

На правах рукописи

Карташов Михаил Юрьевич

**ВСТРЕЧАЕМОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РИККЕТСИЙ
В КЛЕЩАХ В НЕКОТОРЫХ РЕГИОНАХ РОССИИ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2017

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: Нетёсов Сергей Викторович,
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией
бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии
ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»

Официальные оппоненты: Шестопалов Александр Михайлович,
доктор биологических наук, профессор,
временно исполняющий обязанности директора
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
экспериментальной и клинической медицины»

Васильев Геннадий Владимирович,
кандидат биологических наук,
заведующий сектором геномных исследований
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН»

Ведущая организация: ФГБУН Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН)

Защита состоится «22» декабря 2017 г. в 9-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., тел. 8 (383) 336-60-10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и на интернет-сайте <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.М. Зубавичене

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, составляют большую часть всех регистрируемых случаев природно-очаговых инфекций в России (согласно «Сведениям об инфекционных и паразитарных заболеваниях за январь-декабрь 2016 года» Роспотребнадзора). Наряду с вирусным клещевым энцефалитом и иксодовым клещевым боррелиозом риккетсиозы, вызываемые бактериями рода *Rickettsia*, занимают важное место в структуре инфекционной патологии клещевых инфекций.

Риккетсии – мелкие полиморфные грамотрицательные α -протеобактерии, являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами эукариотических клеток. Многие виды риккетсий патогенны для человека и животных, что определяет их медицинское и ветеринарное значение. Передача инфекции, вызываемой бактериями рода *Rickettsia*, осуществляется широким кругом кровососущих членистоногих (клещами, вшами, блохами). На сегодняшний день основное значение в инфекционной патологии имеют риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки, вызывающие природно-очаговые трансмиссивные инфекции, передаваемые клещами.

В последние годы в связи с получением новых данных существенно изменились представления о распространенности, таксономии и экологии риккетсий [Parola et al., 2005; Perlman et al., 2006; Weinert et al., 2009; Oteo, 2012; Parola et al., 2013]. Внедрение современных молекулярно-биологических методов исследования привело к открытию новых видов и подвидов риккетсий, а также описанию новых синдромов, связанных с заражением риккетсиями. Выявлены патогенные свойства у ряда видов риккетсий, долгое время считавшихся непатогенными.

В настоящее время в России официально регистрируют заболевания только двумя риккетсиозами из группы клещевой пятнистой лихорадки [Tarasevich et al., 2006]: североазиатский клещевой риккетсиоз, вызываемый *R. sibirica* и распространенный преимущественно в азиатской части России, и астраханская пятнистая лихорадка, встречающаяся на побережье Каспийского моря и вызываемая *R. conori subsp. caspia*. Также случаи риккетсиоза, вызванного *R. heilongjiangensis*, зарегистрированы в Хабаровском крае [Mediannikov et al., 2004]. Применение же современных молекулярно-биологических методов исследования позволило обнаружить в клещах, собранных на территории России, генетический материал и других патогенных для человека видов риккетсий, а также риккетсий с пока неустановленной патогенностью (*R. slovaca*, *R. raoultii*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *Candidatus R. tarasevichiae* и др.) [Rydкина et al., 1999; Rudakov et al., 2003; Shpynov et al., 2004].

В настоящее время наиболее актуальными проблемами молекулярной эпидемиологии инфекций, передающихся клещами, являются уточнение ареалов риккетсиозов, генотипов их возбудителей, выявление патогенных для человека видов риккетсий, выявление возможной связи инфицирования риккетсиями с

симптоматикой соматических заболеваний, а также видового состава и границ распространения их переносчиков.

Цель исследования: оценить уровень зараженности риккетсиями клещей, собранных на территориях Томской, Новосибирской областей, Республики Коми и полуострова Крым, а также определить генетическое разнообразие риккетсий, циркулирующих в выбранных для исследования природных очагах.

Задачи исследования:

1. Создание коллекции образцов ДНК, выделенных из индивидуальных иксодовых клещей, собранных в изучаемых регионах (территории Томской и Новосибирской областей, Республики Коми, полуострова Крым).

2. Разработка лабораторного варианта тест-системы для выявления ДНК риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, основанного на ПЦР в режиме реального времени.

3. Скрининг образцов ДНК клещей на наличие генетических маркеров риккетсий с целью установления уровня инфицированности клещей данными бактериями.

4. Проведение молекулярно-генетического анализа выявленных изолятов риккетсий с помощью сравнения нуклеотидных последовательностей генов цитратсинтазы (*gltA*) и поверхностного белка В (*ompB*).

Научная новизна работы. Впервые проведено изучение динамики инфицированности риккетсиями (в течение 6 лет) клещей видов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, обитающих на территории Томской области. Проведена оценка инфицированности риккетсиями клещей *D. reticulatus*, обитающих на территории городских биотопов г. Томска и установлена их зараженность *R. raoultii*. Определена инфицированность риккетсиями клещей *I. lividus*, собранных из нор птиц. Из клещей данного вида выявлены геномы риккетсий, генетически наиболее близких к *R. heilongjiangensis* и *R. japonica*.

Определен уровень инфицированности риккетсиями клещей *I. persulcatus*, обитающих на территории Республики Коми в пределах северной границы ареала данного вида клещей. Впервые в клещах *I. persulcatus* на территории Республики Коми выявлены геномы *R. helvetica*.

Впервые показано наличие в клещах, обитающих на территории полуострова Крым, генетического материала различных патогенных риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, помимо *R. conorii*. Так в клещах *D. marginatus* был выявлен генетический материал *R. raoultii*, в клещах *H. punctata* – *R. monacensis*, в клещах *H. mardinatum* – *R. aeschlimannii*.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате проведенных исследований установлены уровни инфицированности риккетсиями иксодовых клещей на территориях Томской, Новосибирской областей, Республики Коми и Крыма. Путем генотипирования по двум генам (*gltA* и *ompB*) определен видовой состав этих патогенов. Данные, полученные при исследовании встречаемости и генетического разнообразия риккетсий, могут быть использованы для дальнейшего совершенствования тест-систем, учитывающих все видовое

многообразие риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, встречающихся в различных регионах России.

Разработан лабораторный вариант тест-системы для выявления ДНК риккетсий методом ПЦР в режиме реального времени. Получен патент на изобретение № 2581952 «Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации генетического материала риккетсий методом ПЦР в реальном времени». Внедрение современных молекулярно-биологических методов принципиально важно для более быстрой и надежной диагностики риккетсиозов, в том числе протекающих с атипичной симптоматикой.

Полученные данные о встречаемости и генетическом разнообразии риккетсий могут быть использованы как для диагностики вызываемых ими заболеваний, так и прогнозирования заболеваемости клещевыми риккетсиозами.

Положения, выносимые на защиту

1. Уровень инфицированности риккетсиями клещей *I. persulcatus* в Томской области колеблется в пределах 12,4 – 25,8 % в зависимости от сезона наблюдения; уровень инфицированности клещей *I. pavlovskyi* колеблется в пределах 1,3 – 13,0 %. Уровень инфицированности клещей *D. reticulatus*, отловленных в Томской области, составляет 40,9 %; клещей *I. lividus* – 51,2 %. Показатель уровня инфицированности клещей *I. persulcatus*, отловленных в Новосибирской области, составляет 26,4 %; клещей *I. pavlovskyi* – 18,1 %; клещей *D. reticulatus* – 40,3 %; клещей *D. marginatus* – 38,7 %. ДНК риккетсий было обнаружено в 7,5 % клещей *I. persulcatus*, собранных в Республике Коми.

2. Уровень инфицированности риккетсиями у самок клещей рода *Ixodes* достоверно выше по сравнению с самцами, а уровень инфицированности риккетсиями клещей вида *I. persulcatus* достоверно выше по сравнению с инфицированностью клещей вида *I. pavlovskyi*.

3. Выявлена циркуляция *R. raoultii* в клещах рода *Dermacentor* на территории Томской и Новосибирской областях, а также в Крыму. ДНК *R. helvetica* обнаружена в клещах *I. persulcatus*, обитающих на территории Новосибирской области и Республики Коми.

4. У 51,2 % клещей *I. lividus*, обитающих в Томской области и являющихся паразитами береговых ласточек, обнаружена ДНК риккетсий, генетически наиболее близких к *R. heilongjiangensis* (уровень гомологии нуклеотидной последовательности гена *gltA* составляет 99,1 %, гена *ompB* – 97,8 %).

5. В клещах *H. punctate*, обитающих на полуострове Крым, впервые обнаружена циркуляция *R. monacensis*; в клещах *H. marginatum* – *R. aeschlimanii*.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается достаточно большой по объему выборкой (всего было исследовано 4549 образцов клещей) и применением современных молекулярно-биологических методов исследования, адекватных поставленным задачам.

Основные результаты исследования по теме диссертационной работы были представлены и обсуждены на VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, 18-20 марта 2014 г.); VI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 24-26 марта 2014 г.); научно-практической конференции молодых ученых и специалистов “От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций: подходы, традиции, инновации” (Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2014 г.); I Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Новосибирск, 7-8 октября 2014 г.); Научной конференции с международным участием «Актуальные аспекты природно-очаговых болезней» (Омск, 11-13 ноября 2014 г.); 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.); II Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Новосибирск, 1-2 октября 2015 г.); VIII Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз – Россия 2015» (Новосибирск, 5–9 октября 2015 г.); Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, 11-15 апреля 2016 г.); III Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Новосибирск, 5-6 октября 2016 г.).

Личный вклад автора. Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно, за исключением сбора клещей, что оговорено ниже. Изучение литературы по теме диссертации, экспериментальная работа, анализ и статистическая обработка собственных результатов, а также написание диссертации выполнено лично автором.

