

На правах рукописи



РАР ВЕРА АЛЕКСАНДРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ, ПЕРЕНОСИМЫХ ИКСОДОВЫМИ
КЛЕЩАМИ НА ТЕРРИТОРИИ АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ**

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация в виде научного доклада
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2024

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

Научный консультант:

Тикунова Нина Викторовна, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии

Официальные оппоненты:

Локтев Валерий Борисович, д.б.н., профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, заведующий лабораторией

Филипенко Максим Леонидович, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, заведующий лабораторией фармакогенетики

Колясникова Надежда Михайловна, д.м.н., Федеральное государственное автономное научное учреждение "Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН", г. Москва, заведующая лабораторией клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов

Защита состоится 16 февраля 2024 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ 03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: Новосибирск 630090, проспект акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Диссертация в виде научного доклада разослана « » декабря 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

к.х.н.



Пестряков П.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Иксодовые клещи являются переносчиками широкого круга бактериальных и протозойных инфекционных агентов, вызывающих заболевания людей и домашних животных с различными клиническими проявлениями, в том числе приводящие к летальным исходам. На территории азиатской части Российской Федерации широко распространены клещи 12 видов из семейства Ixodidae, относящихся к родам *Ixodes* (*I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *I. trianguliceps*, *I. apronophorus*, *I. lividus*, *I. crenulatus*), *Dermacentor* (*D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. nuttalli*, *D. silvarum*) и *Haemaphysalis* (*H. concinna*, *H. japonica*); большинство вышеперечисленных видов могут присасываться к людям и крупным млекопитающим и передавать им инфекционные агенты. В азиатской части России наибольшую эпидемиологическую значимость имеют свободноживущие спирохеты из рода *Borrelia* (включая боррелий из комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) и боррелий из группы возвратных лихорадок) и внутриклеточные бактерии порядка Rickettsiales, включая представителей семейств Rickettsiaceae (*Rickettsia* spp.) и Anaplasmataceae (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Neoehrlichia* spp.). У домашних и сельскохозяйственных животных заболевания чаще всего вызываются бактериями *Anaplasma* spp. и простейшими гемопаразитами *Babesia* spp. и *Theileria* spp.

Несмотря на большую научную и практическую значимость исследований, посвященных изучению переносимых иксодовыми клещами инфекционных агентов, и громадному количеству таких исследований, проводящихся в мире, имеется большой пробел в наших знаниях о возбудителях, циркулирующих на территории России и, в частности, в азиатской части России. Основные проблемы следующие:

1. В России большинство исследований сосредоточено на нескольких видах клещей (прежде всего, на активно атакующих людей *I. persulcatus*). Другие виды, такие как *I. apronophorus* или *I. trianguliceps* были недостаточно или совсем не исследованы. Несмотря на то, что клещи этих видов не способны присасываться к людям, они также могут участвовать в общих энзоотических циклах вместе с атакующими людей клещами *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в результате совместного прокармливания на одних и тех же мелких млекопитающих и передачи инфекционных агентов между разными видами клещей. Изучение *I. apronophorus* и *I. trianguliceps* может иметь не только практическую, но и теоретическую значимость, поскольку можно ожидать обнаружения в этих клещах новых видов или геновариантов инфекционных агентов.

2. На территории Западной Сибири (в Томской области) обнаружены уникальные природные очаги трансмиссивных инфекций, представляющие собой области симпатрии клещей *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и их

межвидовых гибридов (Kovalev et al., 2015). В результате последующих скрещиваний гибридов, как между собой, так и с родительскими видами, могут появиться разнообразные геноварианты гибридов, различающиеся степенью агрессивности по отношению к человеку, по адаптивным свойствам и по тропизму к разным видам возбудителей. Несмотря на несомненную важность изучения межвидовых гибридов, систематических исследований гибридов, включающих установление их областей обитания и инфицированность широким кругом патогенов, до наших исследований не проводилось.

3. Несмотря на значительное количество потенциально патогенных видов риккетсий, ранее на территории азиатской части России были установлены случаи риккетсиозов, вызванные только двумя видами риккетсий. Систематическое исследование клинических образцов, в том числе от пациентов с нетипичными проявлениями, может существенно расширить круг инфекционных агентов.

4. Не все переносимые клещами инфекционные агенты были детально исследованы. В частности, полностью отсутствует информация о видовом и генетическом разнообразии *Babesia* spp. в каких-либо видах иксодовых клещей в азиатской части России.

5. Природные очаги анаплазмозов и пироплазмозов сельскохозяйственных животных широко распространены в России, однако их возбудители практически не изучены. В большинстве случаев постановка диагноза основана на анализе мазков крови. В Центральной части России определение вида анаплазм и тейлерий, основанное на применении молекулярно-генетических методов, проводилось для идентификации патогенов крупного рогатого скота (Bursakov and Kovalchuk, 2019; Fedorina et al., 2019). В азиатской части России генотипирование патогенов было проведено только для анаплазм, обнаруженных во время вспышки анаплазмоза крупного рогатого скота в Омской области. Показано, что возбудителем данной инфекции является новый геновариант *A. marginale*, *Anaplasma* sp. Omsk (Красиков и др., 2007).

Таким образом, актуальность данной работы связана с отсутствием данных по комплексному исследованию природных очагов, находящихся в областях симпатрии нескольких видов клещей, с недостаточной изученностью возбудителей инфекционных заболеваний у пациентов с нетипичной симптоматикой и с отсутствием современных данных о роли переносимых клещами инфекционных агентов в инфицировании домашних животных.

Цель и задачи исследования

Основной целью настоящей работы являлось проведение молекулярно-генетического анализа бактериальных и протозойных инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами на территории азиатской части Российской Федерации, и изучение вклада различных агентов в патогенез инфекций, переносимых клещами.

В ходе исследования решались следующие задачи:

1. Разработать методику генотипирования клещей рода *Ixodes* и генетически охарактеризовать клещей, распространенных в местах совместного обитания *I.persulcatus-I.pavlovskyi* и *Lapronophorus-I.persulcatus-I.triangulariceps*.

2. Провести молекулярно-генетический анализ риккетсий, встречающихся в азиатской части Российской Федерации:

- разработать лабораторный вариант тест-системы для выявления ДНК риккетсий и идентификации наиболее распространенных видов;

- на основании мультилокусного анализа генетически охарактеризовать выявленные виды риккетсий, включая новый и кандидатные виды;

- изучить видовой состав и генетическую вариабельность возбудителей риккетсиозов у людей и установить ассоциацию между этиологическими агентами и клиническими проявлениями.

3. Провести молекулярно-генетический анализ бактерий семейства Anaplasmataceae, встречающихся в азиатской части Российской Федерации:

- генетически охарактеризовать выявленные виды и геноварианты бактерий семейства Anaplasmataceae;

- на основании биоинформатического анализа метаданных об известных последовательностях *A. phagocytophilum* сравнить результаты генотипирования по различным генетическим локусам и оценить вероятность существования очагов ГАЧ в России;

- изучить видовой состав и генетическую вариабельность возбудителей анаплазмоза мелкого и крупного рогатого скота.

4. Изучить генетическое разнообразие боррелий, встречающихся в азиатской части Российской Федерации:

- установить ассоциацию между разными видами боррелий и различными видами клещей;

- исследовать видовое и генетическое разнообразие боррелий в малоизученных видах иксодовых клещей;

- определить видовой состав возбудителей боррелиозов у людей и установить ассоциацию между этиологическими агентами и клиническими проявлениями инфекций.

5. Провести молекулярно-генетический анализ простейших гемопаразитов *Babesia* spp. и *Theileria* spp., встречающихся в азиатской части Российской Федерации:

- генетически охарактеризовать выявленные виды и геноварианты *Babesia* spp.;

- изучить видовой состав и генетическую вариабельность возбудителей пироплазмозов собак и лошадей.

Научная новизна

Было показано существование межвидовых гибридов *I. persulcatus* и *I.*

pavlovskiy, способных к дальнейшему скрещиванию, во всех исследованных местах совместного обитания *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy* на территории Западной Сибири и Дальнего Востока. Впервые показано, что *I. persulcatus* достоверно чаще по сравнению с *I. pavlovskiy* инфицирован “*Candidatus R. tarasevichiae*” и что в межвидовых гибридах обнаружены те же инфекционные агенты, что и в клещах родительских видов.

Впервые клещ *I. apronophorus* был генетически охарактеризован по трем генетическим локусам, что позволило установить его принадлежность к комплексу *I. persulcatus*-*I. ricinus* внутри подрода *Ixodes*. Показано, что *I. apronophorus* является генетически варибельным видом.

Всего в исследованных образцах от иксодовых клещей, мелких млекопитающих, домашних и сельскохозяйственных животных, а также в клинических образцах было выявлено 30 известных и новых видов микроорганизмов, относящихся к родам *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neoehrlichia*, *Babesia* и *Theileria*; из них *R. aeschlimannii*, *R. slovacica*, *A. ovis*, *A. marginale*, *Bab. divergens*, *Bab. venatorum*, *Bab. canis*, *Bab. caballii* и *T. equi* были впервые идентифицированы генетическими методами в азиатской части России, а *R. canadensis* и “*Candidatus R. mendelii*” - впервые обнаружены в России.

Обнаружены и генетически охарактеризованы новые виды боррелий (“*Candidatus B. sibirica*”) и риккетсий (“*Candidatus R. uralica*”), а также новые варианты анаплазм и бабезий, которых нельзя отнести к известным видам. Было показано, что выявленный нами ранее новый геновариант *Ehrlichia* sp. Khabarovsk удовлетворяет критериям нового кандидатного вида; новый вид был назван “*Candidatus E. khabarensis*”

Был подтвержден статус кандидатных видов “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. gaga*” на основании проведенного генетического анализа. Были обнаружены новые генотипы *E. muris* и *N. mikurensis*, предположительно ассоциированные с клещом *I. apronophorus*.

Установлена генетическая гетерогенность популяций *R. raoultii*, *R. helvetica*, *A. phagocytophilum* и *Bab. microti* на территории азиатской части России; впервые показано существование трех генетических линий *R. raoultii* и четырех линий *R. helvetica*, а также трех линий *A. phagocytophilum* и двух генетических групп *Bab. microti*.

Впервые в клещах *I. apronophorus* обнаружены инфекционные агенты (*B. bavariensis*, “*Candidatus B. sibirica*” и *R. helvetica*), а в клещах *I. trianguliceps* – риккетсии (*R. helvetica*, “*Candidatus R. tarasevichiae*” и “*Candidatus R. uralica*”).

Впервые на наличие бабезий были исследованы клещи, обитающие на территории азиатской части России. Потенциально патогенные для людей *Bab. microti* (US-type), *Bab. divergens* и *Bab. venatorum* обнаружены в *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy*; возбудитель пироплазмоза собак *Bab. canis* - в *D. reticulatus*, а возбудитель пироплазмоза лошадей *Bab. caballii* - в *D. silvarum* и *D. nuttalli*. Кроме известных видов, 12 новых геновариантов бабезий,

относящихся к кластерам *Babesia* spp. хищных и *Babesia* spp. крупного и мелкого рогатого скота выявлены в клещах *Haemaphysalis* spp. и *I. persulcatus*.

Показано, что риккетсиозы в Западной Сибири могут быть вызваны не только *R. sibirica*, но и *R. raoultii*, "*Candidatus R. tarasevichiae*", *R. aeschlimannii* и *R. slovacica*; при этом в Новосибирской области (НСО) наблюдалась схожая частота риккетсиозов, вызванных *R. sibirica* и *R. raoultii*. Были установлены различия в клинических проявлениях риккетсиозов, вызванных *R. sibirica* и *R. raoultii*.

Впервые показано, что анаплазмозы КРС в Сибири преимущественно вызываются двумя видами внутриэритроцитарных анаплазм: уникальным геновариантом *A. marginale* (isolate sp. Omsk) и новым вариантом *Anaplasma* sp. Sib122, которого нельзя отнести ни к одному из известных видов.

Установлено генетическими методами, что пироплазмоз лошадей в Сибири может быть связан с *T. equi* и *Bab. caballi*; была показана высокая генетическая вариабельность у выявленных образцов обоих видов и обнаружен новый уникальный генотип *Bab. caballi*.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Проведено комплексное исследование переносимых иксодовыми клещами бактериальных и протозойных инфекционных агентов, распространенных на территории азиатской части России. В исследование были включены: 1) иксодовые клещи десяти видов, собранные на территории девяти административных областей, включая труднодоступные таежные участки и удаленные районы Дальнего Востока; 2) клинические образцы от пациентов из НСО и Алтая; 3). образцы от мелких млекопитающих, домашних и сельскохозяйственных животных. Всего в исследованных образцах от более 6300 клещей, 2200 мелких млекопитающих и 2300 домашних и сельскохозяйственных животных, а также в клинических образцах от 1281 пациента было выявлено 30 известных и новых видов инфекционных агентов, относящихся к семи родам; из них три новых кандидатных вида были обнаружены впервые, три вида - впервые обнаружены в России, а восемь видов - впервые идентифицированы в азиатской части России. Были также обнаружены новые геноварианты анаплазм и бабезий, которых нельзя отнести к известным видам. Был установлен широкий круг инфекционных агентов, вызывающих боррелиозы и риккетсиозы различной этиологии в Западной Сибири. Более тысячи последовательностей различных генетических локусов клещей и переносимых клещами агентов депонировано в базу данных GenBank.

Эти данные позволят установить энзоотические циклы, связанные с различными возбудителями, оценить эпидемиологическую и эпизоотическую обстановку в различных регионах и прогнозировать риск инфицирования людей и домашних животных. Полученные результаты

свидетельствуют о необходимости дифференциально диагностировать переносимые клещами инфекционные агенты у пациентов с различной симптоматикой для назначения своевременного и адекватного лечения.

Методология и методы исследования

В исследование были включены образцы от мелких млекопитающих; иксодовые клещи, собранные на флаг; иксодовые клещи, снятые с грызунов; образцы крови от домашних и сельскохозяйственных животных; клинические образцы от пациентов. От всех образцов была выделена суммарная ДНК, которая затем была исследована на наличие ДНК различных инфекционных агентов. Генотипирование положительных образцов проводили как методом видоспецифичной ПЦР, так и посредством секвенирования различных генетических локусов с последующим биоинформатическим анализом. При выполнении данной работы все пациенты, участвовавшие в исследовании, дали информированное согласие; исследование одобрено локальным этическим комитетом инфекционной больницы №1 г. Новосибирска. Все эксперименты на животных и методика проведения экспериментов одобрены биоэтическим комитетом Омского НИИ природноочаговых инфекций (протокол № 1 от 20.03.2013 г.; протокол № 4 от 17.02.2016 г.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработана методика определения вида клещей рода *Ixodes* молекулярно-генетическими методами.

2. Фертильные межвидовые гибриды *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* распространены во всех местах совместного обитания этих двух видов клещей на территории Западной Сибири и Дальнего Востока.

3. Клещ *I. apronophorus* является генетически варибельным видом и относится к комплексу *I. persulcatus-I. ricinus* внутри подрода *Ixodes*.

4. Разработан лабораторный вариант тест-системы, позволяющий выявлять ДНК риккетсий и идентифицировать наиболее распространенные виды (*R. raoultii*, *R. sibirica*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. helvetica*), включая случаи смешанного инфицирования.

5. На территории азиатской части России обитают, по крайней мере, 30 видов переносимых иксодовыми клещами бактериальных и протозойных инфекционных агентов, часть из которых является новыми для данного региона.

6. Помимо известных видов на территории азиатской части России обитают новые кандидаты виды “*Candidatus B. sibirica*”, “*Candidatus R. uralica*” и “*Candidatus Ehrlichia khabarensis*”, а также новые геноварианты внутриэритроцитарных анаплазм и бабезий, не относящиеся к известным видам.

7. Для большинства выявленных инфекционных агентов показана их ассоциация с определенным видом или родом клещей.

8. На территории азиатской части России обнаружены три генетические линии *R. raoultii*, четыре линии *R. helvetica*, три линии *A. phagocytophilum* и две группы *Bab. microti*, что свидетельствует о генетической гетерогенности данных видов патогенов.

9. На территории Западной Сибири широко распространены боррелиоз, вызванный *B. miyamotoi*, и риккетсиозы, вызванные *R. sibirica* и *R. raoultii*. В единичных случаях риккетсиозы у людей могут быть вызваны “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. aeschlimannii* и *R. slovaca*.

10. Единственным возбудителем анаплазмоза мелкого рогатого скота являются внутриэритроцитарные анаплазмы *A. ovis*, а анаплазмоз крупного рогатого скота может быть вызван тремя видами анаплазм.

11. На территории Сибири *Bab. canis* является основным этиологическим агентом пироплазмоза собак, а *Theileria equi* и *Bab. caballi* – пироплазмоза лошадей.

Публикации и апробация работы

Основные результаты исследования отражены в 31 статье в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, и в двух статьях в журналах базы данных РИНЦ. Основные результаты работы представлены на конференциях: Международная научная конференция «Клещевой энцефалит и другие инфекции, переносимые клещами» (Иркутск, 2012); XII International Jena Symposium on Tick-Borne Diseases (Weimar, Germany, 2013); Научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные аспекты природной очаговости болезней» (Омск, 2014); 14th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-Borne Diseases, (Vienna, Austria, 2015); Научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека» (Омск, 2016); IV Национальный конгресс бактериологов и Международный симпозиум «Микроорганизмы и биосфера» «Microbios-2018» (Омск, 2018); Третья Байкальская международная научная конференция по природно-очаговым трансмиссивным инфекциям (Иркутск, 2018); XV Межгосударственная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (Иркутск, 2021); Региональная научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Сибири и Дальнего Востока» (Иркутск, 2022); Международная научно-практическая конференция «Актуальные природно-очаговые инфекции» (Иркутск, 2023).

Личный вклад автора

Большинство представленных в работе результатов получено автором лично, либо под его руководством или при его участии. Сбор клинических

образцов проводился Савельевой М.В., Филимоновой Е.С. (НГМУ). Сбор клещей и образцов от мелких млекопитающих, домашних и сельскохозяйственных животных проводился Ливановой Н.Н., Пановым В.В. (ИСЭЖ СО РАН), Тикуновым А.Ю. (ИХБФМ СО РАН), Якименко В.В. (Омский НИИ ПОИ Роспотребнадзора), Козловой И.В., Лисак О.В., Дорошенко Е.К. (НЦ ПЗСРЧ), Марченко В.А. (Горно-Алтайский государственный университет), Никитиным А.Я. (Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока), Высочиной Н.П. (Хабаровская противочумная станция) и Боляхиной С.А. (ИЭВСиДВ СО РАСХН). Первичный скрининг образцов от сельскохозяйственных животных из Иркутской области проводился Сунцовой О.В. (НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск). Установление филогенетической позиции "*Candidatus* *V. sibirica*" проведено Сабитовой Ю.В. (ИХБФМ СО РАН). Культивирование "*Candidatus* *E. khabarensis*" проводилось Пуховской Н.М. (Хабаровская противочумная станция). Анализы продуктов секвенирующих реакций проводились в ККП «Геномика», а также Тикуновым А.Ю. (ИХБФМ СО РАН). Электронная микрофотография эрлихий выполнена Рябчиковой Е.И. (ИХБФМ СО РАН), а микрофотография *Bab. canis* - Боляхиной С.А. (ИЭВСиДВ СО РАСХН). В приведенном списке публикаций приведены имена всех соавторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Природные очаги клещевых инфекций являются многокомпонентными паразитарными системами, включающими клещей-переносчиков, инфекционных агентов и позвоночных резервуарных хозяев; все компоненты этой системы тесно взаимодействуют между собой. Особый интерес представляет изучение областей совместного обитания нескольких видов клещей (областей симпатрии), поскольку это предоставляет возможность изучить ассоциацию между клещом и определенным видом/геновариантом возбудителя. Подобная ассоциация, в частности, показана для разных видов клещей рода *Ixodes* с разными видами боррелий (Mukhacheva and Kovalev, 2014) и разными геновариантами *A. phagocytophilum* (Jaarsma et al., 2019). В областях симпатрии особую важность имеет точное определение вида клеща, что не всегда возможно в случае морфологически схожих видов или частично напитававшихся клещей. Поэтому первоочередными задачами исследования являлись разработка методик для надежной идентификации вида клеща молекулярными методами и определение видового состава клещей рода *Ixodes* в областях симпатрии.

На территории азиатской части России существуют различные области симпатрии клещей. В ряде районов Западной Сибири и Дальнего Востока одновременно обитают клещи *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и их межвидовые гибриды, а в других локациях Западной Сибири – *I. persulcatus*,

I. trianguliceps и *I. apronophorus*.

1.1. Определение видовой принадлежности клещей в областях симпатрии *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi*

Необходимость установления вида клеща генетическими методами в данных областях симпатрии связана как с большим морфологическим сходством этих видов, так и с предполагаемым существованием природных межвидовых гибридов *I. persulcatus*-*I. pavlovskyi* (Kovalev et al., 2015). Установление видовой принадлежности клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* проводили на основании анализа двух генетических локусов - митохондриального гена цитохром С оксидазы (*cox1*) и ядерного внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомных генов (ITS2), как было описано ранее (Ткачев и Ливанова, 2012; Livanova et al., 2015). В случае *cox1* генотипирование проводили методом видоспецифичной ПЦР, а в случае ITS2 – секвенированием продуктов ПЦР (Рис. 1).

