чувствителен в ранней

фазе заболевания [Рудаков, 2015]. РНИФ считается золотым стандартом для серодиагностики риккетсиозов [Лобан и др., 2002]. Данный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью, требует небольших затрат времени и экономичен [Еремеева и др., 2014; Лобан и др., 2002; Рудаков, 2015].

Помимо РСК и РНИФ, в настоящее время получил распространение метод иммуноферментного анализа (ИФА), известный также как метод ELISA. Этот метод чаще используется в экспериментальных исследованиях и в меньшей степени для диагностики [Рудаков, 2015]. Преимуществом ИФА в определении антител является возможность использования в качестве антигена как растворимых, так и корпускулярных фракций возбудителей. Кроме того, метод ИФА обладает высокой чувствительностью и специфичностью, и он экономичен [Рудаков и Оберт, 2011].

Для достоверности результатов в иммунологических исследованиях используются парные сыворотки, взятые с интервалом в одну – две недели [Рудаков, 2016; Еремеева и др., 2014; Mediannikov, 2004]. Обычно антитела к риккетсиям начинают выявляться на 7-10 день заболевания, в последующем титры антител растут, достигая максимума на конец третьей - начало четвертой недели заболевания с момента появления клинических симптомов [Рудаков, 2016; Dantas-Torres et al., 2007]. Однако в случае менее вирулентных риккетсий, как например *R. africae* и *R. slovaca*, антитела могут не выявляться до 25–28 дня после начала заболевания [Еремеева и др., 2014; Brouqui et al., 2004; Fournier et al., 2002]. Кроме того, на примере *R. africae* показано, что лечение антибиотиками может предотвращать появление антител [Fournier et al., 2002].

Несмотря на постоянное совершенствование иммунологических методов, положительные результаты у большинства больных могут быть получены лишь на второй неделе болезни [Лобан и др., 2002]. Таким образом, иммунологические методы больше подходят для подтверждения диагноза, чем для его постановки.

Для диагностики риккетсиозов на ранних стадиях заболевания целесообразнее использовать молекулярно-генетические методы. Для выявления риккетсий в клинических образцах применяются ПЦР (с последующим секвенированием) и ПЦР в режиме реального времени. Молекулярно-генетические методы – это чувствительные, специфичные и быстрые методы, позволяющие выявлять единичные риккетсии. Кроме того, молекулярно-генетические методы позволяют осуществить

тонкую межвидовую дифференциацию возбудителей [Лобан и др., 2002]. Клинические образцы, используемые для ПЦР-тестирования, включают цельную кровь, сгустки крови, биоптат кожи и патологические образцы [Brouqui et al., 2004; Charman et al., 2006]. Есть данные о детекции риккетсий с использованием ПЦР в моче и сыворотке больных [Leitner et al., 2002; Sexton et al., 1994]. Однако использование ПЦР для диагностики клещевых риккетсиозов в образцах крови ограничено из-за короткого времени риккетсиемии и недостаточно высокого числа риккетсий, циркулирующих в крови [Biggs et al., 2016; Levin et al., 2016; Liu et al., 2011]. Молекулярно-генетические методы представляются более пригодными для обнаружения риккетсий в биоптатах кожи или в образцах тканей [Biggs et al., 2016; Charman et al., 2016].

В настоящее время многие исследователи широко используют молекулярно-генетические методы, поскольку они позволяют решить филогенетические, популяционные и эпидемиологические вопросы. С помощью молекулярно-генетических методов осуществляется выявление новых патогенов и новых инфекционных заболеваний [Tarasevich, 2003].

### **1.8. Заключение**

Риккетсии – облигатные внутриклеточные грамотрицательные бактерии, которые могут вызывать трансмиссивные инфекции человека [Parola et al., 2013; Raoult et al., 2004]. Переносчиками риккетсий являются членистоногие, в том числе иксодовые клещи, которые, вследствие способности к трансфазовой и трансвариальной передаче риккетсий, служат также природными резервуарами возбудителя [Балашов и Дайтер, 1973]. По степени патогенности риккетсии представлены широким спектром микроорганизмов - от симбионтов клеток эукариот, риккетсий с недоказанной патогенностью и до общепризнанных возбудителей инфекций. В последнее время количество выявленных видов риккетсий растет, чему во многом способствуют широкое использование клеточных культур и развитие специфических и чувствительных молекулярно-генетических методов [Merhej et al., 2011, 2014; Oteo et al., 2012; Rydkina et al., 1999; Shpynov et al., 2003]. Все чаще появляются данные о патогенности видов риккетсий, ранее считавшихся непатогенными [Jia et al., 2013, 2014].

На территории России циркулируют несколько видов риккетсий: *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica*, *Rickettsia conorii* subsp. *caspia*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia helvetica* и *Rickettsia raoultii*, а также кандидатные виды “*Candidatus R. tarasevichiae*”, “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*” [Eremeeva et al., 2006, 2007; Kartashov et al., 2017; Mediannikov et al., 2006, 2008; Rydkina et al., 1999; Shpynov et al., 2003, 2004, 2006].

Официально в России регистрируют заболеваемость СКТ, вызываемым *R. sibirica* subsp. *sibirica*, и АПЛ, вызываемой *R. conorii* subsp. *caspia* [Рудаков, 2016]. Кроме того, случаи клинически схожие с клещевым риккетсиозом, но вызванные *R. heilongjiangensis*, были ретроспективно выявлены в Хабаровском крае [Medyannikov et al., 2006]; один такой случай был зарегистрирован в Алтайском крае [Granitov et al., 2014]. Все остальные виды риккетсий, циркулирующие на территории России, в том числе и патогенные, до начала выполнения данной работы были выявлены только в клещах с помощью молекулярно-генетических методов.

Поскольку этиологические агенты клещевых риккетсиозов в подавляющем большинстве случаев не были подтверждены молекулярно-генетическими методами, нельзя исключить, что на территории России риккетсиозы у людей могут быть вызваны и другими видами риккетсий.

Современные сведения о распространении риккетсий в клещах на территории РФ очень ограничены. Большинство имеющихся данных были получены десять и более лет назад и на небольших выборках клещей. При этом во всем мире меняется представление о распространении и патогенности некоторых видов риккетсий, обнаруживаются новые *Rickettsia* spp. и новые клещевые риккетсиозы. Таким образом, изучение распространения и видового разнообразия риккетсий в клещах и клинических образцах является необходимым для оценки эпидемической ситуации, а также для профилактики заболеваемости клещевыми риккетсиозами на территории России.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

**Реактивы:** агароза (Sigma, США), бромистый этидий (Serva, Германия), бромфеноловый синий (Reanal, Венгрия), минеральное масло (ICN, США), гуанидинизотиоционат (Appli Chem GmbH, Германия), дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты (dNTP) (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск), крезоловый красный (ICN, США), маркер длины 1 Kb DNA Ladder (SibEnzyme, Россия), Sephadex G-50 Fine DNA Grade (Amersham Biosciences, США), *Taq* ДНК-полимераза (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск), Tween 20 (Ferak, Германия), трис-оксиметил аминотетан гидрохлорид (Трис-НСl, ICN, США), этилендиамин N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (ЭДТА, Serva, Германия), тритон X-100 (ЛКВ, Швеция).

**Готовые коммерческие наборы:** «Проба НК» (ДНК-технология, Москва), “BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, США), “BigDye Terminator 5x Sequencing Buffer” (Applied Biosystems, США), *Rickettsia conorii* ELISA IgG/IgM kit (Vircell, Spain), GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit (Amersham Biosciences, США), MagNa Lyser GreenBeads (Roche Diagnostics, Switzerland).

### 2.2. Буферы и основные растворы

#### Растворы для проведения электрофореза:

20xTBE - 1 М Трис, 1 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 40 мМ ЭДТА, pH 8,0

50x TAE - 2 М Трис-ацетат, pH 7,6 50 мМ ЭДТА.

**5x буфер для ПЦР** – 0,335 М Трис-НСl pH 8,9, 88 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,05% Tween 20, 25% глицерин, 0,1% крезоловый красный

#### Растворы для выделения нуклеиновых кислот:

Лизирующий буфер: 4 М гуанидин тиоционат, 0,1 М Трис-НСl pH 6,4, 0,045 М ЭДТА pH 8,0, 1,3% Тритон X-100

### 2.3. Медико-биологические образцы

#### 2.3.1. Иксодовые клещи

Использованные в данной работе клещи были любезно предоставлены к.б.н. Н.Н. Ливановой, к.б.н. В.В. Пановым (Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск), Н.П. Высочиной, к.б.н. Н.М. Пуховской, Л.И. Ивановым

(Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора, г. Хабаровск). а также д.б.н. В.В. Якименко (ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций»).

Все места сбора клещей представляли собой участки хвойно-лиственных или смешанных лиственных лесов. Клещи (n=3849) были собраны на 21 участках, расположенных на территории Дальнего Востока (Рис. 2-1, Табл. 2-1) и Западной Сибири (Рис. 2-1, Табл. 2-2):

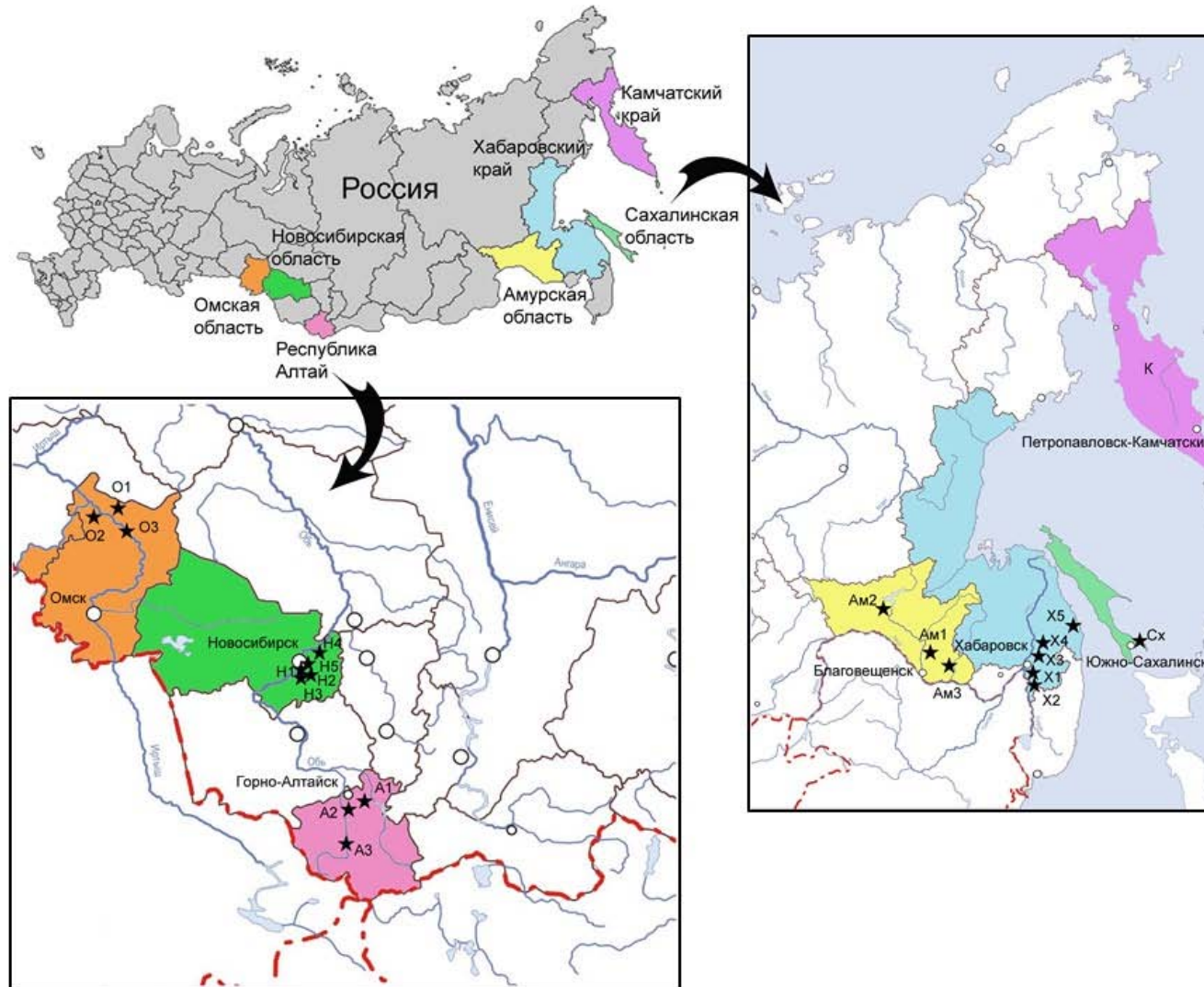
1). Хабаровский край, Дальний Восток. Всего 1195 клещей, относящихся к видам *I. persulcatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis japonica* и *Dermacentor silvarum*, были собраны в 2005 - 2014 годах.

Участок Х1 расположен в 25 км к югу от Хабаровска в хвойно-широколиственном лесу на территории Большехехцирского лесного заповедника. Иксодовые клещи представлены четырьмя видами: *I. persulcatus*, *H. concinna*, *H. japonica*, *D. silvarum* с существенным доминированием *I. persulcatus* - 83%. Для исследования было взято 347 клещей: *D. silvarum* (n=83), *H. concinna* (n=58) и *H. japonica* (n=206).

Участок Х2 расположен в 180 км к югу от Хабаровска. Участок представляет смешанный кедрово-широколиственный лес, популяция клещей представлена четырьмя видами с преобладанием *I. persulcatus* (65.7%). Сбор клещей проводили в Бикинском районе, вблизи населенного пункта (п. Лермонтовка). Для исследования было взято 175 клещей: *I. persulcatus* (n=100), *D. silvarum* (n=30), *H. concinna* (n=3) и *H. japonica* (n=42).

Участок Х3 расположен в 50 км к северо-востоку от Хабаровска. Участок представляет лиственнично-березовый лес, популяция клещей представлена тремя видами: *I. persulcatus*, *H. concinna*, *H. japonica*. Сбор клещей проводили на расстоянии 5 км от п. Чичаговка. Для исследования было взято 293 клещей: *I. persulcatus* (n=31), *H. concinna* (n=153) и *H. japonica* (n=109).

Участок Х4 расположен на расстоянии 96 км к северо-востоку от Хабаровска. Участок представляет смешанный широколиственный лес. Популяция клещей представлена тремя видами: *I. persulcatus*, *H. concinna*, *H. japonica* с доминированием *H. concinna*. Для исследования было взято 144 клещей: *I. persulcatus* (n=100), *H. concinna* (n=27) и *H. japonica* (n=17).



**Рисунок 2-1.** Места сбора клещей на территории Западной Сибири (Новосибирская и Омская области, республика Алтай) и Дальнего Востока (Хабаровский и Камчатский край, Амурская и Сахалинская области). Звездочками отмечены участки, где проводился сбор клещей.

Участок Х5 расположен вблизи поселка Ванино. Участок представляет хвойно-широколиственный лес. Популяция клещей представлена одним видом - *I. persulcatus*. Для исследования было взято 236 клещей *I. persulcatus*.

2). Амурская область, Дальний Восток. Всего 198 *H. concinna* и 75 *D. silvarum* были собраны в 2011 году.

Участок Ам1 расположен в Мазановском районе. Иксодовые клещи представлены видами: *I. persulcatus*, *H. concinna*, *H. japonica*, *D. silvarum*. Для исследования было взято 97 клещей: *D. silvarum* (n=75), *H. concinna* (n=22).

Участок Ам2 расположен в Магдагачинском районе, в 440 км к северо-западу от г. Благовещенска. Участок представляет смешанный хвойно-лиственный лес. Популяция клещей на данном участке представлена *I. persulcatus*, *H. concinna*, с доминированием *H. concinna*. Отмечены единичные находки *D. silvarum*. Сбор клещей проводили вблизи населенного пункта (п. Дактуй). Для исследования было взято 84 *H. concinna*.

Участок Ам3 расположен в Архаринском районе, в 210 км к востоку от Благовещенска. Участок представляет редколесье, смешанный широколиственный лес. Популяция клещей на данном участке представлена *H. concinna*, отмечены единичные находки *I. persulcatus*. Сбор клещей проводили вблизи населенного пункта (село Черниговка). Для исследования было взято 92 *H. concinna*.

3). Камчатский край, Дальний Восток. Клещи были собраны с растительности и сняты с людей в 2005-2006 гг. на территории Камчатского края (К). Для исследования было взято 60 клещей *I. persulcatus*.

4). Сахалинская область, Дальний Восток. Голодные имаго были собраны на флаг в 2011 г. на одном участке (Сх). Биотоп представлен хвойно-широколиственным лесом. Для исследования было взято 137 клещей *I. persulcatus*.

5). Новосибирская область, Западная Сибирь. Всего 966 клещей рода *Ixodes* и *Dermacentor reticulatus* были собраны в 2010, 2014 и 2015 годах на пяти участках, расположенных как в окрестностях Новосибирска и Новосибирского научного центра, так и в отдаленных от города участках.

Участок Н1 расположен в хвойно-лиственном лесу на территории Центрального Сибирского Ботанического Сада. Для исследования было взято 385 клещей: *I. persulcatus* (n=22), *I. pavlovskyi* (n=316) и гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi*



(n=47).

Участок Н2 расположен в хвойно-лиственном лесу, пойма реки Зырянка. Для исследования было взято 27 клещей: *I. pavlovskyi* (n=22) и гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi* (n=5).

Участок Н3 расположен в хвойно-лиственном лесу, устье реки Шадриха. Для исследования было взято 341 клещей: *I. persulcatus* (n=110), *I. pavlovskyi* (n=79) и гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi* (n=152).

Участок Н4 расположен в смешанном лиственном лесу, в окрестностях села Плотниково. Для исследования было взято 140 клещей: *D. reticulatus* (n=80), *I. persulcatus* (n=14), *I. pavlovskyi* (n=22) и гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi* (n=24).

Участок Н5 расположен в хвойно-лиственном лесу, расположенном в окрестностях Нижней Ельцовки. Для исследования было взято 73 клеща: *D. reticulatus* (n=51), *I. persulcatus* (n=3), *I. pavlovskyi* (n=14) и гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi* (n=5).

б) Республика Алтай, Западная Сибирь. Всего 465 клещей рода *Ixodes* и *Dermacentor marginatus* были собраны в 2012-2015 годах на трех участках.

Участок А1 расположен в смешанном хвойно-лиственном лесу в Турочакском районе. Сбор клещей проводили на горных склонах в окрестностях села Артыбаш. Для исследования было взято 50 клещей: *I. persulcatus* (n=33), *I. pavlovskyi* (n=11) и гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi* (n=6).

Участок А2 расположен на территории Центрального Сибирского Ботанического сада, Шебалинский район. Участок представлен смешанным хвойно-лиственным лесом. Сбор клещей проводили на горных склонах. Для исследования было взято 317 клещей: *I. persulcatus* (n=152), *I. pavlovskyi* (n=113) и гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi* (n=52).

Участок А3 расположен на горных склонах перевала Чике-Таман. Сбор клещей проводился в луговых биотопах. Для исследования было взято 98 клещей *D. marginatus*.

Таблица 2-1

## Места сбора клещей на территории Дальнего Востока

Участок	Расположение	Описание биотопа	Координаты	Вид клеща	Н исследованных клещей
<b>Хабаровский край, 2005, 2006, 2011, 2013 и 2014 гг.</b>					
Х1	Большехехцирский заповедник	Хвойно-широколиственный лес	N 48°15' E 135°01'	<i>D. silvarum</i>	83
				<i>H. concinna</i>	58
				<i>H. japonica</i>	206
Х2	Бикинский район	Хвойно-широколиственный лес	N 47°08' E 134°20'	<i>D. silvarum</i>	30
				<i>H. concinna</i>	3
				<i>H. japonica</i>	42
				<i>I. persulcatus</i>	100
Х3	Окрестности озера Петропавловское	Смешанный лиственный лес	N 48°36' E 135°32'	<i>H. concinna</i>	153
				<i>H. japonica</i>	109
				<i>I. persulcatus</i>	31
Х4	с. Сарапульское	Смешанный широколиственный лес	N 48°51' E 135°56'	<i>H. concinna</i>	27
				<i>H. japonica</i>	17
				<i>I. persulcatus</i>	100
Х5	с. Ванино	Хвойно-широколиственный лес	N 49°10' E 140°19'	<i>I. persulcatus</i>	236
<b>Амурская область 2011 г.</b>					
Ам1	Мазановский район	Луг с лиственными деревьями	N 51°24' E 128°22'	<i>D. silvarum</i>	75
				<i>H. concinna</i>	22
Ам2	Магдагачинский район	Хвойно-лиственный лес	N 53°22' E 126°08'	<i>H. concinna</i>	84
Ам3	Архаринский район	Смешанный широколиственный лес	N 49°37' E 129°57'	<i>H. concinna</i>	92
<b>Камчатский край 2005-2006</b>					
К				<i>I. persulcatus</i>	60
<b>Сахалинская область, 2011 г.</b>					
Сх	Корсаковский район	Хвойно-широколиственный лес	N 46°53' E 142°55'	<i>I. persulcatus</i>	137
<b>Всего клещей</b>					<b>1665</b>

N- количество клещей

Таблица 2-2

## Места сбора клещей на территории Западной Сибири

Участок	Расположение	Описание биотопа	Координаты	Вид клеща	№ исследованных клещей
<b>Новосибирская область 2010, 2014 и 2015 гг.</b>					
Н1	Ботсад, Советский район	Хвойно-лиственный лес	N 54°48' E 83°07'	<i>I. persulcatus</i>	22
				<i>I. pavlovskyi</i>	316
				<i>I. per/I. pav</i>	47
Н2	р. Зырянка, Советский район	Хвойно-лиственный лес	N 54°50' E 83°05'	<i>I. pavlovskyi</i>	22
				<i>I. per/I. pav</i>	5
Н3	Шадриха Новосибирский район	Хвойно-лиственный лес	N 54°46' E 83°09'	<i>I. persulcatus</i>	110
				<i>I. pavlovskyi</i>	79
				<i>I. per/I. pav</i>	152
Н4	с. Плотниково, Новосибирский район	Смешанный лиственный лес	N 55°00' E 83°24'	<i>I. persulcatus</i>	14
				<i>I. pavlovskyi</i>	22
				<i>I. per/I. pav</i>	24
				<i>D. reticulatus</i>	80
Н5	Нижняя Ельцовка	Хвойно-лиственный лес	N 54°53' E 83°08'	<i>I. persulcatus</i>	3
				<i>I. pavlovskyi</i>	14
				<i>I. per/I. pav</i>	5
				<i>D. reticulatus</i>	51
<b>Республика Алтай 2012-2015 гг.</b>					
А1	Пос Артыбаш, Турачакский район	Хвойно-лиственный лес	N 51°47' E 87°18'	<i>I. persulcatus</i>	33
				<i>I. pavlovskyi</i>	11
				<i>I. per/I. pav</i>	6
А2	Ботсад, Шебалинский район	Хвойно-лиственный лес	N 51°36' E 85°48'	<i>I. persulcatus</i>	590
				<i>I. pavlovskyi</i>	113
				<i>I. per/I. pav</i>	52
А3	Чике-Таман	Луг	N 50°38' E 86°18'	<i>D. marginatus</i>	98
<b>Омская область 2011, 2012, 2014, 2015, 2018</b>					
О1	Тевризский район	Смешанный лиственный лес	N 54°38' E 73°03'	<i>I. persulcatus</i>	136
				<i>I. persulcatus*</i>	12
				<i>I. trianguliceps*</i>	19
О2	Большеуковский район	Смешанный лиственный лес, луг	N 57°16' E 72 °21'	<i>I. persulcatus</i>	221
				<i>I. persulcatus*</i>	4
				<i>I. trianguliceps*</i>	22
				<i>I. apronophorus*</i>	15
О3	Знаменский район	Смешанный лес	N 57°23' E 73°40'	<i>I. persulcatus</i>	396
<b>Всего клещей</b>					<b>2184</b>

№ – количество клещей; \* клещи снятые с мелких млекопитающих;

*I. per/I. pav* – межвидовые гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi*

7) Омская область, Западная Сибирь. Всего 753 клеща *I. persulcatus* было собрано с растительности в 2011-2018 годах на трех участках. С мелких млекопитающих были сняты 72 клеща *Ixodes* spp. (*I. persulcatus*, *I. trianguliceps* и *I. apronophorus*).