Отлов клещей на территории Томской области проводился сотрудниками кафедры зоологии позвоночных и экологии Томского государственного университета (зав. кафедрой – д.б.н., профессор Москвитина Н.С.); отлов клещей на территории Республики Коми проводился сотрудниками ФГУП «Дезинфекция» Роспотребнадзора (директор – д.м.н. Корабельников И.В.); отлов клещей на территории Республики Крым проводился сотрудниками ФГКУЗ «Противочумная станция Республики Крым» Роспотребнадзора (директор – к.м.н. Тихонов С.Н.). Отлов клещей на территории Новосибирской области проводился лично автором совместно с коллегами из лаборатории молекулярной эпидемиологии особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (зав. лабораторией – к.б.н. Терновой В.А.).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение), выводы, список используемой литературы. Работа иллюстрирована 34 рисунками и 20 таблицами. Список литературы включает 278 литературных источников, из них 23 источников отечественной и 255 источников зарубежной литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование взяты 4549 клещей различных видов, собранных на территории Томской, Новосибирской областей, Республики Коми и Республики Крым. Характеристики изучаемых выборок клещей представлены на рисунке 1.



Рисунок 1. Характеристики исследуемых выборок клещей.

Молекулярно-биологические методы. Выделение нуклеиновых кислот из гомогенатов изучаемых клещей проводили с использованием набора «АмплиПрайм РИБО-преп» («НексБио», Россия). Выявление генетических маркеров риккетсий проводилось методами ПЦР как в режиме реального времени, так и с электрофоретической детекцией. Температурный профиль реакции для разных пар праймеров определяли индивидуально. Секвенирование продуктов амплификации проводили по обеим цепям модифицированным методом Сэнгера на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора 3130xl Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Анализ данных, полученных в ходе секвенирования. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программных продуктов Vector NTI Advance v. 8.0 [Lu et al., 2004], DNASTARLasergene v. 7.1 [Burland, 2000], UniproUGENE v. 1.24 [Okonechnikov et al., 2012]. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с ранее опубликованными с помощью приложения BLAST. Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма ClustalW в программе MEGA v. 6.0 [Tamura et al., 2013]. Построение филогенетических деревьев осуществляли с помощью метода объединения ближайших соседей. Статистические индексы поддержки получали с помощью bootstrap-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка и апробация лабораторного варианта тест-системы для детекции ДНК риккетсий методом ПЦР в режиме реального времени

Для исследования генетического разнообразия риккетсий наиболее часто используются нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК, цитратсинтазы (*gltA*), поверхностного белка А (*ompA*), поверхностного белка В (*ompB*), 17 kDa белка [La Scola et al., 1997]. Нуклеотидные последовательности генов *ompA*, *ompB* и 17 kDa белка весьма вариабельны, что не позволяет подобрать родоспецифические праймеры для целей диагностики. Последовательности генов 16S рРНК и *gltA* являются более консервативными, при этом последовательность гена 16S рРНК является наиболее консервативной. Таким образом, в качестве гена-мишени для разрабатываемой ПЦР-РВ системы нами был выбран ген *gltA*, кодирующий один из ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот. Сравнительный анализ известных последовательностей гена *gltA* позволил найти достаточно консервативные участки этого гена, пригодные для дизайна диагностических олигонуклеотидных праймеров и зонда. На основе этого нами была разработана пара праймеров и ДНК-зонд, структура которых представлена в таблице 1.

Таблица 1. Структура праймеров и зонда, используемых для проведения ПЦР в режиме реального времени

Название праймера/зонда	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина ПЦР продукта
PrF_gltA	5'-GGCTTCGGTCATCGTGT-3'	120 п.н.
PrR_gltA	5'-TTGCTATTTGTAAGAGCGGATTG-3'	
Z(ROX)_gltA	ROX-CCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAAAC-BHQ2'	

В качестве положительного контрольного образца в ПЦР-РВ была использована рекомбинантная плазмидная ДНК рCR2.1 содержащая нуклеотидную последовательность фрагмента гена *gltA*. С использованием полученной плазмидной конструкции экспериментальным путем были подобраны оптимальные условия проведения ПЦР-РВ (концентрации ионов Mg^{2+} , фермента, диагностических праймеров и флуоресцентного зонда, а также температуру гибридизации праймеров и оптимальные временные промежутки для стадий денатурации, отжига праймеров и элонгации).

В работе определена аналитическая чувствительность разработанной ПЦР-РВ, т.е. то минимальное количество ДНК, которое может быть определено в ходе реакции. Для оценки данного показателя были приготовлены последовательные 10-кратные разведения рекомбинантной плазмиды, несущей целевую ДНК-вставку. Значение минимальной аналитической чувствительности составило 80 геном-эквивалентов на реакцию (рис. 2). Полученное значение чувствительности является приемлемым для использования разрабатываемой ПЦР-РВ в лабораторной практике с целью выявления генетических маркеров риккетсий.

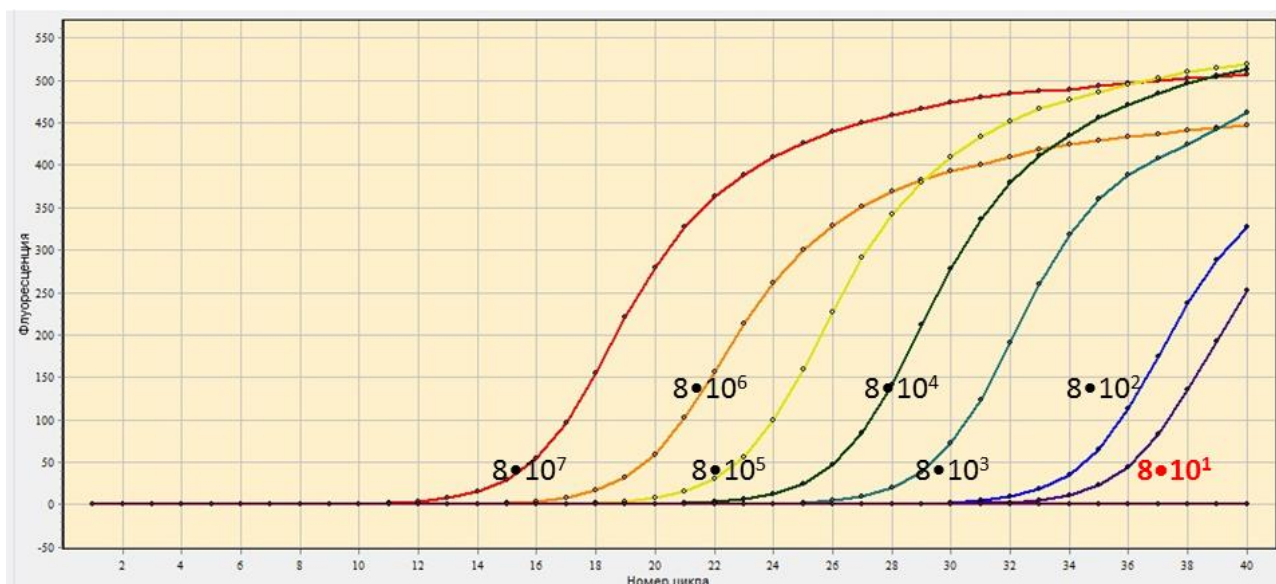


Рисунок 2. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации рекомбинантной плазмиды в реакции (концентрация выражена в геном-эквивалентах на реакцию). Данные получены на приборе DT-lite («ДНК-Технология», Россия) с использованием SmartTaq ДНК-полимеразы («Медиген», Россия).

Специфичность разрабатываемой ПЦР-РВ определялась в два этапа. На первом этапе нуклеотидные последовательности праймеров/зонда проверяли на наличие гомологии со всеми известными нуклеотидными последовательностями, содержащимися в международной базе данных GenBank. Выбранные праймеры и ДНК-зонд не имели гомологии с ДНК человека и ДНК других организмов, представленных в GenBank. На втором этапе аналитическая специфичность была оценена нами экспериментально. Для этого была использована панель, содержащая геномные ДНК человека, мыши, клещей различных видов (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes plumbeus*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma anatolicum*, *Hyalomma marginatum*, *Neamaphysalis punctata*, *Rhipicephalus bursa*), возбудителей других инфекций, передающихся клещами (*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Babesia divergens*, *Babesia microti*, кДНК вируса клещевого энцефалита штаммов 205 и Коларово-2008). Отрицательные результаты ПЦР-РВ анализа с каждым из вышеперечисленных образцов позволяют оценить специфичность набора по использованной выборке образцов как 100 %.

Для оценки возможности применения разработанной тест-системы для анализа полевых проб была сформирована коллекция из 310 образцов гомогенатов клещей, которая была разделена на 4 выборки. В качестве метода сравнения был использован метод ПЦР с электрофоретической детекцией и известная пара праймеров CS409d/RP1258n, широко применяемая в исследованиях. Положительные образцы, выявленные с использованием праймеров CS409d/RP1258n, были генотипированы путем секвенирования. Для решения вопроса о влиянии этапа пробоподготовки на ход ПЦР-РВ, апробация была проведена как с образцами ДНК, выделенными методом фенол-хлороформной экстракции (выборки №№ 1-3), так и с образцами ДНК,

выделенными сорбционным методом (выборка № 4). При параллельном анализе результаты выявления ДНК *R. sibirica*, *R. helvetica* и *R. raoultii* совпали в 100 % случаев, а по определению ДНК *Candidatus R. tarasevichiae* в 99 % случаев (таблица 2). Полученное расхождение может быть объяснено более высоким значением чувствительности метода ПЦР-РВ по сравнению с ПЦР с электрофоретической детекцией. Показано, что для применения разработанной тест-системы пригодны различные методы выделения нуклеиновых кислот.

Таблица 2. Результаты сравнительного анализа исследуемых выборок

Выборка	Объем выборки	Вид клещей	Вид патогена (подтвержден секвенированием фрагмента гена <i>gltA</i>)	Кол-во инфицированных образцов		Сходимость результатов
				ПЦР (CS409d/RP1258n)	ПЦР-РВ	
1	10	<i>D. reticulatus</i>	<i>R. sibirica</i>	5	5	100 %
2	50	<i>D. reticulatus</i>	<i>R. raoultii</i>	20	20	100 %
3	50	<i>I. persulcatus</i>	<i>R. helvetica</i>	20	20	100 %
4	200	<i>I. persulcatus</i> <i>I. pavlovskyi</i>	<i>R. tarasevichiae</i>	50	52	99 %

На данный набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда получен патент РФ на изобретение № 2581952.