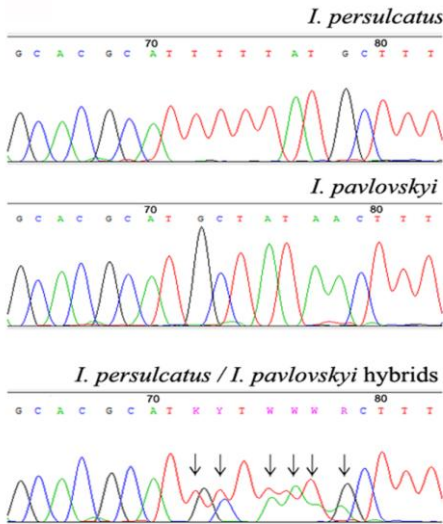


Рис.1. Секвенограммы ITS2 фрагментов (64-82 н.п.) клещей *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и их гибридов. Гетерозиготные позиции указаны стрелками. (Rar et al., 2019)

Ранее было показано, что у клещей *Ixodes scapularis* тандемные копии участков рибосомной ДНК, включая ITS2, расположены на двух парах аутосом и на X-хромосоме, однако количество копий ITS2 на разных хромосомах остается неизвестным (Meyer et al., 2010). На схеме представлено два варианта локализации ITS2 на хромосомах (Рис. 2).

При исследовании клещей из областей симпатрии *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, наряду с типичными для данных видов клещей генотипами, было обнаружено 4 варианта гибридных генотипов. Вариант 1 (mIper/Hybr): митохондриальный ген *cox1* от *I. persulcatus*, а ядерный локус ITS2

гибридный, то есть гетерозиготный по позициям характерным для *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy* (Рис.1). Поскольку митохондриальная ДНК передается от самок, вариант 1 рассматривали как гибрид первого поколения F1 от самок *I. persulcatus* и самцов *I. pavlovskiy*. Аналогично, вариант 2 (mIprav/Hybr) с митохондриальным геном *cox1* от *I. pavlovskiy* и гибридным ядерным локусом ITS2 рассматривали как гибрид первого поколения F1 от самок *I. pavlovskiy* и самцов *I. persulcatus* (Рис. 2А, 2В). Вариант 3 (mIper/Iprav): митохондриальный ген *cox1* от *I. persulcatus* и ядерный локус ITS2 от *I. pavlovskiy*. Вариант 4 (mIprav/Iper): митохондриальный ген *cox1* от *I. pavlovskiy* и ядерный локус ITS2 от *I. persulcatus*. Варианты 3 и 4 с интрогрессией митохондриальных последовательностей могут быть результатом многократного возвратного скрещивания гибридов F1 с родительским видом (Рис. 2С, 2D) либо результатом скрещивания различных гибридных вариантов между собой; эти генотипы могут появиться только в случае фертильности природных межвидовых гибридов.

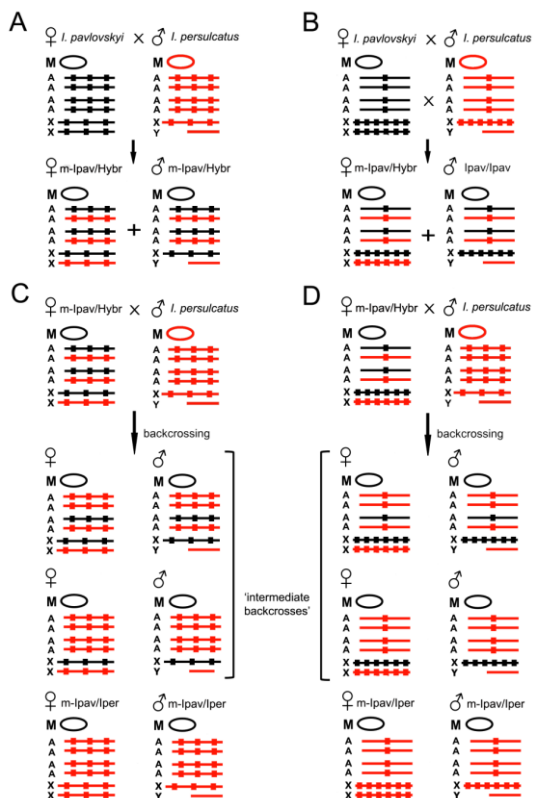


Рис. 2. Схема различных вариантов скрещивания самки *I. pavlovskiy* и самца *I. persulcatus* (А, В) и множественное возвратное скрещивание гибридной самки с самцом *I. persulcatus* (С, D).

Схема включает два варианта локализации ITS2 на хромосомах: А, С – первый вариант: число копий ITS2 на аутосомах значительно больше, чем на X-хромосоме; В, D – второй вариант: количество копий ITS2 на X-хромосоме значительно больше, чем на аутосомах. *I. pavlovskiy* отмечен черным цветом; *I. persulcatus* – красным цветом. М – митохондриальный геном; А – аутосомы, X и Y – половые хромосомы; ■ – ITS2 локус на хромосоме. (Rar et al., 2019)

Гибридные генотипы были обнаружены во всех исследованных участках, находящихся в областях симпатрии *I.persulcatus-I.pavlovskiy* на территории Западной Сибири (НСО - 5 участков; Красноярский край - 1 участок; Республика Алтай - 2 участка) и Дальнего Востока (остров Русский - 3 участка). В различных регионах доля гибридных особей варьировала от 7,1% до 25,8% и была наибольшей на территории НСО (Табл. 1). При этом наибольшая доля межвидовых гибридов (38%-40%) наблюдалась на участках со схожей встречаемостью родительских видов. Во всех исследованных регионах были обнаружены гибридные клещи как с митохондриальными генами *I. persulcatus*, так и с митохондриальными генами *I. pavlovskiy*, что свидетельствует о том, что скрещивание может проходить в двух направлениях. Клещи с генотипом F2 также были обнаружены во всех исследованных регионах, и их доля на отдельных участках достигала 10-20%, что говорит о фертильности межвидовых гибридов (Табл. 1).

Таблица 1. Встречаемость различных вариантов гибридов и клещей родительских видов в областях симпатрии *I. persulcatus* / *I. pavlovskiy*

| Регион | Общее число клещей | Число (%) клещей, генотипированных как | | | | | |
|---------|--------------------|--|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Iper | Ipavl | Гибриды F1 | | Гибриды F2 | |
| | | | | mIper/ Hybr | mIpav/ Hybr | mIper/ Ipav | mIpav/ Iper |
| НСО | 835 | 149 (17,8) | 453 (54,2) | 20 (2,4) | 100 (12,0) | 19 (2,3) | 94 (11,3) |
| Красн. | 490 | 258 (52,7) | 160 (32,7) | 16 (3,3) | 34 (6,9) | 10 (2,0) | 12 (2,4) |
| Алтай | 805 | 623 (77,4) | 124 (15,4) | 17 (2,1) | 13 (1,6) | 15 (1,8) | 13 (1,6) |
| Русский | 421 | 190 (45,1) | 199 (47,3) | 8 (1,9) | 17 (4,0) | 3 (0,7) | 4 (1,0) |

Сокращения: Красн. – Красноярский край; Iper - *I. persulcatus*; Ipavl.- *I. pavlovskiy*.

Относительно низкая доля межвидовых гибридов в Республике Алтай (7,2%) может быть связана с низкой численностью *I. pavlovskiy* в этом регионе. Однако такая же низкая численность гибридов (7,6%) наблюдалась и на о. Русский, на котором численность *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy* была схожей; кроме того, на о. Русский была отмечена наиболее низкая численность гибридов с генотипом F2 (Табл. 1). Известно, что в Западной Сибири и на Дальнем Востоке обитают разные подвиды *I. pavlovskiy*: *I. pavlovskiy occidentalis* и *I. pavlovskiy pavlovskiy*, соответственно (Филиппова, 1977; Колонин, 1981). Можно предположить, что подвид *I. pavlovskiy pavlovskiy* менее эффективно скрещивается с *I. persulcatus*, или что полученные в результате скрещивания с этим подвидом гибриды F1 менее фертильны.

1.2. Определение видовой принадлежности и генетическая характеристика клещей в областях симпатрии *Ixodes persulcatus*, *Ixodes trianguliceps* и *Ixodes apronophorus*

Необходимость разработки генетических методов для видовой идентификации клещей из областей симпатрии *I. persulcatus*-*I. trianguliceps*-*I. apronophorus* связана с большим морфологическим сходством личинок и нимф *I. apronophorus* и *I. persulcatus*, а также с тем, что собранные с мелких млекопитающих клещи могут быть напитавшимися или поврежденными во время процедуры удаления.

В отличие от *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*, ни для одного генетического локуса *I. apronophorus* не были определены последовательности. Поэтому на начальном этапе работы для нескольких самок, идентифицированных как *I. apronophorus* на основании морфологических признаков, было проведено секвенирование ITS2 локуса, которое показали 84-86% сходство с наиболее близкими последовательностями *Ixodes* spp. На основе полученных сиквенсов была разработана схема мультиплексной ПЦП, позволяющая надежно установить вид для клещей *I. persulcatus*, *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* (Рис. 3).

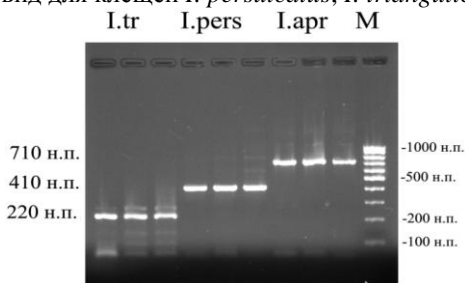


Рис. 3. Определение вида клеща по локусу ITS2 методом мультиплексной ПЦП.
I.tr - *I. trianguliceps*;
I.pers - *I. persulcatus*;
I.apr - *I. apronophorus*;
M – маркеры длины (Rar et al., 2020)

С использованием разработанного метода видовая принадлежность была определена для клещей, снятых с грызунов. Было установлено, что на одном из участков Омской области (участок Ом-Во) наблюдается высокая численность всех трех видов клещей. Показано, что на одном зверьке могут одновременно прокармливаться несколько видов клещей. Это свидетельствует о потенциальной возможности для инфекционных агентов передаваться на данном участке между разными видами клещей во время кормления (трансптиальная передача).

В данной работе клещи *I. apronophorus* были впервые генотипированы по ядерному локусу (ITS2) и двум митохондриальным генам (16S rRNA и *cox1*). С использованием пакета программ DnaSP 5.10.01 было проведено сравнение внутривидового разнообразия *I. apronophorus*, *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*, собранных на одних и тех же участках. Следует отметить, что последовательности гена *cox1* у *I. trianguliceps* также были

определены впервые. Все проанализированные генетические локусы *I. apronophorus* были вариабельными и продемонстрировали более высокое нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие для митохондриальных генов 16S рРНК и *cox1*, тогда как клещи *I. persulcatus* были более вариабельны по ядерному ITS2. Напротив, определенные в данной работе и ранее известные последовательности *I. trianguliceps* были высоко консервативны.

Проведенный филогенетический анализ по ITS2, 16S рРНК и *cox1* генам показал, что по всем исследованным локусам последовательности *I. apronophorus* образуют монофилетическую группу, которая относится к кластеру, объединяющему большинство видов из подрода *Ixodes* (Рис. 4). Полученные результаты также показывают, что *I. apronophorus* образует общую ветвь с известными видами комплекса *I. persulcatus-I. ricinus*. Это первые данные о принадлежности *I. apronophorus* к комплексу *I. persulcatus-I. ricinus*. Клещ *I. trianguliceps* относятся к подроду *Exopalpiger*; поэтому сиквенсы *I. trianguliceps* формировали отдельные ветви на дендрограммах (Рис. 4).

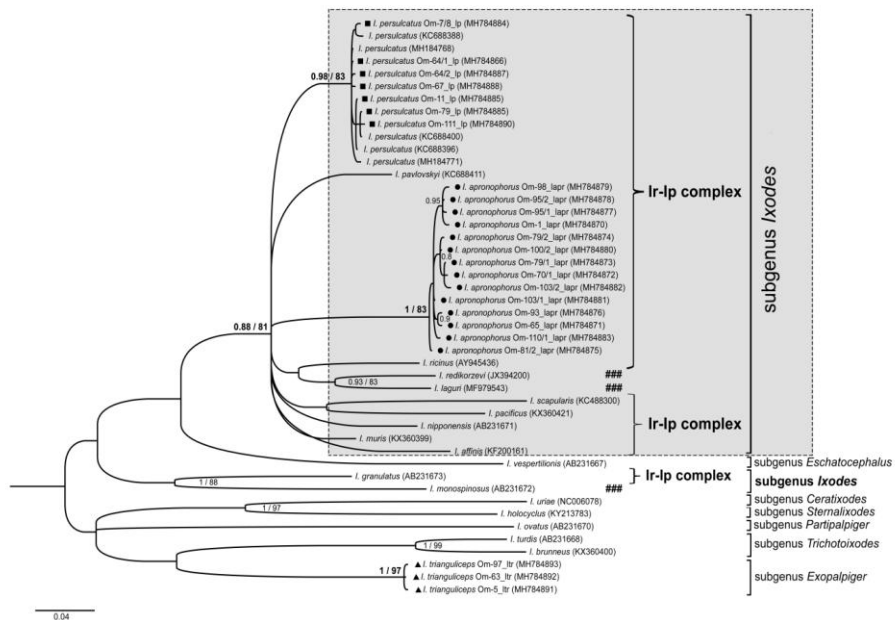


Рис. 4. Филогенетическое дерево MrBayes для выравнивания фрагментов *cox1* клещей *Ixodes* spp. Последовательности клещей, относящихся к основному кластеру подрода *Ixodes*, затенены. Последовательности клещей подрода *Ixodes*, не отнесенные к комплексу *I. persulcatus-Ixodes* отмечены #. Определенные в данном исследовании сиквенсы клещей отмечены: ● – *I. apronophorus*; ■ – *I. persulcatus*; ▲ – *I. trianguliceps*. (Rar et al., 2020)

2. Молекулярно-генетический анализ риккетсий

Ранее на территории азиатской части России были выявлены следующие виды риккетсий – “*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*”, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia raoultii* и *Rickettsia sibirica*. Из них “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica* наиболее часто выявлялись в *I. persulcatus*, *R. heilongjiangensis* – в *Haemaphysalis concinna*, а *R. raoultii* и *R. sibirica* – в клещах рода *Dermacentor* (Shpyunov et al., 2006; Mediannikov et al., 2006). Несмотря на то, что патогенные свойства показаны для всех вышеперечисленных видов риккетсий, в азиатской части России были зарегистрированы только случаи заболевания, вызванные *R. sibirica* (преимущественно в Сибири) и *R. heilongjiangensis* (преимущественно на Дальнем Востоке) (Granitov et al., 2015; Mediannikov et al., 2006; Shpyunov et al., 2009). Для уточнения видового состава риккетсий, вызывающих заболевания в Сибири, в данной работе на наличие возбудителей риккетсиозов были исследованы образцы от пациентов с различными клиническими проявлениями. Изучение распространенности и генетической variability риккетсий в различных видах клещей, обитающих в удаленных друг от друга областях азиатской части России, проводилось с целью установить ассоциацию между определенными видами/геновариантами риккетсий и определенными видами клещей, что необходимо для оценки риска заболевания людей риккетсиозами различной этиологии.

2.1. Видовое и генетическое разнообразие риккетсий в клещах *Dermacentor* spp. и *Haemaphysalis* spp.

На наличие риккетсий были исследованы клещи четырех видов *Dermacentor* spp., собранные с растительности на флаг в Хабаровском крае, Амурской области, Республике Алтай и НСО, и клещи двух видов *Haemaphysalis* spp., собранные в Хабаровском крае и Амурской области.

Независимо от местообитания все *Dermacentor* spp. были наиболее часто инфицированы *R. raoultii* (50,0-93,3%) (Табл. 2). Полученные результаты согласуются с литературными данными о высокой встречаемости *R. raoultii* в клещах данного рода (Shpyunov et al., 2006, Карташов и др., 2019). Представляющий наибольшую эпидемиологическую опасность возбудитель сибирского клещевого тифа (СКТ), *R. sibirica*, был обнаружен только в *Dermacentor* spp. на Алтае (Табл. 2). Известно, что Республика Алтай является одним из наиболее напряженных очагов по СКТ в РФ. В настоящей работе ДНК *R. sibirica* была обнаружена в 20,6% *D. nuttalli* и в 15,3% *D. marginatus*; при этом высокий уровень инфицированности (15,3%-45,7%) наблюдался в четырех из пяти исследованных участков в Усть-Коксинском, Кош-Агачинском и Онгудайском районах Республики Алтай. Помимо *R. raoultii* и *R. sibirica*, в единичных случаях в *Dermacentor* spp. была выявлена ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” (Табл. 2).

В отличие от *Dermacentor* spp., уровень инфицирования клещей *Haemaphysalis concinna* и *Haemaphysalis japonica* риккетсиями был относительно низким и составил 12%-23%. Несмотря на это, в клещах данного рода был выявлен широкий круг риккетсий, включая шесть видов с подтвержденной или предполагаемой патогенностью (*R. sibirica*, *R. heilongjiangensis*, *R. raoultii*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. aeschlimannii*, *R. canadensis*) и два недавно открытых кандидатных вида (“*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*”) (Табл. 2). Возбудитель СКТ был обнаружен в одном *H. concinna* в Амурской области. Еще один высокопатогенный вид риккетсий – возбудитель дальневосточного клещевого риккетсиоза, *R. heilongjiangensis*, был выявлен в *H. concinna* в Хабаровском крае и Амурской области (в 14,5% и 5,6% клещей, соответственно) и, существенно реже, в *H. japonica* (в 1,9%). Полученные данные коррелируют с преобладанием дальневосточного клещевого риккетсиоза среди пациентов с риккетсиозной симптоматикой на территории Хабаровского края (Mediannikov et al., 2004). Кроме того, в обоих видах клещей были выявлены “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. raoultii*, основными переносчиками которых являются *I. persulcatus* и *Dermacentor* spp., соответственно (Табл. 2).

Таблица 2. Встречаемость различных видов риккетсий в клещах *Dermacentor* spp. и *Haemaphysalis* spp.

| Регион | Вид клеща | Число клещей | Число (%) клещей, содержащих ДНК* | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------|--------------|-----------------------------------|------------|----------|-----------|---------|---------|----------|----------|
| | | | R.sib | R.rao | Ca.Rtar | R.heil | R.can | R.aesc | Ca.Rpr | Ca.Rrar |
| <i>Dermacentor</i> spp. | | | | | | | | | | |
| Хабар. | Ds | 113 | 0 | 66 (58,4) | 1 (0,9) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Амур. | Ds | 75 | 0 | 70 (93,3) | 2 (2,7) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| НСО | Dr | 181 | 0 | 64 (35,4) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Алтай | Dm | 98 | 15 (15,3) | 49 (50,0) | 4 (4,1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Dn | 136 | 28 (20,6) | 118 (86,8) | 1 (0,7) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Ds | 8 | 0 | 6 (75,0) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Haemaphysalis</i> spp. | | | | | | | | | | |
| Хабар. | Hc | 241 | 0 | 2 (0,8) | 14 (5,8) | 35 (14,5) | 0 | 1 (0,4) | 1 (0,4) | 10 (4,1) |
| | Hj | 374 | 0 | 5 (1,3) | 20 (5,3) | 7 (1,9) | 1 (0,3) | 1 (0,3) | 21 (5,6) | 4 (1,1) |
| Амур. | Hc | 198 | 1 (0,5) | 8 (4,0) | 0 | 11 (5,6) | 0 | 0 | 0 | 3 (1,5) |

*- включая случаи смешанных инфекций.

Сокращения: Хабар. - Хабаровский край; Амур. - Амурская область; Ds – *D. silvarum*; Dr- *D. reticulatus*; Dm - *D. marginatus*; Dn - *D. nuttalli*; Hc - *H. concinna*; Hj - *H. japonica*; R.sib – *R. sibirica*; R.rao – *R. raoultii*; Ca.Rtar – “*Candidatus R. tarasevichiae*”; R.heil – *R. heilongjiangensis*; R.can – *R. canadensis*; R.aesc - *R. aeschlimannii*; Ca.Rpr - “*Candidatus R. principis*”; Ca.Rrar - “*Candidatus R. rara*”.

Кандидатный вид “*Candidatus R. principis*” был выявлен преимущественно в *H. japonica*, а “*Candidatus R. rara*” – в *H. concinna* (Табл.

2). Ранее эти кандидатные виды были генотипированы только по *gltA* гену (Mediannikov et al., 2006). В данной работе “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*” были впервые охарактеризованы по генам 16S рРНК и поверхностных белков (*ompA*, *ompB* и *sca4*), что позволило достоверно их отнести к отдельным видам на основании существующих критериев, основанных на уровне сходства фрагментов вышеперечисленных пяти генов (Fournier et al., 2003). Проведенный филогенетический анализ показал, что оба кандидатных вида относятся к группе клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ); при этом изоляты “*Candidatus R. principis*” относятся к кластеру, объединяющему большинство риккетсий из группы КПЛ, а “*Candidatus R. rara*” существенно отличается от известных видов и образует отдельную ветвь на дендрограмме (Рис. 5).

Еще одной интересной находкой является обнаружение *R. aeschlimannii* и *R. canadensis* в клещах *Haemaphysalis* spp.; *R. canadensis* впервые выявлены в России, а патогенные для людей *R. aeschlimannii* – впервые на территории азиатской части России, что свидетельствует о расширении ареала данных видов риккетсий.