Участок О1 расположен в смешанном лесу в Тевризском районе. Для исследования было взято 136 собранных на флаг имаго *I. persulcatus*, а также 12 нимф *I. persulcatus* и 19 нимф и имаго *I. trianguliceps*, снятых с мелких млекопитающих.

Участок О2 расположен на территории Большеуковского района. Сбор клещей проводили в смешанном лиственном лесу, лугу и болотистых участках. Для исследования было взято 221 собранных на флаг имаго *I. persulcatus*; а также 4 нимфы *I. persulcatus*, 22 нимф и имаго *I. trianguliceps* и 15 нимф и имаго *I. apronophorus*, снятых с мелких млекопитающих.

Участок О3 расположен в Знаменском районе. Сбор клещей проводили в смешанном лесу. Для исследования было взято 396 собранных на флаг имаго *I. persulcatus*.

### **2.3.2. Клинические образцы пациентов**

Клинические образцы были любезно предоставлены д.м.н. Красновой Е.И., Филимоновой Е.С. и Савельевой М.В. (Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области “Городская инфекционная клиническая больница №1” (ГБУЗ НСО ГИКБ №1))

Для последующего выделения ДНК были собраны клинические образцы от 604 взрослых пациентов ГБУЗ НСО ГИКБ №1, госпитализированных в апреле-сентябре 2016-2017 гг. с признаками инфекционных заболеваний после присасывания или наползания клеща. Кровь объёмом 9 мл собирали в пробирки «Vacurette»-КЗЕ с 0,5 М ЭДТА; для последующего выделения ДНК использовалась лейкоцитарная фракция крови. Образцы цереброспинальной жидкости были взяты у пациентов с признаками менингеального синдрома. Образцы биоптатов были взяты из места укуса при наличии первичного аффекта или эритематозной реакции. Образцы были взяты на 1-2 день после госпитализации до начала этиотропного лечения.

Для последующего проведения ELISA была собрана коллекция сывороток крови от пациентов ГБУЗ НСО ГИКБ №1, с признаками заболеваний переносимых клещами, госпитализированных в апреле-сентябре 2017 г. Были собраны как первые сыворотки, взятые в первые дни после госпитализации (1-2 дня после начала заболевания), так и повторные сыворотки (через 9 и более дней после взятия первых сывороток).

Работа проводилась с одобрения этического комитета ГБУЗ НСО ГИКБ №1.

## **2.4. Выделение ДНК**

### **2.4.1. Выделение ДНК из иксодовых клещей**

Выделение ДНК проводили от каждого клеща индивидуально. Для этого клеща измельчали (MagNA Lyser instrument, Roche), помещали в полипропиленовую пробирку объемом 1.5 мл типа Eppendorf и проводили выделение с использованием коммерческих наборов «Проба НК» (ДНК-технология, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

### **2.4.2. Выделение ДНК из клинических образцов пациентов (крови, ликвора и биоптатов)**

Образцы крови (9 мл) были взяты от каждого из 604 пациентов с использованием Вакуэт-пробирок с ЭДТА. Образцы ликвора (цереброспинальной жидкости) были взяты от 135 пациентов с признаками менингеального синдрома, образцы биоптатов с места укуса – от 19 пациентов. Образцы были взяты на 1-2 день после госпитализации до начала этиотропного лечения.

Образцы крови (9 мл) центрифугировали при 500 g в течение 10 мин для получения четкой границы между плазмой и эритроцитарной фракцией крови. Затем плазму крови переносили в отдельную пробирку и центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. К полученным осадкам добавляли по 100 мкл лейкоцитарной фракции – белого слоя, находящегося между плазмой и эритроцитарной фракцией крови. Затем к полученным суспензиям добавляли по 200 мкл лизирующего буфера, перемешивали и инкубировали при 65°C в течение 10 мин. Суммарную ДНК выделяли из 100 мкл полученного лизата с использованием наборов «Проба НК».

Суммарную ДНК выделяли из 100 мкл ликвора и кожного биоптата с

использованием наборов «Проба НК» согласно инструкции.

## **2.5. Выявление ДНК *Rickettsia* spp. методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

### **2.5.1. Синтетические олигонуклеотиды**

Для проведения ПЦР и определения нуклеотидных последовательностей использовали синтетические олигонуклеотиды приведенные в Таблицах 2-3 и 2-4. Для скрининга образцов на наличие ДНК риккетсий были выбраны праймеры, соответствующие последовательностям гена цитратсинтазы (*gltA*) *Rickettsia* spp., но отличающиеся от соответствующих последовательностей *Wolbachia* spp., *Anaplasma* spp. и *Ehrlichia* spp. Дополнительно были выбраны праймеры из области гена 16S rRNA, и генов поверхностных белков *ompA*, *ompB* и *sca4* *Rickettsia* spp. Кроме того, были выбраны праймеры, специфичные для различных групп и отдельных видов риккетсий, а также для различных видов клещей. Все олигонуклеотиды были синтезированы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск).

### **2.5.2. Постановка ПЦР**

Все реакции амплификации проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 x буфер для ПЦР, 200 мкМ дНТФ, 0,5 мкМ праймеров, 2 ед. акт. Таq-ДНК полимеразы и 2 мкл ДНК (для постановки 1-го раунда ПЦР) или 2 мкл ампликона (для постановки 2-го раунда ПЦР). В качестве отрицательного контроля использовали бидистиллированную воду, а в качестве положительного контроля – ДНК штамма *R. sibirica*, любезно предоставленную Н.В. Рудаковым (Омский НИИ природно-очаговых инфекций), и ДНК *R. helvetica*, выделенную из клещей и охарактеризованную по пяти генам. Протокол проведения ПЦР состоял из 35 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации (94°C, 1 мин), стадию отжига (температура, указанная в Табл. 3, 1 мин) и стадию элонгации (72°C, 1,5 мин).

Видовую принадлежность клещей определяли методом видоспецифичной однораундовой ПЦР. Для установления видовой принадлежности *H. concinna* и *H. japonica* был использован метод видоспецифичной ПЦР с праймерами из области

митохондриального гена цитохромоксидазы (*cox1*) (Табл. 2-3). Видовая принадлежность клещей *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и межвидовых гибридов *I. persulcatus/I. pavlovskyi* была установлена методом ПЦР с видоспецифичными праймерами из области митохондриального гена *cox1*, а также методом ПЦР с праймерами из области внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомальных генов (ITS2) с последующим секвенированием продуктов ПЦР. Видовую принадлежность клещей *I. trianguliceps*, *I. persulcatus*, *I. apronophorus* определяли посредством проведения мультиплексной ПЦР в присутствии одного родоспецифичного и трех видоспецифичных праймеров из области ITS2 (Табл. 2-3).

ДНК риккетсий выявляли с использованием двухраундовой ПЦР в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена *gltA*. Для проведения первого раунда ПЦР были использованы прямой праймер *glt1* и обратный праймер *glt2*, а для проведения второго раунда - прямой праймер *glt3* и обратный праймер *glt4* (Табл. 2-4). Ожидаемая длина продуктов ПЦР составляла 667 н.п.

Для последующего определения нуклеотидных последовательностей других генов риккетсий проводили двухраундовую ПЦР в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена 16S rRNA и генов поверхностных белков *ompA*, *ompB* и *sca4* (Табл. 2-4).

Для выявления риккетсиальных микст-инфекций положительные образцы анализировали с использованием двухраундовой ПЦР с видоспецифичными праймерами, выбранными для широко распространенных видов *Rickettsia* spp. (“*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. raoultii*, *R. helvetica*), и с группоспецифичными праймерами. Из области гена *gltA* были выбраны праймеры видоспецифичные для “*Candidatus R. tarasevichiae*” (группа *R. canadensis*) (RT1 и RT2) и праймеры специфичные для риккетсий группы КПЛ (RH1 и RH3). Из области гена *ompA* были выбраны праймеры видоспецифичные для *R. raoultii* (R1 и R2) и видоспецифичные для *R. sibirica/R. heilongjiangensis* (S1 и S2). Из области гена *ompB* были выбраны праймеры видоспецифичные для “*Candidatus R. tarasevichiae*” (Btar1 и Btar2) и *R. helvetica* (Bh1 и Bh2).

Таблица 2-3

**Синтетические олигонуклеотиды, используемые для установления видовой принадлежности клещей методом однораундовой ПЦР**

Ген	Нуклеотидные последовательности праймеров (5'-3')	Длина ампликона (п.н.)	Температура отжига (°С)	Ссылка
<i>H. concinna</i> cox1	Hc-1 (gracttgagcaggaataactaggrtt) Hc-2 (tgatataaaattgggtcacctcc)	629	57	-
<i>H. japonica</i> cox1	Hj-1 (ggyacttgagctggaatattaggett) Hj-2 (tggataaaattggatccccgcc)	629	57	-
<i>Ixodes</i> sp. ITS2	F-ITS2 (cacactgagcacttactctttg) R1-ITS2 (actggatggctccagtattc)	632	57	Livanova et al., 2015
<i>I. persulcatus</i> cox1	Ixodes-F (acctgatatagctttccctcg) Ipers-R (ttgattcctgttgaacagc)	690	55	Ткачев и Ливанова, 2012
<i>I. pavlovskyi</i> cox1	Ixodes-F (acctgatatagctttccctcg) Ipav-R (taatccccgtggggacg)	689	55	Ткачев и Ливанова, 2012
<i>Ixodes</i> spp. ITS2	dITS29 (ccttcccgtggcttcgtctgt)		60	Varv et al., 2017
<i>I. trianguliceps</i> ITS2	IT_rev (cggcaatcgaacgacgt)	222		
<i>I. persulcatus</i> ITS2	IP_rev (ctgtacatccgtccatttaggc)	412		
<i>I. apronophorus</i> ITS2	IA_rev (tggcgaagatcatttgagttg)	706		



Таблица 2-4

Синтетические олигонуклеотиды, используемые для выявления *Rickettsia* spp. методом двухраундовой ПЦР

Ген	Раунд	Нуклеотидные последовательности праймеров (5'-3')	Длина ампликона (п.н.)	Температура отжига (°C)
<i>Rickettsia</i> spp. <i>gltA</i>	первый	<i>glt1</i> (gattgctttacttacgacc) <i>glt2</i> (tgcatttctttccattgtgc)	1087	52
<i>Rickettsia</i> spp. <i>gltA</i>	второй	<i>glt3</i> (tatagacggtgataaaggaatc) <i>glt4</i> (cagaactaccgatttctttaagc)	667	53
<i>Ca. R. tarasevichiae</i> <i>gltA</i>	второй	RT1 (tactaaaaaagtcgctgttcattc) RT2 (tggtgcaaacatcatgcgtaag)	300	56
Риккетсии группы КПЛ <i>gltA</i>	второй	RH1 (gtcagtctactatcacctatatag) RH3 (taaaatattcatctttaagagcga)	906	54
<i>Rickettsia</i> spp. <i>ompB</i>	первый	B1 (atatgcaggtatcggctact) B2 (ccatataccgtaagctacat)	1270	56
<i>Rickettsia</i> spp. <i>ompB</i>	второй	B3 (gcaggtatcggctactataaac) B4 (aatttacgaaacgattacttccgg)	843	56
<i>R. helvetica ompB</i>	второй	Bh1 (ggtattggtaacggtacaccaa) Bh2 (gtatagtattttgtaccgctg)	677	53
<i>Ca. R. tarasevichiae</i> <i>ompB</i>	второй	Btar1 (gcaggtctgtttactgtaaatgacg) Btar2 (gcgaaacgaaccccgcttgg)	800	59
SFGR <i>ompB</i>	второй	BSFGR1 (ctaggtcttgggaagcgataacg) BSFGR2 (ccgttaaacttagcaccacc)	842	56
<i>Rickettsia</i> spp. <i>ompA</i>	первый	A1 (taacattacaagctggaggaagcc) A2 (ttcagagcctgaccaccgg)	1335	58
<i>Rickettsia</i> spp. <i>ompA</i>	второй	A5 (caagtgcgtggtgatgttacta) A6 (tagttacatttctgcacctac)	975	56
<i>R. raoultii ompA</i>	второй	R1 (ctaatgcaggtgatgtagtctttg) R2 (atgttactatacctcatagtc)	417	59
<i>R. heilongjiangensis/ R. sibirica ompA</i>	второй	S1 (ggtgaaggtacggtaatctttaatg) S2 (tacctgccgtgccacaatc)	532	59
<i>Rickettsia</i> spp. <i>ompA#</i>	первый	AR1 (gcagaaatcaatattggagcc) AR2(taataagcacgttctgtatacc)	364	56
<i>Rickettsia</i> spp. <i>ompA#</i>	второй	AR3(gcaagtgcgtggtgatgttact) AR4(acatcgtcggttattgtaacgg)	290	58
<i>Rickettsia</i> spp. 16S rRNA	первый	16S1 (gacgggtgagtaacacgtggg) 16S2 (gtcttttagggatttgcctcac)	1148	56
<i>Rickettsia</i> spp. 16S rRNA	второй	16S3 (gatggatgagcccgcgtcag) 16S4 (gcatctctgcgatccgcgac)	770	60
<i>Rickettsia</i> spp. <i>sca4</i>	первый	sc4-1 (atgtctctgaattaagcaatgc) Rj2837r (cctgatactacccttacatc)*	1134	52
<i>Rickettsia</i> spp. <i>sca4</i>	второй	sc4-5 (ccggcacaacaacaattgatg) sc4-6 (cctttaccagctcatctactt)	868	50

\* праймер из статьи [Matsumoto and Inokuma, 2009]; # праймеры из другой области гена.

### **2.5.3. Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР**

Детекцию продуктов ПЦР проводили методом гель-электрофореза в 1,5% горизонтальном агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 2 мкг/мл, в 1xTBE буфере при напряжении 5 V/см. Размеры полученных ПЦР-фрагментов определяли визуальным сопоставлением с маркерной ДНК известной молекулярной длины Hi-Lo<sup>TM</sup> (Minnesota Molecular Inc., США).

### **2.5.4. Определения нуклеотидных последовательностей**

Для последующего определения нуклеотидных последовательностей полученные продукты ПЦР очищали электрофоретически в 1,5% агарозном геле (агароза производства фирмы «Sigma»), содержащем бромистый этидий, в 1xTAE буфере. Продукты ПЦР нужной длины вырезали из геля, переносили в пробирки 1,5 мл и выделяли фрагменты ДНК с использованием GFX колонок (Amersham Biosciences, США) в соответствии с инструкцией производителя. Очищенные ПЦР-фрагменты использовали для проведения секвенирующей реакции.

Секвенирующие реакции проводили в объеме 30 мкл с использованием “BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, США) в присутствии “BigDye Terminator 5x Sequencing Buffer” (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Очистку продуктов реакции секвенирования ДНК проводили гельфильтрацией через колонки с сорбентом Sephadex G-50. На колонки наносили по 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл 0,5М ЭДТА. Фильтрат высушивали в вакуумном испарителе. Продукты секвенирующих реакций анализировали на ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Определенные нуклеотидные последовательности были задепонированы в базу данных GenBank (Табл. 2-5).

Таблица 2-5

**Номера доступа нуклеотидных последовательностей задепонированных в базе данных NSBI**

Вид	Генотип	Источник выделения	Образец	Номера доступа в базе данных GenBank последовательностей генов:				
				16S рPHK	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>	<i>ompB</i>	<i>sca4</i>
<i>R. sibirica</i>		образец крови	HB-279	KY780085	KY780027	KY780028	KY780029	
		образец крови	HB-24	KY780084	KY780024	KY780025	KY780026	
		<i>H. concinna</i>	Am-350		MG545035			
		<i>I. persulcatus</i>	Nov14-2605		KX963400			
		<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2469		KX963399			
		<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2408		KX963398			
		<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2412		KX963396			
		<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2422		KX963397			
		<i>I. per/I. pav</i>	Nov14-2615		MG022127			
		<i>I. per/I. pav</i>	Alt15-3100		MG022126			
<i>R. raoultii</i>	New	образец крови	HB-50		KY780031			
	DnS14	образец крови	HB-58		KY780032			
	DnS14	ликвор	HSF-37		KY780030			
	DnS14	<i>D. silvarum</i>	Am-648_Ds	MG517260	MG545021	MG545024	MG545022	MG545023
	Var-Ds	<i>D. silvarum</i>	Am-650_Ds	MG517259	MG545017	MG545020	MG545018	MG545019
	DnS14	<i>H. japonica</i>	Kh-225_Hj		MG545029	MG545032	MG545030	MG545031
	Var-Ds	<i>H. japonica</i>	Kh-73_Hj	MG517258	MG545013	MG545016	MG545014	MG545015
	New	<i>H. japonica</i>	Kh-39_Hj		MG545012			
	DnS14	<i>H. concinna</i>	Kh-171_Hc	MG517261	MG545025	MG545028	MG545026	MG545027
	DnS14	<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2477		KX963395			
	New	<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2395		KX963394			
	New	<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2375		KX963393			
	New	<i>I. persulcatus</i>	Nov14-2565		KX963392			
	New	<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2424		KX963391			
	New	<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2413		KX963390			
	New	<i>I. persulcatus</i>	Nov14-2510		KX963389			
	New	<i>I. pavlovskiyi</i>	Nov15-2991		KY056618			
	DnS14	<i>I. pavlovskiyi</i>	Nov14-2491		KY056617			
	RpA4	<i>I. pavlovskiyi</i>	Nov14-2483		KY056616			
	New	<i>I. pavlovskiyi</i>	Nov15-2979		KY019068			
	DnS14	<i>I. per/I. pav</i>	Nov15-2675		MG022122			
	New	<i>I. per/I. pav</i>	Nov14-2614		MG022121			
	RpA4	<i>I. per/I. pav</i>	Nov14-2485		MG022120			
	DnS28	<i>I. per/I. pav</i>	Alt14-2429		MG022119			
	DnS14	<i>I. per/I. pav</i>	Alt14-2432		MG022118			
	New	<i>I. per/I. pav</i>	Alt14-2428		MG022117			
	<i>Ca.R. tarasevichiae</i>		<i>I. persulcatus</i>	78Sr		KT825963		KT825969
		<i>I. persulcatus</i>	197Skh		KT825962		KT825968	
		<i>I. persulcatus</i>	Nov14-2533		KX963382			
		<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2384		KX963381			
		<i>I. persulcatus</i>	14Ip	KR150779	KR150788		KR150783	
		<i>I. pavlovskiyi</i>	Alt14-1618		KX963384			
		<i>I. pavlovskiyi</i>	Nov14-2523		KX963383			
		<i>I. per/I. pav</i>	Nov15-2622		MG022130			
		<i>I. per/I. pav</i>	Nov14-1742		MG022129			
		<i>I. per/I. pav</i>	Alt14-1624		MG022128			
		<i>I. trianguliceps</i>	17Tr	KR150778	KR150787		KR150782	
		<i>D. silvarum</i>	Am-682_Ds		MG545045		MH595544	
		<i>H. japonica</i>	Kh-80_Hj	MG517263	MG545034		MH595543	
		<i>H. concinna</i>	Kh-55_Hc	MG517262	MG545033		MH595542	
<i>R. helvetica</i>		Var-Iper	<i>I. persulcatus</i>	185Sch		KT825961		KT825967

	Var-Iper	<i>I. persulcatus</i>	272Vn		KT825960		KT825966	KT825970
		<i>I. persulcatus</i>	Nov14-1402		KX963385			
		<i>I. pavlovskiyi</i>	Alt14-1611		KX963388			
		<i>I. pavlovskiyi</i>	Alt14-1601		KX963387			
		<i>I. pavlovskiyi</i>	Nov14-1689		KX963386			
		<i>I. per/I. pav</i>	Alt15-3111		MG022125			
		<i>I. per/I. pav</i>	Alt14-1617		MG022124			
		<i>I. per/I. pav</i>	Alt14-1568		MG022123			
	Var-Itr	<i>I. trianguliceps</i>	43Tr	KR150777	KR150786		KR150781	KR150775
<i>R. heilongjiangensis</i>		<i>H. concinna</i>	Kh-157	MG517257	MG545008	MG545011	MG545009	MG545010
		<i>H. japonica</i>	Kh-75	MG517256	MG545004	MG545007	MG545005	MG545006
		<i>I. persulcatus</i>	12Sr		KT825956	KT825964	KT825965	
		<i>I. persulcatus</i>	251Vn		KT825959			
		<i>I. persulcatus</i>	234Vn		KT825958			
		<i>I. persulcatus</i>	216Vn		KT825957			
		<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2359		KX963401			
		<i>I. pavlovskiyi</i>	Nov14-2504		KX963404			
		<i>I. pavlovskiyi</i>	Alt14-1641		KX963403			
		<i>I. pavlovskiyi</i>	Nov14-1320		KX963402			
<i>Ca.R. uralica</i>		<i>I. trianguliceps</i>	28Tr	KR150776	KR150785	KR150784	KR150780	KR150774
<i>Ca.R. principis</i>		<i>H. japonica</i>	Kh-17		MG544995			
		<i>H. japonica</i>	Kh-154		MG544996			
		<i>H. japonica</i>	Kh-81	MG517253	MG544990	MG544993	MG544991	MG544992
		<i>H. japonica</i>	Kh-79	MG517252	MG544986	MG544989	MG544987	MG544988
		<i>H. concinna</i>	Kh-96		MG544994			
<i>Ca.R. rara</i>		<i>H. concinna</i>	Kh-138	MG517255	MG545000		MG545001	MG545002
		<i>H. concinna</i>	Kh-150	MG517254	MG544997		MG544998	MG544999
		<i>H. japonica</i>	Kh-2		MG545003			
<i>R. aeschlimannii</i>		<i>H. japonica</i>	Kh-527		MG545037			
		<i>H. concinna</i>	Kh-508		MG545036			
<i>R. canadensis</i>		<i>H. japonica</i>	Kh-560	MG517264	MG545038		MH595545	
<i>Rickettsia</i> sp.		<i>H. japonica</i>	Kh-86		MG545039			
		<i>I. persulcatus</i>	Alt14-2452		KX963406			
		<i>I. persulcatus</i>	Nov14-2580		KX963405			

### 2.5.5. Анализ нуклеотидных последовательностей

Для поиска опубликованных нуклеотидных последовательностей использовалась база данных Национального центра биотехнологической информации Genbank NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.

Сравнение и анализ полученных нуклеотидных последовательностей выполняли с использованием программ BlastN <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> и CLUSTALW <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>.

Филогенетический анализ проводили с помощью пакета филогенетических программ MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net/manual.html>) с использованием методов объединения ближайших соседей (NG, neighbor-joining) и максимального правдоподобия (ML, maximum likelihood) (<http://www.kumarlab.net/publications>). Достоверность полученных дендрограмм оценивали с помощью бутстрэп-анализа. При этом индексы бутстрэпа, поддерживающие дерево той или иной топологии,

соответствовали доли деревьев в процентах от общего их числа, генерируемых при осуществлении 1000 операций бутстрепа.

Для филогенетического анализа были использованы зарегистрированные в базы данных GenBank полногеномные последовательности *R. sibirica* strain 246 (AABW01000001), *R. heilongjiangensis* strain 054 (CP002912), *R. slovaca* strain 13-B (NC\_016639), *R. raoultii* strain Khabarovsk (genotype DnS14) (NZ\_CP010969), *R. helvetica* strain C9P9 (NZ\_CM001467), (DQ365804), *R. conorii* strain Malish 7 (AE006914), *R. parkeri* strain At-24(NZ\_LAOL01000001), *R. rickettsii* strain R (NZ\_CP006009), *R. peacockii* strain Rustic (NC\_012730), *R. africae* strain ESF-5 (NC\_012633), *R. rhipicephali* strain 3-7-female6-CWPP (CP003342), *R. montanensis* str. OSU 85-930 (CP003340), *R. monacensis* strain IrR/Munich (NZ\_LN794217), *R. australis* strain Cutlack (CP003338), *R. prowazekii* strain Breinl (CP004889), *R. typhi* strain Wilmington (AE017197), *R. bellii* strain RML369-C (NC\_007940), а также последовательности генов 16S rRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* *Rickettsia* spp.