Изучение встречаемости и генетического разнообразия риккетсий в популяциях иксодовых клещей, обитающих на территории Томской области

Инфицированность клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, отловленных на территории Томской области. На наличие ДНК риккетсий были исследованы образцы от клещей видов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, собранных на территории Томской области в весенне-летние периоды 2010-2016 гг. Уровень инфицированности риккетсиями за наблюдаемый период колебался от 8,1 % до 21,0 % (рис. 3).

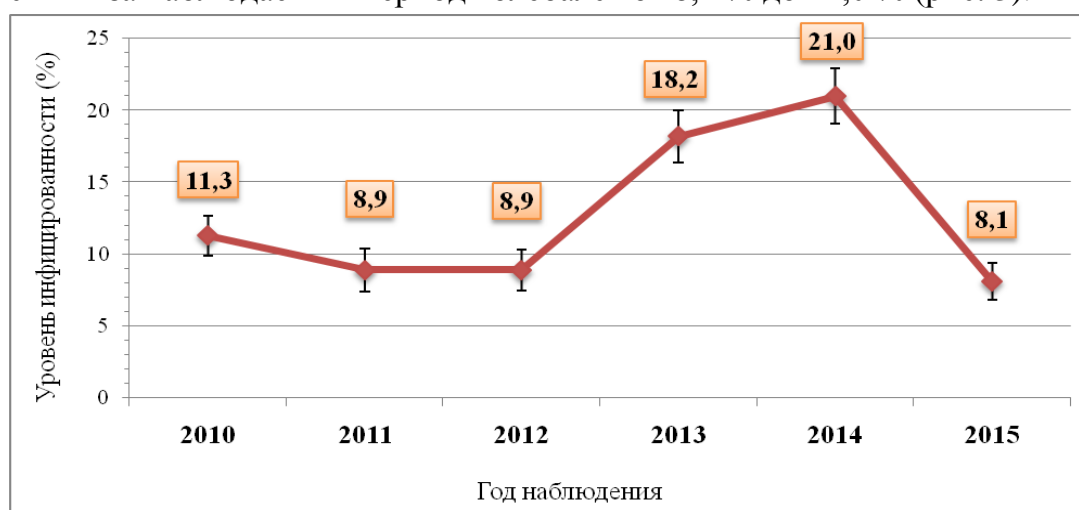


Рисунок 3. Уровень инфицированности риккетсиями клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, отловленных на территории Томской области в 2010-2016 гг.

Таблица 3. Уровень инфицированности риккетсиями клещей, отловленных в Томской области

Год		2010		2011		2012		2013		2014		2016	
Кол-во исследуемых клещей		N=495		N=361		N=403		N=473		N=428		N=435	
Кол-во инфицированных клещей (N)		56		32		36		86		90		35	
Доля инфицированных клещей (%)		11,3±1,4		8,9±1,5		8,9±1,4		18,2±1,8		21,0±1,9		8,1±1,3	
Зависимость инфицирования от пола	Пол клещей	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы
	Кол-во клещей (N)	261	234	182	179	197	206	232	241	215	213	208	227
	Кол-во инфицированных клещей (N)	50	6	23	9	28	8	52	34	56	34	26	9
	Доля инфицированных клещей (%)	19,1 ±2,4	2,6 ±1,0	12,6 ±2,4	5,0 ±1,6	14,2 ±2,5	3,9 ±1,3	22,4 ±2,7	14,1 ±2,2	26,0 ±2,9	15,9 ±2,5	12,5 ±2,3	3,9 ±1,3
Зависимость инфицирования от вида	Вид клещей*	<i>I. per.</i>	<i>I. pav.</i>	<i>I. per.</i>	<i>I. pav.</i>	<i>I. per.</i>	<i>I. pav.</i>	<i>I. per.</i>	<i>I. pav.</i>	<i>I. per.</i>	<i>I. pav.</i>	<i>I. per.</i>	<i>I. pav.</i>
	Кол-во клещей (N)	346	149	199	162	249	154	336	137	267	161	147	288
	Кол-во инфицированных клещей (N)	54	2	125	7	31	5	74	12	69	21	23	12
	Доля инфицированных клещей (%)	15,6 ±1,9	1,3 ±0,9	12,6 ±2,3	4,3 ±1,6	12,4 ±2,1	3,2 ±1,4	22,0 ±2,3	8,7 ±2,4	25,8 ±2,7	13,0 ±2,6	15,6 ±2,8	4,2 ±1,1

*Примечание: *I. per* – *I. persulcatus*, *I. pav* – *I. pavlovskyi*

ДНК риккетсий была обнаружена как у самцов, так и у самок клещей *Ixodes spp.* Однако уровень инфицированности среди самок был значительно выше, чем у самцов (как минимум в 2 раза) (рис. 4). Различия в уровне инфицированности самцов и самок у иксодовых клещей, возможно, следует объяснить большей длительностью их питания и бóльшим объемом поглощаемой самками крови.

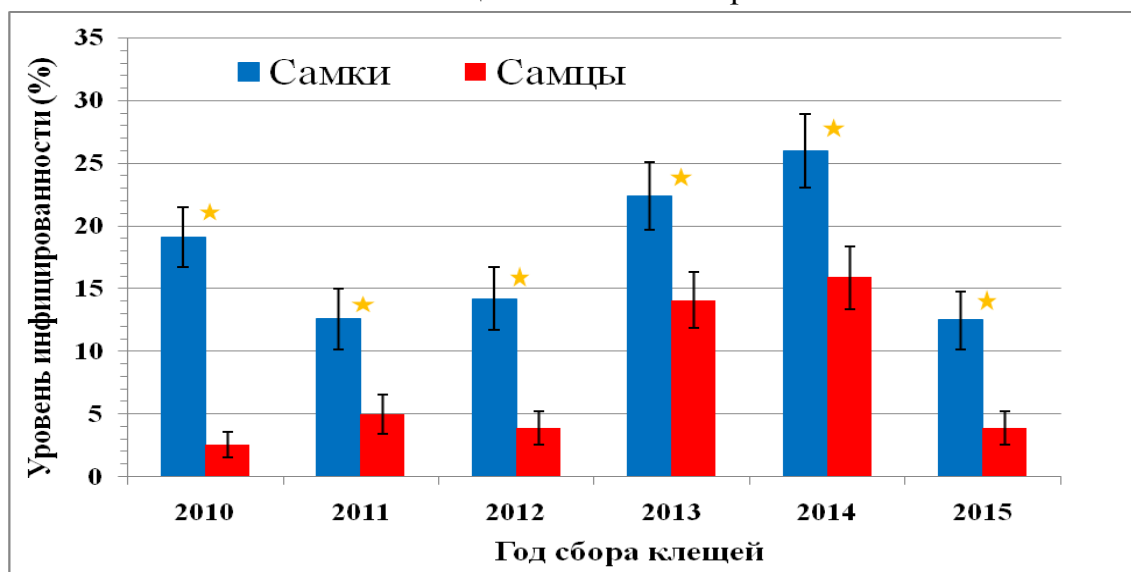


Рисунок 4. Различия в уровне инфицированности риккетсиями самцов и самок клещей *Ixodes spp.*, отловленных на территории Томской области. Достоверность различий ($p < 0,001$) между уровнем инфицированности самцов и самок определена с использованием двухстороннего критерия Фишера и обозначена на диаграмме звездочкой.

В данном исследовании показано, что в клещах *I. pavlovskyi* также встречаются риккетсии, хотя и достоверно реже, чем в клещах *I. persulcatus* (рис. 5).

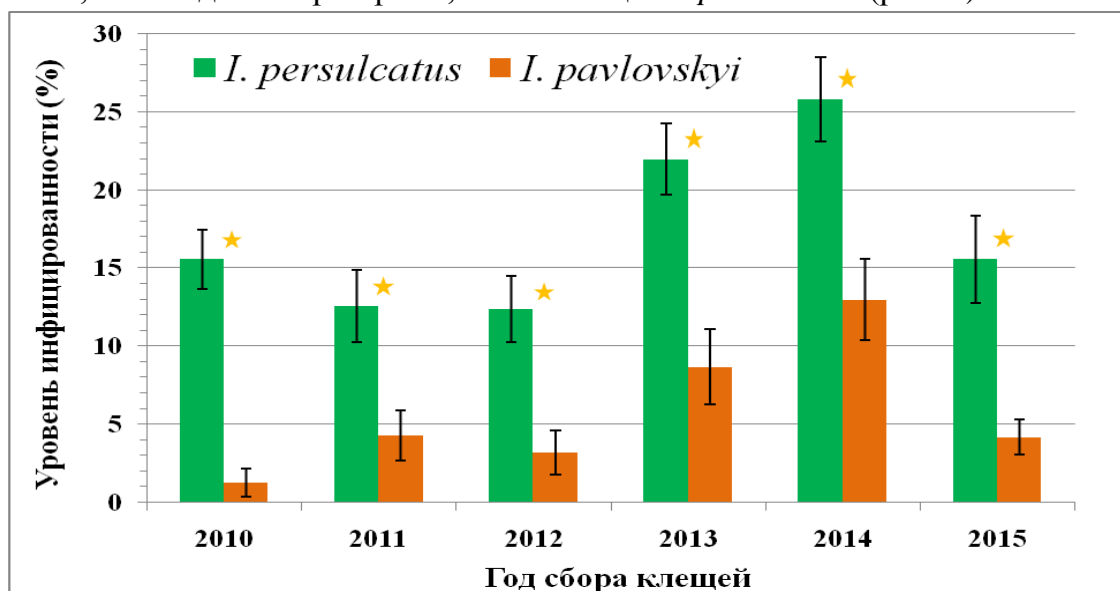


Рисунок 5. Различия в уровне инфицированности риккетсиями клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, отловленных на территории Томской области. Достоверность различий ($p < 0,001$) между уровнем инфицированности двух видов клещей определена с использованием двухстороннего критерия Фишера и обозначена на диаграмме звездочкой.