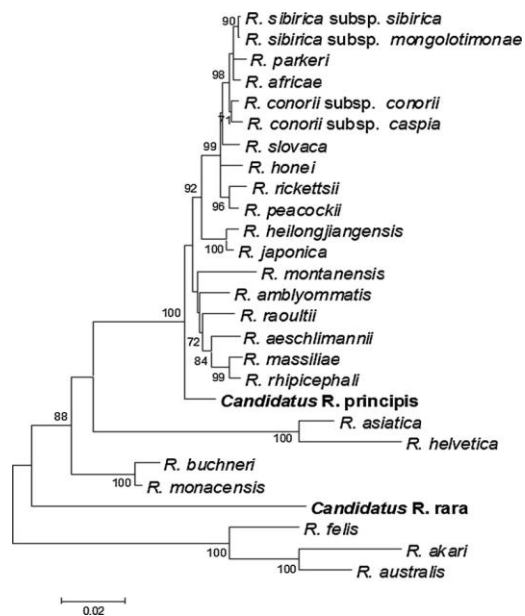


Рисунок 5. Филогенетическая позиция “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*” в группе КПЛ. Дендрограмма построена методом ML на основе объединенных последовательностей фрагментов генов риккетсий из группы КПЛ: *gltA-ompB-sca4* (2262 п.н.). (Igolkina et al., 2018)

2.2. Видовое и генетическое разнообразие риккетсий в клещах *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi*

Для установления ассоциации двух близкородственных видов клещей,

I. persulcatus и *I. pavlovskyi*, с различными видами *Rickettsia* spp. на наличие риккетсий были исследованы клещи *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, собранные в местах их совместного обитания на территории НСО, Красноярского края, Республики Алтай и Приморского края (остров Русский). Во всех исследованных регионах “*Candidatus R. tarasevichiae*” достоверно более часто детектировались в *I. persulcatus* (61,7-87,0%) по сравнению с *I. pavlovskyi* (0,8-2,0%). В гибридах встречаемость “*Candidatus R. tarasevichiae*” была промежуточной по сравнению с родительскими видами (Табл. 3).

Таблица 3. Встречаемость *Rickettsia* spp. в клещах рода *Ixodes*

| Регион | Вид клеща | Число клещей | Число (%) клещей, содержащих ДНК* | | | | | |
|----------------|--------------|--------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | Ca.Rtar | R.helv | R.rao | R.sib | R.heil | Ca.Rmen |
| НСО | Iper | 149 | 92 (61,7) | 1 (0,7) | 7 (4,7) | 2 (1,3) | 0 | 0 |
| | Ipavl | 453 | 9 (2,0) | 10 (2,2) | 15 (3,3) | 0 | 4 (0,9) | 0 |
| | Гибриды | 233 | 57 (24,5) | 0 | 3 (1,3) | 1 (0,4) | 0 | 0 |
| | Всего | 835 | 158 (18,9) | 11 (1,3) | 25 (3,0) | 3 (0,4) | 0 | 0 |
| Алтай | Iper | 185 | 161 (87,0) | 0 | 13 (7,0) | 6 (3,2) | 0 | 0 |
| | Ipavl | 124 | 1 (0,8) | 10 (8,1) | 0 | 0 | 1 (0,8) | 0 |
| | Гибриды | 58 | 26 (44,8) | 4 (6,9) | 3 (5,2) | 1 (1,7) | 0 | 0 |
| | Всего | 367 | 188 (51,2) | 14 (3,8) | 16 (4,4) | 7 (1,9) | 1 (0,3) | 0 |
| Красно- ярс | Iper | 192 | 165 (86,0) | 0 | 1 (0,5) | 0 | 0 | 0 |
| | Ipavl | 117 | 10 (8,5) | 1 (0,9) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Гибриды | 50 | 18 (36,0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Всего | 359 | 193 (53,8) | 1 (0,3) | 1 (0,3) | 0 | 0 | 0 |
| Русский | Iper | 190 | 140 (73,7) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Ipavl | 199 | 10 (5,0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (1,0) |
| | Гибриды | 32 | 10 (31,3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Всего | 421 | 160 (38,0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (0,5) |
| Омск | Iper | 136 | 122 (89,7) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Хабаровск | Iper | 467 | 388 (83,1) | 10 (2,1) | 0 | 0 | 25 (5,4) | 0 |
| Камчатка | Iper | 60 | 39 (65,0) | 1 (1,7) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Сахалин | Iper | 137 | 6 (4,4) | 87 (63,5) | 0 | 0 | 0 | 0 |

*- включая случаи смешанных инфекций. Сокращения: Iper - *I. persulcatus*; Ipavl - *I. pavlovskyi*; Ca.Rtar – “*Candidatus R. tarasevichiae*”; R.helv – *R. helvetica*; R.rao – *R. raoultii*; R.sib – *R. sibirica*; R.heil – *R. heilongjiangensis*; Ca.Rmen - “*Candidatus R. mendelii*”.

Во всех исследованных участках Омской области, Хабаровского и Камчатского краев также наблюдался высокий уровень инфицированности *I.*

persulcatus видом “*Candidatus R. tarasevichiae*”. Удивительно, но на острове Сахалин наблюдалась обратная картина; встречаемость *R. helvetica* (63,5%) была достоверно выше по сравнению с “*Candidatus R. tarasevichiae*” (4,4%) (Табл. 3). Наиболее вероятной причиной такого несоответствия может быть географическая изоляция популяции клещей на острове.

Помимо “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica* в клещах *Ixodes* spp. из разных регионов были обнаружены нетипичные для данного рода риккетсии - *R. raoultii*, *R. sibirica* и *R. heilongjiangensis* (Табл. 3). Особый интерес представляет обнаружение в *I. pavlovskyi* на острове Русский малоизученного вида “*Candidatus R. mendelii*”, не относящегося к группе КПЛ (Табл. 3). В Евразии эти риккетсии ранее были выявлены в *I. ricinus* и генотипированы по 16S рРНК и *gltA* генам. Нами образцы “*Candidatus R. mendelii*” были дополнительно охарактеризованы по *ompB*, *groEL* генам и 23S–5S IGS. Проведенный филогенетический анализ показал, что “*Candidatus R. mendelii*” образует отдельный кластер на дендрограммах и наряду с *R. belli* является базальной группой риккетсий (Рис. 6). Следует подчеркнуть, что в нашем исследовании “*Candidatus R. mendelii*” была впервые обнаружена как в России, так и в клещах *I. pavlovskyi*.

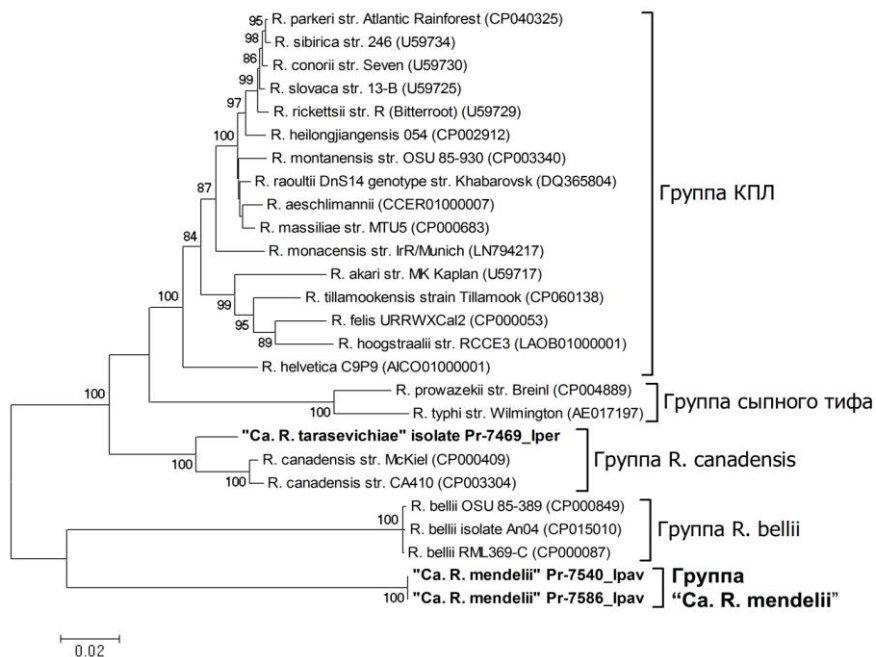


Рис. 6. Филогенетическая позиция “*Candidatus R. mendelii*”. Дендрограмма построена методом ML на основе объединенных последовательностей фрагментов генов риккетсий *gltA-ompB-groEL* (3191 п.н.). Жирным шрифтом выделены последовательности, секвенированные в этой работе. (Igolkina et al., 2023, TTBDIs)

2.3. Видовое и генетическое разнообразие риккетсий в областях симпатрии клещей *I. apronophorus*-*I. persulcatus*-*I. trianguliceps*

Поскольку все стадии развития норных клещей *I. apronophorus* и *I. trianguliceps* прокармливаются на мелких млекопитающих, и клещи этих видов могут быть собраны с животных, но не с растительности, в исследование по изучению ассоциации клещ-риккетсиозный агент были включены только снятые с грызунов клещи *I. apronophorus*, *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*. Часть клещей была исследована сразу после сбора, а часть клещей была подвергнута метаморфозу в лабораторных условиях. В исследуемых клещах было обнаружено два известных и один новый кандидатный вид риккетсий (Табл. 4).

Таблица 4. Выявление ДНК *Rickettsia* spp. в областях симпатрии *I.apronophorus*-*I.persulcatus*-*I.trianguliceps*

| Участок | Тип образца | Число образцов | Число (%) образцов, содержащих ДНК# | | | |
|---------|------------------------------|----------------|-------------------------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | | | Все риккетсии | R.helv | Ca.Rtar | Ca.Rural |
| Om-Bo | Г*- <i>I. apronophorus</i> | 62 | 46 (74,2) | 45 (72,6) | 2 (3,2) | 0 |
| | Г*- <i>I. persulcatus</i> | 59 | 49 (83,1) | 0 | 49 (83,1) | 0 |
| | Г*- <i>I. trianguliceps</i> | 24 | 16 (66,7) | 9 (37,5) | 0 | 7 (29,2) |
| | М**- <i>I. apronophorus</i> | 5 | 3 (60) | 3 (60) | 0 | 0 |
| | М**- <i>I. persulcatus</i> | 14 | 9 (64,3) | 0 | 8 (57,1) | 1 (7,1) |
| | М**- <i>I. trianguliceps</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Om-Zn | М**- <i>I. apronophorus</i> | 5 | 4 (80) | 4 (80) | 0 | 0 |
| | М**- <i>I. persulcatus</i> | 87 | 74 (85,1) | 1 (1,1) | 74 (85,1) | 0 |
| | М**- <i>I. trianguliceps</i> | 23 | 4 (17,4) | 0 | 2 (8,7) | 2 (8,7) |
| Всего | <i>I. apronophorus</i> | 72 | 53 (73,6) | 52 (72,2) | 2 (2,8) | 0 |
| | <i>I. persulcatus</i> | 160 | 132 (82,5) | 1 (0,6) | 131 (81,9) | 1 (0,6) |
| | <i>I. trianguliceps</i> | 48 | 21 (43,8) | 9 (18,8) | 2 (4,2) | 10 (20,8) |

- включая случаи смешанных инфекций; Г*- клещи, снятые с грызунов; М**- клещи, снятые с грызунов и прошедшие метаморфоз в лабораторных условиях. Сокращения: R.helv – *R. helvetica*; Ca.Rtar – “*Candidatus R.tarasevichiae*”; Ca.Rural – “*Candidatus R. uralica*”. (Igolkina et al., 2023, Microorganisms)

Для *I. apronophorus* и *I. persulcatus* наблюдалась строгая ассоциация с определенным видом риккетсий; в 81,9% *I. persulcatus* была обнаружена ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*”, а 72,2% *I. apronophorus* были инфицированы *R. helvetica*. Риккетсии других видов выявлялись в *I. apronophorus* и *I. persulcatus* в единичных случаях (Табл. 4). В клещах *I. trianguliceps* была выявлена ДНК двух известных видов - *R. helvetica* (в 18,8% клещей) и “*Candidatus R. tarasevichiae*” (в 4,2% клещей). Кроме того, в 20,8% *I. trianguliceps* была обнаружена ДНК риккетсий из группы КПЛ,

которых нельзя отнести ни к одному из известных видов. Помимо *I. trianguliceps*, новый вариант риккетсий был идентифицирован в одном перелинявшем *I. persulcatus*, а также в грызунах, отловленных в области обитания *I. trianguliceps* в Омской и Свердловской областях. Новый вариант риккетсий был генотипирован по 8 локусам (15 882 н.п.) и было показано, что он удовлетворяет критериям для нового кандидатного вида (Fournier et al., 2003). Мы назвали новый вариант риккетсий “*Candidatus R. uralica*” по месту, где он впервые был выявлен. Проведенный филогенетический анализ показал, что “*Candidatus R. uralica*” относится к кластеру, объединяющему большинство риккетсий из группы КПЛ (Рис. 7).

Позднее “*Candidatus R. uralica*” была также обнаружена в *I. trianguliceps* в Эстонии (Vikentjeva et al., 2021). Интересно, что *Rickettsia* sp., генетически идентичная “*Candidatus R. uralica*”, была обнаружена в Австрии в снятом с человека *I. ricinus* (Schötta et al., 2020). Мы полагаем, что, хотя и единичные, случаи обнаружения “*Candidatus R. uralica*” в атакующих людей клещах *I. persulcatus* и *I. ricinus* свидетельствуют о необходимости учитывать риск инфицирования людей “*Candidatus R. uralica*”.

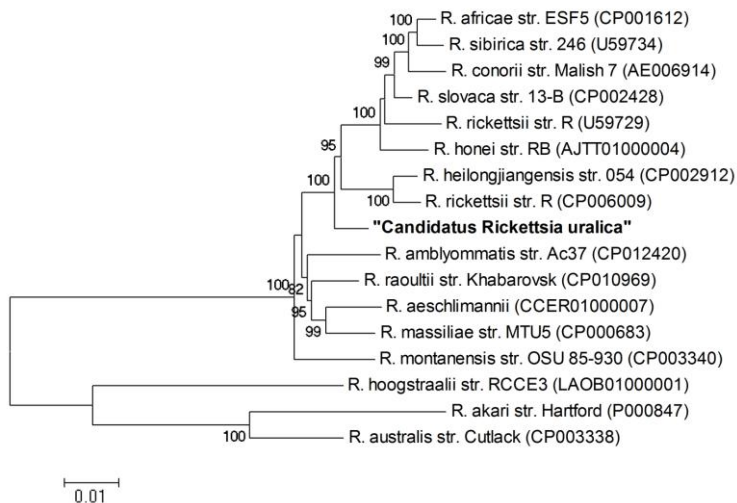


Рис. 7. Филогенетическая позиция “*Candidatus R. uralica*”. Дендрограмма построена методом ML на основе объединенных последовательностей фрагментов генов риккетсий из группы КПЛ *gltA-ompA-ompB-sca4-htrA* (11 576 н.п.). (Igolkina et al., 2022)

2.4. Генетическая гетерогенность популяции *Rickettsia raoultii*

Среди выявленных видов риккетсий наибольшая генетическая вариабельность наблюдалась у *R. raoultii* и *R. helvetica*.

Ранее на основании анализа гена *gltA* было установлено три генотипа *R. raoultii*, различающиеся единичными заменами: генотип RpA4

(прототипный штамм Marne), генотип DnS28 (прототипный штамм Elanda-23/95) и генотип DnS14 (прототипный штамм Khabarovsk) (Rydkina et al., 1999; Mediannikov et al., 2008). Позднее нами на территории Дальнего Востока в клещах *D. silvarum* был обнаружен еще один генотип *R. raoultii*, названный Var-Ds. Помимо этих четырех основных генотипов *R. raoultii*, в ряде клещей (преимущественно рода *Ixodes*) были обнаружены новые уникальные геноварианты гена *gltA*, различающиеся между собой 1-3 заменами.

Чтобы установить, соответствуют ли разные генотипы по консервативному *gltA* гену отдельным филогенетическим кластерам по переменным генам поверхностных белков, ряд изолятов риккетсий были генотипированы по протяженным фрагментам генов *ompA* (3266 н.п.) и *ompB* (4850 н.п.). Филогенетический анализ последовательностей, определенных в данной работе и доступных в базе данных GenBank показал наличие трех кластеров по обоим генам. Образцы с генотипами RpA4 и DnS14 с высоким уровнем поддержки образовывали отдельные кластеры. Образцы с генотипами DnS28 и Var-Ds различались одной заменой по *ompA* и *ompB* генам и образовывали общие кластеры на филогенетических деревьях; это позволяет рассматривать Var-Ds как вариант генотипа DnS28. Исключение составил типовой штамм Elanda-23/95; в отличие от остальных исследованных изолятов этот штамм относился к разным кластерам по *ompA* и *ompB* генам, что вероятно связано с его химерной структурой и показывает возможность рекомбинаций в геноме *R. raoultii* (Рис. 8). Таким образом, показано существование трех генетических линий *R. raoultii*, которые соответствуют основным генотипам по *gltA* гену. Мы полагаем, что для отнесения образцов *R. raoultii* к определенному генотипу целесообразно использовать более консервативный ген *ompA*.

В разных видах клещей преобладали разные генотипы *R. raoultii*. В клещах *D. reticulatus* был обнаружен один генотип - RpA4. В близкородственных *D. nuttalli* и *D. silvarum*, а также в клещах рода *Haemaphysalis* было выявлено два генотипа - DnS14 и DnS28/Var-Ds; в *D. marginatus* доминировали генотипы RpA4 и DnS28/Var-Ds. В клещах *Ixodes* spp. доминирующего генотипа не наблюдалось, при этом в восьми клещах были обнаружены новые уникальные варианты *gltA* гена.

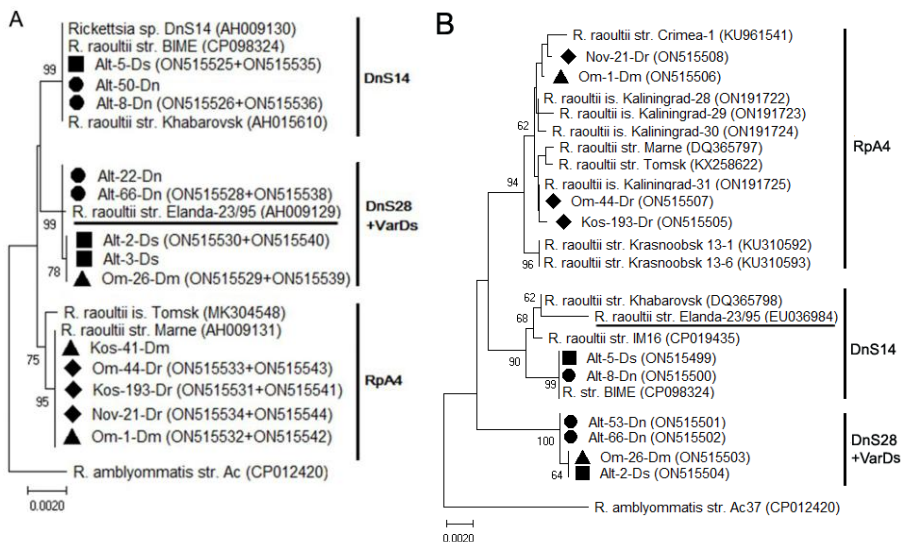


Рисунок 8. Дендрограмма, построенная методом ML на основе последовательностей фрагментов гена (А) *ompA* (3266 н.п.) и (В) *ompB* (4850 н.п.) *R. raoultii*. Сиквенсы, полученные в данном исследовании, отмечены: ■ - *D. silvarum*; ● - *D. nuttalli*; ▲ - *D. marginatus*; ◆ - *D. reticulatus*. (Якубовский и др., 2023)

2.5. Генетическая гетерогенность популяции *Rickettsia helvetica*

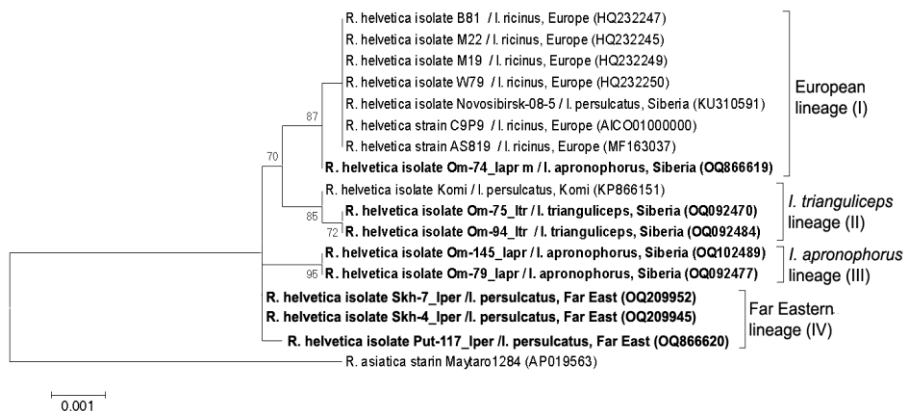
Изучение генетической гетерогенности популяции *R. helvetica* проводилось на основании мультилокусного типирования образцов данного возбудителя, выявленных в клещах *Ixodes* spp. на территории Омской области, Хабаровского края, острова Сахалин и острова Путятина (Приморский край).

Всего на основании анализа объединенных фрагментов *gltA* (840 н.п.), *ompB* (1255 н.п.), *sca4* (783 н.п.) и 16S rRNA (684 н.п.) было идентифицировано 7 вариантов последовательностей, которые на основании проведенного филогенетического анализа были отнесены к четырем генетическим линиям. Линия I (европейская линия) включала последовательности типового штамма *R. helvetica* C9P9, изолированного из *I. ricinus* из Швейцарии, а также образцов *R. helvetica* из трех *I. apronophorus* и одного *I. persulcatus* с участка Ом-Zn Омской области (см. Табл. 4). Линия II (линия *I. trianguliceps*) включала все образцы *R. helvetica* из *I. trianguliceps* и один образец из *I. apronophorus* с участка Ом-Во. Линия III (линия *I. apronophorus*) была наиболее многочисленной и включала последовательности из 48 *I. apronophorus*, преимущественно с участка Ом-Во. Линия IV (дальневосточная линия) включала все сиквенсы *R. helvetica* из *I. persulcatus* из Хабаровского края, островов Сахалин и Путятина.