## 2.6. Проведение иммунологического анализа

Парные сыворотки были исследованы на наличие в них иммуноглобулинов классов М и G к возбудителям риккетсий группы КПЛ методом ELISA с использованием набора *Rickettsia conorii* ELISA IgG/IgM kit (Vircell, Spain) в соответствии с инструкцией производителя.

## 2.7. Проведение статистического анализа

Различия в уровне инфицированности различных видов клещей риккетсиями, а также инфицированности клещей разными видами риккетсий были рассчитаны с помощью критерия согласия Пирсона ( $\chi^2$ ) (<http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/>). Уровень значимости  $P < 0,05$  считался достоверным.

95% доверительный интервал (ДИ) уровня инфицированности клещей риккетсиями был рассчитан в программе MS Excel (<http://www.pedro.org.au/english/downloads/confidence-interval-calculator/>)

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. 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*).

Широкое распространение некоторых видов риккетсий (*R. raoultii*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. helvetica*) затрудняет выявление других видов в случаях одновременного заражения клещей несколькими *Rickettsia* spp. В связи с этим была разработана лабораторная версия методики для дифференциации разных видов риккетсий.

Для наиболее распространенных видов *Rickettsia* spp. были выбраны видоспецифичные праймеры. Из области гена *gltA* были выбраны праймеры видоспецифичные для “*Candidatus R. tarasevichiae*” и специфичные для риккетсий группы КПЛ, к которой “*Candidatus R. tarasevichiae*” не относится. Из области гена *ompA*, были выбраны видоспецифичные праймеры для *R. raoultii* и праймеры специфичные для *R. sibirica/R. heilongjiangensis*. Из области гена *ompB* были выбраны праймеры видоспецифичные для *R. helvetica*, праймеры видоспецифичные для “*Candidatus R. tarasevichiae*” и праймеры специфичные для группы КПЛ.

#### 3.2. 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. pavlovskyi* (n=577) и межвидовые гибриды *I. persulcatus/I. pavlovskyi* (n=291). Также были исследованы 37 нимф и 35 имаго клещей, снятых с мелких млекопитающих, включая *I. persulcatus* (n=16), *I. trianguliceps* (n=41) и *I. apronophorus* (n=15).

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

двухраундовой ПЦР с праймерами из области гена *gltA*. Положительные образцы исследовали на наличие одновременного инфицирования разными видами риккетсий методом ПЦР с видоспецифичными и группоспецифичными праймерами. Идентификацию выявленных риккетсий проводили секвенированием продуктов ПЦР, а также (в ряде случаев) методом видоспецифичной ПЦР.

### 3.2.1. Выявление ДНК риккетсий в иксодовых клещах, собранных на Дальнем Востоке.

#### 3.2.1.1. 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 391 из 467 (83,7%; ДИ: 80,1-86,8) исследованных клещей *I. persulcatus* была выявлена ДНК *Rickettsia* spp. Уровень инфицированности варьировал от 77,4% до 90,7% на разных участках (Табл. 3-1). На всех исследованных участках Хабаровского края (участки X2–X5) в клещах *I. persulcatus* преобладали риккетсии “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Этот вид был выявлен в 388 (83,1%; ДИ: 79,4-86,2) исследованных клещах (что составило 99,2% от инфицированных клещей) (Табл. 3-1). ДНК *R. helvetica* была обнаружена только в 10 (2,1%; ДИ: 1,2-3,9) клещах, а ДНК *R. heilongjiangensis* - в 25 (5,4%; ДИ: 3,7-7,8) клещах. В большинстве случаев *R. helvetica* и *R. heilongjiangensis* были выявлены одновременно с “*Candidatus R. tarasevichiae*” (Табл. 3-1).

В клещах *D. silvarum* преобладали *R. raoultii*, уровень инфицированности составил 58,4% (ДИ: 49,2-67,1). В одном клеще наблюдалось микст-инфицирование *R. raoultii* и “*Candidatus R. tarasevichiae*” (Табл. 3-1).

Риккетсии были выявлены в 56 из 241 (23,2%; ДИ: 18,4-29,0) исследованных клещей *H. concinna*. Чаще всего в клещах этого вида выявлялась ДНК *R. heilongjiangensis* (n=35; 14,5%; ДИ:10,6-19,5). ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” выявлялась реже (n=14; 5,8%; ДИ: 3,5-9,5) и только на одном из исследованных участках (X1). Кроме того, в клещах *H. concinna* выявлялась ДНК “*Candidatus R. rara*” (n=10; 4,2%; ДИ:2,3-7,5) и *R. raoultii* (n=2; 0,8%; ДИ: 0,2-3,0), в единичных случаях -

*R. aeschlimannii* и “*Candidatus R. principis*”. Следует отметить, что в семи клещах *H. concinna*, собранных на участке X1, была одновременно выявлена ДНК нескольких видов риккетсий: в двух клещах – ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. raoultii* и в пяти клещах – ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. heilongjiangensis*.

ДНК риккетсий была обнаружена в 60 из 374 (16%; ДИ: 12,7-20,1) исследованных клещей *H. japonica* (Табл. 3-1). Чаще всего выявлялись “*Candidatus R. principis*” (n=21; 5,6%; ДИ: 3,7-8,4) и “*Candidatus R. tarasevichiae*” (n=20; 5,3%; ДИ: 3,5-8,1), реже - *R. heilongjiangensis* (n=7; 1,9%; ДИ: 0,9-3,8), *R. raoultii* (n= 5; 1,3%; ДИ: 0,6-3,1), “*Candidatus R. rara*” (n=4; 1,1%; ДИ: 0,4-2,7) и в единичных случаях - *R. aeschlimannii*, *R. canadensis*, а также новый генетический вариант *Rickettsia* sp. (Табл. 3-1).

### 3.2.1.2. 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 клещах *D. silvarum* преобладали риккетсии вида *R. raoultii*, которые были выявлены в 70 из 75 (93,3%; ДИ: 85,3-97,1) исследованных клещей. Среди них в двух клещах отмечено микст-инфицирование *R. raoultii* и “*Candidatus R. tarasevichiae*” (Табл. 3-1).

Риккетсии были выявлены в 23 из 198 (11,6%; ДИ: 7,9-16,8) исследованных клещей *H. concinna*. В клещах этого вида была обнаружена ДНК *R. heilongjiangensis* (n=11; 5,6%; ДИ: 3,1-9,7), *R. raoultii* (n=8; 4,0%; ДИ: 2,1-7,8) и “*Candidatus R. rara*” (n=3; 1,5%; ДИ: 0,5-4,5); в одном клеще была выявлена ДНК *R. sibirica*.

### 3.2.1.3. 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 г.г. на всей территории края. Для исследования было взято 60 клещей *I. persulcatus*.

ДНК *Rickettsia* spp. была выявлена в 40 из 60 (66,7%; ДИ: 54,1-77,2) исследованных клещей. Среди них в 39 (65,0%; ДИ: 52,4-75,8) клещах была обнаружена ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”, а в одном клеще – ДНК *R. helvetica*.



Таблица 3-1

## Риккетсии, выявленные в клещах на территории Дальнего Востока

Участок	Вид клеща	N	N (%) клещей, содержащих ДНК *										
			Всех видов	<i>R.heilongjiangensis</i>	<i>R.helvetica</i>	<i>R.raoultii</i>	<i>Rsibirica</i>	<i>Ca.R.tarasevichiae</i>	<i>R.canadensis</i>	<i>R.aeschlimannii</i>	<i>Ca.R.principis</i>	<i>Ca.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
	<i>H. con</i>	58	24 (41,4)	13 (22,4)	0	2 (3,4)	0	14 (24,1)	0	0	0	2 (3,4)	0
	<i>H. jap</i>	206	44 (21,4)	5 (2,4)	0	4 (1,9)	0	17 (8,3)	0	0	13 (6,3)	4 (1,9)	1
X2	<i>D. silv</i>	30	18 (60,0)	0	0	18 (60,0)	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
	<i>H. jap</i>	42	1 (2,4)	0	0	0	0	0	0	0	1 (2,4)	0	0
	<i>I. per</i>	100	78 (78,0)	0	0	0	0	78 (78,0)	0	0	0	0	0
X3	<i>H. con</i>	153	22 (14,4)	12 (7,8)	0	0	0	0	0	1 (0,7)	1 (0,7)	8 (5,2)	0
	<i>H. jap</i>	109	11 (10,1)	0	0	1 (0,9)	0	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	6 (5,5)	0	0
	<i>I. per</i>	31	24 (77,4)	0	1	0	0	23	0	0	0	0	0
X4	<i>H. con</i>	27	9 (33,3)	9 (33,3)	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	1 (5,9)	0	0
	<i>I. per</i>	100	75 (75,0)	7 (7,0)	0	0	0	74 (74,0)	0	0	0	0	0
X5	<i>I. per</i>	236	214 (90,7)	18 (7,6)	9 (3,8)	0	0	213 (90,3)	0	0	0	0	0
<b>Всего X1-X5</b>	<i>D. silv</i>	<b>113</b>	<b>66 (58,4)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>66 (58,4)</b>	<b>0</b>	<b>1 (0,9)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<i>H. con</i>	<b>241</b>	<b>56 (23,2)</b>	<b>35 (14,5)</b>	<b>0</b>	<b>2 (0,8)</b>	<b>0</b>	<b>14 (5,8)</b>	<b>0</b>	<b>1 (0,4)</b>	<b>1 (0,4)</b>	<b>10 (4,1)</b>	<b>0</b>
	<i>H. jap</i>	<b>374</b>	<b>60 (16,0)</b>	<b>7 (1,9)</b>	<b>0</b>	<b>5 (1,3)</b>	<b>0</b>	<b>20 (5,3)</b>	<b>1</b>	<b>1 (0,3)</b>	<b>21 (5,6)</b>	<b>4 (1,1)</b>	<b>1 (0,3)</b>
	<i>I. per</i>	<b>467</b>	<b>391 (83,7)</b>	<b>25 (5,4)</b>	<b>10 (2,1)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>388 (83,1)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Ам1	<i>D. silv</i>	75	70 (93,3)	0	0	70 (93,3)	0	2 (2,7)	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
Ам2	<i>H. con</i>	84	5 (6,0)	1 (1,2)	0	0	1 (1,2)	0	0	0	0	3 (3,6)	0
Ам3	<i>H. con</i>	92	9 (10,0)	9 (10,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Всего Ам1-Ам3</b>	<i>D. silv</i>	<b>75</b>	<b>70 (93,3)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>70 (93,3)</b>	<b>0</b>	<b>2 (2,7)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<i>H. con</i>	<b>198</b>	<b>23 (11,6)</b>	<b>11 (5,6)</b>	<b>0</b>	<b>8 (4,0)</b>	<b>1 (0,5)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3 (1,5)</b>	<b>0</b>
Сх	<i>I. per</i>	137	93 (67,9)	0	87 (63,5)	0	0	6 (4,4)	0	0	0	0	0
Км	<i>I. per</i>	60	40 (66,7)	0	1 (1,7)	0	0	39 (65,0)	0	0	0	0	0

\* Включая случаи одновременного инфицирования двумя разными видами риккетсий

N- количество клещей

### 3.2.1.4. Сахалинская область

Голодные имаго *I. persulcatus* (n=137) были собраны на флаг в 2011 г. на одном участке Сахалинской области (Сх). ДНК *Rickettsia* spp. была выявлена в 93 из 137 (67,9%; ДИ: 59,7-75,1) исследованных клещей (Табл. 3-1). Доминирующим видом риккетсий в клещах *I. persulcatus* был вид *R. helvetica*, он был выявлен в 87 (63,5%; ДИ: 55,2-71,1) клещах (93.5% от инфицированных клещей). Риккетсии “*Candidatus R. tarasevichiae*” были обнаружены лишь в 6 (4.4%; ДИ: 2,0-9,2) клещах (6.4% от инфицированных клещей).

Объединяя результаты по всем исследованным областям Дальнего Востока, можно заключить, что на острове Сахалин клещи *I. persulcatus* были достоверно более часто ( $P < 0.001$ ) инфицированы *R. helvetica* по сравнению с “*Candidatus R. tarasevichiae*”, в то время, как на всех остальных исследованных участках *I. persulcatus* были достоверно более часто ( $P < 0.001$ ) инфицированы “*Candidatus R. tarasevichiae*” по сравнению с другими видами риккетсий.

Следует отметить, что ДНК *R. raoultii* достоверно чаще ( $P < 0.001$ ) выявлялась в клещах *D. silvarum* (72.3%; ДИ: 65,6-78,2), чем в клещах *H. concinna* (2.3%, ДИ: 1,2-4,1) и *H. japonica* (1.3%, ДИ: 0,6-3,1). ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” была выявлена достоверно чаще ( $P < 0.001$ ) в клещах *I. persulcatus* по сравнению с клещами других видов: *H. japonica* (5,4%; ДИ:3,5-8,1), *H. concinna* (3,2%; ДИ: 1,9-5,3) и *D. silvarum* (1,6%; ДИ: 0,5-4,6). *R. heilongjiangensis* достоверно чаще ( $P < 0,001$ ) была выявлена в *H. concinna* (14,5%; ДИ: 10,6-19,5), чем в клещах *H. japonica* (1,9%; ДИ: 0,9-3,8) и *I. persulcatus* (3,8%; ДИ 2,6-5,5). ДНК “*Candidatus R. principis*” достоверно чаще ( $P < 0,001$ ) выявлялась в клещах *H. japonica* (5.6%; ДИ: 3,7-8,4), чем в клещах *H. concinna* (0.2%; ДИ: 0,04-1,3).

## 3.2.2. Выявление ДНК риккетсий в клещах, собранных на флаг в Западной Сибири.

### 3.2.2.1. 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).

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

Риккетсии были выявлены в 97 из 149 (65,1%; ДИ: 57,2-72,3) исследованных клещей *I. persulcatus*. На всех исследованных участках Новосибирской области в этом виде клещей преобладали риккетсии “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Этот вид был выявлен в 92 (61,7%; ДИ: 53,7-69,2) клещах (94,8% от инфицированных клещей) (Табл. 3-2). ДНК *R. raoultii* и *R. sibirica* была обнаружена в 7 (4,7%; ДИ: 2,3-9,4) и 2 (1,3%; ДИ: 0,4-4,8) клещах *I. persulcatus*, соответственно. В единичных клещах встречались *R. helvetica* и риккетсии группы КПЛ, не относящиеся ни к одному из известных видов (*Rickettsia* sp.).

Следует отметить, что в шести клещах “*Candidatus R. tarasevichiae*” были обнаружены одновременно с другими видами риккетсий: с *R. raoultii* (n=3), с *R. helvetica* (n=1), с *R. sibirica* (n=1) и с *Rickettsia* sp. (n=1).

Риккетсии были выявлены в 36 из 453 (7,9%; ДИ: 5,8-10,8) исследованных клещей *I. pavlovskyi*. ДНК *R. raoultii*, *R. helvetica*, “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. heilongjiangensis* была обнаружена в 15 (3,3%; ДИ: 2,0-5,4), 10 (2,2%; ДИ: 1,2-4,0), 9 (2,0%; ДИ: 1,1-3,7) и 4 (0,9%; ДИ: 0,3-2,3) *I. pavlovskyi*, соответственно. В двух клещах были обнаружены риккетсии двух видов: “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica*.

В 61 из 233 (26,2%; ДИ: 21,0-32,2) исследованных клещей с гибридным генотипом *I. persulcatus/I. pavlovskyi* была обнаружена ДНК риккетсий. Так же как и в *I. persulcatus*, в гибридах преобладал вид “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Риккетсии этого вида были обнаружены в 57 (24,5%; ДИ: 19,4-30,4) клещах (93,4% от инфицированных клещей) (Табл. 3-2). ДНК *R. raoultii* выявлялась в 3 (1,3%; ДИ: 0,4-3,7) гибридов; в одном гибридном клеще была обнаружена ДНК *R. sibirica*.

### 3.2.2.2. Республика Алтай

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

Таблица 3-2

## Риккетсии, выявленные в клещах на территории Западной Сибири

Участок	Вид клеща	N	N (%) клещей, содержащих ДНК *						
			Всех видов	<i>R.heilongjiangensis</i>	<i>R.helvetica</i>	<i>R.raoultii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>Ca.R.tarasevichiae</i>	<i>Rickettsia</i> spp.
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
<b>Всего</b>	<b><i>I. persulcatus</i></b>	<b>149</b>	<b>97 (65,1)</b>	<b>0</b>	<b>1 (0,7)</b>	<b>7 (4,7)</b>	<b>2 (1,3)</b>	<b>92 (61,7)</b>	<b>1 (0,7)</b>
<b>Н1-Н5</b>	<b><i>I. pavlovskiyi</i></b>	<b>453</b>	<b>36 (7,9)</b>	<b>4 (0,9)</b>	<b>10 (2,2)</b>	<b>15 (3,3)</b>	<b>0</b>	<b>9 (2,0)</b>	<b>0</b>
	<b><i>I. per/I. pav</i></b>	<b>233</b>	<b>61 (26,2)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3 (1,3)</b>	<b>1 (0,4)</b>	<b>57 (24,5)</b>	<b>0</b>
	<b><i>D. reticulatus</i></b>	<b>131</b>	<b>59 (45,0)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>59 (45,0)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
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
<b>Всего</b>	<b><i>I. persulcatus</i></b>	<b>185</b>	<b>162 (87,6)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13 (7,0)</b>	<b>6 (3,2)</b>	<b>161 (87,0)</b>	<b>1 (0,5)</b>
<b>А1-А3</b>	<b><i>I. pavlovskiyi</i></b>	<b>124</b>	<b>11 (8,9)</b>	<b>1 (0,8)</b>	<b>10 (8,1)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1 (0,8)</b>	<b>0</b>
	<b><i>I. per/I. pav</i></b>	<b>58</b>	<b>29 (50,0)</b>	<b>0</b>	<b>4 (6,9)</b>	<b>3 (5,2)</b>	<b>1 (1,7)</b>	<b>26 (44,8)</b>	<b>0</b>
	<b><i>D. marginatus</i></b>	<b>98</b>		<b>0</b>	<b>0</b>				<b>0</b>
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
<b>Всего</b>	<b><i>I. persulcatus</i></b>	<b>753</b>	<b>627 (83,3)</b>	<b>3 (0,4)</b>	<b>1 (0,1)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>627 (83,3)</b>	<b>0</b>
<b>О1-О3</b>									

\* Включая случаи одновременного инфицирования двумя разными видами риккетсий.

N- количество клещей. Участки Н1-Н5 – Новосибирская область, А1-А3 – Республика Алтай, О1-О3 – Омская область.

Риккетсии были выявлены в 162 из 185 (87,6%; ДИ: 82,0-91,6) исследованных клещей *I. persulcatus*. На всех исследованных участках республики Алтай (А1 и А2) в клещах *I. persulcatus* преобладали “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Риккетсии этого вида были обнаружены в 161 (87,0%; ДИ: 81,4-91,1) клеще (99,4% от инфицированных клещей) (Табл. 3-2). В 6 (3,2%; ДИ: 1,5-6,9) клещах *I. persulcatus* выявлялась ДНК *R. sibirica*; в 5 из них - одновременно с “*Candidatus R. tarasevichiae*”. ДНК других видов риккетсий: *R. raoultii* (n=13), *R. heilongjiangensis* (n=1) и *Rickettsia* sp. (n=1) детектировалась только совместно с ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”.

ДНК *Rickettsia* spp. была обнаружена в 11 из 124 (8,9%; ДИ: 5,0-15,2) исследованных клещей *I. pavlovskyi*. Среди выявленных риккетсий преобладающим видом была *R. helvetica*, которая была обнаружена в 10 (8,1%; ДИ: 4,4-14,2) клещах (в одном клеще одновременно с “*Candidatus R. tarasevichiae*”). В одном клеще была обнаружена ДНК *R. heilongjiangensis*.

Риккетсии были выявлены в 29 из 58 (50,0%; ДИ: 37,5-62,5) исследованных гибридов *I. persulcatus/I. pavlovskyi*. При этом “*Candidatus R. tarasevichiae*” были идентифицированы наиболее часто – в 26 из 58 (44,8%; ДИ: 32,8-57,6) гибридных клещей (Табл. 3-2). Включая случаи смешанной инфекции с “*Candidatus R. tarasevichiae*”, ДНК *R. helvetica* была обнаружена в 4 (6,9%; ДИ: 2,7-16,4) гибридах, *R. raoultii* – в 3 (5,2%; ДИ: 1,8-14,1) гибридах и *R. sibirica* – в одном гибридном клеще.

ДНК риккетсий была выявлена в 65 из 98 (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 49 (50,0%; ДИ: 40,3-59,7) клещах. В *D. marginatus* была также выявлена ДНК *R. sibirica* (n=15; 15,3%; ДИ: 9,5-23,7) и “*Candidatus R. tarasevichiae*” (n=4; 4,1%; ДИ: 1,6-10,0). В трех случаях наблюдалось смешанное инфицирование: “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. raoultii* (n=2); *R. sibirica* и *R. raoultii* (n=1).

Объединяя результаты по Новосибирской области и Республике Алтай, следует отметить, что клещи *I. pavlovskyi* 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. pavlovskyi*.

### 3.2.2.3. 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 выявлена в 627 из 753 клещей (83,3%; ДИ: 80,4-85,8). На всех участках Омской области в клещах *I. persulcatus* превалировал вид “*Candidatus R. tarasevichiae*”, уровень инфицированности клещей составлял 80,1-89,7%. Одновременно с ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” в 3 (0,8%; ДИ: 0,001-0,1) клещах выявлялась ДНК *R. heilongjiangensis* и в одном клеще - ДНК *R. helvetica*.

### 3.2.3. 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 14 (87,5%; ДИ: 64,0-96,5) исследованных клещей *I. persulcatus* была выявлена ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”; в 5 (12,2%; ДИ: 5,3-25,5) *I. trianguliceps* - ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” и в двух *I. trianguliceps* - ДНК *R. helvetica* (Табл. 3-3). Кроме того, в 17 (41,5%; ДИ: 27,8-56,6) *I. trianguliceps* был выявлен новый генетический вариант риккетсий из группы КПЛ, который в данной работе был генетически охарактеризован и назван “*Candidatus Rickettsia uralica*”. Среди инфицированных *I. trianguliceps* в трех клещах одновременно выявлялись “*Candidatus R. tarasevichiae*” и “*Candidatus R. uralica*” и в одном клеще – “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica*. В 12 (80,0%; ДИ: 54,8-93,0) клещах *I. apronophorus* была выявлена ДНК *R. helvetica*, в одном случае – одновременно с ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”.

Таблица 3-3

**Выявление *Rickettsia* spp. в клещах *I. persulcatus*, *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* снятых с мелких млекопитающих.**

Участок	Вид, стадия	N	N клещей, содержащих ДНК*			
			Все риккетсии	<i>Ca.Rtarasevichiae</i>	<i>R.helvetica</i>	<i>Ca.R.uralica</i>
O1	<i>I. persulcatus</i> , Н	12	11	11	0	0
	<i>I. trianguliceps</i> , Н	2	0	0	0	0
	<i>I. trianguliceps</i> , И	17	6	2	0	5
O2	<i>I. persulcatus</i> , Н	4	3	3	0	0
	<i>I. trianguliceps</i> , Н	14	10	3	2	8
	<i>I. trianguliceps</i> , И	8	4	0	0	4
	<i>I. apronophorus</i> , Н	5	4	0	4	0
	<i>I. apronophorus</i> , И	10	8	1	8	0
Всего O1 и O2	<i>I. persulcatus</i> , все	16	14	14	0	0
	<i>I. trianguliceps</i> , все	41	20	5	2	17
	<i>I. apronophorus</i> , все	15	12	1	12	0

\* Включая случаи одновременного инфицирования двумя разными видами риккетсий.  
N – количество исследованных клещей; Н – нимфы; И – имаго

### 3.3. Генетическая характеристика выявленных в клещах риккетсий

Риккетсии, выявленные в данной работе, были охарактеризованы по гену *gltA*, а некоторые изоляты были также охарактеризованы по гену 16S рРНК и генам поверхностных белков (*ompA*, *ompB* и *sca4*).

Единственным строго консервативным видом риккетсий, из выявленных в данной работе, был вид “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Все определенные последовательности фрагментов генов *gltA* и 16S рРНК исследованных изолятов “*Candidatus R. tarasevichiae*” соответствовали известным последовательностям (AF503168, DQ168983). В данной работе впервые была определена последовательность гена *ompB* для “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Последовательности гена *ompB* изолятов “*Candidatus R. tarasevichiae*” из разных видов клещей и разных регионов были идентичны между собой.