Генотипирование по гену *gltA* изолятов риккетсий из клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, собранных в Томской области, показало их принадлежность к *Candidatus R. tarasevichiae*. Все полученные в ходе исследования последовательности были на 100 % гомологичны друг другу и последовательностям геномов изолятов, ранее обнаруженных в Западной Сибири (*Candidatus R. tarasevichiae* штамм Ust'-Tarka, DQ168981) и Восточной Сибири (*Candidatus R. tarasevichiae* штамм Stolby, DQ168982), а также в Китае (*Candidatus R. tarasevichiae* изолят MDJ13, JX996054).

Инфицированность клещей *Ixodes lividus*, отловленных на территории Томской области. Клещи вида *I. lividus* являются специфическими паразитами береговых ласточек. В Западной Сибири клещи этого вида регистрируются в Томской, Новосибирской, Омской и Тюменской областях. Считается, что клещи *I. lividus* не нападают на человека и имеют только эпизоотическое значение в природных очагах лихорадки Западного Нила. Тем не менее, нами проведен анализ инфицированности клещей этого вида риккетсиями, поскольку перелетные птицы, как известно, играют важную роль в распространении на большие расстояния различных патогенов, в том числе и риккетсий.

В настоящее исследование вошли результаты изучения 80 клещей *I. lividus*, отловленных на территории Томской области. Генетический материал риккетсий был обнаружен в 41 образце, уровень инфицированности составил $51,2 \pm 5,5$ %. Генотипирование выявленных изолятов риккетсий по гену *gltA* показало их генетическое родство с *R. heilongjiangensis* и *R. japonica* при гомологии анализируемых последовательностей на уровне 99 %. Для всех выявленных изолятов были определены нуклеотидные последовательности гена *ompB*. Изучаемые изоляты, обнаруженные в клещах *I. lividus*, на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена *ompB* были идентичны друг другу и отнесены к кластеру, образованному *R. heilongjiangensis* и *R. japonica*. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей гена *ompB* изучаемых изолятов при сравнении с прототипным штаммом *R. heilongjiangensis*054 (CP002912) составил 97,8 %; с *R. japonica* YH (AP011533) – 97,4 %.

Инфицированность клещей *Dermacentor reticulatus*, отловленных на территории Томской области. *D. reticulatus* на территории Томской области регистрируется только с 2005 г., и данные о инфицированности этих клещей различными патогенами пока не опубликованы. Для выявления генетических маркеров риккетсий нами было исследовано 264 клеща *D. reticulatus* (178 самок и 86 самцов), отловленных в 2015 г. на территории томского городского биотопа «Лагерный сад». Уровень инфицированности риккетсиями составил $40,9 \pm 3,1$ %. Достоверных различий в уровне инфицированности у самцов и самок клещей *D. reticulatus* установлено не было.

Все выявленные изоляты риккетсий при генотипировании по гену *gltA* были отнесены к *R. raoultii*. Все изоляты оказались идентичны друг другу и на 100 % гомологичны последовательности гена *gltA* *R. raoultii* штамма Marne (DQ365803), выделенного из клеща *D. reticulatus* на востоке Франции в 2004 г. Уровень гомологии

по нуклеотидной последовательности гена *gltA* изучаемых изолятов с прототипными штаммами *R. raoultii* Khabarovsk (DQ365804), выделенным из клеща *D. silvarum* в Хабаровском крае в 2005 г., и *R. raoultii* Elanda-23/95 (EU036985), выделенным из клеща *D. nuttalli* на Алтае в 1995 г., составил 99,9 %.

Уровень гомологии нуклеотидной последовательности гена *ompB* изучаемых изолятов при сравнении с аналогичной для *R. raoultii* Marne (DQ365797) составил 99,9 %; с *R. raoultii* Khabarovsk (CP010969) – 99,7 %; с *R. raoultii* Elanda-23/95 (EU036984) – 99,5 %. Нуклеотидные замены, приводящие к аминокислотным замещениям, в сравнении с прототипными штаммами приведены в таблице 3.

Таблица 4. Несинонимичные замены в гене *ompB* изолята *R. raoultii* Tomsk (KX258622) по сравнению с прототипными штаммами

№ аминокислотной позиции	прототипный штамм → изучаемый изолят
<i>R. raoultii</i> Marne (DQ365797)	
976	P (CCT) → T (ACT)
1262	K (AAA) → Q (CAA)
1490	R (AGA) → S (AGC)
<i>R. raoultii</i> Khabarovsk (CP010969)	
90	S (TCC) → A (GCC)
478	F (TTT) → L (CTT)
487	G (GGT) → S (AGT)
529	S (TCG) → 0
560	T (ACT) → A (GCT)
731	L (TTG) → F (TTT)
824	V (GTT) → G (GGT)
1460	K (AAG) → N (AAT)
1529	A (GCC) → V (GTC)
<i>R. raoultii</i> Elanda-23/95 (EU036984)	
10	P (CCA) → T (ACA)
90	S (TCC) → A (GCC)
229	T (ACT) → A (GCT)
478	F (TTT) → L (CTT)
487	G (GGT) → S (AGT)
529	S (TCG) → 0
560	T (ACT) → A (GCT)
731	L (TTG) → F (TTT)
824	V (GTT) → G (CGT)
1391	N (AAT) → K (AAA)
1392	S (TCT) → T (ACT)
1409	D (GAT) → G (GGT)
1460	K (AAG) → N (AAT)
1529	A (GCC) → V (GTC)

Изучение встречаемости и генетического разнообразия риккетсий в популяциях иксодовых клещей, обитающих на территории Новосибирской области

Изучение видового разнообразия клещей, снятых с людей на территории Новосибирской области. Фауна иксодовых клещей на территории Новосибирской области представлена следующими видами: *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *I. trianguliceps*, *I. apronophorus*, *I. crenulatus*, *I. lividus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. silvarum*. Большинство из них активно нападают на человека и являются переносчиками возбудителей многих природно-очаговых инфекций. В настоящем исследовании были изучены 500 гомогенатов клещей, снятых с людей в мае 2014 г (период наибольшей активности клещей). Поскольку для исследования были представлены гомогенаты клещей, нами было проведено определение их видовой принадлежности путем секвенирования фрагмента гена субъединицы I цитохромоксидазы *COI*, локализованного в митохондриальном геноме клещей. Из 500 снятых с людей клещей 309 были отнесены к роду *Ixodes* (226 — *I. persulcatus* и 83 — *I. pavlovskyi*); 191 образец к роду *Dermacentor* (164 — *D. reticulatus* и 27 — *D. marginatus*) (рис. 6).

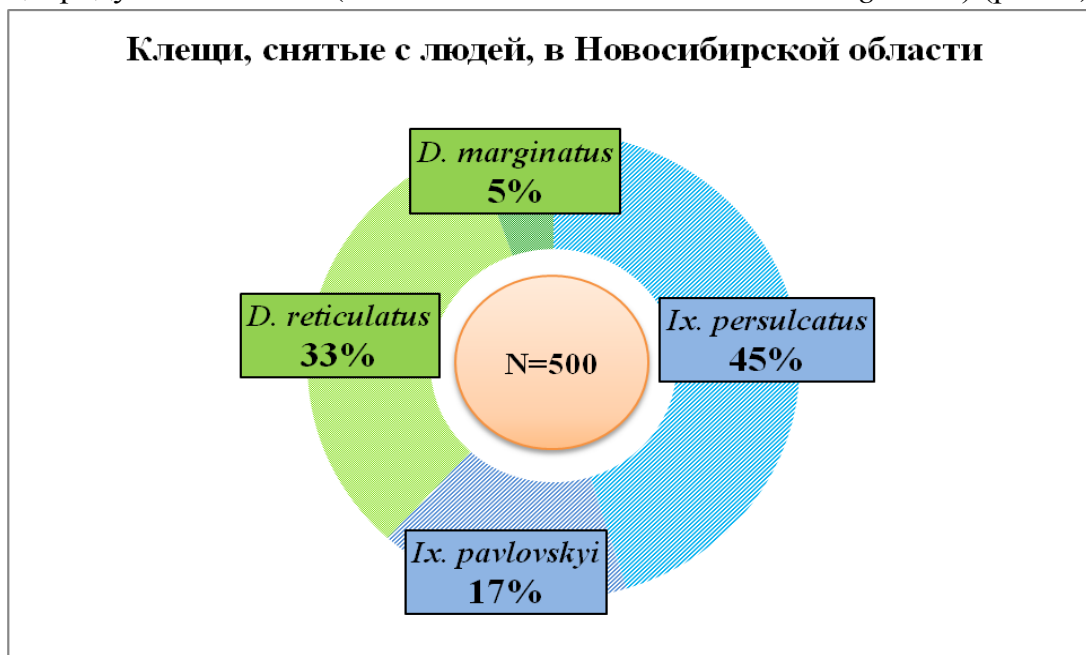


Рисунок 6. Видовой состав клещей, снятых с людей в Новосибирской области в мае 2014 г. (выявлен путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена субъединицы I цитохромоксидазы *COI*).

Инфицированность риккетсиями клещей, снятых с людей в Новосибирской области. Результаты ПЦР-РВ на наличие ДНК риккетсий в исследуемых пробах показали, что уровень инфицированности клещей рода *Ixodes* составил $24,5 \pm 2,4$ %. Для клещей рода *Dermacentor* показатель оказался равным $40,3 \pm 3,5$ %. Результаты генотипирования риккетсий по гену *gltA* показали, что клещи рода *Ixodes* в подавляющем числе случаев инфицированы *Candidatus R. tarasevichiae*, однако из двух клещей *I. persulcatus*, снятых с людей, была изолирована ДНК *R. helvetica*. Генотипирование риккетсий, изолированных от клещей рода *Dermacentor*, показало

их принадлежность к *R. raoultii*. В одном случае из клеща *D. marginatus*, снятого с человека, была изолирована ДНК *R. sibirica*.