Поскольку большинство изолятов *R. helvetica* из базы данных GenBank

были охарактеризованы только по *ompB* гену, мы использовали этот локус для сравнения полученных нами последовательностей с опубликованными ранее. Анализ последовательностей *ompB* гена длиной 2684 н.п. показал наличие все тех же четырех генетических линий (Рис. 9А). Европейская линия (линия I) дополнительно содержала ряд образцов *R. helvetica* из *I. ricinus* из Германии и из *I. persulcatus* из НСО, а *I. trianguliceps* линия (линия II) дополнительно включала образцы *R. helvetica* из *I. persulcatus* из Республики Коми (Silaghi et al., 2011; Kartasov et al., 2017). Анализ последовательностей *sca4* гена показал, что дальневосточная линия также включает образцы *R. helvetica* из *I. persulcatus* из Японии (Matsumoto et al., 2009).

А



В

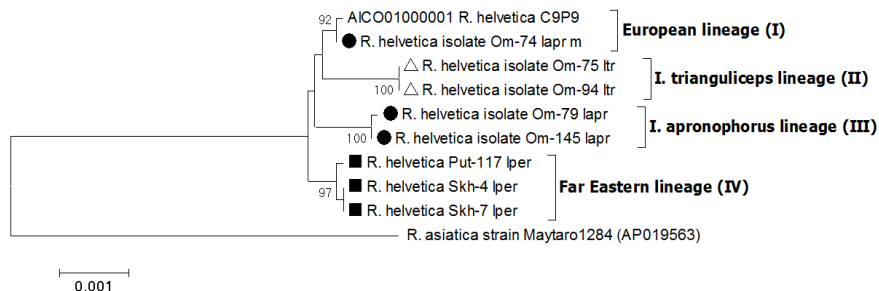


Рис. 9. Дендрограммы, построенные методом ML на основе нуклеотидных последовательностей *R. helvetica*: (А) фрагмент гена *ompB* (2684 н.п.) и (В) объединенных последовательностей фрагментов генов *glnA-ompA-ompB-sca4-htrA-16S rRNA-IGS* (9779 н.п.). Последовательности из различных источников, полученные в данном исследовании, отмечены: ■ – *I. persulcatus*; ● – *I. apronophorus*; △ – *I. trianguliceps*. (Igolkina et al., 2023)

Для более детального генотипирования были секвенированы последовательности генов 16S рРНК (1070 н.п.), *gltA* (1037 н.п.), *ompA* (1417 н.п.), *ompB* (3100 н.п.), *sca4* (2398 н.п.), *htrA* (499 н.п.), *groEL* (1528 н.п.), а также 23S-5S IGS (489 н.п.) для восьми образцов *R. helvetica*, принадлежащих к разным генетическим линиям. Все последовательности *groEL* гена были идентичны. Остальные исследованные генетические локусы имели полиморфные сайты; из них ген *ompB* был наиболее вариабельным. Филогенетический анализ, основанный на сравнении объединенных последовательностей 16S-*gltA-ompA-ompB-sca4-htrA*-IGS (9779 н.п.) также показал с высоким уровнем поддержки наличие четырех кластеров, которые соответствовали генетическим линиям, идентифицированным на основании анализа более коротких последовательностей (Рис. 9В).

Таким образом, впервые показана высокая генетическая вариабельность *R. helvetica*. Известные изоляты *R. helvetica* могут быть надежно отнесены к четырем генетическим линиям, однако ассоциация различных линий с определенным видом клеща или с определенной территорией наблюдалась не во всех случаях. Нельзя исключить, что разные генетические линии *R. helvetica* могут различаться по своим патогенным свойствам.

3.7. Новые этиологические агенты риккетсиозов в Западной Сибири

До последнего времени все описанные случаи риккетсиозов в Западной Сибири были обусловлены инфицированием возбудителем СКТ - *R. sibirica* и, значительно реже, возбудителем дальневосточного клещевого риккетсиоза - *R. heilongjiangensis*. Для того, чтобы идентифицировать новые этиологические агенты риккетсиозов в Западной Сибири и установить вклад различных видов риккетсий в общий спектр риккетсиозных инфекций, на наличие *Rickettsia* spp., были исследованы клинические образцы от 1281 пациента, госпитализированных в 2016-2019 гг. в инфекционную больницу №1 г. Новосибирска с признаками инфекционных заболеваний после присасывания клещей, независимо от наличия специфичной симптоматики. У всех пациентов до начала этиотропного лечения были взяты образцы крови. Повторные образцы крови были взяты у 167 пациентов через 10-20 дней после первого забора крови. Кроме того, у 252 пациентов с менингеальной симптоматикой были взяты образцы спинномозговой жидкости, а у 51 пациента - образцы биоптатов из мест присасывания клеща или эритем.

ДНК риккетсий была обнаружена в клинических образцах от 66 (5,2%) пациентов, включая 53 (4,5%) пациентов из НСО, 12 (13,5%) – из Республики Алтай и Алтайского края и 1 (4,2%) – из других регионов Сибири. Во всех исследованных регионах у пациентов наиболее часто был выявлен возбудитель СКТ – у 2,0% пациентов из НСО, 12,4% пациентов с

Алтая и одного пациента из Республики Хакассия. Вторым по встречаемости видом риккетсий является *R. raoultii*; данный возбудитель был обнаружен у 1,5% пациентов из НСО и одного пациента с Алтая. В единичных случаях у пациентов из НСО была обнаружена ДНК *R. aeschlimannii* (n=3), “*Candidatus R. tarasevichiae*” (n=2) и *R. slovacica* (n=1) (Табл. 5). Таким образом, у пациентов с Алтая риккетсиозы были достоверно более часто ($\chi^2 = 9.0$ df = 1, P = 0.003) вызваны *R. sibirica* по сравнению с *R. raoultii*, в то время как в Новосибирской области различие между частотой выявления этих риккетсиозов не было статистически значимым. Была показана высокая генетическая вариабельность *R. raoultii* в клинических образцах пациентов; последовательности *gltA* гена соответствовали как известным генотипам RpA4 (n=5) и DnS14 (n=4), так и новым геновариантам *R. raoultii* (n=9), что свидетельствует об отсутствии взаимосвязи между определенным генотипом и патогенными свойствами *R. raoultii*. Таким образом, около половины случаев инфекций вызвано нетипичными геновариантами *R. raoultii*, ассоциированными с клещами *Ixodes* spp.

Таблица 5. Выявление различных видов риккетсий в клинических образцах

| Регион | Число пациентов | Число (%) пациентов, у которых выявлена ДНК риккетсий | | | | | | |
|----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Все виды | R.sib | R.rao | R.aesh | Ca.Rtar | R.slov | Rick. spp |
| НСО | 1168 | 53 (4,5) | 23 (2,0) | 17 (1,5) | 3 (0,3) | 2 (0,2) | 1 (0,1) | 7 (0,6) |
| Алтай | 89 | 12 (13,5) | 11 (12,4) | 1 (1,1) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Другие области | 24 | 1 (4,2) | 1 (4,2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Всего | 1281 | 66 (5,2) | 35 (2,7) | 18 (1,4) | 3 (0,2) | 2 (0,2) | 1 (0,1) | 7 (0,5) |

Сокращения: R.sib – *R. sibirica*, R.rao - *R. raoultii*, R.aesh - *R. aeschlimannii*; Ca.Rtar - “*Candidatus R. tarasevichiae*”, R.slov - *Rickettsia slovacica*, Rick.spp – *Rickettsia* spp.

Сравнение клинических проявлений риккетсиозов, вызванных *R. sibirica* и *R. raoultii*, показало, что 1) у всех пациентов наблюдалась лихорадка; 2) сыпь, первичный аффект и высокий уровень АЛТ/АСТ наблюдались достоверно чаще (P < 0,01) у пациентов с СКТ; 3) неврологические симптомы (менингит, скованность шеи, тремор, головокружение и тошнота), напротив, достоверно чаще (P < 0,01) были отмечены у пациентов, инфицированных *R. raoultii*. Следует отметить, что наиболее тяжелые формы инфекции, вызванной *R. raoultii*, наблюдались у пожилого пациента (89 лет) и пациентов с иммунодефицитным статусом (два пациента с ВИЧ); у этих пациентов наблюдалась лихорадка до 38,5°-39°С и менингеальный синдром. Более частое выявление неврологических симптомов у пациентов с *R. raoultii* коррелирует с достоверно более частым (P < 0,01) обнаружением *R. raoultii* в цереброспинальной жидкости (6/19 образцов; 31,6%) по сравнению с *R. sibirica* (1/38 образцов; 2,6%).

Случаи риккетсиозов, вызванных другими видами риккетсий, наблюдались редко. Среди трех пациентов, инфицированных *R. aeschlimannii*, у двоих наблюдалась типичная риккетсиозная симптоматика, которая включала лихорадку (39°C), сыпь, первичный аффект, головную боль, миалгию, артралгию и высокий уровень АЛТ/АСТ.

У одного пациента с ДНК "*Candidatus R. tarasevichiae*" была лихорадка (37,8°C), первичный аффект и головная боль. Второй пациент был инфицирован одновременно "*Candidatus R. tarasevichiae*" и вирусом клещевого энцефалита. Пациент перенес тяжелое заболевание с высокой температурой (39°C), которое привело к летальному исходу, несмотря на проводимую интенсивную терапию. Еще один летальный случай риккетсиоза, вызванный одновременным инфицированием *R. sibirica* и "*Candidatus R. tarasevichiae*", был обнаружен в Красноярском крае; оба риккетсиозных агента были идентифицированы не только в образцах крови, но и в секционном материале головного мозга. Можно предположить, что в этих случаях тяжелое течение клещевого энцефалита и СКТ было усугублено одновременным инфицированием "*Candidatus R. tarasevichiae*".

У больного, инфицированного *R. slovacica*, наблюдалась лихорадка (39°C), головная боль, лейкоцитоз; специфических симптомов, связанных с *R. slovacica*, не наблюдалось. Ни у одного из семи пациентов, инфицированных новыми генетическими вариантами риккетсий, также не было характерных симптомов риккетсиозов.

Следует подчеркнуть, что из 35 пациентов с СКТ только 2 пациента имели смешанные инфекции или сопутствующие тяжелые заболевания (ВКЭ и ВИЧ). Среди 31 пациента с другими риккетсиозами случаи смешанных инфекций или сопутствующих заболеваний были более частыми (n=10) и включали смешанные инфекции с ВКЭ (n=2), *B. miyamotoi* (n=5), ВИЧ (n=2) и одновременно *B. burgdorferi* и ВИЧ (n=1). Представляется вероятным, что другие (не-СКТ) риккетсиозы в отсутствие сопутствующих заболеваний часто могут протекать бессимптомно. Это могло бы объяснить тот факт, что инфекции, вызванные *R. raoultii* и "*Candidatus R. tarasevichiae*", регистрируются довольно редко, несмотря на высокую распространенность в клещах этих патогенов.

Таким образом, был впервые установлен широкий круг инфекционных агентов, которые вызывают риккетсиозы в Западной Сибири. Из них риккетсиозы, вызванные *R. raoultii*, "*Candidatus R. tarasevichiae*", *R. aeschlimannii* и *R. slovacica*, впервые были обнаружены в России. Клинические симптомы риккетсиозов, вызванных *R. aeschlimannii*, схожи с симптомами, характерными для СКТ, что может привести к ошибочной диагностике. Интересно, что ни *R. aeschlimannii*, ни *R. slovacica* до настоящего времени не были обнаружены в клещах на территории Сибири.

В целом, клинические проявления риккетсиозов в Западной Сибири разнообразны и часто неспецифичны, поэтому их этиологические агенты в большинстве случаев могут быть идентифицированы только с помощью

генетических методов. Определение возбудителей риккетсиозов, особенно в случаях с неспецифической симптоматикой, представляется необходимым для назначения адекватной антибактериальной терапии. Особая значимость корректной диагностики риккетсиозов связана с тем, что для их лечения используют антибиотики против внутриклеточных возбудителей (прежде всего доксициклин), в то время как для лечения инфекций, вызванных свободноживущими микроорганизмами (например, боррелиями) могут применяться антибиотики других групп.

3. Генетическое разнообразие бактерий семейства Anaplasmataceae

Бактерии семейства Anaplasmataceae представляют собой обширную группу внутриклеточных грамотрицательных бактерий, паразитирующих как в позвоночных резервуарных хозяевах, так и в беспозвоночных переносчиках. Среди переносимых иксодовыми клещами бактерий данного семейства наибольшую эпидемиологическую и эпизоотическую значимость имеют представители родов *Anaplasma*, *Ehrlichia* и *Neoehrlichia*. Заболевания у людей в большинстве случаев связаны с инфицированием *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* и *Neoehrlichia mikurensis*.

Ранее на территории азиатской части России в клещах *Ixodes* spp. и в мелких млекопитающих была выявлена ДНК *A. phagocytophilum*, *E. muris* и *N. mikurensis* (Shrynov et al., 2006; Rar et al., 2010). Кроме того, три новых геноварианта эрлихий были обнаружены в клещах *Haemaphysalis* spp. и в тканях мелких млекопитающих на Дальнем Востоке (Rar et al., 2010). Нам не удалось выявить ДНК бактерий семейства Anaplasmataceae в клинических образцах (Tkachev et al., 2008). Дальнейшее изучение бактерий данного семейства в рамках данной работы включало изучение ассоциации различных видов/геновариантов анаплазм, эрлихий и неоэрлихий с разными видами клещей в областях симпатрии *I.persulcatus-I.pavlovskiy* и *I.persulcatus-I.trianguliceps-I.apronophorus*; детальный молекулярно-генетический анализ выявленных анаплазм, эрлихий и неоэрлихий; выявление возбудителей анаплазмоза в образцах сельскохозяйственных животных.

3.1. Ассоциация различных видов анаплазм, эрлихий и неоэрлихий с *I. persulcatus* и *I. pavlovskiy*

На наличие бактерий семейства Anaplasmataceae были исследованы клещи, собранные в областях симпатрии *I.persulcatus-I.pavlovskiy* на территории НСО и Республики Алтай. В обоих видах клещей, а также в их межвидовых гибридах была обнаружена ДНК *A. phagocytophilum*, *E. muris* и *N. mikurensis*. Из них только *E. muris* достоверно более часто ($P < 0.001$) выявлялась в *I. persulcatus* по сравнению с *I. pavlovskiy*. Для остальных патогенов разница в уровне инфицирования *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy* и межвидовых гибридов не была статистически значимой (Табл. 6).

Таблица 6. Встречаемость бактерий семейства Anaplasmataceae в клещах Ixodes spp.

| Участок | Вид клеща | Общее число клещей | Число (%) клещей, содержащих ДНК | | |
|---------|-----------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| | | | <i>A. phagocytophilum</i> | <i>E. muris</i> | <i>N. mikurensis</i> |
| Алтай | <i>I. persulcatus</i> | 185 | 15 (8,1) | 27 (14,6) | 0 |
| | <i>I. pavlovskiyi</i> | 124 | 3 (2,4) | 1 (0,8) | 1 (0,8) |
| | Гибриды | 58 | 1 (1,7) | 4 (6,9) | 0 |
| | Всего | 367 | 19 (5,2) | 32 (8,7) | 1 (0,3) |
| НСО | <i>I. persulcatus</i> | 149 | 6 (4,0) | 13 (8,7) | 2 (1,3) |
| | <i>I. pavlovskiyi</i> | 453 | 16 (3,5) | 1 (0,2) | 8 (1,8) |
| | Гибриды | 233 | 14 (6,0) | 17 (7,3) | 3 (1,3) |
| | Всего | 835 | 36 (4,3) | 31 (3,7) | 13 (1,6) |

3.2. Изучение генетической variability *A. phagocytophilum*

Возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) *A. phagocytophilum* – генетически вариабельный вид, который адаптирован к широкому кругу позвоночных хозяев и различным видам клещей рода *Ixodes*. На основании анализа около 2000 последовательностей *groEL* гена было идентифицировано восемь кластеров *A. phagocytophilum*, среди которых кластеры 5 и 6 тесно связаны с мелкими млекопитающими в Евразии (Jaarsma et al., 2019). Ранее в России в образцах от клещей и мелких млекопитающих нами были выявлены три генетические группы *A. phagocytophilum* по *groEL* гену, соответствующие кластерам 4–6 (Rar et al., 2011). Наличие этих же трех групп было подтверждено на основании секвенирования фрагментов гена *msh4* и *DOV1* локуса.

Для установления ассоциации выявленных генетических групп *A. phagocytophilum* с различными видами клещей на наличие анаплазм были исследованы клещи и мелкие млекопитающие, собранные в областях симпатрии *I. persulcatus*–*I. trianguliceps* в Омской области и на участках, расположенных вне ареала *I. trianguliceps*. Образцы, относящиеся к кластеру 5, были обнаружены только в области обитания *I. trianguliceps*; этот генотип был выявлен во всех генотипированных *I. trianguliceps* и доминировал в образцах от мелких млекопитающих (86,8%); в *I. persulcatus* кластер 5 не обнаружен. Другой генотип, ассоциированный с мелкими млекопитающими (кластер 6), в Омской области был обнаружен в 13% грызунов и в *I. persulcatus* (Табл. 7). Следует отметить, что кластер 6 преобладал в образцах от грызунов, отловленных вне ареала *I. trianguliceps* (Рис. 10). Образцы, относящиеся к кластеру 4, в Омской области были обнаружены в единичных грызунах и доминировали в *I. persulcatus*. Во всех остальных исследованных областях, расположенных вне ареала *I. trianguliceps*, в клещах *I. persulcatus* и *I. pavlovskiyi* были обнаружены анаплазмы, относящиеся к кластерам 4 и 6, но

не к кластеру 5 (Рис. 10). Интересно, что на участке с высокой численностью *I. apronophorus* (Ом-Во) не было обнаружено новых геновариантов *A. phagocytophilum*; можно предположить, что клещ *I. apronophorus* не является специфическим переносчиком *A. phagocytophilum*, либо что он переносит геноварианты, ассоциированные с другими видами клещей.

Таблица 7. Генотипирование образцов *A. phagocytophilum*, выявленных в областях симпатрии *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* в Омской области

| Тип образца | Число генотипированных образцов | Число (%) образцов с генотипом# | | |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|-----------|
| | | кластер 4 | кластер 5 | кластер 6 |
| Грызуны-кровь | 197 | 2 (1,0) | 171 (86,8) | 25 (12,7) |
| Г*- <i>I. trianguliceps</i> | 13 | 0 | 13 (100) | 0 |
| М** - <i>I. persulcatus</i> | 2 | 0 | 0 | 2 (100) |
| М** - <i>I. trianguliceps</i> | 1 | 0 | 1 (100) | 0 |
| Флаг*** - <i>I. persulcatus</i> | 33 | 32 (97,0) | 0 | 1 (3,0) |

- включая случаи смешанных инфекций; Г*- клещи, снятые с грызунов; М**- клещи, снятые с грызунов и прошедшие метаморфоз в лабораторных условиях; Флаг***- клещи, собранные с растительности на флаг. (Rag et al., 2020)

Таким образом, в азиатской части России обнаружены три генетические линии *A. phagocytophilum*. Первая линия (кластер 5 по *groEL* гену) передается от *I. trianguliceps* полёвкам, мышам и землеройкам; вторая линия (кластер 6) передается полёвкам, мышам и землеройкам от *I. persulcatus*; и третья линия (кластер 4) передается от *I. persulcatus* бурундукам и, вероятно, другим хозяевам. Важно отметить, что в области симпатрии *I. persulcatus*-*I. trianguliceps* на одном участке могут сосуществовать три частично взаимосвязанных энзоотических цикла *A. phagocytophilum*. Наличие нескольких энзоотических циклов указывает на то, что *A. phagocytophilum* можно рассматривать как комплекс отдельных линий, четко различающихся по генетическим характеристикам, резервуарам, переносчикам, географии, патогенности. Изучение этих циклов необходимо для установления эпидемиологических рисков, связанных с наличием штаммов с зоонозным потенциалом.