Остальные виды риккетсий были переменными. Определенные последовательности фрагментов генов *gltA*, 16S rRNA, *ompA* и *ompB* для большинства образцов *R. sibirica* соответствовали известной 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. pavlovskyi* (MG022126 и MG022127) последовательности фрагмента гена *gltA* отличались между собой и от известной последовательности 1-2 заменами (Рис. 3-1).

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *gltA*, 16S rRNA, *ompA*, *ompB* и *sca4* для большинства образцов *R. heilongjiangensis* соответствовали известной последовательности *R. heilongjiangensis* штамма 054 (CP00291). Однако последовательности фрагмента гена *gltA* для двух образцов из *I. persulcatus* из Хабаровского края (KT825957 и KT825958) и одного образца из *I. pavlovskyi* из Новосибирской области (KX963404) отличались между собой и от известной последовательности 1-2 заменами (Рис. 3-1).

Последовательность фрагмента гена *gltA* единственного обнаруженного образца *R. canadensis* из клеща *H. japonica* была идентична известной последовательности *R. canadensis* Jeju-1 из клеща *Haemaphysalis flava* из Южной Кореи (AB297809), но отличалась тремя заменами от последовательности *R. canadensis* штаммов McKiel (CP000409) и SA410 (CP003304), изолированных из клещей *Haemaphysalis leporispalustris* из США и Канады (Рис. 3-2). Последовательность гена 16S рРНК соответствовала последовательности *R. canadensis* штамма McKiel, а последовательность гена *ompB* отличалась шестью заменами от соответствующей последовательности этого же штамма.

Две определенные последовательности *gltA* гена *R. aeschlimannii* отличались между собой и от известной последовательности *R. aeschlimannii* штамма Stavropol (DQ235776) единичными заменами (Рис. 3-2).

Среди обнаруженных видов риккетсий, *R. helvetica* и *R. raoultii* были наиболее переменными.

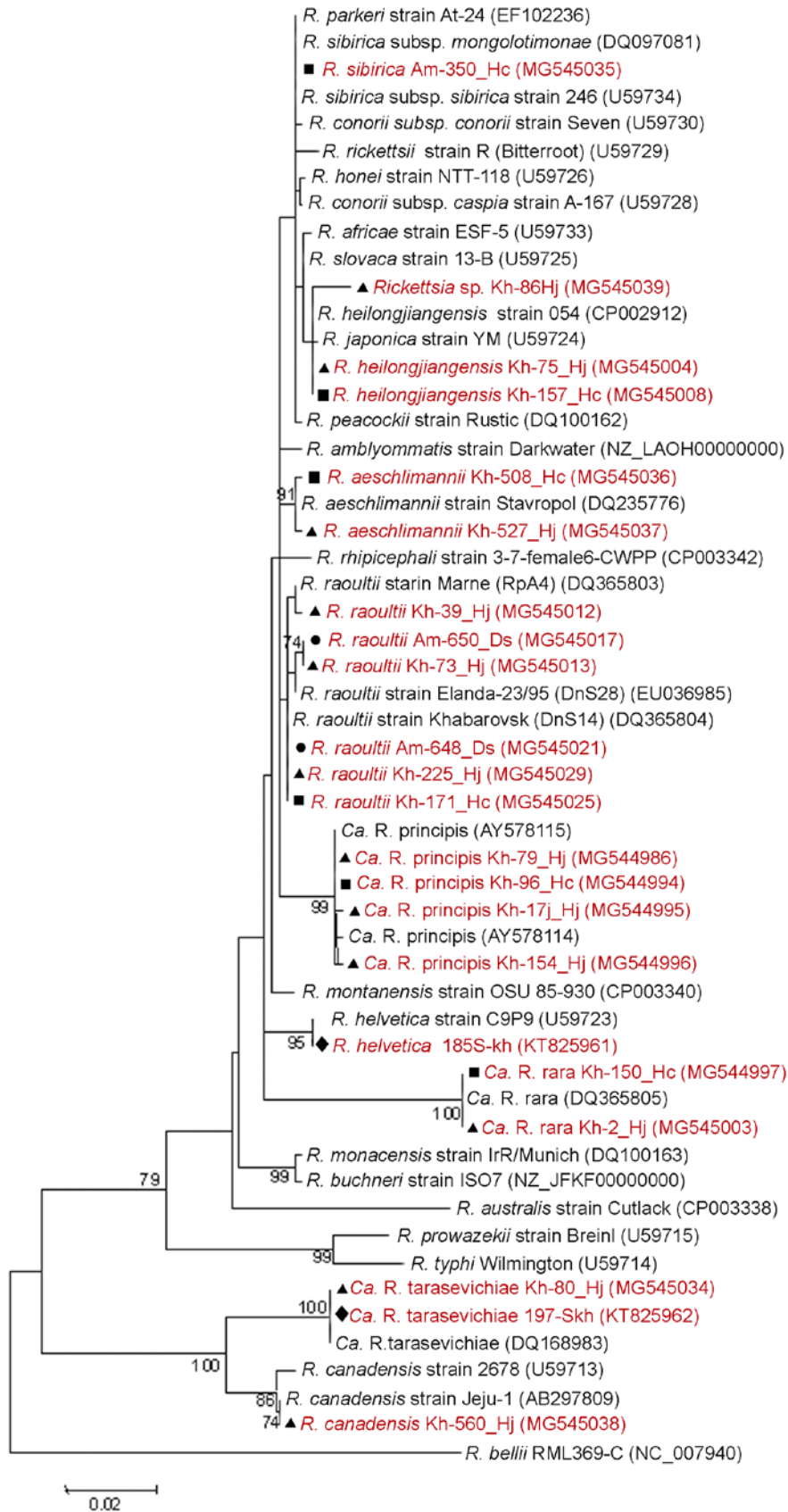
На основании анализа последовательностей генов *gltA*, *ompB* и *sca4* было показано, что все выявленные генетические варианты *R. helvetica* отличались от известных изолятов этого вида. Было обнаружено три наиболее часто встречающихся генетических варианта *R. helvetica*, которые были связаны с определенными видами клещей, а также несколько генетических вариантов, обнаруженных в единичных клещах (Рис. 3-3).



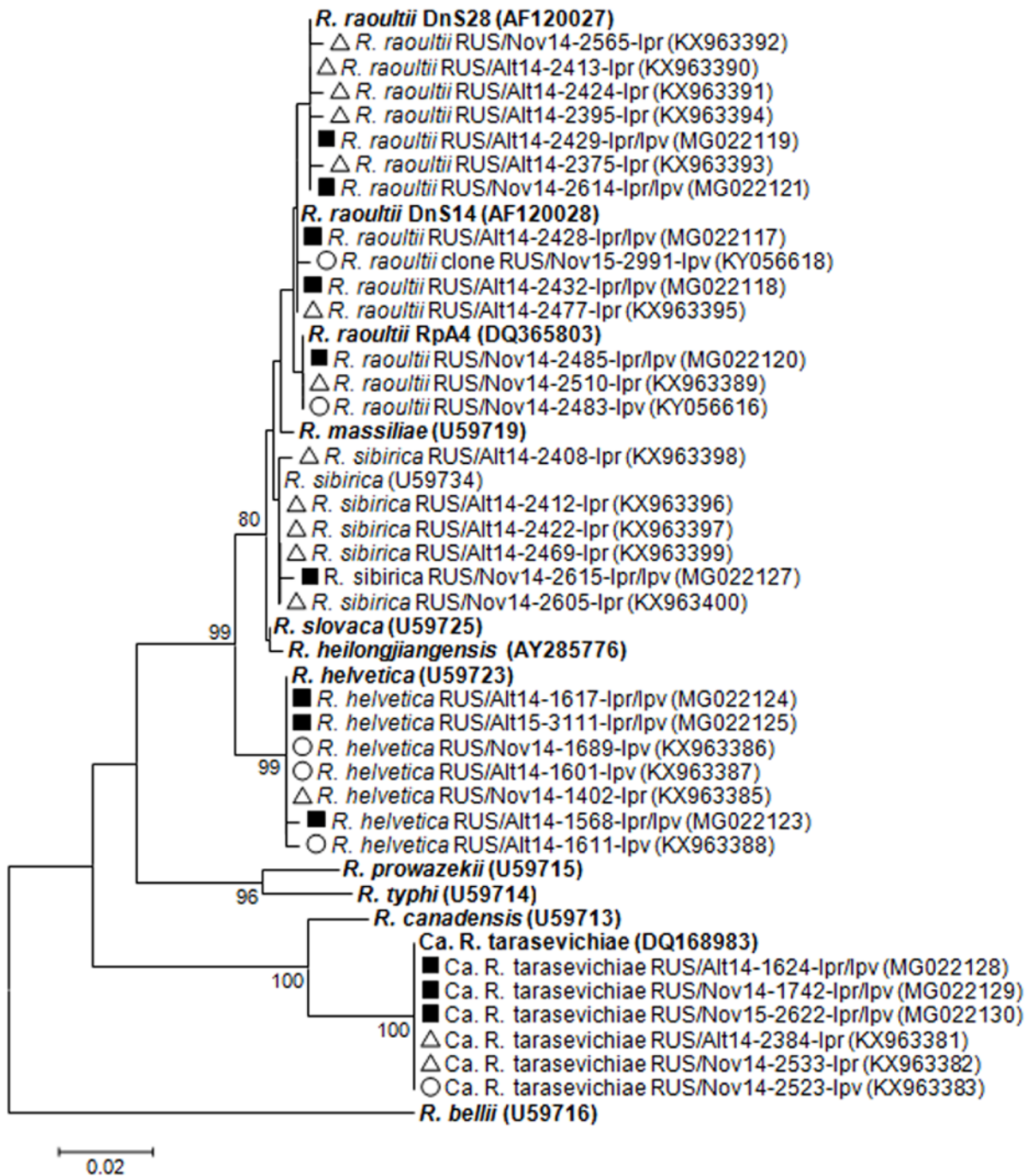
Для геноварианта *R. helvetica* Var-Iper (выявленного преимущественно в клещах *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*) определенные последовательности гена *gltA* были идентичны известным последовательностям *R. helvetica* штамма С9Р9, изолированного из клеща *I. ricinus* (U59723) и *R. helvetica* из клеща *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* из клещей *I. persulcatus* (KJ572368, KM288472) и *I. ricinus* (AF123725). Для геноварианта *R. helvetica* Var-Itr (связанного с клещами *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 (связанный с клещами *I. apronophorus*) отличался 1-4 заменами по генам *gltA*, *ompB* и *sca4* от соответствующих известных последовательностей *R. helvetica* (KF859958, U59723, KJ572382, FJ358501).

*R. helvetica* Var-Iper выявлялся во всех генотипированных образцах из клещей *I. persulcatus*, собранных в Хабаровском крае и на острове Сахалин. Кроме того, этот геновариант был выявлен в клещах *I. persulcatus* (n=1), *I. pavlovskyi* (n=15) и в гибридах *I. persulcatus*/*I. pavlovskyi* (n=3), собранных в Новосибирской области и в республике Алтай, а также в одном клеще *I. apronophorus* в Омской области. *R. helvetica* Var-Itr был обнаружен во всех образцах *R. helvetica* из клещей *I. trianguliceps* и в одном образце из *I. apronophorus*. *R. helvetica* Var-Iapr был выявлен только в клещах *I. apronophorus* (Табл. 3-4).

Кроме того, в четырех клещах разных видов (*I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *I. persulcatus*/*I. pavlovskyi* и *I. apronophorus*) были выявлены четыре геноварианта *R. helvetica*, отличающихся по гену *gltA* от всех известных последовательностей единичными заменами (Рис. 3-3).



**Рисунок 3-1.** Дендрограмма, построенная ML методом на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gltA* (555 п.н.) риккетсий, выявленных на территории Дальнего Востока. В узлах дендрограммы указаны индексы поддержки. Полученные в данной работе последовательности выделены красным цветом. Обозначения: ● *D. silvarum*; ▲ *H. japonica*; ■ *H. concinna*; ◆ *I. persulcatus*



**Рисунок 3-2.** 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: △ *I. persulcatus*; ○ *I. pavlovskyi*; ■ гибриды *I. persulcatus*/*I. pavlovskyi*.

<b>A</b>	175525	175543	175567	175576	175847	176092	176156
NZ_CM001467 <i>I. ricinus</i> C9P9*	TGTAGCTCT/	/ATGGCTATT/	/TCTCTTTCGGCA/	/GCTTCTACT/	/GCCGCAGTA/	/CCGCTCTTA	
KM288465 <i>I. persulctus</i> Нов*	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KP866150 <i>I. persulcatus</i> Коми*	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T...
<b>KT825960 <i>I. persulcatus</i> Var-Iper</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>KR150786 <i>I. trianguliceps</i> Var-Itr</b>	... <b>A</b> ...	.....	.....	.....	.....	.....	.....T...
<i>I. apronophorus</i> Var-Iapr	.....	.....	.....	.....T	.....	.....	.....
MG022123 <i>I. perl I. pav</i> Alt-1568	.....	.....	.....	.....T	.....	.....	.....
<i>I. apronophorus</i> Om-103	.....	.....	.....	.....T	..... <b>A</b> ...	.....	.....
KX963388 <i>I. pavlovskiyi</i> Alt-1611	.....	.....T	.....	.....	.....	.....	.....
<i>I. persulcatus</i> Om-20	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	.....
<b>B</b>	381079	381549	381958	382176	382239		
NZ_CM001467 <i>I. ricinus</i> C9P9*	GGTGTTCCT/	/GGTGGCGAC/	/AATGGTCCG/	/AGTGCCTT/	/GTACCGGCT		
KM288465 <i>I. persulctus</i> Нов*	.....	.....	.....	.....	.....		
KP866151 <i>I. persulcatus</i> Коми*	... <b>A</b> ...	.....	... <b>A</b> ...	.....T	.....		
<b>KT825966 <i>I. persulcatus</i> Var-Iper</b>	.....	.....	... <b>A</b> ...	.....T	.....		
<b>KR150781 <i>I. trianguliceps</i> Var-Itr</b>	... <b>A</b> ...	.....	... <b>A</b> ...	.....T	.....--		
<i>I. apronophorus</i> Var-Iapr	.....	.....T	... <b>A</b> ...	.....T	..... <b>A</b> ...		
<i>I. apronophorus</i> Om-103	.....	.....T	.....	.....	.....		
<b>B</b>	812583	812147					
AICO01000001 <i>I. ricinus</i> C9P9*	CAAGGCTAT/	/AATGGCGAA					
<b>KT825966 <i>I. persulcatus</i> Var-Iper</b>	... <b>A</b> ...	.....					
<b>KR150781 <i>I. trianguliceps</i> Var-Itr</b>	.....	.....					
<i>I. apronophorus</i> Var-Iapr	.....	.....T					
<i>I. apronophorus</i> Om-103	.....	.....T					

**Рисунок 3-3.** Генетическая вариабельность *R. helvetica*. Выровненные последовательности фрагментов **A** – гена *gltA*, **B** – гена *ompB* **B** – гена *sca4*. Звездочкой отмечены последовательности известных штаммов и изолятов *R. helvetica*. Жирным шрифтом отмечены последовательности, определенные в данной работе. Представлены генетические варианты *R. helvetica*, ассоциированные с определенными видами клещей (Var-Iper, Var-Itr и Var-Iapr), а также варианты, выявленные в единичных клещах.

В литературе описано три основных геноварианта *R. raoultii*: RpA4 (штамм Marne), DnS14 (штамм Khabarovsk) и DnS28 (штамм Elanda 23/95) (Rydkina, 1999). Эти три геноварианта *R. raoultii* были выявлены в большинстве исследованных нами клещей. Геновариант *R. raoultii* RpA4 был обнаружен на территории Новосибирской области и республики Алтай во всех генотипированных образцах из клещей *D. reticulatus*, в 10 из 22 *D. marginatus* и в 8 из 29 *Ixodes* spp. (Табл. 3-5). Геновариант *R. raoultii* DnS14 был выявлен на территории Дальнего Востока в 8 из 9 *H. concinna*, в 2 из 5 *H. japonica*, в 38 из 58 *D. silvarum*, а также в Новосибирской области и республики Алтай в 6 из 29 клещей *Ixodes* spp. Геновариант *R. raoultii* DnS28 был обнаружен на территории Новосибирской области и республики Алтай в 8 из 22 клещах *D. marginatus* и в 7 из 29 клещей рода *Ixodes*.

Таблица 3-4

**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

Помимо известных, были выявлены 11 новых генетических вариантов *R. raoultii*, один из которых (Var-Ds) был широко распространен на территории Дальнего Востока (Табл. 3-5; Рис. 3-4). У геноварианта *R. raoultii*-Ds последовательность гена *gltA* отличалась одной заменой от последовательности *R. raoultii* DnS28 (EU036985); последовательность гена *sca4* отличалась тремя заменами от известной последовательности (DQ365808); последовательности генов *ompA* и *ompB* были идентичны известным последовательностям *R. raoultii* (CP010969 и FN651772, соответственно). Этот геновариант наиболее часто выявлялся в клещах *D. silvarum* (в 20 из 58 генотипированных образцов от клещей) и в 3 из 14 клещей рода *Haemaphysalis*. Кроме того, он был обнаружен в 3 из 22 *D. marginatus* в республике Алтай.

Таблица 3-5

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				
			RpA4	DnS14	DnS28	Var-Ds	Новые генотипы
<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

Остальные 10 геновариантов *R. raoultii*, отличающихся по гену *gltA* 1-3 заменами от известных последовательностей, были выявлены в единичных клещах: в одном *H. japonica* на территории Хабаровского края, а также в одном *D. marginatus* и восьми клещах рода *Ixodes* из Новосибирской области и республики Алтай (Рис 3-4).

A	1286975	1286968	1286943	1286929	12869215	1286768	1286719	1286709	1286695	1286684	1286639	1286555	1286531	1286452	1286375	1286371
MG545025 H. con Kh-171 (DnS14)*	GCTGAGAAAAGTGAT/	TATTTACTG/	GAACTACCAAGTGGC/	TATCCTGAT/	ATGATTGCTAAG/	GCCGCAATGTCT/	AATTCGTTA/	AATGCTCTT/	CTACAATGCC/	ATTAGCACG/	AGTTCTGAG					
D. ret Nov-3015 (RpA4)**	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
D. marg Alt-527(DnS28)***	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A..
MG545017 D. sil Am-650 (Var-Ds)	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A...	.....	.....	.....	.....	.....	A..
D. mar Alt-517	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A..
MG545012 H. jap Kh-39	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C..	.....	.....	-----
KX963394 I. per Alt-2395	..C.....	...C....	A.....	.....	C...	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A..
KX963393 I. per Alt-2375	.....	.....	AG.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A..
KX963392 I. per Nov-2565	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	G.....	.....	.....	.....	.....	.....	A...	...T....	.....	A..
KX963391 I. per Alt-2424	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	A..
KY056618 I. pav Nov-2991	-----	.....	.....	.....	.....	G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KY019068 I. pav Nov-2979	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A.....	.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MG022121 I. per/L pav Nov-2614	.....G.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	-----
MG022117 I. per/L pav Alt-2428	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..C.....

Б	1082573	В	732262	731828	731806
MG545026 H. con Kh-171 (DnS14)*	CAACCATTA	MG545027 H. con Kh-171 (DnS14)*	AGATTGTTA/	AACCGGTGG/	GAATTGTAC
D. ret Nov-3015 (RpA4)**	.....	D. ret Nov-3015 (RpA4)**	.....	C...A..A.	.....
D. marg Alt-527(DnS28)***	.....	D. marg Alt-527(DnS28)***	.....	A..	.....
FN651772 <i>D. nuttalli</i> tick_463	...T...	MG545017 D. sil Am-650 (Var-Ds)	.....	A...	.....
MG545017 D. sil Am-650 (Var-Ds)	...T...	<i>D. mar</i> Alt-517	.....	A...	.....
<i>D. mar</i> Alt-517	...T...				

**Рисунок 3-4.** Выравнивание последовательностей фрагмента гена *gltA* *R. raoultii*. Последовательности, соответствующие прототипным штаммам, обозначены: \* - штамм Khabarovsk (DnS14); \*\* - штамм Marne (RpA4); \*\*\* - штамм Elanda (DnS28).

### 3.4. Филогенетический анализ кандидатных видов риккетсий

В данной работе в клещах *I. trianguliceps* впервые был выявлен кандидатный вид “*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* [Mediannikov et al., 2006]. В настоящее время, согласно общепризнанным критериям, присвоение статуса кандидатного вида риккетсий группы КПЛ проводится на основании анализа последовательностей фрагментов пяти генов (16S рРНК, *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4*) [Parola et al., 2005].

Для генетической характеристики нового кандидатного вида, а также выявленных, но не охарактеризованных “*Candidatus R. rara*” и “*Candidatus R. principis*” были определены последовательности генов *gltA*, 16S рРНК и генов поверхностных белков для этих риккетсий.

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 16S рРНК, *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* были идентичны между собой, но отличались от последовательностей из базы данных GenBank. Сравнительный анализ полученных последовательностей “*Candidatus R. uralica*” с последовательностями известных видов *Rickettsia* показал, что фрагменты генов *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* “*Candidatus R. uralica*” имеет уровень сходства не более чем 99,6%, 98,2%, 97,8% и 98,2% с ближайшими видами риккетсий группы КПЛ, соответственно (Табл. 3-6).

**Таблица 3-6**

**Степень сходства последовательностей “*Candidatus R. uralica*” с общепризнанными видами риккетсий**

гены, фрагментов	размер	Процент сходства последовательностей “ <i>Candidatus R. uralica</i> ” с последовательностями других видов			
		<i>R. conorii</i> s.s.	<i>R. sibirica</i> s.s.	<i>R. slovacica</i>	<i>R. heilongjiangensis</i>
16S rRNA, 1067 п.н.		100	99,9	99,9	99,7
<i>gltA</i> , 1002 п.н.		99,4	99,6	99,5	99,4
<i>ompA</i> , 1256 п.н.		97,1	96,7	98,1	98,1
<i>ompB</i> , 1274 п.н.		97,3	97,0	97,6	97,2
<i>sca4</i> , 782 п.н.		97,7	97,7	98,2	97,7



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.), and *sca4* (772 п.н.). Последовательности фрагмента гена *gltA* для большинства изолятов “*Candidatus R. principis*” соответствовали известной последовательности данного кандидатного вида (AY578115), а для трех изолятов – 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. Сравнительный анализ полученных последовательностей “*Candidatus R. principis*” с последовательностями известных видов *Rickettsia* показал, 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 (Табл. 3-5).