Уровень гомологии по фрагменту гена *gltA* всех выделенных изолятов *Candidatus R. tarasevichiae* из Новосибирской области составил 100 % с изолятами, ранее обнаруженными в Западной Сибири (*Candidatus R. tarasevichiae* Ust'-Tarka, DQ168981) и Восточной Сибири (*Candidatus R. tarasevichiae* Stolby, DQ168982), а также в Китае (*Candidatus R. tarasevichiae* MDJ13, JX996054). Гомология изучаемых фрагментов геномов изолятов *Candidatus R. tarasevichiae* из Новосибирской области также составила 100 % с изолятами, обнаруженными нами в соседней Томской области. Гомология нуклеотидных последовательностей гена *gltA* выделенной *R. helvetica* составила 100 % с последовательностями изолятов *R. helvetica*, циркулирующих в Германии (HQ232251) и Румынии (JX683116). Изоляты *R. raoultii* из Новосибирской области и циркулирующие в Европе (DQ365803, AF120029) имеют идентичную нуклеотидную последовательность фрагмента гена *gltA*. Уровень гомологии по фрагменту гена *gltA* выделенного изолята *R. sibirica* составил 100 % в сравнении с изолятами, циркулирующими в Китае (KM288711).

Инфицированность риккетсиями клещей, собранных с растительности в Новосибирской области. На наличие ДНК риккетсий было исследовано 220 образцов от клещей *I. persulcatus*, собранных в пригороде г. Новосибирск. Уровень инфицированности составил $17,3 \pm 2,5$ %. Данный показатель практически сходится с аналогичным показателем за этот период для соседней Томской области ($21,0 \pm 1,9$ %) и ниже показателя инфицированности риккетсиями клещей данного вида в Новосибирской области, которые были сняты с людей ($24,5 \pm 2,4$ %). Генотипирование по гену *gltA* выявленных изолятов риккетсий показало их принадлежность к *Candidatus R. tarasevichiae*. Все полученные в ходе исследования последовательности были на 100 % гомологичны друг другу и последовательностям геномов изолятов *Candidatus R. tarasevichiae*, ранее обнаруженных в Западной и Восточной Сибири, а также изолятов, обнаруженных в Томской области и описанных в данной работе.

Для выявления генетических маркеров риккетсий нами было исследовано 85 клещей *D. reticulatus*, собранных с растительности в пригороде поселка Краснообск. Уровень инфицированности риккетсиями составил $38,2 \pm 5,4$ %. Данный показатель практически идентичен уровню инфицированности клещей *D. reticulatus*, снятых с людей в Новосибирской области ($40,3 \pm 3,5$ %). Все выявленные изоляты риккетсий при генотипировании по гену *gltA* были отнесены к *R. raoultii*. Все изоляты оказались идентичны друг другу и на 100 % гомологичны последовательности гена *gltA* *R. raoultii* штамма Marne (DQ365803).

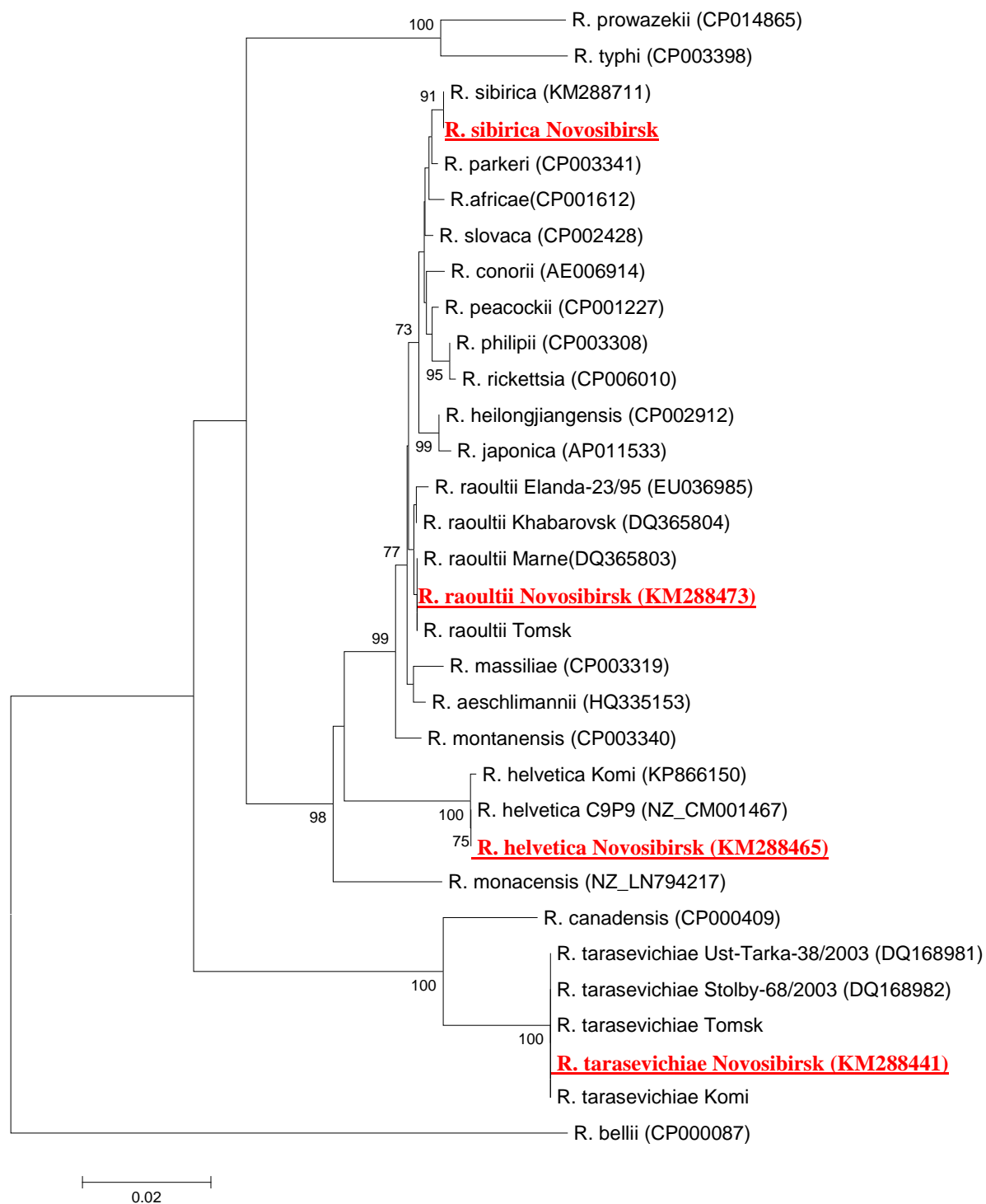


Рисунок 7. Дендрограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей гена *gltA* (1305 п.н.). Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием двухпараметрической модели Кимуры. Длина линии отражает генетическую дистанцию. Указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик. Для прототипных последовательностей указаны номера в базе данных GenBank. Красным жирным шрифтом с подчеркиванием выделены анализируемые последовательности, полученные в данной работе.

Изучение встречаемости и генетического разнообразия риккетсий в популяциях иксодовых клещей, обитающих на территории Республики Коми

В последние годы регистрируется рост случаев укуса иксодовыми клещами, а также заболеваемости клещевым энцефалитом и клещевым боррелиозом в Республике Коми [Глушакова и др., 2012]. На территории Республики Коми точные границы ареала клещей *I. persulcatus* четко не определены, однако известно, что в последние десятилетия произошло резкое продвижение границы ареала на север. С учетом сложившейся ситуации нами было решено выявить спектр переносимых клещами риккетсий в этом регионе.

В ходе работы было исследовано 676 клещей *I. persulcatus*, отловленных в южных районах республики Коми в 2011-2013 гг. ДНК *Rickettsia* spp. была выявлена в 51 образце, уровень инфицированности таким образом составил $7,5 \pm 1,1$ %. Генотипирование выявленных изолятов риккетсий по фрагменту гена *gltA* позволило установить, что 32 образца (62,7 %) риккетсий из Республики Коми принадлежат к *R. helvetica* и 19 образцов (37,3 %) относятся к *Candidatus R. tarasevichiae*. Для всех изолятов *R. helvetica*, обнаруженных на территории Республики Коми, нами также были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена *ompB* (длиной 1500 н.п.). Генотипирование изолятов по этому фрагменту подтвердило результаты, полученные по фрагменту гена *gltA*. Сравнение нуклеотидных последовательностей изучаемых фрагментов генома у разных изолятов *R. helvetica*, циркулирующих на территории Республики Коми, показало их идентичность.

Уровень гомологии по гену *gltA* изолятов *Candidatus R. tarasevichiae*, выявленных в Республике Коми, составил 100 % с изолятами, ранее обнаруженными в Западной Сибири (DQ168981) и Восточной Сибири (DQ168982), а также в Китае (JX996054).

При сравнении полноразмерных последовательностей гена *gltA* оказалось, что образцы *R. helvetica* из Республики Коми имеют уровень сходства с другими риккетсиями этого вида на уровне 99,8 %. Все выделенные нами изоляты *R. helvetica* характеризовались синонимичной трансверсией $\text{ctC}_{1029} \rightarrow \text{ctT}$ в третьей позиции кодона, кодирующего Leu_{344} цитратсинтазы по сравнению с известными прототипами (U59723, DQ131912, EU359285). Процент гомологии изученных нами изолятов *R. helvetica* по гену *ompB* в сравнении с прототипным штаммом, выделенным в Швейцарии (*R. helvetica* C9P9, NZ_CM001467), оказался значительно ниже. Последовательности гена *ompB* у двух сравниваемых риккетсий отличались 8 нуклеотидными заменами, 6 из которых приводят к следующим аминокислотным замещениям: $\text{tG}_{209\text{c}} \rightarrow \text{tAc}$ ($\text{Cys}_{70} \rightarrow \text{Tyr}$), $\text{T}_{736\text{ct}} \rightarrow \text{Gct}$ ($\text{Ser}_{246} \rightarrow \text{Ala}$), $\text{aA}_{2042\text{t}} \rightarrow \text{aGt}$ ($\text{Asn}_{681} \rightarrow \text{Ser}$), $\text{aaT}_{2415} \rightarrow \text{aaC}$, $\text{G}_{2872\text{tt}} \rightarrow \text{Att}$ ($\text{Val}_{958} \rightarrow \text{Ile}$), $\text{G}_{3751\text{gt}} \rightarrow \text{Agt}$ ($\text{Gly}_{1251} \rightarrow \text{Ser}$), $\text{gcG}_{3969} \rightarrow \text{gcT}$, $\text{aG}_{4355\text{c}} \rightarrow \text{aAc}$ ($\text{Ser}_{1452} \rightarrow \text{Asn}$) (рис. 8).