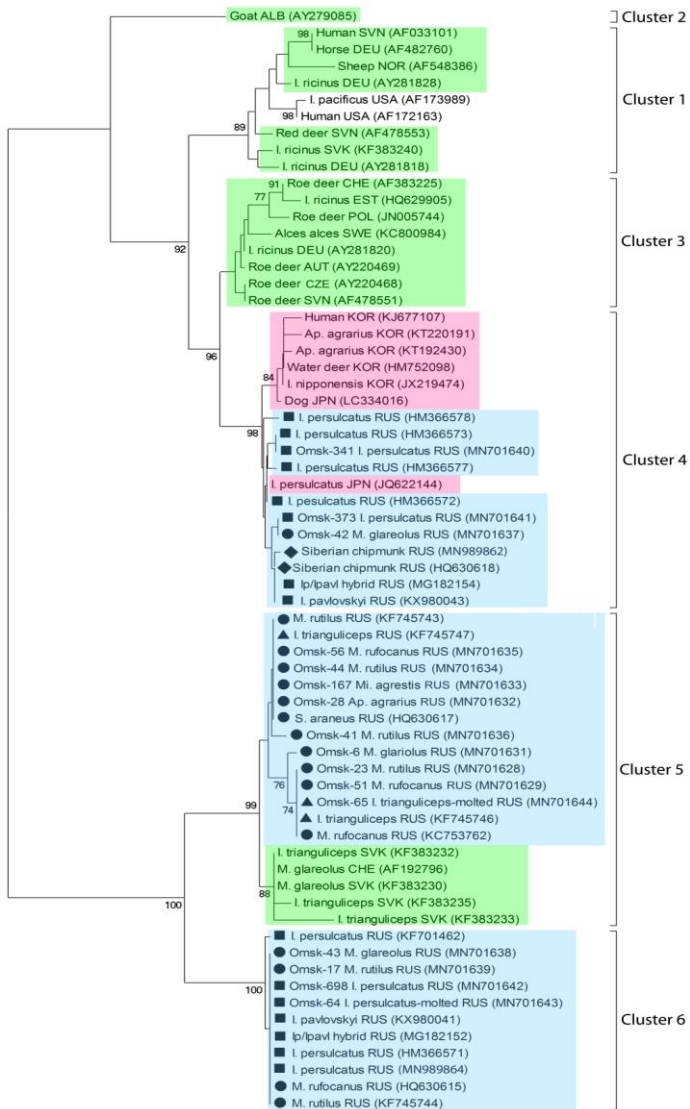


Рис. 10. Дендрограмма, построенная методом NJ на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента *groESL* оперона *A. phagocytophilum* (1200 н.п.). Последовательности из различных источников из данного исследования, отмечены: ● - мелкие млекопитающие; ■ - *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*; ▲ - *I. trianguliceps*; ◆ - бурундуки. Последовательности образцов из Европы отмечены зеленым, из Сибири – голубым, с Дальнего Востока – розовым (Rar et al., 2020)

3.3. Сопоставление результатов типирования *A. phagocytophilum* по MLST, *ankA* и *groEL* генов на основании анализа метаданных

Генотипирование *A. phagocytophilum* разными группами исследователей проводится по различным генетическим локусам. Чаще всего для генотипирования используют MLST анализ, основанный на сравнении объединенных фрагментов семи генов домашнего хозяйства общей длиной 2877 н.п., а также анализ фрагмента *groEL* гена и двух фрагментов *ankA* гена (Huhn и др., 2014; Jaarsma et al., 2019; Scharf et al., 2011). По всем исследованным генетическим локусам последовательности *A. phagocytophilum* подразделяются на отдельные кластеры, ассоциированные с разными видами клещей и позвоночных хозяев, однако результаты, основанные на анализе разных локусов, не всегда сопоставимы между собой.

Нами было проведено сопоставление результатов генотипирования *A. phagocytophilum* по MLST локусам, а также *ankA* и *groEL* генам, основанное на анализе метаданных, включающих данные из базы данных MLST о последовательностях всех известных 311 сиквенс-типов (ST) и все доступные последовательности *ankA* гена длиной более 520 н.п. (всего 755 сиквенсов) и *groEL* гена длиной более 895 н.п. (всего 312 сиквенсов), включая сиквенсы *groEL* гена, определенные в наших исследованиях. Включенные в анализ последовательности были доступны в марте 2020 г. Полученные результаты о соответствии между различными кластерами *A. phagocytophilum* представлены в нашей обзорной статье - Rar et al., Infect. Genet. Evol., 2021, 91:104833.

В большинстве случаев изоляты *A. phagocytophilum*, которые были охарактеризованы по *groEL* гену, не были генотипированы ни на основании MLST, ни по *ankA* гену. Тем не менее, наблюдаемая схожая картина кластеризации по исследуемым локусам позволила с большой вероятностью установить соответствие между филогенетическими кластерами, полученными с использованием различных методов типирования. Показано, что независимо от исследуемого локуса изоляты *A. phagocytophilum* от мелких млекопитающих из стран Европы и России кластеризуются отдельно от других изолятов. Аналогично, геноварианты *A. phagocytophilum*, выявленные в снятых с птиц клещах *I. ricinus*, образуют отдельные кластеры. Таким образом, *groEL* кластеры 5 и 7 с высокой вероятностью соответствуют MLST кластерам 3 и 7 и *ankA* кластерам 5 и 6, соответственно (Рис. 11).

Образцы *A. phagocytophilum* из Азии принадлежат к двум разным кластерам по всем исследованным локусам. Один из этих кластеров обнаружен в *I. persulcatus*, *I. pavlovskiyi*, межвидовых гибридах и полевках в азиатской части России. Второй кластер был обнаружен в тех же видах клещей и в различных видах животных в азиатской части России и странах Азии, а также в клинических образцах и *I. nipponensis* из Кореи. Проведенное сопоставление последовательностей показало, что *groEL* кластеры 6 и 4 соответствуют MLST кластерам 6 и 5 и *ankA* кластерам 10 и

8, соответственно.

Что касается кластеров, ассоциированных с крупными млекопитающими из Европы, соответствие между ними неочевидно. Тем не менее, все изоляты от людей из Европы генетически схожи между собой по всем локусам и образуют общие кластеры с большинством изолятов от собак, лошадей и кабанов. Таким образом, европейские изоляты от людей, собак, лошадей и кабанов из кластера 1 по *groEL* гену наиболее вероятно соответствуют кластеру 1 по MLST и кластеру 1 по *ankA* гену (Рис. 11).

Изоляты *A. phagocytophilum*, способные инфицировать людей (зоонозные штаммы), представляют незначительную часть известных геновариантов *A. phagocytophilum*; по всем исследованным локусам американские, европейские и азиатские зоонозные штаммы образуют отдельные монофилетические группы, относящиеся к разным кластерам (Рис. 11). Для установления эпидемиологической опасности *A. phagocytophilum* в различных местообитаниях необходима информация о том, какие генетические линии *A. phagocytophilum* представляют опасность для человека, и с какими видами клещей и резервуарных хозяев они ассоциированы.

Анализ доступных в базах данных последовательностей показал, что только два ST на основе MLST, два варианта *ankA* и два варианта *groEL* генов обнаружено у зоонозных штаммов из США. Все европейские зоонозные штаммы принадлежат к кластеру 1 на филогенетических деревьях по MLST, *ankA* и *groEL* генам (Рис. 11). Среди образцов от людей было идентифицировано четыре ST на основе MLST, два варианта *ankA* гена и один вариант *groEL* гена. Интересно, что среди нескольких сотен доступных последовательностей *A. phagocytophilum* от *I. ricinus* только семь образцов охарактеризованных методом MLST, четыре последовательности *ankA* гена и три последовательности *groEL* гена идентичны зоонозным вариантам, что коррелирует с низкой заболеваемостью гранулоцитарным анаплазмозом человека (ГАЧ) в Европе.

Что касается азиатских зоонозных штаммов, зоонозный вариант *A. phagocytophilum* из Южной Кореи на основании анализа *ankA* гена был идентичен геноварианту из *I. nipponensis*, но отличался от геновариантов из *I. persulcatus* (Lee et al., 2020). Анализ последовательностей *groEL* гена показал, что зоонозные изоляты относятся к монофилетической группе, в которую входят образцы от *I. nipponensis*, собаки, мелких грызунов и водяного оленя из Южной Кореи и Японии, но не от *I. persulcatus*. Таким образом, *I. nipponensis* является наиболее вероятным переносчиком зоонозных вариантов в Азии (Рис. 11).

На основании проанализированных данных нельзя сделать вывода о циркуляции в азиатской части России в области обитания *I. persulcatus* патогенных для людей штаммов *A. phagocytophilum*. В то же время представляется вероятным существования очагов ГАЧ на территории Европейской части России в ареале *I. ricinus*.

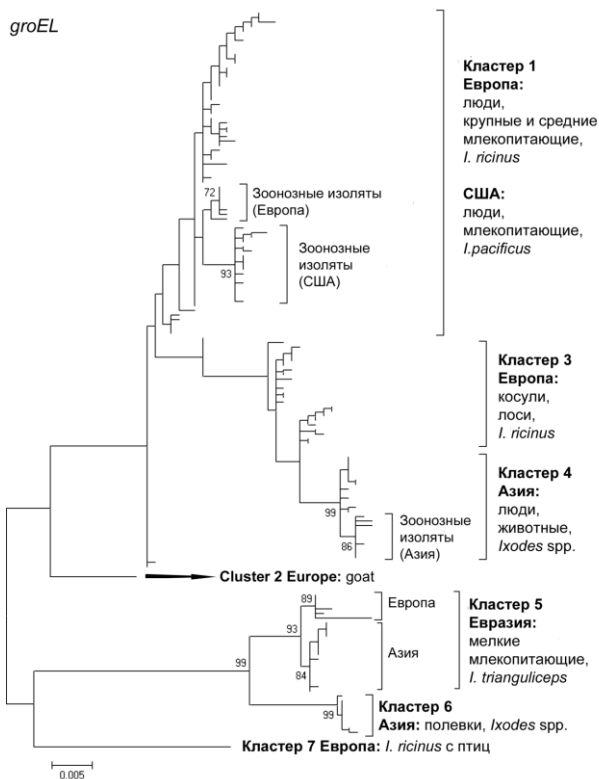


Рис. 11. Дендрограмма, построенная методом ML на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента *groEL* гена (895 н.п) *A. phagocytophilum*. (Rar et al., 2021)

3.4. Изучение генетической вариабельности *E. muris* и *N. mikurensis*

Все генотипированные нами ранее образцы *E. muris* и *N. mikurensis* из разных частей Сибири и Дальнего Востока были высококонсервативны и отличались единичными заменами на основании анализа 16S рРНК и *groEL* генов (Rar et al., 2010). Проведенный анализ образцов от мелких млекопитающих из Омской области показал наличие новых геновариантов *E. muris* и *N. mikurensis*, наряду с типичными вариантами (Рис. 12, 13). Новый *E. muris* вариант на основании анализа *gltA* гена образовывал общий кластер с образцами из Евразии, а по *groEL* гену был наиболее схож с североамериканскими образцами из клещей *I. cookei* и *I. scapularis* (Рис.12).

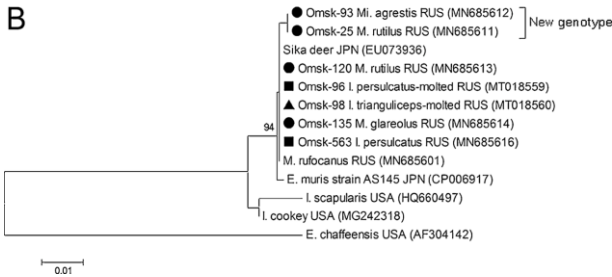
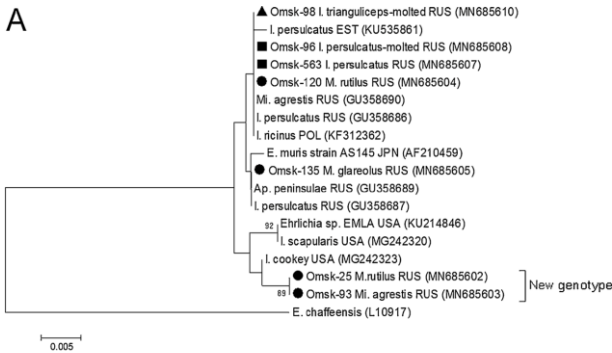


Рис. 12. Дендрограммы, построенные методом NJ на основе нуклеотидных последовательностей *E. muris*: (А) фрагмент *groEL* гена (619 н.п.), (В) фрагмент *gItA* гена (514 н.п.). Последовательности из различных источников, секвенированные в данном исследовании, отмечены: ● - мелкие млекопитающие; ■ - *I. persulcatus*; ▲ - *I. trianguliceps*. (Rar et al., 2020)

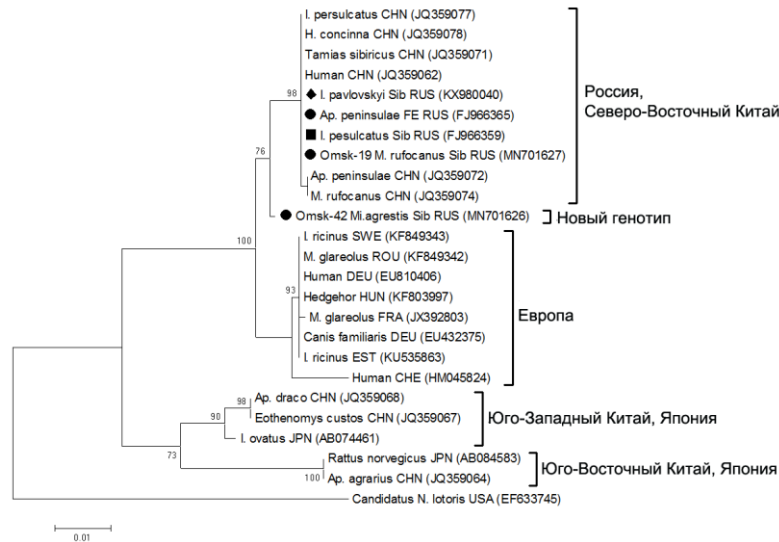


Рис. 13. Дендрограмма, построенная методом NJ на основе последовательностей фрагмента *groEL* гена (914 н.п.) *N. mukurensis*. Последовательности, секвенированные в данном исследовании, отмечены: ● - мелкие млекопитающие; ■ - *I. persulcatus*; ◆ - *I. pavlovskiy*; ▲ - *I. trianguliceps*. (Rar et al., 2020)

Новый *N. mikurensis* геновариант по *groEL* гену образует сестринскую ветвь с высококонсервативными последовательностями из Евразии (Рис. 13). Поскольку новые геноварианты наиболее часто выявлялись на участке с высокой численностью *I. apronophorus*, мы предполагаем, что данный клещ является наиболее вероятным переносчиком новых потенциально патогенных геновариантов *E. muris* и *N. mikurensis*.

3.5. Молекулярно-генетический анализ нового кандидатного вида эрлийий “*Candidatus Ehrlichia khabarensis*”

Новый генетический вариант эрлийий, первоначально названный *Ehrlichia* sp. Khabarovsk, был нами ранее выявлен в тканях полевков и бурозубок, обитающих в окрестностях г. Хабаровск (Rar et al., 2010).

Для подтверждения принадлежности выявленных бактерий к новому виду *Ehrlichia* sp. Khabarovsk из суспензий селезенки природно-инфицированной полевки были культивированы в новорожденных лабораторных мышах. При проведении трех пассажей инфицирования ДНК эрлийий была обнаружена в образцах крови, селезенки, печени, почек и головного мозга от всех исследованных мышей. ДНК эрлийий выявлялась в образцах, взятых на 1-4 недели после инфицирования, при этом наиболее высокое содержание эрлийий в тканях наблюдалось на второй неделе после инфицирования. Электронная микроскопия выявила морулы, содержащие грамотрицательные бактерии, в моноцитах печени и селезенки инфицированных мышей. Размер и ультраструктура этих бактериальных клеток соответствует описанным ранее для других видов эрлийий (Bell-Sakyi et al., 2000), что позволяет идентифицировать их как *Ehrlichia* sp. (Рис.14). У нескольких инфицированных мышей наблюдались признаки эрлийиозной инфекции - умеренная спленомегалия и гепатомегалия; в печени одной мыши были обнаружены участки некроза.

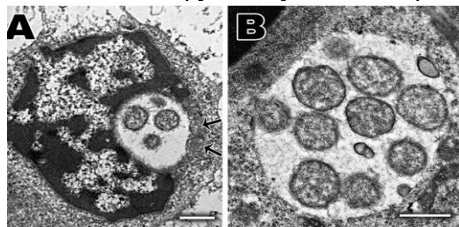


Рисунок 14. Электронная микрофотография моноцитов, содержащих морулы, в печени (А) и селезенке (В). Размер шкалы соответствует 1 микрону (электронная микрофотография выполнена Рябчиковой Е.И). (Rar et al., 2015)

В образцах ДНК от лабораторных мышей третьего пассажа были секвенированы фрагменты гена 16S рРНК (1504 н.п.), *groESL* оперона (1374 н.п.) и *gltA* гена (1259 н.п.) эрлийий. Все определенные последовательности были идентичны последовательностям *Ehrlichia* sp. Khabarovsk из природно-инфицированных полевков. Степень сходства последовательностей 16S рРНК, *groESL* оперона и *gltA* гена *Ehrlichia* sp. Khabarovsk с другими известными последовательностями *Ehrlichia* sp. составил 96,7%-97,2%; 86,8%-90,2% и

79,9%-81,4%, соответственно, что меньше степени сходства между соответствующими последовательностями известных видов эрлихий. Проведенный филогенетический анализ показал, что по всем трем исследованным локусам *Ehrlichia* sp. Khabarovsk кластеризуется отдельно от других видов и генетических вариантов эрлихий (Рис. 15). Все вышеперечисленное указывает, что *Ehrlichia* sp. Khabarovsk является отдельным новым видом эрлихий. Мы предложили его назвать “*Candidatus Ehrlichia khabarensis*” по названию территории, где этот вид был обнаружен.

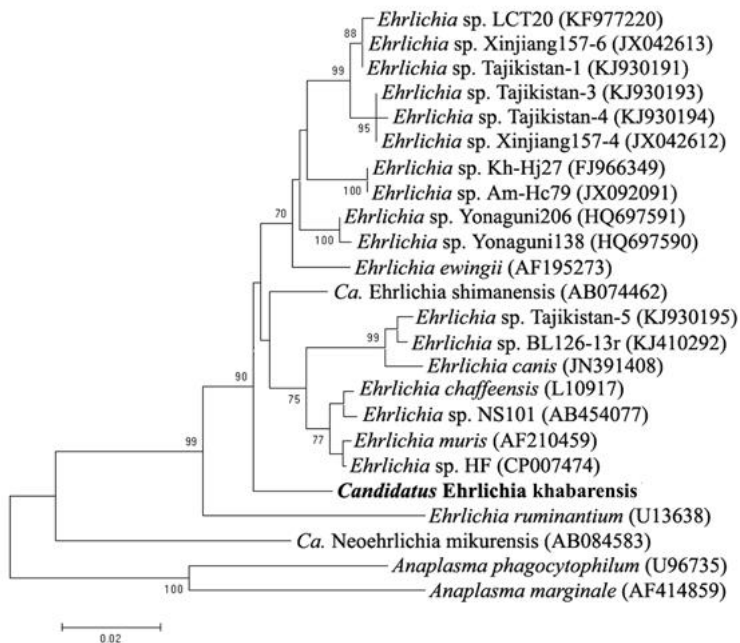


Рисунок 15. Филогенетическая позиция “*Candidatus E. khabarensis*”. Дендрограмма построена методом NJ на основе последовательностей фрагмента гена *groEL* (1169 н.п.) бактерий семейства Anaplasmataceae. (Rar et al., 2015)

3.6. Анаплазмы сельскохозяйственных животных

Анаплазмозы сельскохозяйственных животных могут быть вызваны различными видами *Anaplasma* spp. Внутриэритроцитарные анаплазмы *A. marginale* и *A. ovis* вызывают заболевания у крупного и мелкого рогатого скота, соответственно; эти инфекции широко распространены в тропических и субтропических зонах. Возбудитель ГАЧ, *A. phagocytophilum*, также имеет большую эпизоотическую значимость и вызывает клещевую лихорадку у крупного и мелкого рогатого скота в различных странах Европы. Еще одним возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота на территории Азии, Африки и Южной Америки являются размножающиеся в моноцитах *A. bovis*. Все

вышеперечисленные возбудители могут вызывать как тяжелые формы анаплазмозов, приводящие к гибели животных, так и длительно персистирующие инфекции, не имеющие видимых проявлений.

Природные очаги анаплазмозов сельскохозяйственных животных широко распространены в России, однако их возбудители практически не изучены. Для идентификации возбудителей анаплазмозов сельскохозяйственных животных нами были исследованы образцы крови крупного рогатого скота, коз и овец, обитающих на территории НСО, Алтайского края, Республики Алтай и Иркутской области, а также клещи рода *Dermacentor*, как наиболее вероятные переносчики внутриэритроцитарных анаплазм. Был показан высокий уровень инфицирования анаплазмами коз и овец во всех исследованных регионах (56%-100%), а также высокий уровень инфицирования анаплазмами крупного рогатого скота на территории НСО и Алтая (34,4%-84,0%) (Табл. 8). Нам не удалось обнаружить ДНК анаплазм в образцах крупного рогатого скота в Иркутской области, что может быть связано с различиями в иксодофауне в Иркутской области и Западной Сибири.

Таблица 8. Выявление ДНК *Anaplasma* spp. в образцах крови сельскохозяйственных животных

| Регион | Вид животного | Общее число проб | Число (%) проб, содержащих ДНК анаплазм | Число типированных проб | Число (%) * образцов, содержащих ДНК | | | |
|--------------|---------------|------------------|---|-------------------------|--------------------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------|
| | | | | | <i>A. bovis</i> | <i>An. sp. Omsk</i> | <i>An. sp. Sib122</i> | <i>A. ovis</i> |
| НСО | КРС | 50 | 42 (84,0) | 14 | - | - | 14 (100) | - |
| Алтай. край | КРС | 180 | 62 (34,4) | 31 | - | 17 (54,8) | 15 (48,4) | 0 |
| Респ. Алтай | КРС | 118 | 76 (64,4) | 20 | 1 (5,0) | 0 | 19 (95,0) | 0 |
| Респ. Алтай | козы | 65 | 65(100) | 25 | 0 | 0 | 0 | 25 (100) |
| Респ. Алтай | овцы | 30 | 29 (96,7) | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 (100) |
| Иркутск | козы | 30 | 21 (70,0) | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 (100) |
| Иркутск | овцы | 1002 | 561 (56,0) | 60 | 0 | 0 | 0 | 60 (100) |
| Иркутск | КРС | 101 | 0 | - | | | | |
| Всего | КРС | 449 | 180 (40,1) | 65 | 1 (1,5) | 17 (26,2) | 48 (73,8) | 0 |
| | козы | 95 | 86 (90,5) | 35 | 0 | 0 | 0 | 35 (100) |
| | овцы | 1032 | 590 (57,2) | 68 | 0 | 0 | 0 | 68 (100) |

*- Включая случаи смешанных инфекций; % от числа генотипированных образцов. Первичный скрининг образцов из Иркутской области проведен Сунцовой О.В. (НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск).