**Таблица 3-7**

**Степень сходства последовательностей “*Candidatus R. principis*” с общепризнанными видами риккетсий**

гены, размер фрагментов	Процент сходства последовательностей “ <i>Candidatus R. principis</i> ” с последовательностями других видов			
	<i>R. raoultii</i>	<i>R. sibirica</i> s.s.	<i>R. slovacica</i>	<i>R. heilongjiangensis</i>
16S rRNA, 700 п.н.	99,3	99,1	99,1	99,1
<i>gltA</i> , 805 п.н.	98,9	98,6	98,5	98,4
<i>ompA</i> , 884 п.н.	96,0	95,6	96,3	95,4
<i>ompB</i> , 777 п.н.	96,9	96,1	95,9	95,9
<i>sca4</i> , 772 п.н.	97,5	97,8	98,1	97,5

Для генетической характеристики “*Candidatus R. gara*” были секвенированы фрагменты генов *gltA* (754 п.н.), 16S rRNA (643 п.н.), *ompB* (833 п.н.) и *sca4* (799 п.н.) для ряда изолятов. Все определенные последовательности данных генов были идентичны между собой; последовательности фрагмента гена *gltA* соответствовали известной последовательности данного кандидатного вида риккетсий (DQ365805), последовательности остальных генов отличались от последовательностей из базы данных GenBank. Не удалось амплифицировать фрагменты *ompA* гена, несмотря на то, что были использованы несколько разных пар праймеров. По всей видимости, этот ген либо отсутствует (как например у *R. helvetica*), либо его последовательность

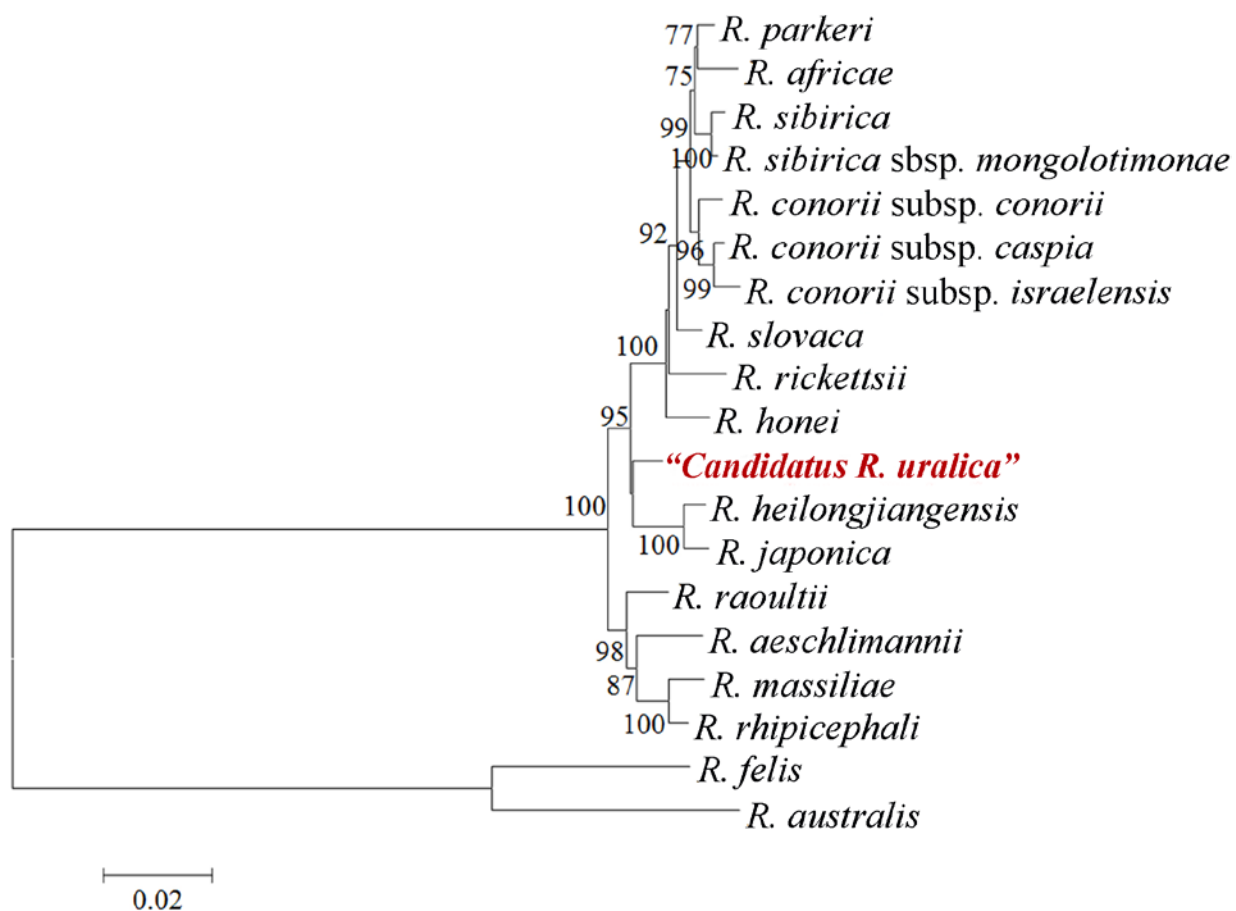
сильно отличается от последовательностей большинства других риккетсий (как например у *R. canadensis*). Уровень сходства выявленных последовательностей “*Candidatus R. gara*” с последовательностями ближайших видов риккетсий группы КПЛ для фрагментов генов 16S рРНК, *gltA*, *ompB* и *sca4* не превышал 99,2%, 95,1%, 87,6% и 87,5%, соответственно (Табл. 3-6).

Таким образом, “*Candidatus R. uralica*”, “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. gara*” на основании существующих критериев [Fournier, Parola] можно отнести к новым кандидатным видам. Дендрограммы, построенные на основе объединенных последовательностей гена *gltA* и генов поверхностных белков, демонстрирует, что все три кандидатные виды относятся к группе КПЛ. При этом изоляты “*Candidatus R. uralica*” и “*Candidatus R. principis*” относятся к кластеру, объединяющему большинство риккетсий из группы КПЛ, а “*Candidatus R. gara*” существенно отличается от известных видов группы КПЛ и образует отдельную ветвь на дендрограмме.

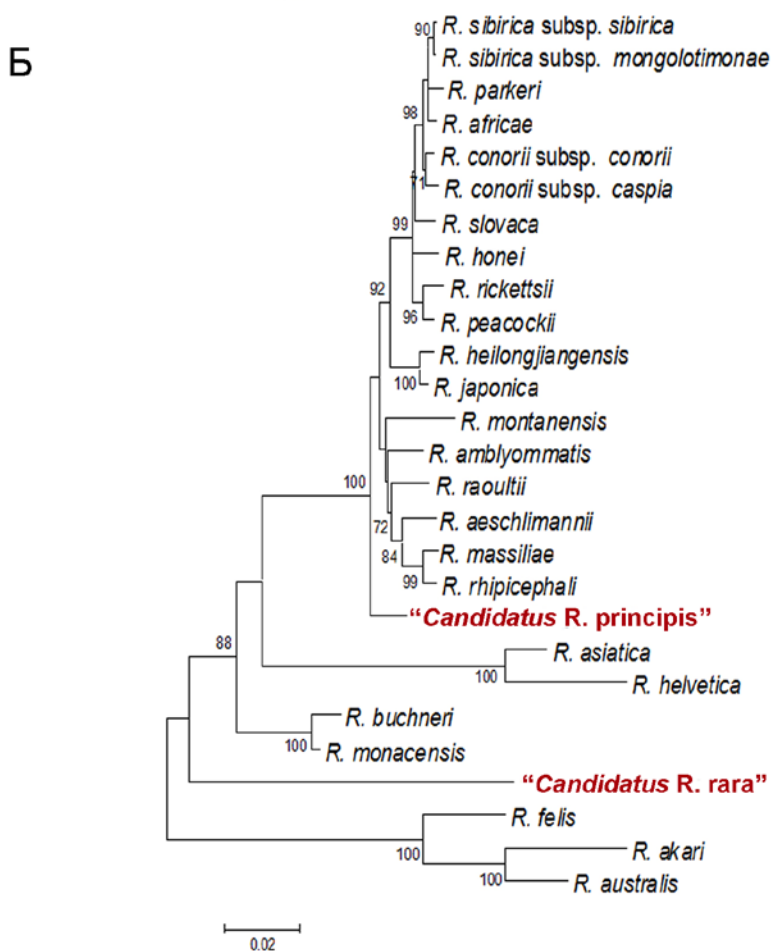
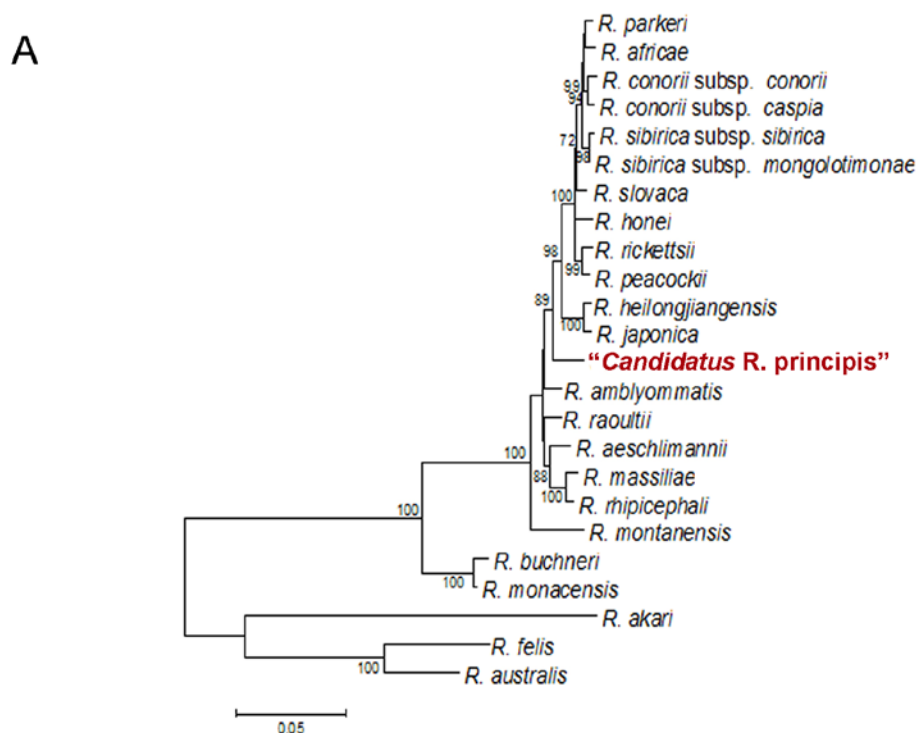
Таблица 3-8

**Степень сходства последовательностей “*Candidatus R. gara*” с общепризнанными видами риккетсий**

Гены, размер фрагментов	Процент сходства последовательностей “ <i>Candidatus R. gara</i> ” с последовательностями других видов			
	<i>R. monacensis</i>	<i>R. japonica</i>	<i>R. raoultii</i>	<i>R. heilongjiangensis</i>
16S rRNA, 643 п.н.	98,9	98,9	99,2	99,1
<i>gltA</i> , 754 п.н.	94,7	94,7	95,0	94,7
<i>ompB</i> , 833 п.н.	87,0	87,6	87,1	87,0
<i>sca4</i> , 799 п.н.	87,1	80,4	80,6	80,3



**Рисунок 3-5.** Дендрограмма, построенная методом ML на основе объединенных последовательностей фрагментов генов *gltA-ompA-ompB-sca4* (4151 п.н.) риккетсий из группы КПЛ. Показано филогенетическое положение "*Candidatus R. uralica*".



**Рисунок 3-6.** Дендрограмма, построенная методом ML на основе объединенных последовательностей фрагментов генов риккетсий из группы КПЛ: **A** – *gltA-ompA-ompB-sca4* (3172 п.н.); **Б** – *gltA-ompB-sca4* (2262 п.н.). Показано филогенетическое положение "Candidatus *R. principis*" и "Candidatus *R. rara*"

### 3.5. Выявление ДНК риккетсий в образцах пациентов

На наличие ДНК риккетсий были исследованы клинические образцы от 604 пациентов, госпитализированных в ГИКБ №1 г. Новосибирска. В исследование были включены пациенты с признаками инфекционного процесса после укусов клещами или после посещения потенциальных мест обитания клещей в период с апреля по октябрь 2016 и 2017 гг. Среди пациентов было 359 (59,4%) мужчин и 245 (40,6%) женщин. Возраст пациентов варьировал от 18 до 89 лет, средний возраст составил 48,8 лет (48,3 для мужчин и 49,5 для женщин).

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 (в 31 образце крови, в 6 образцах ликвора и 3 биоптатах с места укуса). 34 из этих 37 пациентов отмечали присасывание клещей в Новосибирской области и три пациента – в Алтайском крае. Диагноз клещевой риккетсиоз 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 в 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, которых нельзя отнести ни к одному из известных видов.

### 3.6. Генотипирование риккетсий, выявленных в клинических образцах пациентов

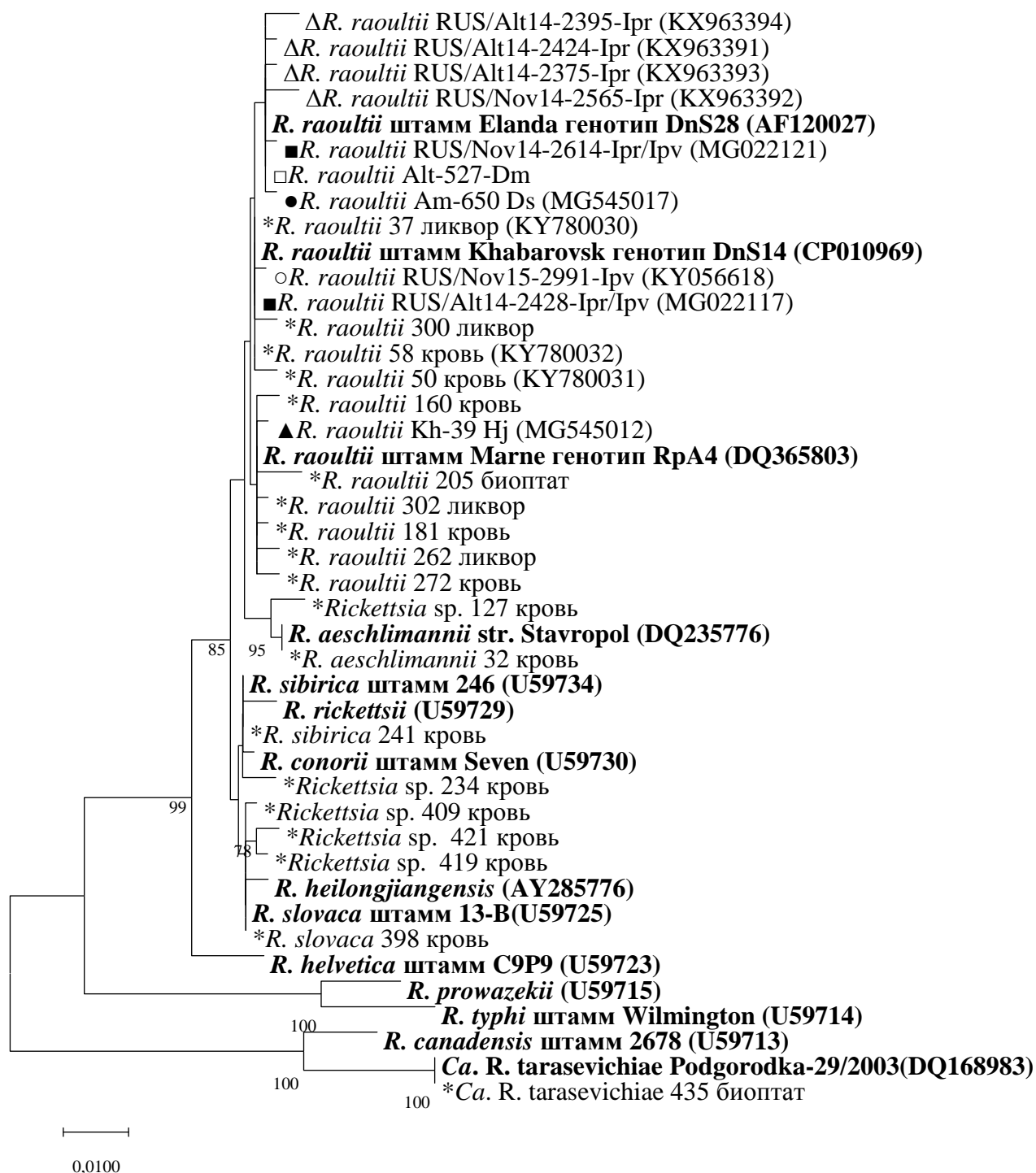
Определенные нуклеотидные последовательности фрагментов гена *gltA* в образцах крови 14 пациентов были идентичны друг другу и соответствовали последовательности *R. sibirica* (GenBank RSU59734). Дополнительно были определены последовательности гена поверхностного белка *ompA* для 12 образцов *R.*

*sibirica*. Последовательности были идентичны друг другу и соответствовали последовательности *R. sibirica* subsp. *sibirica* (GenBank U83455) (Рис. 3-7). Также были определены последовательности фрагментов гена 16S rRNA для 5 образцов *R. sibirica* и последовательности фрагментов гена поверхностного белка *ompB* для 13 образцов *R. sibirica*, которые были идентичны известным последовательностям *R. sibirica* (GenBank NR\_036848, AF123722).

Последовательности фрагментов *gltA* гена *R. raoultii* в клинических образцах отличались высокой вариабельностью. Последовательности фрагментов гена *gltA* в образцах двух пациентов (в одном образце крови и в одном образце ликвора) были идентичны друг другу и имели 100% сходство с последовательностью *R. raoultii* DnS14 (AF120028). Последовательности фрагментов гена *gltA* в образцах 5 пациентов (5 образцов крови и 1 ликвор) были идентичны друг другу и имели 100% сходство с последовательностью *R. raoultii* RpA4 (DQ365803), а последовательности фрагмента гена *gltA* в образцах 8 пациентов отличались между собой и от известных последовательностей *R. raoultii* 1-4 заменами (Рис. 3-8). Ни для одного из клинических образцов *R. raoultii* не были амплифицированы фрагменты генов 16S рРНК, *ompA* и *ompB*, вероятно из-за малого количества ДНК *R. raoultii* в образцах крови и ликвора пациентов.

Последовательности фрагментов генов *gltA* и *ompB* для клинического образца “*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. slovaca* и *R. aeschlimannii* были идентичны известным последовательностям (CP002428) и (DQ235776), соответственно. Последовательности фрагментов гена *gltA* для образцов остальных пяти пациентов отличались несколькими заменами от последовательностей риккетсий *R. slovaca*, *R. aeschlimannii* и *R. sibirica* (Рис. 3-7). Ни для одного из изолятов *R. slovaca*, *R. aeschlimannii* и *Rickettsia* spp. фрагменты генов 16S рРНК, *ompA* и *ompB* не были амплифицированы.



**Рисунок 3-7.** Дендрограмма, построенная методом ML на основе последовательностей фрагмента гена *gltA* (589 п.н.) *Rickettsia* spp. из образцов пациентов и из клещей. Жирным шрифтом выделены последовательности прототипных штаммов. Полученные в данной работе последовательности отмечены: \* клинические образцы пациентов;  $\Delta$  *I. persulcatus*; ○ *I. pavlovskyi*; ■ гибриды *I. persulcatus*/*I. pavlovskyi*; ● *D. silvarum*; □ *D. marginatus*; ▲ *H. japonica*.

	1286987	1286975	1286968	1286943	1286937	1286929	1286915	1286913	1286885	1286833	1286830	1286768	1286736	1286719	1286709	1286702	1286695	1286684	1286674	1286671	1286639	1286614	1286555	1286538	1286531	1286536	1286518	1286501	1286452	1286439	1286388	1286375	1286371		
MG545025 <i>H. con</i> Kh-171 (DnS14)*	TAA	TGA	AAG	TTT	GAT	GGA	CGA	TGC	TTG	TAG	TGA	CGA	AAT	TAA	CTA	CGC	TTA	TTC	TAT	GTT	GCA	TCT	TAT	TGC	CGA	GCA	CAA	TAG	TGC	TAT	TTC	TGA			
<i>D. ret</i> Nov-3015 (RpA4)**	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
<i>D. mar</i> Alt-527 (DnS28)***	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	
MG545017 <i>D. sil</i> Am-650 (Var-Ds)	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	
MG022121 <i>I. per/I. pav</i> Nov-2614	...	...	.G.	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	---	---	---		
MG022117 <i>I. per/I. pav</i> Alt-2428	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	
MG545012 <i>H. jap</i> Kh-39	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	---	---	---		
KY056618 <i>I. pav</i> Nov-2991	---	---	---	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
KX963394 <i>I. per</i> Alt-2395	...	C..	...	..C	...	.A.	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	
KX963393 <i>I. per</i> Alt-2375	...	...	...	...	...	.AG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	
KX963392 <i>I. per</i> Nov-2565	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	..T.	...	...	...	...	.A.		
KX963391 <i>I. per</i> Alt-2424	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	
KY019068 <i>I. pav</i> Nov-2979	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
MG02119 <i>I. per/I. pav</i> Alt-2429	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	
KY780031 58 кровь (DnS14)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
181 кровь	...	...	...	..C	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	---	---	---	---	
205 биоптат	...	...	...	...	...	T..	C..	...	.G.	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	---	---	---	---
262 ликвор	...	...	...	...	...	T.G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T.	...	...	---	---	---	---	---	
300 ликвор	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G.	...	...	..G	...	...	---	---	---	---	---	---	
272 кровь	...	...	...	...	...	T..	...	..C.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...	...	---	---	---	---	---	---	
KY780031 50 кровь	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	..C	...	...	...	...	...	...	
302 ликвор	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	---	---	---	---	---	---	
160 кровь	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	...	...	...	...	

**Рисунок 3-8.** Выравнивание последовательностей фрагмента гена *gltA* риккетсий *R. raoultii*, выявленных в клещах и в образцах пациентов. Последовательности, соответствующие прототипным штаммам, обозначены: \* - Khabarovsk (CP010969); \*\* - Marne (DQ365803); \*\*\* - Elanda (AF120027).



### 3.7. 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.

У всех 14 пациентов, в крови которых обнаружена ДНК *R. sibirica*, наблюдалось повышение температуры (38,8-39,7°C), синдром интоксикации с выраженной слабостью и головной болью. У большинства пациентов (10 из 14) отмечалась розеолезно-папулезная сыпь, при этом у 9 пациентов одновременно с сыпью выявлялся первичный аффект на месте укуса. У одного пациента выявлялся первичный аффект без сыпи. У восьми пациентов наблюдалась миалгия, у семи – артралгия, у одного – лимфаденопатия и у одного – эритематозная реакция (4 см) на месте укуса. Симптомы появлялись на 2-12 день (в среднем на 8 день) после укуса клеща. Длительность лихорадки составляла от 5 до 9 суток от начала заболевания. У трех из 14 пациентов наблюдалась анемия, у одного пациента - лейкоцитоз и у одного – лейкопения. У шести из 14 пациентов наблюдалась тромбоцитопения. У девяти пациентов отмечено повышение уровня трансаминаз АЛТ и АСТ разной степени выраженности; у одного пациента был повышен уровень только АСТ (Табл. 3-9).

У всех пациентов, в клинических образцах которых выявлена ДНК *R. raoultii*, наблюдалось повышение температуры до 37.2-39.7°C. У 13 из 15 пациентов отмечена головная боль, у семи пациентов – миалгия, у девяти пациентов - кратковременный менингеальный синдром и у двух пациентов - эритематозная реакция (2-5 см) на месте укуса клеща; артралгия не наблюдались ни у одного из пациентов. Лишь у двух из 15 пациентов наблюдалась сыпь, у одного из них одновременно с сыпью выявлялся первичный аффект. У одного пациента отмечался первичный аффект без сыпи. У одного пациента выявлялась лимфаденопатия. У семи из 15 пациентов наблюдалась тромбоцитопения, у одного – тромбоцитоз, у одного – анемия; повышенный уровень трансаминаз не был отмечен ни у одного из пациентов.

У всех пациентов, в крови которых выявлялись другие виды и геноварианты риккетсий, наблюдалось повышение температуры (37,3-39,3) и головная боль. Сыпь не была выявлена ни у одного пациента, первичный аффект был обнаружен только у одного пациента (с инфекцией, вызванной “*Candidatus R. tarasevichiae*”). У одного

пациента наблюдалась эритематозная реакция (2,5 см) на месте укуса, еще у одного пациента – артралгия и миалгия.

Антибактериальную терапию проводили доксициклином или цефтриаксоном, и длительность лихорадочного периода в условиях проведения лечения составила, в среднем, 5 дней.

Таблица 3-9

**Сравнение клинических симптомов пациентов, в образцах которых выявлена ДНК *Rickettsia* spp.**

	Группы пациентов, в клинических образцах которых выявлена ДНК:		
	<i>R. sibirica</i>	<i>R. raoultii</i>	<i>Rickettsia</i> spp.
Пациенты, число	14	15	8*
Дней между укусом и началом заболевания (в среднем)	2-14 (8,6)	1-23 (10,2)	1-20 (8,4)
Температура (°C)	38,8-39,7	37,2-39,7	37,3-39,3
Сыпь	10/14	2/15	0/6
Первичный аффект	10/14	2/15	1/6
Лимфаденопатия	1/14	1/15	0/6
Лимфаденит	0/14	2/15	0/6
Головная боль	14/14	13/15	6/6
Эритема	1/14	2/15	1/6
Менингеальный синдром	4/14	9/15	0/6
Артралгия	5/14	0/15	1/6
Миалгия	8/14	7/15	1/6
Повышенный уровень АЛТ (>43 u/l)	9/12	3/15	0/5
Повышенный уровень АСТ (>34 u/l)	10/12	2/15	1/5

\* для двух пациентов данные о клинических проявлениях не известны

### 3.8. Анализ парных сывороток пациентов на наличие антител к риккетсиям методом ELISA

На наличие антител групп IgM и IgG к риккетсиям группы КПЛ (ELISA с антигеном к *R. conorii*) были проанализированы 36 сывороток от 18 пациентов. Антитела к риккетсиям группы КПЛ были выявлены у 4 из 5 исследованных пациентов, в образцах которых была обнаружена ДНК *R. sibirica*, и у 1 из 3 пациентов с типичными симптомами СКТ, но у которых ДНК риккетсий не была выявлена (Таблица 3-10). У одного из 6-ти исследованных пациентов, в клинических образцах

которых была выявлена ДНК *R. raoultii*, наблюдалась слабая сероконверсия. У пациентов с риккетсиозами, вызванными *R. aeschlimannii* (n=1) и *Rickettsia* spp. (n=2) сероконверсии не наблюдалось.