Последовательности гена *sca9* (поверхностного клеточного антигена 9) отличаются от прототипа 3 нуклеотидными заменами, одна из которых приводит к аминокислотному замещению: $\text{taC}_9 \rightarrow \text{taT}$, $\text{ttA}_{15} \rightarrow \text{ttG}$, $\text{tC}_{17\text{g}} \rightarrow \text{tTg}$ ($\text{Ser}_6 \rightarrow \text{Leu}$).

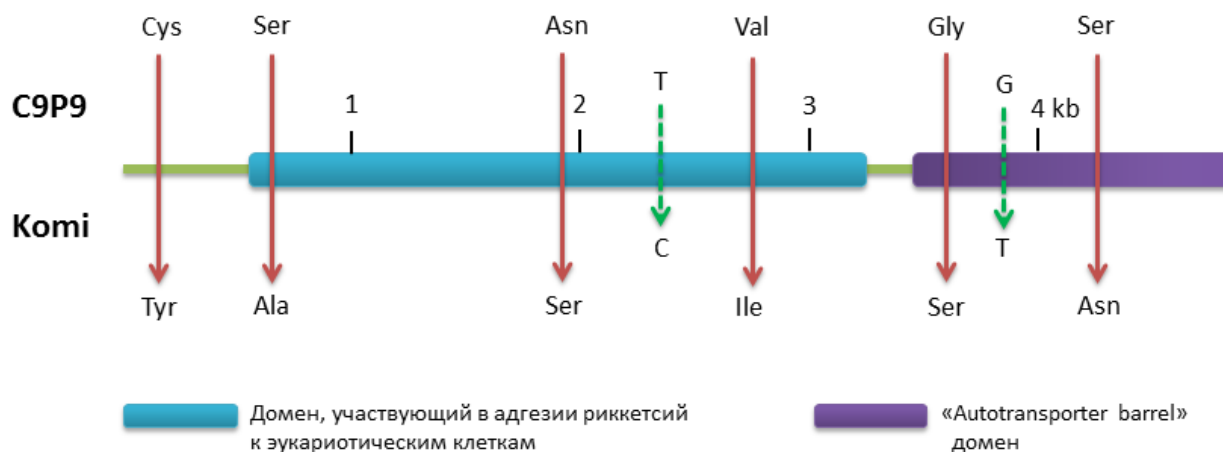


Рисунок 8. Синонимичные и несинонимичные замены в нуклеотидных последовательностях гена *ompB* изученного нами изолята *R. helvetica* в сравнении с прототипным штаммом *R. helvetica* C9P9 (NZ_CM001467).

Известно, что отношение числа несинонимичных и синонимичных замен является важной характеристикой движущих факторов эволюции анализируемого участка генома. Преобладание несинонимичных замен над синонимичными означает, что для данного гена доминирует положительный отбор. Это предположение нашло подтверждение и в работе [Blanc et al., 2005], в которой было показано, что ген *ompB* (так же как *ompA*, *Sca1*, *Sca2*, *Sca4*) эволюционировал в результате положительного отбора. Кодированный данным геном, белок OmpB относится к группе поверхностных клеточных антигенов и является одним из основных поверхностных белков риккетсий, играющих ключевую роль в связывании риккетсий с клетками хозяина [Renesto et al., 2006; Uchiyama et al., 2006]. Белок OmpB (наряду с белком OmpA) несет основные антигенные детерминанты, вызывающие иммунный ответ у пациентов, больных риккетсиозами. OmpB является большим белком (свыше 1600 аминокислот), несущим на С-конце высококонсервативный для всех видов риккетсий autotransporter (AT-) домен (примерно 300 аминокислотных остатков). AT-домен формирует «β-бочковидную» структуру, которая встраивается в наружную мембрану и формирует в ней поры. Через эти поры в свою очередь проходит центральный домен, который в дальнейшем высвобождается протеолитическим путем от части пропротеина и экспонируется на поверхности бактериальной клетки. В отличие от консервативного AT-домена последовательности центрального домена, участвующего в адгезии, гораздо более вариабельны. В работе [Blanc et al., 2005] определено, что два этих домена эволюционируют в различных режимах отбора, и результаты нашего исследования подтверждают данный факт. Так, отношение несинонимичных замен к синонимичным (dN/dS) для AT-домена и центрального домена составило, соответственно, 1,4 и 2,5.

Изучение встречаемости и генетического разнообразия риккетсий в популяциях иксодовых клещей, обитающих на территории полуострова Крым

В последние годы на территории Крыма отмечается тенденция к утяжелению клинических проявлений Средиземноморской пятнистой лихорадки, выраженных преобладанием среднетяжелых форм над легкими и усилением интоксикационного синдрома, а также появлением различных атипичных форм [Вербенец, 2009]. На сегодняшний день крайне актуальным является вопрос изучения встречаемости и генетического разнообразия риккетсий на территории Крыма с целью оптимизации эпидемического надзора и совершенствования методов лабораторной диагностики риккетсиозов. С этой целью нами было исследовано 129 клещей (виды: *I. ricinus*, *D. marginatus*, *H. punctata*, *H. marginatum* и *R. bursa*), отловленных на территории Белогорского, Бахчисарайского районов, а также в пригороде г. Алушта.

По результатам ПЦР-скрининга и генотипирования по гену *gltA* в двух образцах от клещей *D. marginatus*, отловленных в Белогорском районе, выявлен генетический материал *R. raoultii*; в клеще *H. punctata* из Белогорского района – *R. monacensis*. Генетический материал *R. aeschlimani* был обнаружен в клеще *H. marginatum*, отловленном в пригороде г. Алушта.

Уровень гомологии по нуклеотидной последовательности гена *gltA* выделенных изолятов *R. raoultii* из клещей *D. marginatus* в Республике Крым составил 100 % с *R. raoultii* Marne (DQ365803), уровень гомологии с *R. raoultii* Khabarovsk (CP010969) и *R. raoultii* Elanda-23/95 (EU036984) – 99,9 %. Гомология нуклеотидной последовательности гена *gltA* *R. monacensis*, выявленной в клеще *H. punctate*, составила 100 % в сравнении с последовательностью *R. monacensis* IrR/Munich (LN794217), выявленной в Германии в клещах *I. ricinus*. Уровень гомологии по фрагменту гена *gltA*, выявленного в клеще *H. marginatum* изолята *R. aeschlimannii*, составил 100 % с изолятом *R. aeschlimannii* Stavropol (DQ235776), обнаруженным ранее в Ставропольском крае в клещах *H. marginatum*.

Нуклеотидные последовательности гена *ompB* изолятов *R. raoultii* Crm-1 и Crm-2 оказались идентичными друг другу и показали следующие уровни гомологии при сравнении с прототипными штаммами: с *R. raoultii* Marne (DQ365797) – 99,8 %; с *R. raoultii* Khabarovsk (CP010969) – 99,7 %; с *R. raoultii* Elanda-23/95 (EU036984) – 99,5 %. Гомология нуклеотидной последовательности гена *ompB* изучаемого изолята *R. monacensis* составила 99,9 % с последовательностью гена *ompB* штамма *R. monacensis* IrR/Munich (EF380356), обнаруженного в Германии в клещах *I. ricinus*, и 99,1 % с последовательностью гена *ompB* штамма *R. monacensis* MT34 (JX625150), выделенного из клещей *I. nipponensis* в Южной Корее. Уровень гомологии по нуклеотидной последовательности гена *ompB* выделенного изолята *R. aeschlimannii* составил 99,9 % с *R. aeschlimannii* (AF123705) и 99,6 % с прототипным штаммом *R. aeschlimannii* RH15 (HM050278), выделенного из клещей *H. truncatum* в Сенегале.