Видовая принадлежность выявленных анаплазм была установлена посредством секвенирования фрагмента гена 16S рРНК для случайно выбранных образцов от различных видов животных. Во всех исследованных образцах от овец и коз были выявлены фрагменты ДНК *A. ovis*, различающиеся между собой единичной нуклеотидной заменой. Те же самые геноварианты *A. ovis* были обнаружены в восьми *D. nuttalli*, собранных в Иркутской области.

Результаты генотипирования анаплазм в крови крупного рогатого скота выявили три различных вида (Табл. 8). В 73,8% генотипированных образцов из всех исследованных регионов была выявлена ДНК нового генетического варианта внутриэритроцитарных анаплазм (*Anaplasma* sp. Sib122), который по гену 16S рРНК отличался от известных видов и показывал 99,5% сходства с *A. ovis* и 99,3% сходства с *A. marginale* (Рис. 16). На основании проведенного филогенетического анализа этот генетический вариант не может быть отнесен ни к одному из известных видов анаплазм. Позднее идентичная последовательность была выявлена в образцах от крупного рогатого скота и яков в Монголии, что свидетельствует о широком распространении данного варианта анаплазм в регионе. В 26,2% генотипированных образцов была обнаружена ДНК *A. marginale*, идентичная последовательности геноварианта *Anaplasma* sp. Omsk. Уровень сходства исследуемого фрагмента *Anaplasma* sp. Omsk с последовательностями других штаммов *A. marginale* не превышал 99,7%. Интересно, что *Anaplasma* sp. Omsk была обнаружена только на территории Алтайского края, и в этом регионе данный геновариант анаплазм доминировал (Табл. 8). В одном образце крови (Республика Алтай) была обнаружена ДНК *A. bovis*, идентичная последовательности анаплазм, обнаруженных в крови оленей и коз на территории Китая (KJ659040) (Liu et al., 2012).

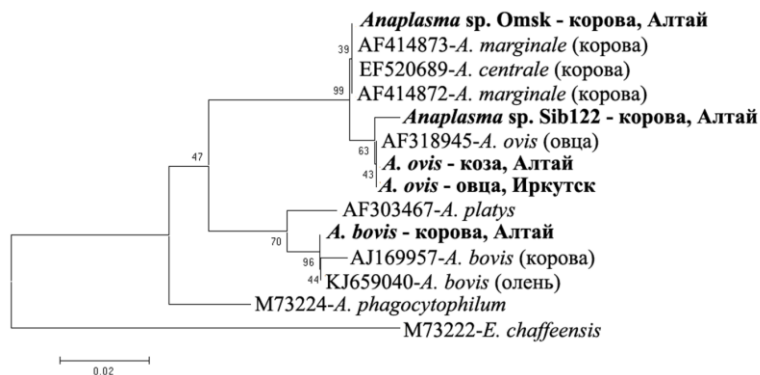


Рисунок 16. Дендрограмма, построенная методом NJ на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК *Anaplasma* spp. (558 н.п.). Жирным шрифтом выделены последовательности, полученные в данной работе. (Пар и др., 2015)

Таким образом, полученные результаты указывают на широкое распространение внутриэритроцитарные анаплазм *A. ovis* и *Anaplasma* sp. Sib122 на территории Сибири. Ни в одном из исследованных образцов не были найдены гранулоцитарные анаплазмы *A. phagocytophilum*, повсеместно выявляемые в коровах, козах и овцах на территории Европы (Stuen et al., 2006), что вероятнее всего связано с циркулирующей на территории Европы и Сибири разных генетических линий *A. phagocytophilum*.

4. Изучение генетического разнообразия боррелий

Ранее было показано, что на территории азиатской части России широко распространены три вида боррелий из комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*) и *B. miyamotoi* из группы возвратных лихорадок; в единичных случаях отмечены находки *B. valaisiana* (Фоменко и др., 2010; Kurilshikov et al., 2014; Korenberg et al., 2010; Sabitova et al., 2018). Все эти виды спирохет вызывают боррелиозы у людей. Основными (и, возможно, единственными) переносчиками *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* являются клещи рода *Ixodes*. Для установления ассоциации между малоизученными видами *Ixodes* spp. и боррелиями, на наличие *B. burgdorferi* s.l. были исследованы клещи из областей симпатрии *I.apronophorus-I.persulcatus-I.trianguliceps*. Видовую принадлежность *B. burgdorferi* s.l. определяли на основании анализа последовательностей фрагментов генов *clpA* и/или *r83/100*, как описано ранее (Sabitova et al., 2018).

4.1. Ассоциация различных геновидов боррелий с *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*

Были исследованы клещи, собранные в областях симпатрии *I.persulcatus-I.pavlovskyi* на территории НСО, Красноярского край, Республики Алтай и Приморского края (остров Русский). Уровень инфицированности клещей рода *Ixodes* спирохетами *B. burgdorferi* s.l. варьировал от 19% до 41% в разных регионах, однако ни для одного из регионов достоверных различий между инфицированностью *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и межвидовых гибридов боррелиями комплекса *B. burgdorferi* s.l. не наблюдалось (Табл. 9).

Сравнение видового спектра боррелий в разных видах клещей показало, что во всех исследованных регионах *I. persulcatus* достоверно чаще был инфицирован *B. bavariensis* и *B. afzelii* и достоверно более редко *B. garinii* ($P < 0.001$) по сравнению с *I. pavlovskyi*. Ранее аналогичная закономерность была показана для клещей, собранных на территории Томской области (Mukhacheva and Kovalev, 2014). Уровень инфицированности межвидовых гибридов спирохетами *B. bavariensis* и *B. garinii* был промежуточным по сравнению с родительскими видами клещей (Табл. 9). Поскольку разные виды *B. burgdorferi* s.l. ассоциированы с разными клиническими формами ИКБ, изменение структуры сообщества клещей рода *Ixodes* может привести к изменению доминирующих в популяции геновидов боррелий и изменению клинических форм боррелиозов, регистрируемых в том или ином районе.

Спирохеты *B. miyamotoi* были обнаружены в *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и межвидовых гибридах; уровень инфицированности *Ixodes* spp. составил 2,1% на острове Русский и 5,6%-7,7% в исследуемых областях Западной Сибири. При этом достоверных различий между зараженностью разных видов клещей и гибридов не наблюдалось. В данной работе впервые *B.*

bavariensis были обнаружены в клещах *I. pavlovskiy*, а в межвидовых гибридах *I.persulcatus-I.pavlovskiy* впервые были выявлены боррелии: *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii* и *B. miyamotoi*.

Таблица 9. Встречаемость различных видов *B. burgdorferi* s.l. в клещах *Ixodes* spp. в областях симпатрии *I.persulcatus-I.pavlovskiy*

| Регион | Вид клеща | Общее число клещей | Число (%) клещей, инфицированных <i>B. burgdorferi</i> | Число типированных клещей | Число (%) * клещей, содержащих ДНК | | |
|------------|--------------|--------------------|--|---------------------------|------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| | | | | | <i>B. afzelii</i> | <i>B. bavariensis</i> | <i>B. garinii</i> |
| Алтай | Iper | 185 | 70 (37,8) | 70 | 19 (25,7) | 50 (67,6) | 5 (6,8) |
| | Ipravl | 124 | 58 (46,8) | 58 | 3 (5,2) | 0 | 56 (96,5) |
| | Гибриды | 58 | 22(37,9) | 22 | 4 (16,0) | 10 (40,0) | 11 (44,0) |
| | Всего | 367 | 150 (40,9) | 157 | 26 (16,6) | 60 (38,2) | 71 (45,2) |
| НСО | Iper | 149 | 56 (37,6) | 56 | 20 (35,7) | 28 (50,0) | 13 (23,2) |
| | Ipravl | 453 | 187 (41,3) | 187 | 5 (2,7) | 6 (3,2) | 178 (95,2) |
| | Гибриды | 233 | 88 (37,8) | 88 | 11 (12,5) | 30 (34,1) | 53 (60,2) |
| | Всего | 835 | 331 (39,6) | 331 | 36 (10,9) | 64 (19,3) | 244 (73,7) |
| Красноярск | Iper | 192 | 33 (17,2) | 23 | 6 (26,1) | 13 (56,2) | 4 (17,4) |
| | Ipravl | 117 | 23 (19,7) | 16 | 1 (6,3) | 2 (12,5) | 13 (81,2) |
| | Гибриды | 50 | 13 (26,0) | 9 | 2 (22,2) | 5 (55,6) | 2 (22,2) |
| | Всего | 359 | 69 (19,2) | 48 | 9 (18,8) | 20 (41,7) | 19 (39,6) |
| Русский | Iper | 190 | 59 (31,1) | 50 | 14 (28,0) | 33 (66,0) | 3 (6,0) |
| | Ipravl | 199 | 55 (27,6) | 46 | 2 (4,3) | 1 (2,2) | 43 (93,5) |
| | Гибриды | 32 | 7 (21,9) | 6 | 1 (16,7) | 3 (50,0) | 2 (33,3) |
| | Всего | 421 | 121 (28,7) | 102 | 17 (16,7) | 37 (36,3) | 48 (47,1) |

4.2. Генетическая вариабельность *B. burgdorferi* s.l. в областях симпатрии клещей *I.apronophorus-I.persulcatus-I.trianguliceps*

Генетическая вариабельность *B. burgdorferi* s.l. была исследована в трех областях симпатрии клещей *I.apronophorus-I.persulcatus-I.trianguliceps* на территории Западной Сибири – двух участках в Омской области (Om-Bo и Om-Zn) и одном участке на Алтае (Alt). Из них только на участке Om-Bo наблюдалась высокая численность *I. apronophorus*. Было исследовано четыре группы образцов: 1) клещи *Ixodes* spp., снятые с грызунов и перелинявшие в лаборатории; 2) неперелинявшие клещи *Ixodes* spp., снятые с грызунов; 3) собранные на флаг *I. persulcatus*; 4) образцы мелких млекопитающих (Табл. 10).

Следует отметить, что выявление боррелий в перелинявших клещах означает, что клещи способны передавать данный вид боррелий, по крайней мере, следующей стадии развития клеща. Выявление патогена в неперелинявших клещах означает только то, что они способны их воспринять от позвоночных хозяев. В исследованных образцах была выявлена ДНК *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, а также нового геноварианта боррелий из комплекса *B. burgdorferi* s.l., который нельзя отнести ни к одному из известных видов. Встречаемость различных видов

боррелий существенно различалась в зависимости от участка и типа образца. Два вида, *B. afzelii* и *B. bavariensis*, были обнаружены в образцах от мелких млекопитающих на всех участках. В собранных на флаг *I. persulcatus* обнаружено три вида боррелий; из них доминировали *B. bavariensis*, а *B. garinii* была выявлена в единичном случае. Во всех трех видах перелинявших клещей была обнаружена ДНК *B. bavariensis*, в то время как *B. afzelii* была выявлена только в перелинявших *I. persulcatus* (Табл. 10). Идентичные геноварианты *B. bavariensis* по *clpA* и *p83/100* генам были обнаружены у *I. apronophorus*, *I. trianguliceps* и *I. persulcatus*, что свидетельствует об их возможном участии в общем энзоотическом цикле. Это первое выявление *B. bavariensis* в прошедших метаморфоз *I. apronophorus* и *I. trianguliceps*.

Таблица 10. Выявление ДНК *B. burgdorferi* s.l. в областях симпатрии *I. apronophorus* / *I. persulcatus* / *I. trianguliceps*

| Участок | Тип образца | Число образцов | Число (%) образцов, содержащих ДНК# | | | |
|---------|--------------------------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|
| | | | <i>B. afzelii</i> | <i>B. bavariensis</i> | <i>B. garinii</i> | <i>Ca. B. sibirica</i> |
| Om-Bo | Грызуны, кровь | 188 | 2 (1,1) | 1 (0,5) | 0 | 2 (1,1) |
| | Г*- <i>I. apronophorus</i> | 62 | 0 | 0 | 0 | 5 (8,1) |
| | Г*- <i>I. persulcatus</i> | 59 | 0 | 0 | 0 | 8 (13,6) |
| | Г*- <i>I. trianguliceps</i> | 24 | 0 | 0 | 0 | 2 (8,4) |
| | М**- <i>I. apronophorus</i> | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | М**- <i>I. persulcatus</i> | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | М**- <i>I. trianguliceps</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Om-Zn | Флаг***- <i>I. persulcatus</i> | 221 | 3 (1,4) | 21 (9,5) | 1 (0,5) | 0 |
| | Грызуны, кровь | 198 | 10 (5,1) | 14 (7,1) | 0 | 0 |
| | М**- <i>I. apronophorus</i> | 5 | 0 | 2 (40,0) | 0 | 1 (20,0) |
| | М**- <i>I. persulcatus</i> | 87 | 32 (36,8) | 18 (20,7) | 0 | 0 |
| Alt | М**- <i>I. trianguliceps</i> | 23 | 0 | 7 (30,4) | 0 | 0 |
| | Грызуны, селезенка | 141 | 0 | 2 (1,4) | 0 | 1 (0,7) |
| | Грызуны, уши | 141 | 2 (1,4) | 21 (14,9) | 0 | 3 (2,1) |

- включая случаи смешанных инфекций; Г*- клещи, снятые с грызунов; М**- клещи, снятые с грызунов и прошедшие метаморфоз в лабораторных условиях; Флаг***- клещи, собранные с растительности на флаг. (Sabitova et al., 2023)

Помимо изветных видов, новый геновариант боррелий, относящийся к комплексу *B. burgdorferi* s.l., был обнаружен в шести образцах от мелких млекопитающих, в одном перелинявшем *I. apronophorus* и в 15 снятых с грызунов клещей разных видов (Табл. 10). Новый геновариант боррелий был генетически охарактеризован по 5S-23S IGS (219 н.п.), *p83/100* (366 н.п.), *clpA* (579 н.п.) и 16S рРНК (1276 н.п.) генам, а два образца (из Омской области и Республики Алтай) были генетически охарактеризованы методом мультилокусного типирования (MLST), являющимся золотым стандартом в таксономии боррелий (Margos et al., 2007). Объединенные сиквенсы этих локусов были одинаковыми для обоих изолятов. Было показано, что попарное генетическое расстояние объединенных MLST

последовательностей между новым вариантом боррелий и наиболее схожими *B. bavariensis* и *B. garinii* составило 0,051, что намного выше межвидового порогового уровня для системы MLST, который был определен как 0,017 (Margos et al., 2009).

Проведенный филогенетический анализ показал, что, независимо от исследуемого генетического локуса, последовательности новых боррелий образуют монофилетические группы на соответствующих филогенетических деревьях с высоким уровнем поддержки (Рис. 17). Все это свидетельствует о том, что новый геновариант боррелий можно рассматривать как новый кандидатный вид боррелий, который мы предложили назвать “*Candidatus Borrelia sibirica*” по месту обитания данного вида.

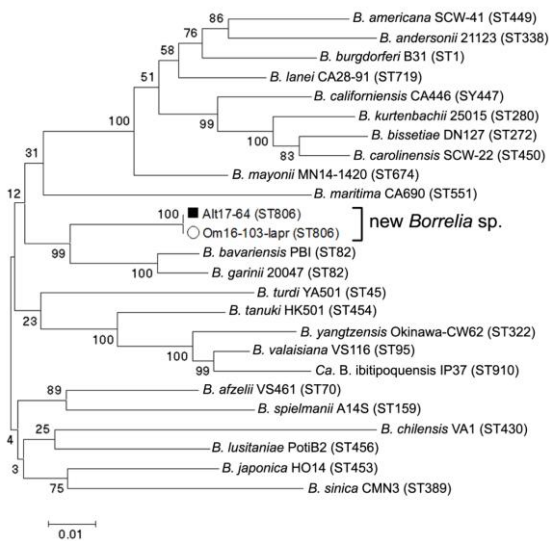


Рис. 17. Филогенетическое дерево, построенное методом ML на основе объединенных последовательностей генов домашнего хозяйства MLST (длина 4782–4788 п.н.). Последовательности из различных источников, секвенированные в данном исследовании, отмечены: ○ – *I. apronophorus*, ■ – мелкие млекопитающие. Установление филогенетической позиции “*Candidatus B. sibirica*” проведено Сабитовой Ю.В. (Sabitova et al., 2023)

Новый вид “*Candidatus B. sibirica*” был обнаружен во всех трех исследованных областях симпатрии на территории Омской области и Республики Алтай, однако высокая встречаемость “*Candidatus B. sibirica*” наблюдалась только на участке Om-Bo с высокой численностью *I. apronophorus*. На этом участке “*Candidatus B. sibirica*” была обнаружена в 17 образцах от грызунов и снятых с них клещей (Табл. 10). Следует отметить, что *B. burgdorferi* s.l. не передается трансвариально, поэтому выявление боррелий в напитавшихся личинках не свидетельствует о наличии ассоциации клеща с возбудителем. Среди нимф и имаго (которые могут получить *B. burgdorferi* s.l. не только во время кормления, но и от предшествующей стадии развития) “*Candidatus B. sibirica*” были обнаружены в *I. apronophorus* и *I. persulcatus*, что позволяет допустить, что оба этих вида могут быть переносчиками “*Candidatus B. sibirica*”. Тем не менее, на участке

От-Во "*Candidatus B. sibirica*" не был выявлен в собранных на флаг *I. persulcatus* (Табл. 10), и ранее новый вид боррелий не был обнаружен в локациях, расположенных вне ареала *I. apronophorus*. Мы предполагаем, что *I. apronophorus* является наиболее вероятным основным переносчиком "*Candidatus B. sibirica*".

Следует подчеркнуть, что "*Candidatus B. sibirica*" - единственный вид боррелий, который впервые был обнаружен на территории России. Наиболее актуальный вопрос – является ли новый вид боррелий патогенным для человека. На основании проведения MLST анализа "*Candidatus B. sibirica*" образует общий филогенетический кластер с высокопатогенными видами боррелий – *B. bavariensis* и *B. garinii* (Рис. 17); это позволяет предположить, что новый вид боррелий также может быть патогенным. В Евразии боррелии эффективно передаются методом трансгиальной передачи во время совместного кормления на мелких млекопитающих; поэтому нельзя исключить, что в областях симпатрии атакующие людей клещи *I. persulcatus* (и в некоторых местообитаниях *I. pavlovskiyi*) могут воспринять "*Candidatus B. sibirica*" от *I. apronophorus* и затем инфицировать людей.

4.2. Установление этиологических агентов боррелиозов на территории Западной Сибири

На наличие ДНК *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* были исследованы образцы от 1281 пациентов, госпитализированных в 2016-2019 гг. в инфекционную больницу №1 г. Новосибирска с признаками инфекционных заболеваний после присасывания клещей. Сбор клинических образцов описан в главе 3.7.

На основании клинических проявлений (наличие мигрирующей эритемы) и серологических данных эритемная форма ИКБ была диагностирована у 16,0% пациентов, а безэритемная форма ИКБ - у 4,6% пациентов. При этом ДНК *B. burgdorferi* s.l. была выявлена в клинических образцах только от 25 (2,0%) пациентов. Наблюдаемая низкая выявляемость возбудителя ИКБ может быть связана с коротким временем персистенции *B. burgdorferi* в крови. Было установлено, что этиологическими агентами ИКБ у исследуемых пациентов являлись *B. bavariensis* и *B. garinii*.

ДНК *B. miyamotoi* обнаружена в клинических образцах от 121 (9,5%) лихорадящих пациентов (от 7,7% до 11,2% в разные годы). В большинстве случаев ДНК *B. miyamotoi* была обнаружена только в первых образцах крови, у двоих пациентов – и в первом и во втором образце крови, и в одном случае - только во втором образце крови. Характерно, что персистенция в крови *B. miyamotoi* наблюдалась в течение двух недель у пациентов, которым не проводили антибиотикотерапию. Помимо образцов крови, у трех пациентов ДНК *B. miyamotoi* была дополнительно обнаружена в биоптатах и у двух пациентов (один из которых был ВИЧ-инфицированным) - в ликворе. У всех пациентов заболевание начиналось остро с повышения температуры тела, при этом у 85% пациентов температура превышала 38,5°C. Проведение

адекватной антибиотикотерапии во всех случаях приводило к полному выздоровлению пациентов. Следует отметить, что в отличие от случаев инфекции в Удмуртии (Сарксян и др., 2012, 2015) в НСО заболевание протекало в более легкой форме и не сопровождалось функциональными изменениями печени и почек либо рецидивирующим течением.

Генотипирование выявленных образцов *B. miyamotoi* проводили на основании анализа фрагментов генов *r66* и *glpQ*. Все определенные последовательности были идентичны между собой и соответствовали азиатскому варианту *B. miyamotoi* (Рис. 18).

Полученные результаты свидетельствуют о широком распространении боррелиоза, вызванного *B. miyamotoi*, на территории Западной Сибири и о высокой эффективности его диагностики методами, основанными на выявлении ДНК в образцах крови, в первые дни после начала заболевания. Для верификации инфекции в более поздние сроки целесообразно использовать серологические методы. Высокая встречаемость боррелиоза, вызванного *B. miyamotoi*, неспецифичность симптомов заболевания и высокая эффективность специфичной антибиотикотерапии является основанием для обязательного использования молекулярных методов выявления ДНК *B. miyamotoi* в крови пациентов, отмечающих присасывание клещей.