Таблица 3-10

**Выявление антител к риккетсиям группы КПЛ в парных сыворотках пациентов методом ELISA**

ПЦР	Вид риккетсий	Сыпь	Первич. аффект	Температура (°C)	Другие признаки	Дней между взятием сывороток	Индекс антител			
							IgM		IgG	
							сыворотки		сыворотки	
							1-я	2-я	1-я	2-я
-		+	+	38,6		9	0,7	<b>12,2</b>	2,9	8,3
-		+	-	36,5		30	3,0	3,5	2,6	2,6
-		+	-	37,5		76	1,8	2,2	1,2	1,2
+	<i>R. sibirica</i>	+	+	38,8	эритема	90	3,1	<b>19,4</b>	3,3	<b>11,0</b>
+	<i>R. sibirica</i>	-	+	39,0		50	2,2	<b>22,5</b>	5,8	<b>10,2</b>
+	<i>R. sibirica</i>	+	+	39,7		77	1,9	<b>17,4</b>	3,7	7,2
+	<i>R. sibirica</i>	-	-	39,0		40	3,6	2,7	2,6	2,6
+	<i>R. sibirica</i>	+	+	39,6		14	1,2	<b>16,4</b>	3,7	6,6
+	<i>R. raoultii</i>	-	-	39,0	лимфаденит	15	3,0	2,9	3,6	4,1
+	<i>R. raoultii</i>	+	-	39,7	лимфаденит	13	1,0	1,3	2,0	2,0
+	<i>R. raoultii</i>	-	-	38,6		55	1,1	<b>9,0</b>	1,9	2,6
+	<i>R. raoultii</i>	-	-	38,0		9	2,0	2,0	3,9	5,5
+	<i>R. raoultii</i>	-	-	38,0		53	2,7	3,1	3,1	1,9
+	<i>R. raoultii</i>	-	-	39,3		20	2,3	3,8	2,6	2,6
+	<i>R. aeschlimannii</i>	-	-	37,3		30	4,7	4,3	3,9	4,2
+	<i>Rickettsia</i> sp.	Н	Н	Н	Н	76	3,6	4,7	4,6	5,9
+	<i>Rickettsia</i> sp.	-	-	38,0		16	2,6	5,2	2,1	2,9
+	<i>Rickettsia</i> sp.	Н	Н	37,5	Н	90	3,0	3,0	2,4	1,4

Н – данные не известны; + положительный результат ПЦР; индекс антител <9,0 – отрицательные результаты; 9,0 -11,0 – сомнительные результаты; >11,0 – положительные результаты

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Азиатская часть России является эндемичной по клещевому риккетсиозу. Несколько видов иксодовых клещей, являющихся переносчиками риккетсий, распространены на этой территории. Однако в настоящее время данные о встречаемости различных видов риккетсий в клещах разных видов весьма ограничены.

В настоящей работе были исследованы на наличие ДНК риккетсий клещи родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis*, собранных на флаг на территории Дальнего Востока и Западной Сибири.

Известно, что различные виды риккетсий связаны с определенными видами клещей. По литературным данным, во всех изученных регионах Сибири и Дальнего Востока “*Candidatus R. tarasevichiae*” является преобладающим видом в клещах *I. persulcatus* [Shrynov et al., 2003, 2006b]. Напротив, в Европейской части России (республика Коми) в клещах *I. persulcatus* риккетсии вида *R. helvetica* выявлялись чаще по сравнению с “*Candidatus R. tarasevichiae*” [Kartashov et al., 2017].

В данной работе был показан высокий уровень инфицированности риккетсиями клещей *I. persulcatus* во всех изученных регионах Дальнего Востока и Западной Сибири (62-87%). Было показано, что на большинстве исследованных участков (на территории Хабаровского и Камчатского краев, Новосибирской и Омской областей, Республики Алтай), в клещах *I. persulcatus* преобладает вид “*Candidatus R. tarasevichiae*” (до 90% инфицированных клещей), в то время как *R. helvetica* выявлялась в единичных случаях (уровень инфицированности от (0,1-2%). Однако на острове Сахалин наблюдалась обратная ситуация: преобладающим видом риккетсий был вид *R. helvetica* (уровень инфицированности 63,5%), тогда как “*Candidatus R. tarasevichiae*” выявлялась значительно реже (4%).

Чтобы проверить, может ли такая разница в инфицированности клещей *I. persulcatus* риккетсиями “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica* на Сахалине по сравнению с другими регионами быть связана с генетическими особенностями этих двух видов риккетсий, был проведен их молекулярно-генетический. Последовательности фрагментов генов *gltA* и *ompB* образцов “*Candidatus R. tarasevichiae*”, определенные в клещах *I. persulcatus* из всех исследованных регионов, были идентичны между собой и соответствовали известным последовательностям

этого вида. Аналогично, последовательности фрагментов гена *gltA*, *ompB* и *sca4* образцов *R. helvetica*, определенные в клещах *I. persulcatus* из Хабаровского края и острова Сахалин, были идентичными, хотя и отличались единичными нуклеотидными заменами от соответствующих последовательностей, выявленных в клещах *I. persulcatus* из других регионов и/или в других видах клещей. Было также показано, что последовательности фрагментов гена *cox1* *I. persulcatus* из Сахалина и других регионов существенно не различались между собой. Таким образом, высокий уровень инфицированности клещей *I. persulcatus* на Сахалине риккетсиями вида *R. helvetica*, по-видимому, не связан с генетическими различиями риккетсий и/или клещей. Следует отметить, что исследованный участок на острове Сахалин и один из исследованных участков в Хабаровском крае (Х5) имеют сходные климатические условия, репертуар клещей и их хозяев – мелких млекопитающих. Возможно, наблюдаемые различия связаны с географической изоляцией острова.

Как правило, на одной территории могут обитать несколько разных видов клещей. В таких областях симпатрии клещи могут приобретать нехарактерные для них виды риккетсий при питании на одних и тех же животных. На территории Западной Сибири существуют области симпатрии нескольких видов клещей рода *Ixodes*: *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* (Новосибирская, Томская, Кемеровская области, Республика Алтай) и клещей *I. persulcatus*, *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* (Омская область).

Два близкородственных вида клещей *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* схожи между собой как морфологически, так и генетически [Филиппова, 1977; Livanova et al., 2015]. Имаго *I. pavlovskyi* прокармливаются преимущественно на птицах, тогда как имаго *I. persulcatus* – на средних и крупных млекопитающих. Однако их нимфы и личинки, питающиеся на мелких млекопитающих, могут приобретать одни и те же инфекционные агенты при питании на инфицированных животных либо передавать патогены трансмитально клещам другого вида. Таким образом, можно предположить, что *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* переносят одни и те же виды риккетсий. Распространение риккетсий в клещах *I. pavlovskyi* практически не изучено. Есть данные о выявлении “*Candidatus R. tarasevichiae*” в клещах *I. pavlovskyi* в Новосибирской и Томской областях [Карташов, 2017].

В работе были исследованы клещи *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и их гибриды в очагах симпатрии этих видов в Новосибирской области и Республике Алтай. Состав риккетсий, переносимых клещами *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*, был схож для этих видов (“*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. heilongjiangensis*), однако уровень инфицированности существенно различался. Как и на всех других исследованных участках, в клещах *I. persulcatus* преобладала “*Candidatus R. tarasevichiae*” (уровень инфицированности 62-87%), в то время как *R. helvetica* выявлялась в единичных случаях (<1%). Уровень инфицированности клещей *I. pavlovskyi* риккетсиями был значительно ниже (8-9%) по сравнению с *I. persulcatus* (65-88%). Кроме того, в *I. pavlovskyi* более часто выявлялась *R. helvetica* (2-8%) по сравнению с “*Candidatus R. tarasevichiae*” (0,8-2,0%). Следует отметить, что различия в уровне инфицированности *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* риккетсиями “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica* было статистически значимым.

В гибридах выявлялись те же самые виды риккетсий, что и в клещах *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, за исключением *R. heilongjiangensis*. Как и в клещах *I. persulcatus*, в гибридах преимущественно выявлялись риккетсии вида “*Candidatus R. tarasevichiae*” (25-45%). Таким образом, уровень инфицированности гибридов “*Candidatus R. tarasevichiae*” был промежуточным по сравнению с родительскими видами; наблюдаемые различия являлись статистически значимыми.

Области совместного обитания трех видов клещей - *I. persulcatus*, *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* встречаются редко, поскольку *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* обитают в биотопах с умеренной влажностью, а *I. apronophorus* – с высокой влажностью [Филиппова, 1977; Якименко и др., 2013]. Клещи *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* относятся к паразитам с гнездово-норным типом паразитизма; все стадии этих клещей питаются на мелких млекопитающих. Несмотря на то, что *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* не нападают на людей, они могут служить резервуарами для патогенных видов риккетсий, поскольку прокармливаются на тех же мелких млекопитающих, что и преимагинальные стадии *I. persulcatus*. На начало выполнения данной работы не было данных о выявлении и генетической variability риккетсий в клещах *I. trianguliceps* и *I. apronophorus*.

В работе были проанализированы нимфы и имаго клещей *I. persulcatus*, *I. trianguliceps* и *I. apronophorus*, снятые с мелких млекопитающих, отловленных в

области симпатрии этих трех видов. Была показана связь каждого из видов клещей с определенным видом риккетсий. В клещах *I. persulcatus* преобладающим видом риккетсий был “*Candidatus R. tarasevichiae*”, в клещах *I. apronophorus* – *R. helvetica*, а в клещах *I. trianguliceps* – новый кандидатный вид риккетсий “*Candidatus R. uralica*”. Следует отметить, что “*Candidatus R. uralica*” не был обнаружен в других видах иксодовых клещей, что свидетельствует о связи этого кандидатного вида с *I. trianguliceps*. Помимо “*Candidatus R. uralica*”, в клещах *I. trianguliceps* были обнаружены еще два вида риккетсий: “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica*, однако их встречаемость была более низкой.

Риккетсии вида *R. helvetica* выявляются в клещах рода *Ixodes*: *I. ricinus* и *I. persulcatus* [Beati et al., 1993; Katargina et al., 2015; Shpynov et al., 2006b]. В данной работе *R. helvetica* также были обнаружены в разных видах клещей этого рода: *I. persulcatus* (Дальний Восток, Новосибирская область, Республика Алтай), *I. pavlovskyi* и в гибридах *I. persulcatus/I. pavlovskyi* (Новосибирская область, Республика Алтай), *I. apronophorus* и *I. trianguliceps* (Омская область). Интересно, что разные виды клещей были связаны с разными генетическими вариантами *R. helvetica*; три основных геноварианта были выявлены в клещах 1) *I. apronophorus*; 2) *I. trianguliceps* и 3) *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и гибридах, соответственно. То, что один и тот же геновариант был обнаружен в *I. persulcatus* как в Западной Сибири, так и на Дальнем Востоке, позволяет предположить, что разные геноварианты *R. helvetica* связаны именно с видом клеща, а не с местом их обитания.

В отличие от клещей рода *Ixodes*, видовое разнообразие риккетсий в клещах из рода *Dermacentor* было значительно ниже. Все исследованные виды *Dermacentor* spp. (*D. silvarum*, *D. reticulatus* и *D. marginatus*) были наиболее часто инфицированы *R. raoultii*, при этом уровень инфицированности составлял 46-93%. Интересно, что возбудитель СКТ - *R. sibirica* был выявлен только в клещах *D. marginatus* (уровень инфицированности 15%). В единичных клещах *D. silvarum* и *D. marginatus* также были обнаружены “*Candidatus R. tarasevichiae*”.

Уровень инфицированности клещей *Haemaphysalis* spp. был значительно ниже (12-23%) по сравнению с клещами *Dermacentor* spp. и *I. persulcatus* (45-93% и 62-87%, соответственно), однако видовое разнообразие риккетсий было наиболее высоким. В клещах *H. concinna* наиболее часто выявлялась *R. heilongjiangensis* (6-15%); реже

выявлялись *R. raoultii*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. sibirica*, *R. aeschlimannii* и кандидатные виды “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*”. В клещах *H. japonica* выявлялись в основном те же самые виды риккетсий: *R. heilongjiangensis*, *R. raoultii*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. aeschlimannii*, *R. canadensis* и кандидатные виды “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*”. Следует отметить, что “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*” были выявлены только в клещах рода *Haemaphysalis* и только на территории Дальнего Востока; при этом “*Candidatus R. principis*” были обнаружены преимущественно в клещах *H. japonica*, а “*Candidatus R. rara*” – в клещах *H. concinna*.

В данной работе впервые на территории азиатской части России были выявлены риккетсии *R. aeschlimannii* и впервые на территории России - *R. canadensis*. Риккетсиоз, вызванный *R. aeschlimannii*, регистрируется в Африке и Европе (Germanakis et al., 2013; Raoult et al., 2002). Ранее *R. aeschlimannii* были обнаружены в клещах *Haemaphysalis punctata* в Казахстане, в клещах *Rhipicephalus turanicus* в Китае и в клещах *Hyalomma* spp. в Африке, Европе и европейской части России (Ставрополь и Крым) [Beati et al., 1997; Matsumoto et al., 2004; Shrynov et al., 2004, 2009; Wei et al., 2015, Карташов, 2017]. *R. canadensis* изначально была выявлена в клещах *H. leporispalustris* в Канаде и США [Eremeeva et al., 2005]. Позже ДНК *R. canadensis* была обнаружена в одном клеще *H. flava* из Южной Кореи (AB297809).

Интересно, что на разных участках уровень инфицированности клещей *Haemaphysalis* spp. риккетсиями *R. raoultii* и “*Candidatus R. tarasevichiae*” существенно различался. Так, на участке Ам1 в Амурской области в клещах *H. concinna* преобладал вид *R. raoultii* (36%), при том, что на остальных участках доля *H. concinna*, инфицированных *R. raoultii*, не превышала 3%. Следует отметить, что участок Ам1 являлся единственным участком, расположенном в луговом биотопе, где в иксодофауне преобладали клещи *D. silvarum* (76% от общего числа собранных клещей), являющимися основными переносчиками *R. raoultii*.

Точно так же на участке Х1 в Хабаровском крае в клещах *H. concinna* и *H. japonica* преобладал вид “*Candidatus R. tarasevichiae*” (24% и 8% соответственно). На этом участке существенно доминировал вид *I. persulcatus* (83% от общего числа собранных клещей), который является основным переносчиком “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Можно предположить, что личинки и нимфы *Haemaphysalis* spp. могли



приобретать *R. raoultii* или “*Candidatus R. tarasevichiae*” при совместном кормлении с клещами *D. silvarum* или *I. persulcatus* на мелких млекопитающих, соответственно. Тем не менее, остается неясным, способны ли клещи *Haemaphysalis* spp. поддерживать циркуляцию *R. raoultii* и “*Candidatus R. tarasevichiae*” в природных очагах в отсутствие *D. silvarum* и *I. persulcatus*.

Следует отметить, что большинство видов риккетсий выявлялись не только в основных клещах-переносчиках, но и в других видах иксодовых клещей. Так, например, “*Candidatus R. tarasevichiae*” - вид, который ранее выявлялся только в *I. persulcatus*, был обнаружен во всех исследованных в данной работе видах клещей, кроме *D. reticulatus*. Аналогично, риккетсии *R. raoultii*, основными переносчиками которых являются клещи рода *Dermacentor* и *Rhipicephalus*, были выявлены в большинстве исследованных видов клещей, принадлежащих к родам *Haemaphysalis* и *Ixodes*. При этом, “*Candidatus R. tarasevichiae*” - высоко консервативный вид. Все определенные последовательности генов 16S rRNA, *gltA* и *ompB* для риккетсий этого вида (выявленные в разных видах/родах клещей) были идентичны. Для *R. raoultii* наблюдалась другая картина: в клещах *D. reticulatus* был выявлен только один генотип *R. raoultii*, в клещах *D. silvarum* и *H. concinna* - два генотипа, тогда как в клещах рода *Ixodes* обнаруживалось множество генетических вариантов. Так, в 14 клещах *I. persulcatus* было выявлено семь различных вариантов *R. raoultii*, включая три известных ранее и четыре новых (Табл. 3-5).

Клещевые риккетсиозы широко распространены на территории Сибири и на Дальнем Востоке. До недавнего времени считалось, что единственным клещевым риккетсиозом, на территории азиатской части России является СКТ (этиологический агент *R. sibirica*). Характерными симптомами данного заболевания являются первичный аффект на месте укуса, острая лихорадка, головная боль, пятнисто-папулезная сыпь [Рудаков, 2016]. Недавно в Хабаровском крае было описано еще одно риккетсиальное заболевание - дальневосточный клещевой риккетсиоз, вызываемый *R. heilongjiangensis*, и имеющий схожую с СКТ симптоматику [Mediannikov et al., 2004].

В настоящее время идентификация этиологического агента молекулярно-генетическими методами была подтверждена лишь в немногих случаях клещевых риккетсиозов. В Новосибирской области описаны только два случая генетически

подтвержденного СКТ, вызванного *R. sibirica* [Shpynov et al., 2006; Tkachev et al., 2008]. На Алтае в 44 клинических образцах подтверждено присутствие *R. sibirica*, а в одном - *R. heilongjiangensis* [Shpynov et al., 2006; Shpynov et al., 2009; Granitov et al., 2015; Dedkov et al., 2017]. В Хабаровском крае в 14 клинических образцах была идентифицирована ДНК *R. heilongjiangensis* и лишь в двух образцах - ДНК *R. sibirica* [Mediannikov et al., 2004; Mediannikov et al., 2006; Mediannikov et al., 2009; Бондаренко и др., 2014]. Данные по другим регионам, насколько нам известно, отсутствуют.

В данной работе ДНК *R. sibirica* была выявлена у 14 пациентов. У большинства из них наблюдалась типичная для СКТ симптоматика, тогда как у трех пациентов такие характерные симптомы, как сыпь, первичный аффект и лимфаденит, отсутствовали. Были проанализированы парные сыворотки пяти пациентов и у четырех из них инфекция была подтверждена серологически (методом ELISA). Стоит отметить, что антитела к риккетсиям не были выявлены у пациента без характерных для риккетсиозов симптомов. Это может быть связано с тем, что слабовирулентные штаммы вызывают инфекцию, которая протекает в легкой форме и без сероконверсии. Следует отметить, что ДНК риккетсий не была обнаружена в клинических образцах 15 пациентов с характерной для СКТ симптоматикой. Парные сыворотки трех из этих пациентов были проанализированы методом ELISA и только у одного из них наблюдалась сероконверсия. Таким образом, у двух пациентов, которым был поставлен диагноз клещевой риккетсиоз (Табл. 3-8), инфекция не была подтверждена ни молекулярными, ни серологическими методами.

В данной работе впервые на территории Российской Федерации были описаны случаи обнаружения ДНК *R. raoultii*, "*Candidatus R. tarasevichiae*", *R. slovaca*, *R. aeschlimannii*, а также *Rickettsia* spp., не относящихся к известным видам, в клинических образцах пациентов, госпитализированных после укуса клещами. *R. slovaca* и *R. aeschlimannii* являются признанными патогенами; заболевания вызываемые этими риккетсиями регистрируются в Европе и Африке. Симптоматика риккетсиозов, вызванных *R. slovaca* и *R. aeschlimannii*, может отличаться от типичной клинической картины СКТ [Germanakis, 2013; Raoult, 2002]. *R. raoultii* и "*Candidatus R. tarasevichiae*" ранее считались непатогенными риккетсиями. Однако недавно ДНК этих двух видов риккетсий была выявлена в образцах пациентов в Китае. [Jia et al., 2014; Liu et al., 2017]. Из 28 пациентов, в крови которых была обнаружена ДНК *R.*

*raoultii*, у 7 пациентов инфекция протекала бессимптомно, у 15 пациентов была инфекция легкой и средней степени тяжести и у 4 развилась тяжелая инфекция с осложнениями. Среди этих пациентов только у одного наблюдалась сыпь, у трех - первичный аффект и у 10 - лимфаденопатия. Для 15 пациентов клещевой риккетсиоз был подтвержден серологически методом ИФА с антигеном к *R. raoultii*. Более того, из клинических образцов пациентов были изолированы два штамма *R. raoultii* и для одного из них было проведено полногеномное секвенирование [Jia et al., 2014; Liu et al., 2017]. ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” была выявлена у 61 пациента. Только у двух пациентов выявлялась сыпь, у 12 - первичный аффект и у 18 – лимфаденопатия. Интересно, что у 34% пациентов отмечена невралгии [Jia et al., 2013; Li et al., 2018]. Таким образом, у пациентов с инфекциями, вызванными *R. raoultii* и “*Candidatus R. tarasevichiae*”, как правило, отсутствует характерная для клещевых риккетсиозов симптоматика.

В данной работе ДНК *R. raoultii* в образцах пациентов выявлялась чаще, чем ДНК *R. sibirica*. Из 15 пациентов, в клинических образцах которых обнаружена ДНК *R. raoultii*, только у трех были симптомы, типичные для риккетсиозов: сыпь и первичный аффект (n=1), только сыпь (n=1), только первичный аффект (n=1). Парные сыворотки 6 пациентов были исследованы серологически; только у одного из них наблюдалась слабая сероконверсия; возможно это связано с тем, что в нашей работе был использован коммерческий набор ELISA с антигеном к *R. conorii*, а не к *R. raoultii*. С другой стороны, согласно литературным данным, не все случаи клещевых риккетсиозов подтверждаются серологическими методами. Так, например, из 94 пациентов, у которых наблюдались все типичные признаки СКТ, 38 были отрицательны в РСК с антигеном к *R. sibirica* [Рудаков, 2016].

Интересно, что в 2016 году у большинства пациентов в образцах выявлялась ДНК *R. sibirica* (n=7), реже – ДНК *R. raoultii* (n=3), другие виды риккетсий не были выявлены. В 2017 году было выявлено и подтверждено молекулярно-генетическими методами 27 случаев риккетсиозов; у большинства из них инфекция была вызвана *R. raoultii* (n=12), реже риккетсиозы были вызваны *R. sibirica* (n=7). В единичных случаях в клинических образцах пациентов была выявлена ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. slovacae*, *R. aeschlimannii* и новых геновариантов риккетсий.

В настоящее время диагноз клещевой риккетсиоз ставят только на основании

клинической симптоматики. Из 37 пациентов, в образцах которых была выявлена ДНК риккетсий, диагноз был поставлен только для 15. Таким образом, больше половины случаев клещевых риккетсиозов остались не диагностированными. Поскольку риккетсиозы могут протекать без характерной симптоматики, число случаев заболеваний, вызванных риккетсиями, может быть значительно больше по сравнению с официальной статистикой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы была разработана методика 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. pavlovskyi* на территории Западной Сибири, показало, что в *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* 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. pavlovskyi* (0,8-2,0%), а *R. helvetica* чаще выявлялись в *I. pavlovskyi* (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*, отличающихся от геноварианта, обнаруженного в клещах *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и их гибридах на территории Западной Сибири и Дальнего Востока.

Было показано, что клещи рода *Dermacentor* (*D. silvarum* на территории Дальнего Востока, *D. reticulatus* и *D. marginatus* на территории Западной Сибири) преимущественно инфицированы *R. raoultii*. Для разных видов клещей уровень инфицированности составлял 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, возбудителем которого является *R. sibirica*. Выявление в клещах других патогенных риккетсий, таких как *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. raoultii* и “*Candidatus R. tarasevichiae*”, свидетельствует о потенциальной опасности инфицирования людей этими инфекционными агентами. При анализе клинических образцов госпитализированных пациентов, отмечавших укусы или наползание

клещей, была выявлена ДНК не только *R. sibirica*, но и *R. raoultii*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. aeschlimannii*, *R. slovacica* 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 некоторых 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 некоторых пациентов наблюдалась нетипичная симптоматика (эритематозная реакция, сыпь вокруг места укуса клеща, менингеальные проявления).