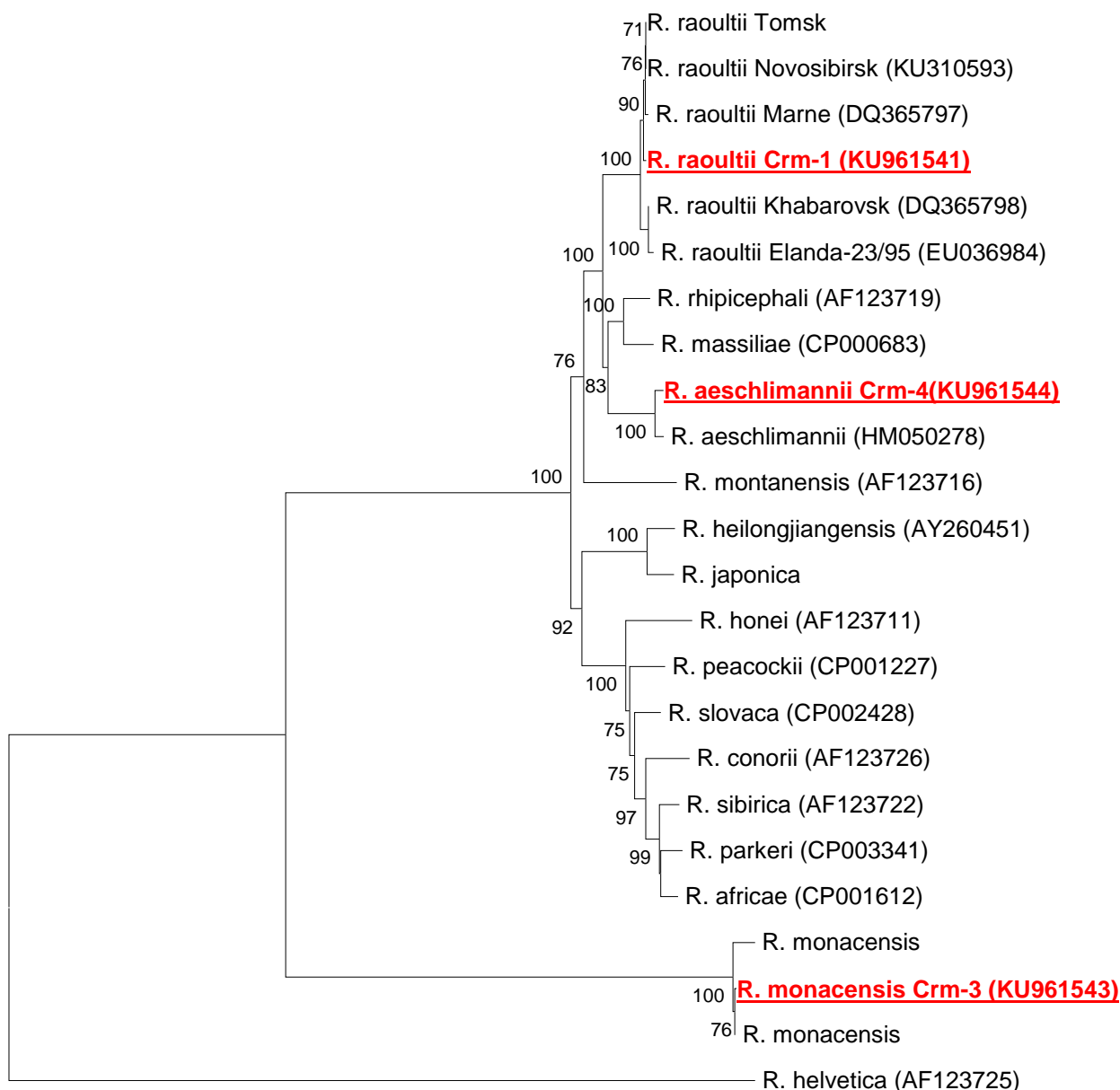


Рисунок 9. Дендрограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей гена *ompB* (4962 п.н.).

Риккетсиозы относятся к заболеваниям, которые довольно трудно клинически диагностировать, т.к. их клинические симптомы часто варьируют в зависимости от этиологического агента и физических, физиологических и генетических особенностей пациента [Еремеева и др., 2014]. Об этом свидетельствует тот факт, что большинство больных Средиземноморской пятнистой лихорадкой в Крыму госпитализируются с совершенно другими диагнозами [Пеньковская, 2014]. В итоге это приводит к задержке в проведении необходимого лечения, а также адекватных и полноценных противоэпидемических мероприятий. Выявление на территории Крыма риккетсий видов *R. raoultii*, *R. monacensis*, *R. aeschlimannii* свидетельствует о потенциальной опасности развития вызываемых ими инфекций у людей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей работы был разработан и апробирован лабораторный вариант тест-системы для быстрой и эффективной детекции генетического материала риккетсий методом ПЦР в режиме реального времени. Результаты оценки аналитической чувствительности данного ПЦР-теста показали возможность выявления ДНК риккетсий в количестве от 80 геном-эквивалентов на реакцию, что является приемлемым для использования данного теста в лабораторной практике.

С использованием разработанной системы для детекции ДНК риккетсий установлены уровни инфицированности этими бактериями иксодовых клещей, собранных на территориях Томской и Новосибирской областях, Республики Коми. На территории Томской области проведено изучение динамики инфицированности риккетсиями клещей видов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в течении 6 лет. Показано, что уровень инфицированности в различные сезоны может отличаться более чем в два раза. Нами также обнаружены статистически значимые различия в уровнях инфицированности риккетсиями самцов и самок клещей рода *Ixodes*, а также клещей двух разных видов – *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*. Получены данные о крайне высокой инфицированности риккетсиями клещей *D. reticulatus* на территории городских биотопов г. Томска, а также клещей *I. lividus*, отловленных в Томской области. Определение и анализ уровней инфицированности проведены также для клещей, обитающих в Новосибирской области. В работе путем определения и анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента митохондриального генома клещей изучен видовой состав иксодид, нападающих на людей в Новосибирской области. Получены данные о зараженности риккетсиями клещей *I. persulcatus* на территории Республики Коми в пределах северной границы ареала распространения данного вида клещей.

Определение и анализ нуклеотидных последовательностей двух маркерных генов (*gltA* и *ompB*) позволили генотипировать выявленные изоляты риккетсий. В работе показано широкое распространение *Candidatus R. tarasevichiae* в клещах *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, обитающих на территориях Томской, Новосибирской областях и Республики Коми. Клещи *D. reticulatus*, отловленные в Томской и Новосибирской областях, часто заражены *R. raoultii*. В клещах *I. lividus* выявлены ДНК риккетсий с наиболее высокими уровнями гомологии нуклеотидных последовательностей изучаемых генов с *R. heilongjiangensis*. В клещах *I. persulcatus*, обитающих на территории Республики Коми, обнаружена ДНК *R. helvetica*, имеющая ряд уникальных синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен в гене *ompB*, отсутствующих у прототипных штаммов. Анализ нуклеотидных замен показал, что разные домены основного поверхностного белка В (*ompB*) у *R. helvetica* эволюционируют в различных режимах отбора.

На территории полуострова Крым было показано наличие в клещах различных патогенных риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, помимо *R. conorii*. Так, в клещах *D. marginatus* был выявлен генетический материал *R. raoultii*, в клещах *H. punctata* – *R. monacensis*, в клещах *H. mardinatum* – *R. aeschlimannii*.

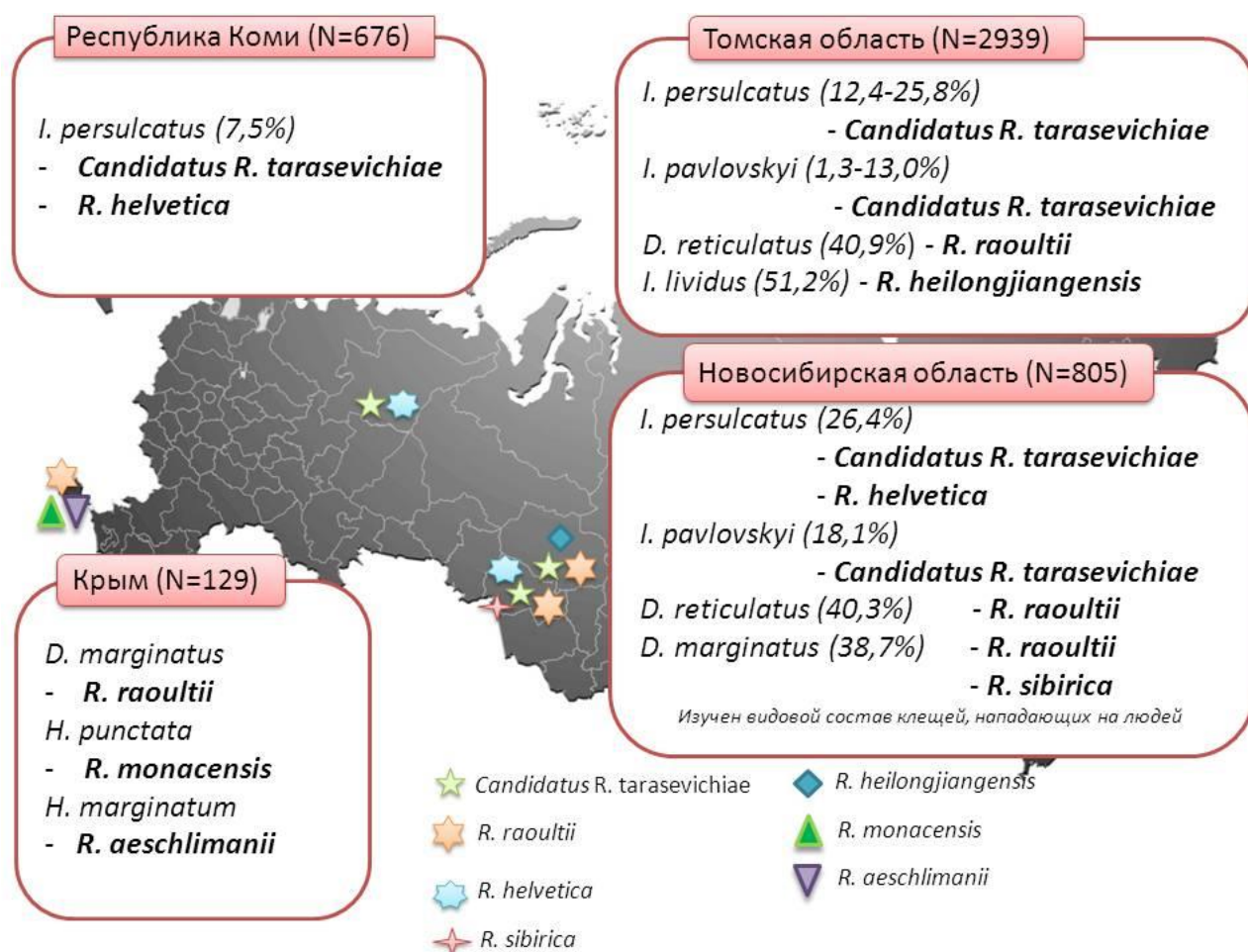


Рисунок 10. Данные о встречаемости в клещах различных видов риккетсий, полученные в работе.

ВЫВОДЫ

1. Разработана система праймеров и зонда для быстрой и высокочувствительной детекции риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки методом ПЦР в реальном времени в различных биологических образцах. На основе разработанной системы создан лабораторный вариант набора реагентов для выявления генетического материала риккетсий. Аналитическая чувствительность разработанного ПЦР-РВ теста составила 80 геном-эквивалентов на реакцию, аналитическая специфичность – 100 %.