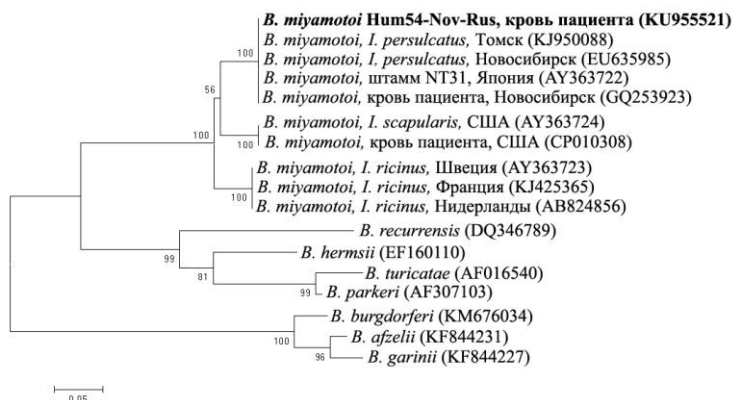


Рис.18. Дендрограмма, построенная на основе последовательностей фрагмента гена *r66* длиной 514 п.н. Жирным шрифтом выделены последовательности *B. miyamotoi* из крови пациента, полученные в данной работе.

5. Генетическое разнообразие простейших гемопаразитов *Babesia* spp. и *Theileria* spp.

Бабезии и тейлерии – простейшие внутриэритроцитарные паразиты, относящиеся к порядку *Piroplasmida* (тип *Apicomplexa*) и вызывающие инфекции у людей и широкого круга домашних и диких животных. *Piroplasmida* является гетерогенной группой организмов; на основании

филогенетического анализа в состав порядка входят три основных кластера: 1) тейлерии, 2) истинные бабезии или *Babesia sensu stricto* (s.s.) и 3) «малые» бабезии или *Babesia microti* group (Hunfeld et al., 2008). Трансовариальная передача показана только для группы *Babesia* s.s. В Евразии бабезиозы у людей вызываются в основном тремя видами пироплазм: *Bab. microti*, *Bab. divergens* и *Bab. venatorum*; в Европейской части России установлено по крайней мере два случая заболевания, вызванных *Bab. divergens*, один из которых привел к летальному исходу (Kukina et al., 2018, 2019). Среди пироплазмозов домашних животных в России наибольшую опасность представляют пироплазмозы собак и лошадей, приводящие к гибели животных. Несмотря на большую эпидемиологическую и эпизоотическую значимость пироплазм, очень мало исследований посвящено изучению *Babesia* spp. и *Theileria* spp. в России. В нашей работе впервые было изучено распространение и генетическое разнообразие бабезий в различных видах клещей, в мелких млекопитающих, домашних и сельскохозяйственных животных в азиатской части России.

5.1. Генетическое разнообразие *Babesia* spp. в иксодовых клещах

Встречаемость *Babesia* spp. в клещах была относительно низкой и не превышала 4,5% ни для одного из исследованных видов клещей (Табл. 11). На основании анализа фрагментов гена 18S РНК выявленные бабезии относились к четырем филогенетическим кластерам (Рис. 19).

Как и в случае других инфекционных агентов показана ассоциация разных видов бабезий с определенными видами клещей. Патогенные для людей виды бабезий (*Bab. microti*, *Bab. divergens* и *Bab. venatorum*) были обнаружены только в *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*; однако поскольку все генотипированные образцы *Babesia* spp. отличались от циркулирующих в Европе геновариантов бабезий, вопрос об их патогенности остается открытым. Так, выявленный в клещах геновариант *Bab. microti* по исследованному фрагменту гена 18S РНК был идентичен геноварианту, ранее обнаруженному в мелких млекопитающих в России (Zamoto et al., 2004; Nefedova et al., 2012), но отличался одной заменой от европейских штаммов *Bab. microti* (Gray et al., 2010). Аналогично, выявленный в *I. persulcatus* геновариант *Bab. venatorum* соответствовал варианту, обнаруженному в *I. persulcatus* в Китае, но отличался единичными заменами от европейских изолятов *Bab. venatorum* (Herwaldt et al., 2003). Еще для одного геноварианта, *Bab. divergens*-like, отличия от европейских штаммов были более существенными; по исследованному фрагменту образцы *Bab. divergens*-like отличались шестью заменами как от патогенных для людей европейских штаммов *Bab. divergens*, так и от непатогенных штаммов *Bab. capreoli* (Gray et al., 2010; Malandrin et al., 2010). Интересно, что обнаруженный нами *Bab. divergens*-like геновариант образует общий кластер с азиатской линией *Bab. divergens*, выявленной в оленях и *I. persulcatus* в Японии (Zamoto-Niikura et al., 2018).

Таблица 11. Выявление ДНК *Babesia* spp. в различных видах иксодовых клещей

| Регион | Вид клеща | Общее число клещей | Число (%) клещей, содержащих ДНК | | | | | | |
|---------|---------------|--------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------|---------------------|
| | | | <i>Bab. microti</i> | <i>Bab. venatorum</i> | <i>Bab. divergens</i> | <i>Babesia</i> группа жвачных | <i>Babesia</i> группа хищных | <i>Bab. canis</i> | <i>Bab. caballi</i> |
| ДВ | Iper | 770 | 5 | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Hc | 470 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | Hj | 543 | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 0 | 0 |
| | Ds | 251 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Иркутск | Iper | 355 | 4 | 3 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | Hc | 103 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| | Dn | 43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| НСО | <i>Ixodes</i> | 789 | 10 | 12 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Iper | 149 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Ipravl | 453 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Гибриды | 233 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Dr | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| Алтай | Iper | 185 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Ipravl | 124 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Гибриды | 58 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Ds | 199 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| | Dn | 236 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Омск | Iper | 394 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| всего | <i>Ixodes</i> | 3560 | 31 (0,9) | 23 (0,6) | 9 (0,3) | 4 (0,1) | 0 | 0 | 0 |
| | Hc | 573 | 0 | 0 | 0 | 17 (3,0) | 0 | 0 | 0 |
| | Hj | 543 | 0 | 0 | 0 | 8 (1,5) | 4 (0,7) | 0 | 0 |
| | Ds | 450 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 (2,0) |
| | Dn | 279 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (0,7) |
| | Dr | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 (4,2) | 0 |

Сокращения: ДВ – Дальний Восток (Хабаровский край и Амурская область); Алтай – Республика Алтай; Iper - *I. persulcatus*; Ipravl - *I. pavlovskiy*; *Ixodes* - *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy* и гибриды; Hc - *H. concinna*; Hj - *H. japonica*; Ds – *D. silvarum*; Dn – *D. nuttalli*; Dr – *D. reticulatus*.

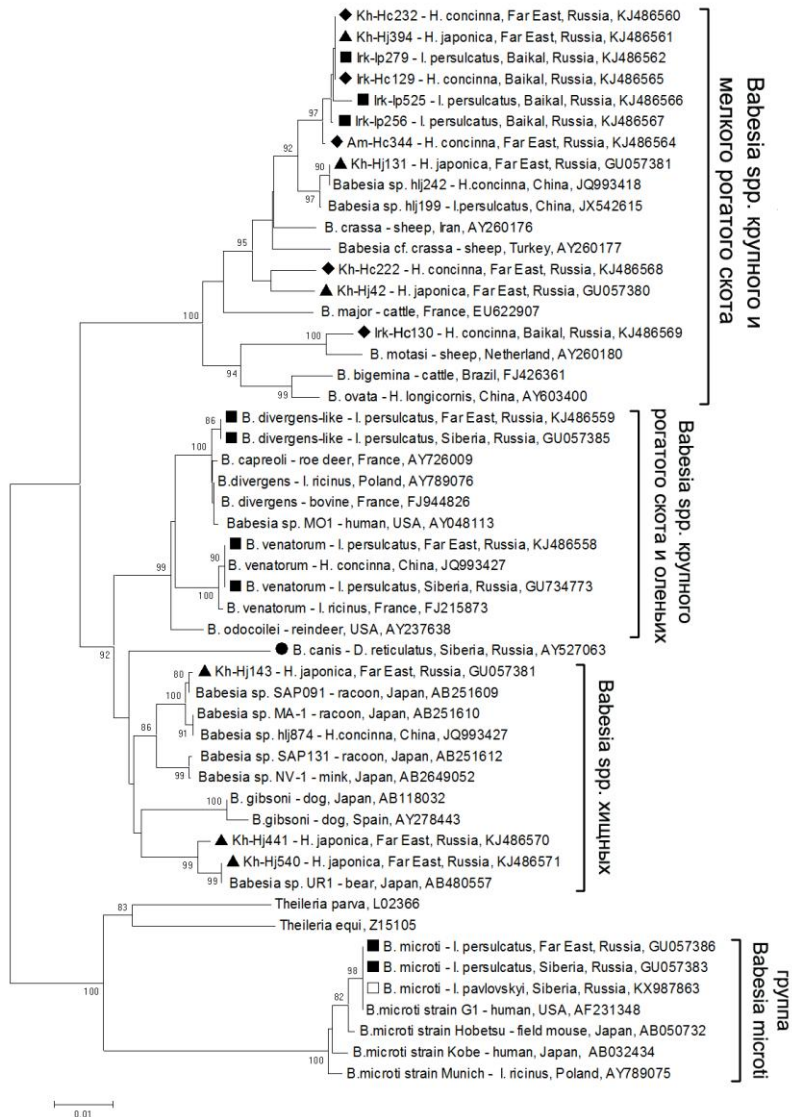


Рис. 19. Дендрограмма, построенная методом NJ на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 18S рРНК *Babesia* spp. (1201 н.п.). Последовательности из различных источников, секвенированные в данном исследовании, отмечены: ■ - *I. persulcatus*; ◆ - *H. concinna*; ▲ - *H. japonica*; ● - *D. reticulatus*. (Rar et al., 2014, Infect Genet Evol.)

Как и следовало ожидать, патогенные для собак пироплазмы *Bab. canis* были обнаружены в *D. reticulatus*, единственном специфичном переносчике для данного вида бабезий (Bajer and Dwuznik-Szarek, 2021); возбудитель пироплазмоза лошадей, *Bab. caballi*, был выявлен в *D. nuttalli* и *D. silvarum* на территории Республики Алтай (Табл. 11).

Помимо известных видов бабезий, в клещах *I. persulcatus* из Иркутской области и *Haemaphysalis* spp. из Иркутской области и Дальнего Востока было обнаружено 12 геновариантов бабезий, которых нельзя отнести ни к одному из известных видов. В клещах *H. japonica* было выявлено три геноварианта, относящихся к кластеру *Babesia* spp. хищных; эти геноварианты были наиболее схожи с пироплазмами енотов и медведей. Остальные девять геновариантов бабезий из разных видов клещей относились к разветвленному кластеру бабезий крупного и мелкого рогатого скота (Рис. 19). Бабезии из этого кластера были позже обнаружены в *H. concinna* из географически отдаленных регионов Европы и Китая (Bajer and Dwuznik-Szarek, 2021).

5.2. Генетические группы *Babesia microti*, выявленные в мелких млекопитающих

Bab. microti представляет собой генетически разнообразную группу простейших паразитов, чей жизненный цикл связан с разными видами мелких млекопитающих и клещей *Ixodes* spp. Поскольку *Bab. microti* не переносится трансовариально, для поддержания жизненного цикла этого патогена необходимы резервуарные хозяева. *Bab. microti* состоит из четырех отдельных генетических групп, две из которых ('Kobe'-type и 'Hobetsu'-type) были обнаружены только в Японии (Nakajima et al. 2009). Группа *Bab. microti* 'US'-type широко распространена в Евразии и США; пироплазмы из этой группы выявлены в пациентах, мышевидных грызунов и клещах *I. scapularis*, *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Бабезии из группы *Bab. microti* 'Munich'-type также были обнаружены в мышевидных грызунах в некоторых европейских странах (Zamoto-Niikura et al. 2012), однако достоверные данные об их переносчиках отсутствуют.

Для установления ассоциации между разными видами клещей и геновариантами *Bab. microti* на наличие патогена были исследованы образцы крови от 1706 мелких млекопитающих, отловленных в областях симпатрии *I. trianguliceps-I. persulcatus* (Омская, Свердловская области) и вне ареала *I. trianguliceps* (Новосибирская, Иркутская области, Хабаровский край). Обе генетические линии *Bab. microti* были обнаружены в грызунах в области симпатрии *I. trianguliceps-I. persulcatus*, при этом генетическая линия *Bab. microti* 'Munich'-type существенно доминировала. Напротив, только *Bab. microti* 'US'-type были идентифицированы в грызунах, отловленных вне ареала *I. trianguliceps* (Табл. 12). Интересно, что уровень инфицирования

грызунов *Bab. microti* 'Munich'-type (30,1%-36,2%) был существенно выше по сравнению с *Bab. microti* 'US'-type (<8,2%). Таким образом, *I. trianguliceps* является наиболее вероятным переносчиком для *Bab. microti* 'Munich'-type.

Таблица 12. Сравнение встречаемости *Bab. microti* в мелких млекопитающих, отловленных в различных регионах России

| Регион | Общее число образцов | Число (%) образцов, содержащих ДНК | | |
|-----------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| | | <i>Bab. microti</i> , всего | <i>Bab. microti</i> 'Munich'- type | <i>Bab. microti</i> 'US'- type |
| Омская область* | 651 | 212 (32,6) | 196 (30,1) | 16 (2,5) |
| Свердловская область* | 196 | 71(36,2) | 71 (36,2) | 0 |
| Новосибирская область | 330 | 19 (5,7) | 0 | 15 (5,3) |
| Иркутская область | 66 | 5 (7,6) | 0 | 5 (7,6) |
| Хабаровский край | 463 | 38 (8,2) | 0 | 38 (8,2) |

*- область симпатрии *I. persulcatus*/*I. trianguliceps*

5.3. Генетическое разнообразие *Babesia* spp. и *Theileria* spp. в домашних и сельскохозяйственных животных

Пироплазмоз является одной из наиболее распространенных инфекций собак в Западной Сибири. В период активности клещей около 30% обращений к ветеринарам связано с инвазией бабезиозом. Несмотря на то, что случаи бабезиоза собак в России давно известны, и эта инфекция широко распространена в Европейской части России и в Западной Сибири (Шайкин и Никитина, 2002), молекулярно-генетических работ по изучению этиологического агента бабезиоза собак в России не проводилось.

На наличие бабезий были исследованы образцы крови от 35 собак из Новосибирской области с диагнозом бабезиоз, поставленном на основании клинических признаков и микроскопического исследования мазков периферической крови (Рис. 20). Во всех исследованных образцах были выявлены последовательности *Bab. canis*, различающиеся между собой по двум полиморфным позициям. Полученные последовательности были идентичны или отличались одной заменой от последовательностей *Bab. canis*, обнаруженных в клещах *D. reticulatus* на территории того же региона. Таким образом, *Bab. canis* является основным (если не единственным) этиологическим агентом бабезиоза собак в Западной Сибири.

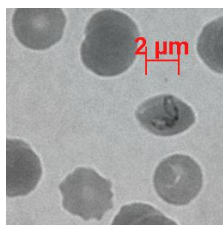


Рис. 20. Мазок периферической крови собаки, инфицированной *Bab. canis*. Микрофотография выполнена Боляхиной С.А. (ИЭВСиДВ СО РАСХН, НСО, Краснообск)

Пироплазмоз лошадей – природно-очаговая инфекция, вызываемая *Bab. caballi*, *T. equi* и *T. haneui*, и наносящая тяжелый ущерб коневодству во всем мире. Животные, выздоровевшие после пироплазмоза, остаются в течение длительного времени резервуарами инфекции и могут передавать патогены клещам-переносчикам. Случаи пироплазмоза лошадей периодически отмечают в различных регионах Сибири, однако возбудители пироплазмозов лошадей в России не были генетически охарактеризованы.

На наличие пироплазм были исследованы образцы крови от 730 лошадей из хозяйств, расположенных в Новосибирской и Иркутской областях и Республике Алтай. Уровень инфицирования лошадей пироплазмами был высоким и составил 59,4-67,5%, при этом в отдельных хозяйствах доля инфицированных лошадей варьировала от 0 до 100%. Во всех регионах было обнаружено два возбудителя – *Bab. caballi* и *T. equi*. Из них *T. equi* достоверно выявлялись более часто и были распространены повсеместно; *Bab. caballi* были обнаружены лишь в отдельных хозяйствах и чаще в виде микст инфекции (Табл. 13).

Таблица 13. Выявление ДНК Piroplasmida в образцах крови лошадей

| Регион | Общее число образцов | Число (%) образцов, содержащих ДНК | | | |
|--------------|----------------------|------------------------------------|-------------------|---------------------|--------------------------------------|
| | | Все Piroplasmida | <i>T. equi</i> | <i>Bab. caballi</i> | <i>T. equi</i> + <i>Bab. caballi</i> |
| НСО | 20 | 12 (60,0) | 11 (55,0) | 1 (5,0) | 0 |
| Иркутск | 424 | 286 (67,5) | 264 (62,3) | 5 (1,2) | 17 (4,0) |
| Алтай | 286 | 170 (59,4) | 139 (48,6) | 9 (3,1) | 22 (7,7) |
| Всего | 730 | 468 (64,1) | 414 (56,7) | 15 (2,0) | 39 (5,3) |

Для изучения генетического разнообразия выявленных пироплазм 281 образец *T. equi* и 52 образцов *Bab. caballi* были секвенированы. В настоящее время на основании изучения гена 18S рРНК идентифицировано пять генотипов *T. equi* (А-Е) и два генотипа *Bab. caballi* (А-В) (Tirosch-Levy et al., 2020) (Рис. 21). Большинство генотипированных образцов *T. equi* (249 из 281) относились к одному широко распространенному сиквенс-варианту генотипа Е. Из 32 образцов *T. equi*, относящихся к генотипу А, большинство также было идентично между собой и только два образца отличались единичными заменами.

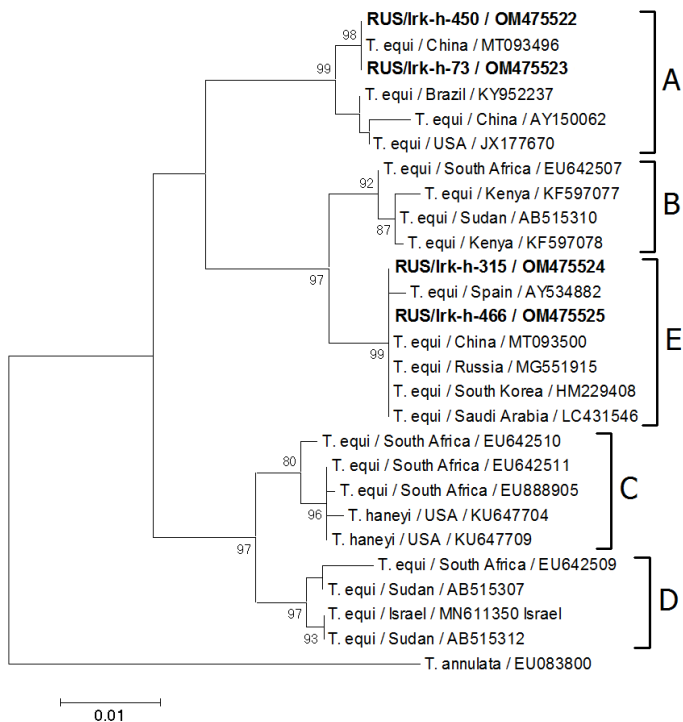


Рис. 21. Дендрограмма, построенная методом NJ на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 18S рРНК *T. equi*. (1190 н.п). Последовательности, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом. (Сунцова и др., 2022)

Выявленные образцы *Bab. caballi* отличались более высокой генетической вариабельностью. Из пяти определенных сиквенс-вариантов *Bab. caballi* три относились к генотипу А, и только один из них соответствовал известной последовательности. Два остальных сиквенс-варианта существенно отличались от известных последовательностей и образовывали отдельный кластер на филогенетическом дереве (Рис. 22). Только новый генотип *Bab. caballi* был обнаружен на территории Иркутской области, и этот же генотип доминировал на территории Республики Алтай. В клещах *D. nuttalli* и *D. silvarum* были обнаружены те же варианты *Bab. caballi*, что в образцах от лошадей (Рис. 22).

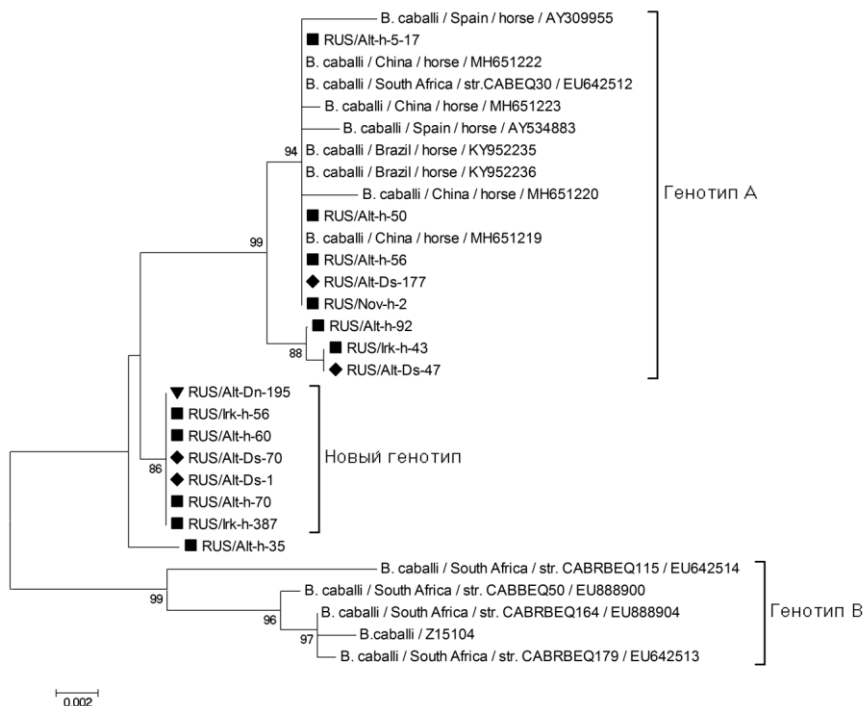


Рис. 22. Дендрограмма, построенная методом NJ на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 18S рРНК *Bab. caballi* (1144 н.п). Последовательности из различных источников, секвенированные в данном исследовании, отмечены: ■ – лошади; ◆ - *D. silvarum*; ▼- *D. nuttalli*

Полученные данные о широком распространении очагов пироплазмоза лошадей на территории Сибири свидетельствуют о высоком риске инфицирования лошадей, особенно при их перемещении из неэндемичных в эндемичные зоны и, следовательно, о необходимости неукоснительного проведения противопаразитарных мероприятий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе было проведено комплексное исследование природных очагов инфекций, сформированных с участием клещей разных видов и родов. На наличие широкого круга бактериальных и протозойных инфекционных агентов были исследованы различные компоненты природных очагов, а именно, все виды клещей-переносчиков, обитающие на данной территории, предполагаемые резервуарные хозяева исследуемых агентов (прежде всего, мелкие млекопитающие) и, для нескольких природных очагов, клинические образцы пациентов. Всего в работу были включены образцы от более 6300 клещей, относящихся к десяти видам, клинические образцы от 1281 пациента, а также образцы от более 4500 различных видов млекопитающих.