Значительное число исследованных в данной работе клещей разных видов 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. aeschlimannii*, *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. slovacca* (n=1), *R. aeschlimannii* (n=1) и новых геновариантов *Rickettsia* spp. (n=5); у большинства из этих пациентов (20/23) не наблюдалась характерная для клещевых риккетсиозов симптоматика.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Балашов, Ю.С. Кровососущие членистоногие и риккетсии./ Ю.С. Балашов и А.Б. Дайтер. – Ленинград: Наука, – 1973. – 251 с.
2. Балашов, Ю. С. Иксодовые клещи – паразиты и переносчики инфекций. / Ю. С. Балашов. – СПб.: Наука, – 1998. – 287 с.
3. Бондаренко, Е.И. Выявление возбудителей клещевого риккетсиоза в клещах и крови пациентов на Дальнем Востоке с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени. / Е.И. Бондаренко, Е.В. Мокрецова, Н.И. Здановская, Н.П. Высочина, Н.М. Пуховская, Д.И. Тимофеев, М.К. Иванов // Поликлиника. – 2014. – 5. – С. 44-48.
4. Возианова, Ж.И. Инфекционные и паразитарные болезни. / Ж.И. Возианова. – Киев.: Здоровье, 2001. – 2. – 696с.
5. Еремеева, М.Е. Современные подходы к лабораторной диагностике риккетсиозов. М.Е. Еремеева, С.Н. Шпынов, Н.К. Токаревич // Инфекция и иммунитет. – 2014. – 2. – С. 113-134.
6. Здродовский, П.Ф. Учение о риккетсиях и риккетсиозах. / П.Ф. Здродовский и Е.М. Голиневич. – М.: Медгиз, – 1956. – 492 с.
7. Злобин, В.И. Клещевые трансмиссивные инфекции. / В.И. Злобин, Н.В. Рудаков, И.В. Малов. – Новосибирск: Наука, – 2015. – 224 с.
8. Карташов, М.Ю. Встречаемость и генетическое разнообразие риккетсий в клещах в некоторых регионах России. Автореферат дис. канд. биол. наук: 03.01.03 / Карташов Михаил Юрьевич // Кольцово, 2017. – 26 с.
9. Лобан, К.М. Риккетсиозы человека: Руководство для врачей. / К.М. Лобан, Ю.В.Лобзин, Е.П. Лукин. – Москва, Санкт-Петербург: [ЭЛБИ], – 2002. – 473 с.
10. Паутов, В.Н. Биология риккетсий (Морфология, физиология и изменчивость). / В.Н. Паутов, А.И. Игумнов. – Москва: Медицина, –1968. – 204 с.
11. Рудаков, Н.В. Клещевой риккетсиоз. / Н.В. Рудаков и А.С. Оберт. – Омск: Омский научный вестник, – 2011. – 120 с.
12. Рудаков, Н.В. Проблемы лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России. / Н.В. Рудаков, И.Е.Самойленко, Т.А. Решетникова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – №1. – С. 50-

- 52.
13. Рудаков, Н.В. О роли *Rickettsia raoultii* в эпидемиологии клещевых риккетсиозов в России. / Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, С.А. Рудакова, Л.В. Кумпан, Ю.Б. Белан, Т.А. Решетникова, С.Н. Шпынов, Н.В. Абрамова, А.Н. Коломеец // Мед. Паразитол. – 2015. – №19. – С. 17-21.
  14. Рудаков, Н.В. Риккетсии и риккетсиозы. Руководство для врачей. / Н.В. Рудаков. – Омск: Омский научный вестник, – 2016. – 424 с.
  15. Самойленко, И.Е. Новые клещевые риккетсиозы на территории России и сопредельных государств. Информационно-методическое письмо. / И.Е. Самойленко, Т.А. Решетникова, Л.В. Кумпан, Н.В. Рудаков // Омск, – 2014. – 10 с.
  16. Тарасевич, И.В. Современные представления о риккетсиозах. / И.В. Тарасевич // Клин. Микробиол. антимикроб. химиотер. – 2005. – Том 7. – №2. – С. 119-129.
  17. Тарасевич, И.В. Экология риккетсий и эпидемиология риккетсиозов. / И.В. Тарасевич // Вестник российской АМН. – 2008. – №7. – С. 5-9.
  18. Тарасевич, И.В. Развитие учения о риккетсиях и риккетсиозах. / И.В. Тарасевич // Журнал для непрерывного медицинского образования для врачей. – 2017. – №2. – С. 22-30.
  19. Ткачев, С.Е. Разработка системы молекулярного видотипирования клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi* / С.Е. Ткачев, Н.Н. Ливанова // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – №5. – С. 325–327.
  20. Филиппова, Н.А. Иксодовые клещи подсемейства Ixodinae. / Н.А. Филиппова // Ленинград: Наука, – 1977. – 393 с.
  21. Шпынов, С.Н. Генотипирование риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, выявленных в России и Казахстане. / С.Н. Шпынов, Р. Parola, Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, М.А.Танкибаев, И.В. Тарасевич, D. Raoult, Н.Г. Ковалев, М.И. С.Н.Чубирко, А.П. Гаврилов // Мед. Паразитол. – 2003. – №. 3. – С. 20-24.
  22. Якименко, В.В. Иксодовые клещи Западной Сибири. Фауна, экология, основные методы исследования. / В.В. Якименко, М.Г. Малькова и С.Н. Шпынов // Омск: Омский научный вестник, – 2013. – 240 с.
  23. Balraj, P. Advances in rickettsia pathogenicity. / P. Balraj, P. Renesto, D. Raoult //

- Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2009. – V.1166. – P.94-105.
24. Beati, L. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. / L. Beati, O. Péter, W. Burgdorfer, A. Aeschlimann, D. Raoult // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1993. – V.43(3). – P. 521-526.
25. Beati, L. *Rickettsia aeschlimannii* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia associated with *Hyalomma marginatum* ticks. / L. Beati, M. Meskini, B. Thiers, D. Raoult // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1997. – 47(2). – P. 548-554.
26. Beati, L. Experimental infections of vervet monkeys (*Cercopithecus pygerythrus*) with three spotted fever group rickettsiae. / L. Beati, P.J. Kelly, P.R. Mason, D. Raoult // S. Afr. J. Sci. – 1999. – V.95. – P. 448–449.
27. Bell, E.J. Nonpathogenic rickettsias related to the spotted fever group isolated from ticks, *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni* from eastern montana. / E.J. Bell, G.M. Kohls, H.G. Stoenner, D.B. Lackman // J. Immunol. – 1963. – V.90. – P.770-781.
28. Biggs, H.M. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis — United States. / H.M. Biggs, C.B. Behravesh, K.K. Bradley, F.S. Dahlgren, N.A. Drexler, J.S. Dumler, S.M. Folk, C.Y. Kato, R.R. Lash, M.L. Levin, R.F. Massung, R.B. Nadelman, W.L. Nicholson, C.D. Paddock, B.S. Pritt, M.S. Traeger // A Practical Guide for Health Care and Public Health Professionals MMWR Recomm Rep. – 2016. – V.65(2). – P. 1-44.
29. Bitam, I. First molecular detection of *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, and *R. massiliae* in ticks from Algeria. / I. Bitam, P. Parola, K. Matsumoto, J.M. Rolain, B. Baziz, S.C. Boubidi, Z. Harrat, M. Belkaid, D. Raoult // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006. – V.1078. – P. 368-372.
30. Blanc, G. Reductive genome evolution from the mother of *Rickettsia*. / G. Blanc, H. Ogata, C. Robert, S. Audic, K. Suhre, G. Vestris, J.M. Claverie, D. Raoult // PLoS Genet. – 2007. – V.3(1). – e14.
31. Botelho-Nevers, E. Host, pathogen and treatment-related prognostic factors in rickettsioses. / E. Botelho-Nevers, D. Raoult // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – V.10. – P. 1139-50. doi: 10.1007/s10096-011-1208-z. Epub 2011 Apr 26.
32. Boudebouch, N. Molecular survey for spotted fever group rickettsiae in ticks from

- Morocco. / N. Boudebouch, M. Sarih, C. Socolovschi, H. Amarouch, M. Hassar, D. Raoult, P. Parola // *Clin. Microbiol. Infect.* –2009. – Suppl 2. – P. 259-260.
33. Burgdorfer, W. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. / W. Burgdorfer, K.T. Friedhoff, J.L. Jr. Lancaster // *Bull. WHO.* – 1966. – V.35. – P.149-153.
34. Burgdorfer, W. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. / W. Burgdorfer, L.P. Brinton // *Ann. N. Y. Acad Sci.* – 1975. – V.266. –P. 61-72.
35. Brouqui, P. ESCMID. Study Group on Coxiella, Anaplasma, Rickettsia and Bartonella; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. / P. Brouqui, F. Bacellar, G. Baranton, R.J. Birtles, A. Bjoërsdorff, J.R. Blanco, G. Caruso, M. Cinco, P.E. Fournier, E. Francavilla, M. Jensenius, J. Kazar, H. Laferl, A. Lakos, S. Lotric Furlan, M. Maurin, J.A. Oteo, P. Parola, C. Perez-Eid, O. Peter, D. Postic, D. Raoult, A. Tellez, Y. Tselentis, B. Wilske // *Clin. Microbiol. Infect.* 2004. – V.12. – P. 1108-1132.
36. Chapman, A.S. Tickborne Rickettsial Diseases Working Group, CDC. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis--United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. / A.S. Chapman, J.S. Bakken, S.M. Folk, C.D. Paddock, K.C. Bloch, A. Krusell, D.J. Sexton, S.C. Buckingham, G.S. Marshall, G.A. Storch, G.A. Dasch, J.H. McQuiston, D.L. Swerdlow, S.J. Dumler, W.L. Nicholson, D.H. Walker, M.E. Ereemeeva, C.A. Ohl // *MMWR Recomm. Rep.* – 2006. – V.55(RR-4). – P. 1-27.
37. Cheng, C. Diversity of spotted fever group *Rickettsia* infection in hard ticks from Suifenhe, Chinese-Russian border. / C. Cheng, W. Fu, W. Ju, L. Yang, N. Xu, Y.M. Wang, H. Li, Y.L. Wang, M.X. Hu, J. Wen, D. Jiao, C. Geng, Y. Sun // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2016. – V.5. – P. 715-719.
38. Clay, K. Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. / K. Clay, O. Klyachko, N. Grindle, D. Civitello, D. Oleske, C. Fuqua // *Mol. Ecol.* – 2008. – V. 17(19). – P. 4371-4381.
39. Curto, P. Differences in Intracellular Fate of Two Spotted Fever Group Rickettsia in

- Macrophage-Like Cells. / P. Curto, I. Simões, S.P. Riley, J.J. Martinez // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2016. – V.6. – 80.
40. Dantas-Torres, F. Rocky Mountain spotted fever. / F. Dantas-Torres // *Lancet Infect. Dis.* – 2007. – V.7(11). – P. 724-732.
41. Darby, A.C. Intracellular pathogens go extreme: genome evolution in the Rickettsiales. / A.C. Darby, N.H. Cho, H.H. Fuxelius, J. Westberg, S.G. Andersson // *Trends Genet.* – 2007. – V.10. – P. 511-520.
42. Dedkov, V.G. The burden of tick-borne diseases in the Altai region of Russia. / V.G. Dedkov, E.G. Simonova, O.V. Beshlebova, M.V. Safonova, O.A. Stukolova, E.V. Verigina, G.V. Savinov, I.P. Karaseva, E.A. Blinova, V.M. Granitov, I.V. Arsenjeva, G.A. Shipulin // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2017. – V.5. – P. 787-794.
43. Denison, A.M. Detection of *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, and *Rickettsia akari* in skin biopsy specimens using a multiplex real-time polymerase chain reaction assay. / A.M. Denison, B.D. Amin, W.L. Nicholson, C.D. Paddock // *Clin. Infect. Dis.* – 2014. – V.59(5). – P. 635-642.
44. De Sousa, R. *Rickettsia slovaca* infection in humans, Portugal. / R. De Sousa, B.I. Pereira, C. Nazareth, S. Cabral, C. Ventura, P. Crespo, N. Marques, S. da Cunha // *Emerg. Infect. Dis.* – 2013. – V.10. – P. 1627-1629.
45. Diop, A. Rickettsial genomics and the paradigm of genome reduction associated with increased virulence. / A. Diop, D. Raoult, P.E. Fournier // *Microbes Infect.* – 2018. – V.7-8. – P. 401-409.
46. Drancourt, M. Biological variations in 412 patients with Mediterranean spotted fever. / M. Drancourt, D. Raoult, J.R. Harlé, H. Chaudet, F. Janbon, C. Charrel, H. Gallais // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1990. – V.590. – P. 39-50.
47. Ellison, D.W. Genomic comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. / D.W. Ellison, T.R. Clark, D.E. Sturdevant, K. Virtaneva, S.F. Porcella, T. Hackstadt // *Infect. Immun.* – 2008. – V.76(2). – P. 542-550.
48. Eremeeva, M.E. Proteinic and genomic identification of spotted fever group rickettsiae isolated in the former USSR. / M.E. Eremeeva, N.M. Balayeva, V.F. Ignatovich, D. Raoult // *J. Clin. Microbiol.* – 1993. – V.10. P. 2625-2633.
49. Eremeeva, M.E. Prevalence of bacterial agents in *Ixodes persulcatus* ticks from the

- Vologda Province of Russia. / M.E. Ereemeeva, A. Oliveira, J.B. Robinson, N. Ribakova, N.K. Tokarevich, G.A. Dasch // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – V.1078. – P. 291-298.
50. Ereemeeva, M.E. Detection and identification of bacterial agents in *Ixodes persulcatus* Schulze ticks from the north western region of Russia. / M.E. Ereemeeva M.E., A. Oliveira, J. Moriarity, J.B. Robinson, N.K. Tokarevich, L.P. Antyukova, V.A. Pyanyh, O.N. Emeljanova, V.N. Ignatjeva, R. Buzinov R., V. Pyankova, G.A. Dasch // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2007. – V.7(3). –P. 426-36.
51. Estripeaut, D. Rocky Mountain spotted fever, Panama. / D. Estripeaut, M.G. Aramburú, X. Sáez-Llorens, H.A. Thompson, G.A. Dasch, C.D. Paddock, S. Zaki, M.E. Ereemeeva // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – V.11. – P. 1763-1765.
52. Fang, R. Rickettsiae as Emerging Infectious Agents. / R. Fang, L.S. Blanton, D.H. Walker // *Clin. Lab. Med.* – 2017. – V.37(2). – P. 383-400.
53. Ferla, M.P. New rRNA gene-based phylogenies of the Alphaproteobacteria provide perspective on major groups, mitochondrial ancestry and phylogenetic instability. / M.P. Ferla, J.C. Thrash, S.J. Giovannoni, W.M. Patrick // *PLoS One.* – 2013. – V.8(12). – e83383.
54. Fujita, H. *Rickettsia asiatica* sp. nov., isolated in Japan. / H. Fujita, P.E. Fournier, N. Takada, T. Saito, D. Raoult // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – V.56(Pt 10). – P. 2365-2368.
55. Foldvari, G. Transmission of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* by male *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks to humans. / G. Foldvari, K. Rigo, A. Lakos // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2013. –V. 76(3). – P. 387-389.
56. Fournier, P.E. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. / P.E. Fournier, F. Grunnenberger, B. Jaulhac, G. Gastinger, D. Raoult // *Emerg. Infect. Dis.* – 2000. – V.6(4). – P. 389-392.
57. Fournier, P.E. Kinetics of antibody responses in *Rickettsia africae* and *Rickettsia conorii* infections. / P.E. Fournier, M. Jensenius, H. Laferl, S. Vene, D. Raoult // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2002. – V.2. – P. 324-328.
58. Fournier, P.E. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. / P.E. Fournier, J.S.

- Dumler, G. Greub, J. Zhang, Y. Wu, D. Raoult // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – V.41(12). – P. 5456-5465.
59. Fournier, P.E. Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. / P.E. Fournier, C. Allombert, Y. Supputamongkol, G. Caruso, P. Brouqui, D. Raoult // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – V.42(2). – P. 816-818.
60. Fournier, P.E. Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. / P.E. Fournier, F. Gouriet, P. Brouqui, F. Lucht, D. Raoult // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – V.40(10). – P. 1435-44. Epub 2005 Apr 7.
61. Garavelli, P.L. [Rickettsialpox: report of two cases imported from South Africa]. / P.L. Garavelli // *Recenti Prog. Med.* – 2005. – V.96(12). – P. 609-610.
62. Germanakis, A. *Rickettsia aeschlimannii* infection in a Man, Greece. / A. Germanakis, D. Chochlakis, E. Angelakis, Y. Tselentis, A. Psaroulaki // *Emerg. Infect. Dis.* – 2013. – V.19. P. 1176–1177.
63. Gillespie, J.J. *Rickettsia* phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. / J.J. Gillespie, K. Williams, M. Shukla, E.E. Snyder, E.K. Nordberg, S.M. Ceraul, C. Dharmanolla, D. Rainey, J. Soneja, J.M. Shallom, N.D. Vishnubhat, R. Wattam, A. Purkayastha, M. Czar, O. Crasta, J.C. Setubal, A.F. Azad, B.S. Sobral // *PLoS One.* – 2008. V.3(4). – e2018.
64. Gouin, E. The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. / E. Gouin, C. Egile, P. Dehoux, V. Villiers, J. Adams, F. Gertler, R. Li, P. Cossart // *Nature.* – 2004. – V.427(6973). P. 457-461.
65. Granitov, V. New evidence on tick-borne rickettsioses in the Altai region of Russia using primary lesions, serum and blood clots of molecular and serological study. / V. Granitov, S. Shpynov, O. Beshlebova, I. Arsenjeva, V. Dedkov, M. Safonova, O. Stukolova, A. Pantjukhina, I. Tarasevich // *Microbes. Infect.* – 2015. – V.17(11-12). – P. 862-865.
66. Horta, M.C. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. / M.C. Horta, J. Moraes-Filho, R.A. Casagrande, T.B. Saito, S.C. Rosa, M. Ogrzewalska, E.R. Matushima, M.B. Labruna // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2009. – V.9(1). P. 109-118.



67. Heinzen, R.A. Directional actin polymerization associated with spotted fever group *Rickettsia* infection of Vero cells. / R.A. Heinzen, S.F. Hayes, M.G. Peacock, T. Hackstadt // *Infect. Immun.* – 1993. – V.61(5). – P. 1926-1935.
68. Heise, S.R. Bacterial diversity in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) with a focus on members of the genus *Rickettsia*. / S.R. Heise, M.S. Elshahed, S.E. Little // *J. Med. Entomol.* – 2010. – V.47(2). – P. 258-268.
69. Hun, L. Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* isolated from human clinical samples and from the rabbit tick *Haemaphysalis leporispalustris* collected at different geographic zones in Costa Rica. / L. Hun, X. Cortés, L. Taylor // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2008. – V.79(6). – P. 899-902.
70. Ibarra, V. *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. / V. Ibarra, J.A. Oteo, A. Portillo, S. Santibáñez, J.R. Blanco, L. Metola, J.M. Eiros, L. Pérez-Martínez, M. Sanz // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – V.1078. – P. 206-214.
71. Inokuma, H. Prevalence of tick-borne *Rickettsia* and *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* in Tokachi district, Eastern Hokkaido, Japan. / H. Inokuma, M. Ohashi, Jilintai, S. Tanabe, K. Miyahara // *J. Vet. Med. Sci.* – 2007. – V.69(6). – P. 661-664.
72. Ireton, K. Molecular mechanisms of cell–cell spread of intracellular bacterial pathogens. / K. Ireton // *Open Biol.* – 2013. – V.3(7). – P. 130079.
73. Jado, I. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. / I. Jado, J.A. Oteo, M. Aldámiz, H. Gil, R. Escudero, V. Ibarra, J. Portu, A. Portillo, M.J. Lezaun, C. García-Amil, I. Rodríguez-Moreno, P. Anda // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – V.13(9). – P. 1405-1407.
74. Jayaseelan, E. Cutaneous eruptions in Indian tick typhus. / E. Jayaseelan, S.C. Rajendran, S. Shariff, D. Fishbein, JS. Keystone // *Int. J. Dermatol.* – 1991. – V.30. – P. 790–794.
75. Jensenius, M. Sequential changes in hematologic and biochemical parameters in African tick bite fever. / M. Jensenius, P.E. Fournier, K.B. Hellum, L. Wesslén, G. Caruso, T. Priø, K. Løhne, S. Vene, D. Raoult, B. Myrvang // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2003a. – V.9(7). – P. 678-683.
76. Jensenius, M. Systemic inflammatory responses in African tick-bite fever. / M. Jensenius, T. Ueland, P.E. Fournier, F. Brosstad, E. Stylianou, S. Vene, B. Myrvang,

- D. Raoult, P. Aukrust // *J. Infect. Dis.* – 2003b. – V.187(8). – P. 1332-1336.
77. Jia, N. Human infection with *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. / N. Jia, Y.C. Zheng, J.F. Jiang, W.C. Cao // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – V.369. – P. 1178-1180.
78. Jia, N. Human infections with *Rickettsia raoultii*, China. / N. Jia, Y.C. Zheng, L. Ma, Q.B. Huo, X.B. Ni, B.G. Jiang, Y.L. Chu, R.R. Jiang, J.F. Jiang, W.C. Cao // *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – V.20(5). – P. 866-868.
79. Kartashov, M.Y. Detection of *Rickettsia helvetica* and *Candidatus R. tarasevichiae* DNA in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Northeastern European Russia (Komi Republic). / M.Y. Kartashov, L.I. Glushkova, T.P. Mikryukova, I.V. Korabelnikov, Y.I. Egorova, N.L. Tupota, E.V. Protopopova, S.N. Konovalova, V.A. Ternovoi, V.B. Loktev // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2017. – V.8(4). P. 588-592.
80. Karkouri, K.E. Origin and Evolution of Rickettsial Plasmids. / K.E. Karkouri, D. Pontarotti, D. Raoult, P.E. Fournier // *PLoS One.* – 2016. – V.11(2). – P. e0147492.
81. Katargina, O. Detection and identification of *Rickettsia* species in *Ixodes* tick populations from Estonia. / O. Katargina, J. Geller, A. Ivanova, K. Värvi, V. Tefanova, S. Vene, A. Lundkvist, I. Golovljova // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2015. – V.6(6). – P. 689-694.
82. Kirschner, F. A combination of different types of vasculitis in African tick bite fever. Clinical Reference. / F. Kirschner, D. Metzger, D. Nashan, T. Schwarz, S. Ständer, A. Stein, C. Sunderkötter // *Dermatopathology: Practical & Conceptual.* – 2005. – V. 11. –P.
83. Kohn, M. *Dermacentor reticulatus* in Berlin/Brandenburg (Germany): Activity patterns and associated pathogens. / M. Kohn, J. Krücken, J. McKay-Demeler, S. Pachnicke, K. Krieger, von G. Samson-Himmelstjerna // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2019. – V.10(1). – P. 191-206.
84. Kuloglu, F. Mediterranean spotted fever in the Trakya region of Turkey. / F. Kuloglu, J.M. Rolain, F. Akata, C. Eroglu, A.D. Celik, P. Parola // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2012. – V.3(5-6). – P. 298-304.
85. Labruna, M.B. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. / M.B. Labruna, M. Ogrzewalska, T.F. Martins, A. Pinter, M.C. Horta // *J. Med. Entomol.* – 2008. – V.45(6). – P. 1156-9.