2. Определен уровень инфицированности риккетсиями клещей родов *Ixodes* (*I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *I. lividus*) и *Dermacentor* (*D. reticulatus*, *D. marginatus*), отловленных в Томской и Новосибирской областях и Республике Коми. Уровень инфицированности риккетсиями у самок клещей рода *Ixodes* оказался достоверно выше в сравнении с самцами, а уровень инфицированности риккетсиями клещей вида *I. persulcatus* – достоверно выше по сравнению с инфицированностью клещей *I. pavlovskyi*.

3. Основными видами клещей, нападавших на людей в Новосибирской области, являлись *I. persulcatus*, *D. reticulatus*, *I. pavlovskyi*, *D. marginatus* на долю

которых приходилось 45 %, 33 %, 17 % и 5 % всех нападений, соответственно (по результатам анализа выборки из 500 образцов ДНК клещей, снятых с людей).

4. Анализ нуклеотидных последовательностей генов *gltA* и *ompB* риккетсий позволил выявить геномы *Candidatus R. tarasevichiae* в клещах *I. persulcatus* (уровень инфицированности от 12,4±2,1 % до 25,8±2,7 %) и в клещах *I. pavlovskyi* (1,3±0,9–13,0±2,6 %), собранных в Томской области; в клещах *I. persulcatus* (26,4±2,4 %) и в клещах *I. pavlovskyi* (18,1±1,8 %), собранных в Новосибирской области; в клещах *I. persulcatus* (2,8±0,6 %), собранных на территории Республики Коми. Генетический материал *R. raoultii* был обнаружен в клещах *D. reticulatus* (40,9±3,1 %), обитающих в городском биотопе г. Томска, в клещах *D. reticulatus* (40,3±3,5 %) и *D. marginatus* (38,7±2,9 %), снятых с людей в Новосибирской области. В единичном образце клеща *D. marginatus* выявлен генетический материал *R. sibirica*.

5. В клещах *I. lividus*, отловленных в Томской области и являющихся паразитами перелетных птиц, впервые выявлена ДНК риккетсий (уровень инфицированности – 51,2±5,5 %), генетически наиболее близких к *R. heilongjiangensis* (уровень идентичности нуклеотидной последовательности гена *gltA* составляет 99,1 %, гена *ompB* – 97,8 % в сравнении с известными прототипными штаммами).

6. Генетический материал *R. helvetica* был обнаружен в единичных особях *I. persulcatus*, обитающих в Новосибирской области, а также в клещах *I. persulcatus* (4,7±0,8 %), обитающих в Республике Коми. Геномы изолятов *R. helvetica* из Республики Коми характеризуются рядом уникальных нуклеотидных замен в генах *gltA* и *ompB* в сравнении с известными прототипными штаммами этого вида.

7. Впервые на территории полуострова Крым показано носительство клещами различных патогенных риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, помимо *R. conorii*. В частности, в клеще *D. marginatus* выявлен генетический материал *R. raoultii*, в клеще *H. punctata* – *R. monacensis*, в клеще *H. marginatum* – *R. aeschlimanii*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные статьи:

1) **Kartashov M.Y.**, Glushkova L.I., Mikryukova T.P., Korabelnikov I.V., Egorova Y.I., Tupota N.L., Protopopova E.V., Konovalova S.N., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Detection of Rickettsia helvetica and Candidatus R. tarasevichiae DNA in Ixodes persulcatus ticks collected in Northeastern European Russia (Komi Republic) // Ticks and Tick-borne Diseases. – 2017. – V. 8. – N. 4. – P. 588–592.

2) **Карташов М.Ю.**, Микрюкова Т.П., Терновой В.А., Москвитина Н.С., Локтев В.Б. Высокоэффективная детекция ДНК риккетсий методом ПЦР в реальном времени // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60 (12). – С. 39–43.

3) Moskvitina N.S., Korobitsyn I.G., Tyutenkov O.Y., Gashkov S.I., Kononova Y.V., Moskvitin S.S., Romanenko V.N., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., **Kartashov M.Y.**, Chausov E.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoy V.A., Loktev V.B. The Potential Role of Migratory Birds in the Spread of Tick-

borne Infections in Siberia and the Russian Far East // Achievements in the Life Sciences. – 2015. – V. 2. – P. 51.

4) Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Микрюкова Т.П., Кононова Ю.В., Коновалова С.Н., Тупота Н.Л., **Карташов М.Ю.**, Чаусов Е.В., Локтев В.Б. Возбудители инфекционных заболеваний в организме таежного клеща на территории Республики Коми // Дезинфекционное дело. – 2012. – №1. – С. 52-56.

5) Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Микрюкова Т.П., Кононова Ю.В., Коновалова С.Н., Тупота Н.Л., **Карташов М.Ю.**, Чаусов Е.В., Локтев В.Б., Егорова Ю.И. Выявление возбудителей заболеваний в *Ixodes persulcatus* на территории Республики Коми // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 88-91.

Патент:

1) **Карташов М.Ю.**, Микрюкова Т.П., Терновой В.А., Локтев В.Б. Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации генетического материала риккетсий методом ПЦР в реальном времени // Патент РФ № 2581952, приоритет изобретения от 09 июня 2015 г. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 29 марта 2016 г.

Тезисы научных конференций:

1) **Карташов М.Ю.**, Микрюкова Т.П., Терновой В.А., Москвитина Н.С., Локтев В.Б. Изучение встречаемости и генетического разнообразия возбудителей трансмиссивных инфекций, передающихся клещами *D. reticulatus* в городе Томске // III Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio», Новосибирск, 5-6 октября 2016 г. - С. 257-262.

2) **Карташов М.Ю.** Встречаемость и генетическое разнообразие риккетсий, выявленных в клещах на территории России // Ломоносов – 2016: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология», Москва, 11-15 апреля 2016 г. - С. 252.

3) **Карташов М.Ю.**, Тихонов С.Н., Микрюкова Т.П., Коваленко И.С., Терновой В.А., Барина О.Ю., Локтев В.Б. Генотипирование изолятов риккетсий, циркулирующих на территории Крыма // Материалы VIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 28–30 марта 2016 г. - С. 130

4) **Карташов М.Ю.**, Микрюкова Т.П., Терновой В.А. Разработка и апробация метода выявления возбудителей риккетсиозов в ПЦР с детекцией в режиме реального времени // 19-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино, 20-24 апреля 2015 г. – С. 21.

5) **Карташов М.Ю.**, Микрюкова Т.П., Терновой В.А., Москвитина Н.С., Корабельников И.В., Беклемишев А.Б., Тупота Н.Л., Протопопова Е.В., Нетесов С.В., Локтев В.Б. Встречаемость и генетическое разнообразие риккетсий в популяциях иксодовых клещей на территории Западной Сибири и Республики Коми. // Материалы Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней», Сочи, 25-26 мая 2015 г. – С. 229-234.

6) **Карташов М.Ю.**, Микрюкова Т.П., Терновой В.А., Москвитина Н.С., Локтев В.Б. Изучение распространения риккетсий и их переносчиков на территории Новосибирской области. // II Международная конференция молодых ученых:

биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio», Новосибирск, 1-2 октября 2015 г. – С. 173-177.

7) **Карташов М.Ю.**, Тупота Н.Л., Москвитина Н.С., Терновой В.А., Микрюкова Т.П., Локтев В.Б. Генотипирование изолятов риккетсий, циркулирующих на территории Новосибирской области. // Материалы VIII Всероссийского с международным участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз – Россия 2015», Новосибирск, 5–9 октября 2015 г. – С. 82.

8) **Карташов М.Ю.** Изучение и генетическое разнообразие риккетсий, выделенных из клещей в различных регионах России // Сборник тезисов I Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio», Кольцово, 2014 г. – С. 117-120.

9) **Карташов М.Ю.**, Микрюкова Т.П., Тупота Н.Л., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Москвитина Н.С., Корабельников И.В., Локтев В.Б. Молекулярно-генетические исследования распространенности риккетсий в различных природных очагах // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 4. – №1. – С. 70.

10) **Карташов М.Ю.**, Микрюкова Т.П., Тупота Н.Л., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Корабельников И.В., Локтев В.Б. Встречаемость и молекулярно-биологическая характеристика риккетсий из природных очагов Западной Сибири и Северного Урала // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014», Москва, 18-20 марта 2014 г. – С. 490-491.

11) Микрюкова Т.П., **Карташов М.Ю.**, Протопопова Е.В., Кононова Ю.В., Тупота Н.Л., Чаусов Е.В., Терновой В.А., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Гори А.Ф., Москвитина Н.С., Локтев В.Б. Генетические варианты риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки из различных эпидемически активных очагов. // Материалы IV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, Москва, 26–28 марта 2012 г. – С. 249-250.

Благодарности

Автор выражает благодарность коллегам, любезно предоставившим образцы клещей для данного исследования: сотрудникам кафедры зоологии позвоночных и экологии Томского государственного университета (зав. кафедрой – д.б.н., профессор Москвитина Н.С.), сотрудникам ФГУП «Дезинфекция» Роспотребнадзора (директор – д.м.н. Корабельников И.В.); сотрудникам ФГКУЗ «Противочумная станция Республики Крым» Роспотребнадзора (директор - к.м.н. Тихонов С.Н.).

Особую благодарность автор выражает своим научным наставникам к.б.н. Микрюковой Т.П. и к.б.н. Терновому В.А. за помощь в выборе темы, направления исследований и всестороннюю поддержку. За помощь в проведении исследования автор выражает искреннюю благодарность к.б.н. Тупоте Н.Л.

Автор благодарит своих коллег, в плодотворном сотрудничестве с которыми была выполнена диссертационная работа: д.б.н. Локтева В.Б., к.б.н. Чаусова Е.В., к.б.н. Протопопову Е.В., к.б.н. Чуб Е.В., к.б.н. Кононову Ю.В., к.ф.-м.н. Швалова А.Н., Коновалову С.Н., Семенцову А.О.

Автор выражает искреннюю признательность к.б.н. Романенко М.В. за ценные замечания при чтении и обсуждении данной работы.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю члену-корреспонденту РАН, д.б.н., проф. Нетёсову С.В. за осуществление общего руководства, а также активную поддержку в планировании, проведении и интерпретации результатов исследования.