Проведенное комплексное исследование показало, что на территории азиатской части России встречается значительно большее число переносимых иксодовыми клещами возбудителей, чем считалось ранее. При этом наибольшее видовое разнообразие инфекционных агентов наблюдалось в природных очагах, сформированных с участием клещей всех трех родов. Всего из 30 выявленных видов возбудителей, три вида были обнаружены впервые и полностью соответствовали критериям для новых видов, два вида впервые были выявлены в России, а девять видов – впервые в азиатской части России.

В случае совместного обитания разных видов иксодовых клещей в одном природном очаге, новые инфекционные агенты могут быть переданы от клещей, не представляющих опасности для людей, атакующим людей клещам *I. persulcatus* в результате их участия в общих энзоотических циклах. Именно поэтому необходимые дальнейшие исследования будут включать природные очаги, включающие ранее не изученные виды иксодовых клещей, а также более широкий круг позвоночных хозяев.

На наличие клещевых инфекций были исследованы клинические образцы от пациентов, госпитализированные с подозрением на клещевые инфекции с различной симптоматикой, в том числе нетипичной для исследуемых возбудителей. Была доказана высокая встречаемость боррелиоза *B. miyamotoi* у пациентов в Западной Сибири и было установлено, что клещевые риккетсиозы могут быть вызваны более широким кругом инфекционных агентов, чем считалось до настоящего времени. Полученные результаты указывают на необходимость широкого использования молекулярно-генетических методов для дифференциальной диагностики клещевых инфекций у пациентов и последующего назначения адекватной антибиотикотерапии.

Интересно, что два вида риккетсий, впервые обнаруженные у пациентов в НСО, ранее в данном регионе не выявлялись. Это можно объяснить тем, что круг циркулирующих в природе переносимых клещами патогенов является более широким, чем считается в настоящее время.

ВЫВОДЫ

Разработан комплекс молекулярно-генетических методик, позволяющих определять видовую принадлежность клещей рода *Ixodes* и переносимых иксодовыми клещами инфекционных агентов, а также изучать их генетическую вариабельность. На основании анализа более 6300 клещей родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis*, клинических образцов от 1281 пациента и образцов от более 4500 млекопитающих различных видов проведено комплексное исследование широкого круга ассоциированных с клещами бактериальных и протозойных инфекционных агентов, циркулирующих в азиатской части Российской Федерации.

1. Показано, что в Сибири и на Дальнем Востоке встречаются 30 переносимых иксодовыми клещами известных и новых видов, относящихся к родам *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neoehrlichia*, *Borrelia*, *Babesia* и *Theileria*, а также ряд геновариантов, которых нельзя отнести к известным видам. Среди известных видов *Rickettsia canadensis* и “*Candidatus Rickettsia mendelii*” впервые обнаружены в России, а *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia slovaca*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma marginale*, *Babesia divergens*, *Babesia venatorum*, *Babesia canis*, *Babesia caballi* и *Theileria equi* впервые идентифицированы в азиатской части России.

2. На территории азиатской части России выявлено и охарактеризовано три новых вида: “*Candidatus Borrelia sibirica*”, “*Candidatus Rickettsia uralica*” и “*Candidatus Ehrlichia khabarensis*”:

- “*Candidatus B. sibirica*”, генетически наиболее схожий с высокопатогенными *Borrelia bavariensis* и *Borrelia garinii*, обитает в Западной Сибири во всех исследованных областях симпатрии *I.apronophorus-I.persulcatus-I.trianguliceps*;

- “*Candidatus R. uralica*” относится к группе клещевой пятнистой лихорадки и выявлен в Западной Сибири преимущественно в *I. trianguliceps*;

- “*Candidatus E. khabarensis*” обнаружен только в грызунах в окрестностях г. Хабаровска.

3. Показано существование в Западной Сибири и на Дальнем Востоке устойчивых природных очагов, сформированных с участием *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi* и их фертильных межвидовых гибридов. В обоих родительских видах и в гибридных особях обнаружены одни и те же виды инфекционных агентов, однако клещи *I. persulcatus* достоверно чаще по сравнению с *I. pavlovskyi* инфицированы “*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*”, *Ehrlichia muris*, *Borrelia afzelii* и *B. bavariensis*, и достоверно реже - *B. garinii*. Инфицированность межвидовых гибридов этими патогенами промежуточная по сравнению с родительскими видами.

4. Впервые генетически охарактеризован вид *I. apronophorus*, что

доказало его принадлежность к комплексу *I. persulcatus*-*I. ricinus* внутри подрода *Ixodes* рода *Ixodes*.

5. Впервые на наличие инфекционных агентов были исследованы клещи и мелкие млекопитающие из природных очагов, находящихся в областях симпатрии клещей *I. apronophorus*-*I. persulcatus*-*I. trianguliceps*. В *I. apronophorus* впервые выявлены *R. helvetica*, *B. bavariensis* и “*Candidatus B. sibirica*”, а в *I. trianguliceps* обнаружены *B. bavariensis* и, впервые, *A. phagocytophilum* и риккетсии (*R. helvetica*, “*Candidatus R. tarasevichiae*” и “*Candidatus R. uralica*”). Обнаружение новых видов “*Candidatus R. uralica*” и “*Candidatus B. sibirica*” в *I. persulcatus* свидетельствует о потенциальном риске инфицирования ими людей.

6. Показана ассоциация между разными видами/родами клещей и разными видами риккетсий. “*Candidatus R. tarasevichiae*” наиболее часто выявлялись в *I. persulcatus*, *R. raoultii* и *R. sibirica* – в клещах рода *Dermacentor*, а *Rickettsia heilongjiangensis*, “*Candidatus R. rara*” и “*Candidatus R. principis*” - в *Haemaphysalis* spp. В отличие от других регионов, на острове Сахалин в *I. persulcatus* существенно преобладали *R. helvetica*.

7. Наиболее высокое видовое разнообразие риккетсий наблюдалось на Дальнем Востоке, где были обнаружены уникальные для азиатской части России риккетсии: *R. canadensis*, *R. aeschlimannii*, “*Candidatus R. mendelii*”, “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*”. Доказано, что “*Candidatus R. mendelii*” формирует отдельную базальную группу риккетсий.

8. Возбудитель сибирского клещевого тифа *R. sibirica* обнаружен в клещах-переносчиках только на территории Республики Алтай, которая является наиболее напряженным природным очагом данного клещевого риккетсиоза; возбудитель дальневосточного клещевого риккетсиоза *R. heilongjiangensis* в основном выявлялся в клещах в природном очаге дальневосточного клещевого риккетсиоза в Хабаровском крае.

9. На территории Западной Сибири показано широкое распространение боррелиозов, вызванных *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*, и риккетсиозов, вызванных *R. sibirica* и *R. raoultii*, и установлены различия в их клинических проявлениях. Впервые в Российской Федерации в клинических образцах обнаружены *R. raoultii*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. aeschlimannii* и *R. slovacica*. Выявление ДНК клещевых патогенов у пациентов без специфичной симптоматики свидетельствует о необходимости широкого использования молекулярно-генетических методов для детекции боррелий и риккетсий.

10. Среди бактерий семейства Anaplasmataceae гранулоцитарные анаплазмы *A. phagocytophilum* являются наиболее генетически варибельным видом. На территории азиатской части России циркулируют три генетические линии *A. phagocytophilum*; одна из линий ассоциирована с *I.*

trianguliceps, а две другие – с *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*. Все три генетические линии могут сосуществовать на одном участке и участвовать в частично взаимосвязанных энзоотических циклах.

11. На основе биоинформатического анализа метаданных об известных последовательностях *A. phagocytophilum* установлена низкая вероятность обнаружения в азиатской части России патогенных штаммов *A. phagocytophilum*, способных вызывать гранулоцитарный анаплазмоз человека.

12. Показано широкое распространение анаплазмозов крупного и мелкого рогатого скота в Сибири. Установлено, что единственным этиологическим агентом анаплазмоза у коз и овец является *A. ovis*, в то время как анаплазмоз КРС может быть вызван двумя видами внутриэритроцитарных анаплазм - *A. marginale* isolate sp. Omsk и *Anaplasma* sp. Sib122, и в единичных случаях моноцитарными анаплазмами *A. bovis*.

13. Впервые на наличие пироплазм были исследованы клещи, обитающие в азиатской части России. Потенциально патогенные для людей *Babesia microti* (US-type), *Babesia divergens* и *Babesia venatorum* выявлены в *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*; возбудитель пироплазмоза собак *Babesia canis* - в *Dermacentor reticulatus*, а возбудитель пироплазмоза лошадей *Babesia caballi* - в *Dermacentor nuttalli* и *Dermacentor silvarum*. Кроме того, в клещах *Haemaphysalis* spp. и *I. persulcatus* обнаружено 12 новых геновариантов бабезий, генетически схожих с пироплазмами хищных и пироплазмами жвачных. Доказано, что основным этиологическим агентом пироплазмоза собак в Сибири является *Bab. canis*, а пироплазмоз лошадей может быть вызван *T. equi* и *Bab. caballi*.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. **Rar V.A.**, Maksimova T.G., Zakharenko L.P., Bolykhina S.A., Dobrotvorsky A.K., Morozova O.V. *Babesia* DNA detection in canine blood and *Dermacentor reticulatus* ticks in southwestern Siberia, Russia // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2005. – V. 5(3). – P. 285-287. doi: 10.1089/vbz.2005.5.285.

2. **Rar V.A.**, Epikhina T.I., Livanova N.N., Panov V.V. Genetic diversity of *Babesia* in *Ixodes persulcatus* and small mammals from North Ural and West Siberia, Russia // Parasitology. – 2011. – V. 138(2). – P. 175-182. doi: 10.1017/S0031182010001162.

3. **Рар В.А.**, Епихина Т.И., Ливанова Н.Н., Панов В.В., Пуховская Н.М., Высочина Н.П., Иванов Л.И. Выявление ДНК бабезий у мелких млекопитающих и иксодовых клещей в трех различных природных очагах Северного Урала, Западной Сибири и Дальнего Востока // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2010. – №3. – С. 26-30.

4. **Rar V.**, Golovljova I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus* Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review // Infect Genet Evol. 2011. – V. 11(8). – P. 1842-1861. doi: 10.1016/j.meegid.2011.09.019.

5. **Рар В.А.**, Епихина Т.И., Пуховская Н.М., Высочина Н.П., Иванов Л.И. Генетическое разнообразие бактерий из семейства Anaplasmataceae, обнаруженных в клещах рода *Haemaphysalis* и *Dermacentor* на территории Дальнего Востока // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2013. – No. 2. – С. 16–22.

6. **Rar V.A.**, Epikhina T.I., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Bondarenko E.I., Ivanov M.K., Tikunova N.V. Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in ticks and voles from *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia // Ticks Tick Borne Dis. – 2014. – V. 5(6). – P. 854-863. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.008.

7. **Rar V.A.**, Epikhina T.I., Suntsova O.V., Kozlova I.V., Lisak O.V., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I., Tikunova N.V. Genetic variability of *Babesia* parasites in *Haemaphysalis* spp. and *Ixodes persulcatus* ticks in the Baikal region and Far East of Russia // Infect Genet Evol. – 2014. – P. 28. – P. 270-275. doi: 10.1016/j.meegid.2014.10.010.

8. **Rar V.A.**, Pukhovskaya N.M., Ryabchikova E.I., Vysochina N.P., Bakhmetyeva S.V., Zdanovskaia N.I., Ivanov L.I., Tikunova N.V. Molecular-genetic and ultrastructural characteristics of '*Candidatus* Ehrlichia khabarensis', a new member of the *Ehrlichia* genus // Ticks Tick Borne Dis. – 2015. – V. 6(5). – P. 658-667. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.05.012.

9. Igolkina Y.P., **Rar V.A.**, Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Tikunov A.Y., Epikhina T.I., Tikunova N.V. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia,

Russia: Identification of a new *Candidatus Rickettsia* species // Infect Genet Evol. – 2015. – V. 34. – P. 88-93. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.015.

10. **Рар В.А.**, Епихина Т.И., Ефремова Е.А., Марченко В.А., Сунцова О.В., Лисак О.В., Дорошенко Е.К., Зубарева И.М., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В. Молекулярно-генетический анализ возбудителей анаплазмозов сельскохозяйственных животных на территории Западной и Восточной Сибири // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. – 2015. – Т. 105. – № 5. – С. 83-87.

11. **Rar V.**, Yakimenko V., Makenov M., Tikunov A., Epikhina T., Tancev A., Bobrova O., Tikunova N. High prevalence of *Babesia microti* 'Munich' type in small mammals from an *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric area in the Omsk region, Russia // Parasitol Res. –2016. –V. 115(9). – P. 3619-3629. doi: 10.1007/s00436-016-5128-9.

12. Igolkina Y., Bondarenko E., **Rar V.**, Epikhina T., Vysochina N., Pukhovskaya N., Tikunov A., Ivanov L., Golovljova I., Ivanov M., Tikunova N. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus* ticks from continental and island areas of the Russian Far East // Ticks Tick Borne Dis. –2016. – V. 7(6). – P. 1284-1289. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.06.005

13. Värvi K., Ivanova A., Geller J., Remm J., Jaik K., Tikunova N., **Rar V.**, Lundkvist Å., Golovljova I. Identification of *I. ricinus*, *I. persulcatus* and *I. trianguliceps* species by multiplex PCR // Ticks Tick Borne Dis. – 2017. – V. 8(2). – P. 235-240. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.11.004.

14. **Rar V.**, Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Y., Igolkina Y., Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I., Tikunova N. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia // Parasit Vectors. –2017. – V. 10(1). – P. 258. doi: 10.1186/s13071-017-2186-5.

15. Igolkina Y., Krasnova E., **Rar V.**, Savelieva M., Epikhina T., Tikunov A., Khokhlova N., Provorova V., Tikunova N. Detection of causative agents of tick-borne rickettsioses in Western Siberia, Russia: identification of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia sibirica* DNA in clinical samples // Clin Microbiol Infect. – 2018. – V. 24(2). – P. 199.e9-199.e12. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.003.

16. Igolkina Y., **Rar V.**, Vysochina N., Ivanov L., Tikunov A., Pukhovskaya N., Epikhina T., Golovljova I., Tikunova N. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Dermacentor* and *Haemaphysalis* ticks from the Russian Far East // Ticks Tick Borne Dis. – 2018. – V. 9(6). – P. 1594-1603. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.07.015.

17. Савельева М.В., Краснова Е.И., Хохлова Н.И., Филимонова Е.С., Проворова В.В., **Рар В.А.**, Тикунова Н.В. Клинико-лабораторная характеристика заболеваний, вызванных боррелиями, у жителей Новосибирской области в 2015–2017 гг. // Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10. – № 2. – С. 68-75. doi: 10.22625/2072-6732-2018-10-2-68-75.

18. **Pap B.A.**, Марченко В.А., Ефремова Е.А., Сунцова О.В., Лисак О.В., Тикунов А.Ю., Мельцов И.В., Тикунова Н.В. Идентификация и генетическая характеристика этиологического агента пироплазмидоза лошадей на территории Западной и Восточной Сибири // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22. – № 2. – P. 224-229. doi: 10.18699/VJ18.351.

19. **Rar V.**, Livanova N., Sabitova Y., Igolkina Y., Tkachev S., Tikunov A., Babkin I., Golovljova I., Panov V., Tikunova N. *Ixodes persulcatus/pavlovskyi* natural hybrids in Siberia: Occurrence in sympatric areas and infection by a wide range of tick-transmitted agents // Ticks Tick Borne Dis. – 2019. – V. 10(6). – P. 101254. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.05.020.

20. Rudakov N., Samoylenko I., Shtrek S., Igolkina Y., **Rar V.**, Zhirakovskaia E., Tkachev S., Kostyrykina T., Blokhina I., Lentz P., Tikunova N. A fatal case of tick-borne rickettsiosis caused by mixed *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica* and "*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*" infection in Russia // Ticks Tick Borne Dis. – 2019. – V. 10(6). – P. 101278. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101278.

21. **Rar V.**, Yakimenko V., Tikunov A., Vinarskaya N., Tancev A., Babkin I., Epikhina T., Tikunova N. Genetic and morphological characterization of *Ixodes apronophorus* from Western Siberia, Russia // Ticks Tick Borne Dis. – 2020. – V. 11(1). – P. 101284. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101284.

22. **Rar V.**, Yakimenko V., Tikunov A., Tancev A., Epikhina T., Tikunova N. Long-term persistence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia muris* in wild rodents // Ticks Tick Borne Dis. 2020. – V. 11(4). – P. 101440. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101440.

23. **Rar V.**, Yakimenko V., Tikunov A., Makenov M., Epikhina T., Tancev A., Tikunova N. Genetic variability of Anaplasmataceae circulating in small mammals and ticks in an *Ixodes persulcatus/Ixodes trianguliceps* sympatric area in Russian Siberia // Ticks Tick Borne Dis. – 2020. – V. 11(5). – P. 101499. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101499.

24. **Rar V.**, Tkachev S., Tikunova N. Genetic diversity of *Anaplasma* bacteria: Twenty years later // Infect Genet Evol. – 2021. – V. 91. – P. 104833. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104833.

25. Никитин А.Я., Сабитова Ю.В., **Pap B.A.**, Морозов И.М., Гордейко Н.С., Алленов А.В., Каверина Г.Б., Бабкин И.В., Тикунова Н.В., Андаев Е.И. Роль *Ixodes pavlovskyi* (Acari, Ixodidae) в боррелиозном эпизоотическом процессе на острове Русском // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 1. – С. 116-121. doi: 10.21055/0370-1069-2021-1-116-121.

26. Сунцова О.В., **Pap B.A.**, Лисак О.В., Мельцов И.В., Дорошенко Е.К., Савинова Ю.С., Тикунов А.Ю., Козлова И.В. Эпизоотическая ситуация по анаплазмозу мелких жвачных животных на территории Иркутской области // Acta Biomedica Scientifica. – 2021. – Т. 6. – № 1. – С. 60-68.

doi: 10.29413/ABS.2021-6.1.9.

27. Igolkina Y., **Rar V.**, Yakimenko V., Tikunov A., Tikunova N. "*Candidatus Rickettsia uralica*" and "*Candidatus Rickettsia thierseensis*" are genetic variants of one species // Ticks Tick Borne Dis. – 2022. – V. 13(3). – P. 101933. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.101933.

28. Igolkina Y., **Rar V.**, Krasnova E., Filimonova E., Tikunov A., Epikhina T., Tikunova N. Occurrence and clinical manifestations of tick-borne rickettsioses in Western Siberia: First Russian cases of *Rickettsia aeschlimannii* and *Rickettsia slovaca* infections // Ticks Tick Borne Dis. – 2022. – V. 13(3). – P.101927. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.101927.

29. Сунцова О.В., Лисак О.В., Дорощенко Е.К., Савинова Ю.С., Козлова И.В., **Рар В.А.**, Тикунов А.Ю., Мельцов И.В. Пироплазмоз лошадей Иркутской области: этиология, инвазированность, распространение // Ветеринария. – 2022. – № 6. – С. 31-40.

30. Igolkina Y., Nikitin A., Verzhutskaya Y., Gordeyko N., Tikunov A., Epikhina T., Tikunova N., **Rar V.** Multilocus genetic analysis indicates taxonomic status of "*Candidatus Rickettsia mendelii*" as a separate basal group. // Ticks Tick Borne Dis. – 2023. – V. 14(2). – P. 102104. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.102104.

31. Igolkina Y., Yakimenko V., Tikunov A., Epikhina T., Tancev A., Tikunova N., **Rar V.** Novel genetic lineages of *Rickettsia helvetica* associated with *Ixodes apronophorus* and *Ixodes trianguliceps* ticks // Microorganisms. – 2023. – V. 11. – № 5. – 1215. doi: 10.3390/microorganisms11051215

32. Sabitova Y., **Rar V.**, Tikunov A., Yakimenko V., Korrallo-Vinarskaya N., Livanova N., Tikunova N. Detection and genetic characterization of a putative novel *Borrelia* genospecies in *Ixodes apronophorus* / *Ixodes persulcatus* / *Ixodes trianguliceps* sympatric areas in Western Siberia // Ticks Tick Borne Dis. – 2023 – V. 4 (№ 1). – P. 102075. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.102075.

33. Якубовский В.И., Иголкина Я.П., Тикунов А.Ю., Панов В.В., Якименко В.В., Жабькпаева А.Г., Епихина Т.И., **Рар В.А.** Генетическая вариабельность риккетсий в клещах *Dermacentor* spp. на территории Западной Сибири и Северного Казахстана // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2023. – V. 41 – № 3. – P. 25–34. doi: ht10.17116/molgen20234103125.