86. Lakos, A. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA). / A. Lakos // Wien. Klin. Wochenschr. –2002. – V.114(13-14). – P. 648-54.
87. Lamason, R.L. Rickettsia Sca4 Reduces Vinculin-Mediated Intercellular Tension to Promote Spread. / R.L. Lamason , E. Bastounis , N.M. Kafai , R. Serrano , J.C. Del Álamo , J.A. Theriot , M.D. Welch // Cell. – 2016. – V.167(3). – P. 670-683.
88. Leitner, M. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. / M. Leitner, S. Yitzhaki, S. Rzotkiewicz, A. Keysary // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2002. – V.67(2). – 166-169.
89. Levin, M.L. Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. / M.L. Levin, L.F. Killmaster, G.E. Zemtsova // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2012. – V.12(1). – P. 28-33.
90. Levin, M.L. Comparative value of blood and skin samples for diagnosis of spotted fever group rickettsial infection in model animals. / M.L. Levin, A.N. Snellgrove, G. E. Zemtsova // Ticks Tick Borne Dis. – 2016. – V.7(5). – P. 1029–1034.
91. Li, H. Isolation and Identification of *Rickettsia raoultii* in Human Cases: A Surveillance Study in 3 Medical Centers in China. / H. Li, P.H. Zhang, Y. Huang, J. Du, N. Cui, Z.D. Yang, F. Tang, F.X. Fu, X.M. Li, X.M. Cui, Y.D. Fan, B. Xing, X.K. Li, Y.G. Tong, W.C. Cao, W. Liu // Clin. Infect. Dis. – 2018. – V.66(7). – P. 1109-1115.
92. Liang, C.W. Spotted fever group *Rickettsia* in Yunnan Province, China. / C.W. Liang, J.B. Zhao, J. Li, L.T. Chang, H.L. Yu, L.X. Zhang, L.J. Zhang, X.J. Yu // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2012. V.12(4). – P. 281-286.
93. Livanova, N.N. Genetic diversity of *Ixodes pavlovskyi* and *I. persulcatus* (Acari: Ixodidae) from the sympatric zone in the south of Western Siberia and Kazakhstan. / N.N. Livanova, A.Y. Tikunov, A.M. Kurilshikov, S.G. Livanov, N.V. Fomenko, D.E. Taranenko, A.E. Kvashnina, N.V. Tikunova // Exp. Appl. Acarol. – 2015. – V.67. – P. 441–456.
94. Liu, D. Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens. / D. Liu // CRC Press, – 2011. –1278 p.
95. Liu, H. Characterization of rickettsiae in ticks in northeastern China. / H. Liu, Q. Li, X. Zhang, Z. Li, Z. Wang, M. Song, F. Wei, S. Wang, Q. Liu // Parasit. Vectors. – 2016. – V.9. – P. 498.

96. Liu, W. *Candidatus* Rickettsia tarasevichiae Infection in Eastern Central China: A Case Series. / W. Liu, H. Li, Q.B. Lu, N. Cui, Z.D. Yang, J.G. Hu, Y.D. Fan, C.T. Guo, X.K. Li, Y.W. Wang, K. Liu, X.A. Zhang, L. Yuan, P.Y. Zhao, S.L. Qin, W.C. Cao // Ann. Intern. Med. – 2016. – V.164(10). – P. 641-648.
97. Lu, Q. *Rickettsia japonica* Infections in Humans, Zhejiang Province, China, 2015. / Q. Lu, J. Yu, L. Yu, Y. Zhang, Y. Chen, M. Lin, X. Fang // Emerg. Infect. Dis. – 2018. – V.24(11). – P. 2077-2079.
98. Macaluso, K.R. Infection and transovarial transmission of rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. / K.R. Macaluso, D.E. Sonenshine, S.M. Ceraul, A.F. Azad // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2001. – V.1(1). – P. 45-53.
99. Madeddu, G. *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. / G. Madeddu, F. Mancini, A. Caddeo, A. Ciervo, S. Babudieri, I. Maida, M.L. Fiori, G. Rezza, M.S. Mura // Emerg. Infect. Dis. – 2012. – V.18(4). – P. 702-704.
100. Maioli, G. Ethiological agents of rickettsiosis and anaplasmosis in ticks collected in Emilia-Romagna region (Italy) during 2008 and 2009. / Maioli G, Pistone D, Bonilauri P, Pajoro M, Barbieri I, Mulatto P, Vicari N, Dottori M. // Exp. Appl. Acarol. – 2012. – V.57. – P. 199–208.
101. Mansueto, P. New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases. / P. Mansueto, G. Vitale, A. Cascio, A. Seidita, I. Pepe, A. Carroccio, S. di Rosa, G.B. Rini, E. Cillari, D.H. Walker // Clin. Dev. Immunol. – 2012. – V.2012. – P. 967852.
102. Martijn, J. Single-cell genomics of a rare environmental alphaproteobacterium provides unique insights into Rickettsiaceae evolution. / J. Martijn, F. Schulz, K. Zaremba-Niedzwiedzka, J. Viklund, R. Stepanauskas, S.G. Andersson, M. Horn, L. Guy, T.J. Ettema // ISME J. – 2015. – V.9(11). – P. 2373-2385.
103. Martins L.A., Galletti M.F.B.M., Ribeiro J.M., Fujita A., Costa F.B., Labruna M.B., Daffre S., Fogaça A.C. The Distinct Transcriptional Response of the Midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* Ticks to *Rickettsia rickettsia* Correlates to Their Differences in Susceptibility to Infection. / L.A. Martins, M.F.B.M. Galletti, J.M. Ribeiro, A. Fujita, F.B. Costa, M.B. Labruna, S. Daffre, A.C. Fogaça // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2017. – V.7. – P. 129.

104. Matsumoto, K. Identification of spotted fever group *Rickettsia* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the *sca4* gene. / K. Matsumoto and H. Inokuma // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2009. – V. 9(6). – P. 747-749.
105. McClure, E.E. Engineering of obligate intracellular bacteria: progress, challenges and paradigms. / E.E. McClure, A.S.O. Chávez, D.K. Shaw, J.A. Carlyon, R.R. Ganta, S.M. Noh, D.O. Wood, P.M. Bavoil, K.A. Brayton, J.J. Martinez, J.W. McBride, R.H. Valdivia, U.G. Munderloh, J.H.F. Pedra // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2017. – V.15(9). – P. 544-558.
106. McDade, J.E. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. / J.E. McDade, V.F. Newhouse // *Annu. Rev. Microbiol.* –1986. – V.40. – P. 287-309.
107. Mechai, F. Emergence of *Rickettsia slovaca* infection in Brittany, France. / F. Mechai and M. Revest // *Clinical Microbiology and Infection.* – 2009. – V15. – P. 230–231.
108. Mediannikov, O.Y. *Acute tick-borne rickettsiosis caused by Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. / O.Y. Mediannikov, Y. Sidelnikov, L. Ivanov, E. Mokretsova, P.E. Fournier, I. Tarasevich, D. Raoult // *Emerg. Infect. Dis.* – 2004. – V.10(5). P. 810-817.
109. Mediannikov, O. Far eastern tick-borne rickettsiosis: identification of two new cases and tick vector. / O. Mediannikov, Y. Sidelnikov, L. Ivanov, P.E. Fournier, I. Tarasevich, D. Raoult // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – V.1078. P. 80-88.
110. Mediannikov, O. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. / O. Mediannikov, K. Matsumoto, I. Samoylenko, M. Drancourt, V. Roux, E. Rydkina, B. Davoust, I. Tarasevich, P. Brouqui, P.E. Fournier // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – V.7. – P. 1635-1639.
111. Merhej, V. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. / V. Merhej, D. Raoult // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 2011. – V.86(2). P. 379-405.
112. Merhej, V. The rhizome of life: the sympatric *Rickettsia felis* paradigm demonstrates the random transfer of DNA sequences. / V. Merhej, C. Notredame, M. Royer-Carenzi, P. Pontarotti, D. Raoult // *Mol Biol Evol.* – 2011. – V.28(11). – P. 3213-3223.

113. Merhej, V. Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. / V. Merhej, E. Angelakis, C. Socolovschi, D. Raoult // *Infect. Genet. Evol.* – 2014. – V.25. – P. 122-137.
114. Mokrani, N. *Rickettsia aeschlimannii* infection, Algeria. / N. Mokrani, P. Parola, S. Tebbal, M. Dalichaouche, A. Aouati, D. Raoult // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – V.14(11). – P. 1814-1815.
115. Movila, A. Detection of *Babesia* Sp. EU1 and members of spotted fever group rickettsiae in ticks collected from migratory birds at Curonian Spit, North-Western Russia. / A. Movila, A.L. Reye, H.V. Dubinina, O.O. Tolstenkov, I. Toderas, J.M. Hübschen, C.P. Muller, A.N. Alekseev . // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2011. – V.11(1). – P. 89-91.
116. Ngwamidiba, M. Sca1, a previously undescribed paralog from autotransporter protein-encoding genes in *Rickettsia* species. / M. Ngwamidiba, G. Blanc, D. Raoult, P.E. Fournier // *BMC Microbiol.* – 2006. – V.6. – P. 12.
117. Nilsson, K. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. / K. Nilsson, O. Lindquist, C. Pålson // *Lancet.* – 1999. – V. 354(9185). – P. 1169-1173.
118. Nilsson, K. Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. / K. Nilsson, C. Pålson, A. Lukinius, L. Eriksson, L. Nilsson, O. Lindquist // *J. Infect. Dis.* – 2002. – V.185(8). – P. 1128-1138.
119. Nilsson, K. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. / K. Nilsson, K. Elfving, C. Pahlson // *Emerg. Infect. Dis.* – 2010. – V.16(3). – P. 490-492.
120. Nogueras, M.M. Coinfection with "*Rickettsia sibirica* subsp. *mongolotimonae*" and *Rickettsia conorii* in a Human Patient: a Challenge for Molecular Diagnosis Tools. / M.M. Nogueras, B. Roson, S. Lario, I. Sanfeliu, I. Pons, E. Anton, A. Casanovas, F. Segura // *J. Clin. Microbiol.* – 2015. – V.53(9). – P. 3057-3062.
121. Ogata, H. *Rickettsia felis*, from culture to genome sequencing. / H. Ogata, C. Robert, S. Audic, S. Robineau, G. Blanc, P.E. Fournier, P. Renesto, J.M. Claverie, D. Raoult // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2005a. – V.1063. – P. 26-34.
122. Ogata, H. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. / H. Ogata, P. Renesto, S.

- Audic, C. Robert, G. Blanc, P.E. Fournier, H. Parinello, J.M. Claverie, D. Raoult // PLoS Biol. – 2005b. – V.3(8). – P. e248.
123. Ogata, H. Genome Sequence of *Rickettsia bellii* Illuminates the Role of Amoebae in Gene Exchanges between Intracellular Pathogens. / H. Ogata, B. La Scola, S. Audic, P. Renesto, G. Blanc, C. Robert, P.E. Fournier, J.M. Claverie, D. Raoult // PLoS Genet. – 2006. – V.2(5). – P. e76.
124. Oteo, J.A. Tick-borne rickettsioses in Europe. / J.A. Oteo and A. Portillo // Ticks Tick Borne Dis. – 2012. – V.3(5-6). – P. 271-278.
125. Paddock, C.D. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. / C.D. Paddock, J.W. Sumner, J.A. Comer, S.R. Zaki, C.S. Goldsmith, J. Goddard, S.L. McLellan, C.L. Tamminga, C.A. Ohl // Clin. Infect. Dis. – 2004. – V.38(6). – P. 805-811.
126. Parola, P. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. / P. Parola, D. Raoult // Clin. Infect. Dis. – 2001. – V.32(6). – P. 897-928.
127. Parola, P. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses. / P. Parola, C. Roveery, J.M. Rolain, P. Brouqui, B. Davoust, D. Raoult // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – V.15(7). – P. 1105-1108.
128. Parola, P. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. / P. Parola, C.D. Paddock, C. Socolovschi, M.B. Labruna, O. Mediannikov, T. Kernif, M.Y. Abdad, J. Stenos, I. Bitam, P.E. Fournier, D. Raoult // Clin. Microbiol. Rev. – 2013. – V.26(4). – P. 657-702.
129. Piranda, E.M. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. / E.M. Piranda, J.L. Faccini, A. Pinter, R.C. Pacheco, P.H. Cançado, M.B. Labruna // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2011. – V.11(1). – P. 29-36.
130. Portillo, A. Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp. / A. Portillo, R. de Sousa, S. Santibáñez, A. Duarte, S. Edouard, I.P. Fonseca, C. Marques, M. Novakova, A.M. Palomar, M. Santos, C. Silaghi, L. Tomassone, S. Zúquete, J.A. Oteo // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2017. – V. 17(1). – P. 23-32.
131. Pretorius, A.M. *Rickettsia aeschlimannii*: A new pathogenic spotted fever group rickettsia, South Africa. / A.M. Pretorius, R.J. Birtles // Emerg. Infect. Dis. –

2002. – V.8(8). – P. 874.
132. Quintal, D. Historical aspects of the rickettsioses. / D. Quintal // Clin. Dermatol. – 1996. V.14(3). – P. 237-242.
133. Raoult, D. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to sub-Saharan Africa. / D. Raoult, P.E. Fournier, F. Fenollar, M. Jensenius, T. Prioe, J.J. de Pina, G. Caruso, N. Jones, H. Laferl, J.E. Rosenblatt, T.J. Marrie // N. Engl. J. Med. – 2001. – V.344(20). – P. 1504-1510.
134. Raoult, D. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. / D. Raoult, P.E. Fournier, P. Abboud, F. Caron // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – V.8(7). – P. 748-749.
135. Raoult, D. A new rickettsial disease in the United States. / D. Raoult // Clin Infect Dis. – 2004. V. 38(6). – P. 812-813.
136. Raoult, D. Naming of *Rickettsiae* and rickettsial diseases. / D. Raoult, P.E. Fournier, M. Ereemeeva, S. Graves, P.J. Kelly, J.A. Oteo, Z. Sekeyova, A. Tamura, I. Tarasevich, L. Zhang // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2005. – V.1063. – P. 1-12.
137. Renvoisé, A. Urban family cluster of spotted fever rickettsiosis linked to *Rhipicephalus sanguineus* infected with *Rickettsia conorii* subsp. *caspia* and *Rickettsia massiliae*. / A. Renvoisé, P. Delaunay, E. Blanchouin, I. Cannavo, E. Cua, C. Socolovschi, P. Parola, D. Raoult // Ticks Tick Borne Dis. – 2012. – V. 3(5-6). – P. 389-392.
138. Rovey, C. Mediterranean spotted fever. / C. Rovey, D. Raoult // Infect. Dis. Clin. North. Am. – 2008. V.22(3). – P. 515-530.
139. Rydkina, E. New *Rickettsiae* in ticks collected in territories of the former soviet union. / E. Rydkina, V. Roux, N. Rudakov, M. Gafarova, I. Tarasevich, D. Raoult // Emerg. Infect. Dis. – 1999. – V.5(6). – P. 811-814.
140. Sahni, A. Pathogenesis of Rickettsial Diseases: Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection. / A. Sahni, R. Fang, S.K. Sahni, D.H. Walker // Annu. Rev. Pathol. – 2019. – V.14. – P. 127-152.
141. Samoilenko, I.E. Study of biological characteristics of spotted fever group rickettsial genotypes RpA4, DnS14, and DnS28. / I.E. Samoilenko, N.V. Rudakov, S.N. Shpynov, M.A. Tankibaev, V.V. Yakimenko, L.V. Kumpan // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2003. – V.990. – P. 612-616.



142. Sekeyova, Z. Evaluation of clinical specimens for *Rickettsia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Anaplasma*, *Franciscella* and *Diplorickettsia* positivity using serological and molecular biology methods. / Z. Sekeyova, G. Subramanian, O. Mediannikov, M.Q. Diaz, A. Nyitray, H. Blaskovicova, D. Raoult // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2012. – V.64(1). – P. 82-91.
143. Sentausa, E. Genome sequence of *Rickettsia conorii* subsp. *indica*, the agent of Indian tick typhus. / E. Sentausa, K. El Karkouri, C. Robert, D. Raoult, P.E. Fournier // J. Bacteriol. – 2012. – V.194(12). – P. 3288-3289.
144. Sexton, D.J. Rocky Mountain "spotless" and "almost spotless" fever: a wolf in sheep's clothing. / D.J. Sexton, G.R. Corey // Clin. Infect. Dis. – 1992. – V.15(3). – P. 439-448.
145. Sexton, D.J. The use of a polymerase chain reaction as a diagnostic test for Rocky Mountain spotted fever. / D.J. Sexton, S.S. Kanj, K. Wilson, G.R. Corey, B.C. Hegarty, M.G. Levy, E.B. Breitschwerdt // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1994. – V.50(1). – P. 59-63.
146. Silva-Pinto, A. Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. / A. Silva-Pinto, L. Santos Mde, A. Sarmiento // Ticks Tick Borne Dis. – 2014. – V.5(6). – P. 656-659.
147. Shpynov, S. "*Candidatus Rickettsia tarsevichiae*" in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Russia. / S. Shpynov, P.E. Fournier, N. Rudakov, D. Raoult // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2003. – V.990. – P. 162-172.
148. Shpynov, S. Detection of a rickettsia closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, "*Rickettsia heilongjiangensis*," *Rickettsia* sp. strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan. / S. Shpynov, P.E. Fournier, N. Rudakov, M. Tankibaev, I. Tarasevich, D. Raoult // J. Clin. Microbiol. – 2004. – V.42(5). – P. 2221-2223.
149. Shpynov, S.N. Molecular identification of a collection of spotted Fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. / S.N. Shpynov, P.E. Fournier, N.V. Rudakov, I.E. Samoilenko, T.A. Reshetnikova, V.K. Yastrebov, M.S. Schaiman, I.V. Tarasevich, D. Raoult // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2006a. – 7V.4(3). – P. 440-443.
150. Shpynov, S. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma* and

- Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. / S. Shpynov, P.E. Fournier, N. Rudakov, I. Tarasevich, D. Raoult // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006b. – V.1078. – P. 378-383.
151. Shpynov, S. Detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma marginatum* ticks in western Russia. / S. Shpynov, N. Rudakov, Y. Tohkov, A. Matushchenko, I. Tarasevich, D. Raoult, P.E. Fournier // Clin. Microbiol. Infect. – 2009. – V.15. – Suppl. 2. – P. 315-316.
152. Shpynov, S. Tick-borne rickettsiosis in the Altay region of Russia. / S. Shpynov, P.E. Fournier, N. Rudakov, I. Arsen'eva, M. Granitov, I. Tarasevich, D. Raoult // Clin. Microbiol. Infect. – 2009. – V.15 – Suppl. 2. – P. 313-314.
153. Socolovschi, C. Transmission of *Rickettsia conorii conorii* in naturally infected *Rhipicephalus sanguineus*. / C. Socolovschi, I. Bitam, D. Raoult, P. Parola // Clin. Microbiol. Infect. – 2009. – V.15. – Suppl. 2. – P. 319-321.
154. Souza, CE. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. / CE Souza, J Moraes-Filho, M Ogrzewalska, FC Uchoa, MC Horta, SS Souza, RC Borba, MB Labruna // Vet Parasitol. 2009 Apr 6;161(1-2):116-21. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.12.010. Epub 2008 Dec 13.
155. Sprong, H. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. / H. Sprong, P.R. Wielinga, M. Fonville, C. Reusken, A.H. Brandenburg, F. Borgsteede, C. Gaasenbeek, J.W. van der Giessen // Parasit. Vectors. – 2009. – V.2(1). – P. 41.
156. Switaj, K. Spotted fever rickettsiosis caused by *Rickettsia raoultii*--case report. / K. Switaj, T. Chmielewski, P. Borkowski, S. Tylewska-Wierzbanowska, M. Olszynska-Krowicka // Przegl. Epidemiol. – 2012. – V.66(2). – P. 347-350.
157. Szokoli, F. Disentangling the Taxonomy of Rickettsiales and Description of Two Novel Symbionts ("Candidatus Bealeia paramacronuclearis" and "Candidatus Fokinia cryptica") Sharing the Cytoplasm of the Ciliate Protist *Paramecium biaurelia*. / F. Szokoli, M. Castelli, E. Sabaneyeva, M. Schrallhammer, S. Krenek, T.G. Doak, T.U. Berendonk, G. Petroni // Appl. Environ. Microbiol. – 2016. – V.82(24). – P. 7236-7247.

158. Tarasevich, I.V. Problems and perspectives of molecular epidemiology of infectious diseases. / I.V. Tarasevich, I.A. Shaginyan, O.Y. Mediannikov // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2003. – V.990. – P. 751-756.
159. Tkachev, S.E. PCR-detection and molecular-genetic analysis of tick-transmitted pathogens in patients of Novosibirsk region, Russia International journal of medical microbiology. / S.E. Tkachev, N.V. Fomenko, V.A. Rar, Y.P. Igolkina, Y.V. Kazakova, N.Y. Chernousova // Int. J. Med. Microbiol. – 2008. – V.98. – Suppl. 1. – P. 365-367
160. Torina, A. *Rickettsia conorii* Indian tick typhus strain and *R. slovaca* in humans, Sicily. / A. Torina, I.G. Fernández de Mera, A. Alongi, A.J. Mangold, V. Blanda, F. Scarlata, V. Di Marco, J. de la Fuente // Emerg. Infect. Dis. – 2012. – V.18(6). – P. 1008-1010.
161. Uchida, T. *Rickettsia japonica* sp. nov., the etiological agent of spotted fever group rickettsiosis in Japan. / T. Uchida, T. Uchiyama, K. Kumano, D.H. Walker // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1992. – V. 42(2). – P. 303-305.
162. Uchiyama, T. Tropism and pathogenicity of rickettsiae. / T. Uchiyama // Front. Microbiol. – 2012a V.3. – P. 230.
163. Uchiyama, T. Restriction of the growth of a nonpathogenic spotted fever group rickettsia. / T. Uchiyama, M. Kishi, M. Ogawa // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2012b. – V.64(1). – P. 42-47.
164. Valbuena, G. Infection of the endothelium by members of the order Rickettsiales. / G. Valbuena, D.H. Walker // Thromb. Haemost. – 2009. – V.102(6). – P. 1071-1079.
165. Värvi, K. Identification of *I. ricinus*, *I. persulcatus* and *I. trianguliceps* species by multiplex PCR. / K. Värvi, A. Ivanova, J. Geller, J. Remm, K. Jaik, N. Tikunova, V. Rar, Å. Lundkvist, I. Golovljova // Ticks Tick Borne Dis. – 2017. – V.8(2). – P. 235-240.
166. Walker, D.H. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. / D.H. Walker // Clin. Infect. Dis. – 2007. – V.45. – Suppl 1. – P. 39-44.
167. Walker, D. H. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. / D.H. Walker, N. Ismail // Nahed. Ismail. Review Article. – 2008. – V. 6(5). – P. 375-386.

168. Walker, D.H. *Rickettsia* and *Orientia*. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, et al, eds. Manual of clinical microbiology. 11th ed. / D.H. Walker, D.H. Bouyer // Washington, DC: American Society of Microbiology Press, – 2015. [Chapter 64]. – P. 1122–1134.
169. Wikswo, M.E. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor* species from southern California. / M.E. Wikswo, R. Hu, G.A. Dasch, L. Krueger, A. Arugay, K. Jones, B. Hess, S. Bennett, V. Kramer, M.E. Eremeeva // J. Med. Entomol. – 2008. – V.45(3). – P. 509-516.
170. Wright, C.L. Experimental vertical transmission of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. / C.L. Wright, H.D. Gaff, D.E. Sonenshine, W.L. Hynes // Ticks Tick. Dis. – 2015a. – V.6. – P. 568–573.
171. Wright, C.L. *Rickettsia parkeri* Transmission to *Amblyomma americanum* by Cofeeding with *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) and Potential for Spillover. / C.L. Wright, D.E. Sonenshine, H.D. Gaff, W.L. Hynes // J. Med. Entomol. – 2015b. – V.52(5). – P. 1090-1095.
172. Zemtsova, G. Co-feeding as a route for transmission of *Rickettsia conorii israelensis* between *Rhipicephalus sanguineus* ticks. / G. Zemtsova, L.F. Killmaster, K.Y. Mumcuoglu, M.L. Levin // Exp. Appl. Acarol. – 2010. – V.52(4). – P. 383-392.
173. Zhang, L.J. Identification of a new serotype of *Rickettsia heilongjiangensis* in wild rats from Guangdong Province, China. / L.J. Zhang, J.G. Han, J.G. Xu, J. Turchetto, O. Mediannikov, J.M. Rolain, D. Raoult, P.E. Fournier // Clin. Microbiol. Infect. 2009. – V.15. – Suppl. 2. – P. 338–339.