

УДК 578.833.28:578.427(571.1)

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ В КЛЕЩАХ *DERMACENTOR RETICULATUS*, СОБРАННЫХ В ГОРОДСКИХ БИОТОПАХ г. ТОМСКА

© 2019 г. М. Ю. Карташов^{a,b}, Т. П. Микрюкова^a,
Е. И. Кривошеина^{a,b}, А. И. Кузнецов^{a,b}, В. Н. Романенко^c,
Н. С. Москвитина^c, В. А. Терновой^a, В. Б. Локтев^{a,b,*}

^a Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл. 630559, Россия

^b Национальный исследовательский Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова 2, Новосибирск 630090, Россия

^c Национальный исследовательский Томский государственный университет,
пр. Ленина 36, Томск 634050, Россия

*e-mail: loktev@vector.nsc.ru; valeryloktev@gmail.com

Поступила в редакцию 18.07.2019 г.

После доработки 22.08.2019 г.

Принята к публикации 28.08.2019 г.

Осенью 2015 г. было обнаружено более чем 200-кратное увеличение численности клещей *Dermacentor reticulatus* (Fabric., 1794) в городских биотопах г. Томска. Собранные в городских биотопах в 2016–2017 гг. клещи *D. reticulatus* исследованы на наличие генетических маркеров шести возбудителей клещевых инфекций с помощью ПЦР. Инфицированность клещей составила приблизительно 44–48 % для *Rickettsia* spp., 0.7–0.9 % для вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и достигала 0.6 % для *Anaplasma phagocytophilum*. Генетический материал вируса Кемерово, *Borrelia* spp. и *Coxiella burnetii* не обнаружен. Все выявленные изоляты риккетсий при генотипировании по пяти генам (*gltA*, *16S pPHK*, *ompA*, *ompB*, *geneD*) были отнесены к *Rickettsia raoultii*. Томские изоляты *R. raoultii* наиболее генетически близки к риккетсиям, циркулирующим во Франции. Анализ полных нуклеотидных последовательностей *groESL*-оперона *A. phagocytophilum* показал их схожесть (99 %) с изолятами, выделенными ранее в Томском регионе. Генотипирование ВКЭ выявило циркуляцию сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ. Таким образом, показано, что клещи *D. reticulatus* активно участвуют в формировании городских очагов клещевых инфекций в Томске.

Ключевые слова: *Dermacentor reticulatus*, клещевые инфекции, *Rickettsia raoultii*, *Anaplasma phagocytophilum*, вирус клещевого энцефалита, городские биотопы, Томск.

DOI: 10.1134/S0031184719050016

В последнее время в биотопах многих городов России отмечается увеличение численности иксодовых клещей, изменение их видового состава и увеличение их инфицированности возбудителями клещевых инфекций (Романенко, Кондратьева, 2011; Маль-

кова и др., 2012; Ястребов и др., 2012). Ранее в парках г. Томска и на его окраинах были обнаружены клещи, относящиеся к семейству Ixodidae: *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930), *Ixodes pavlovskyi* (Pomerantzev, 1946), *Dermacentor reticulatus* (Fabric, 1794), *Haemaphysalis concinna* (Koch, 1844), среди которых доминировали клещи *I. pavlovskyi* (Романенко, 2009). В последние годы *D. reticulatus* в окрестностях г. Томска обнаруживали в небольшом количестве, чаще всего в городской пойме реки Томь. Осенью 2015 г. впервые был обнаружен участок с высокой численностью клеща этого вида на склонах высокого берега р. Томь, биотоп «Лагерный сад» (Романенко и др., 2017). В предшествующие годы *D. reticulatus* встречался в этом городском биотопе в учётах только в 2012 и 2014 гг., при этом средняя сезонная численность в эти годы составляла 0.17 особей/уч. км. В середине сентября 2015 г. численность *D. reticulatus* достигла уровня 42 особей/уч. км., а в 2016 г. до 66 особей/уч. км.

Участие *D. reticulatus* в распространении клещевых инфекций непосредственно в городской черте Томска не было исследовано. Цель данного исследования заключалась в определении уровня инфицированности и генотипировании возбудителей клещевых инфекций в *D. reticulatus*, отловленных в городских биотопах г. Томска.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Сбор образцов проводили в весенне-летние периоды 2016–2017 гг. на территории городского биотопа «Лагерный сад» и примыкающих к историческому центру г. Томска парковых зон (Романенко и др., 2017). Сбор клещей проводили с растительности методом «на флаг». До начала исследования клещи хранили при -70°C , индивидуально. Принадлежность исследуемых клещей к виду *D. reticulatus* определяли морфологически с последующим подтверждением путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента митохондриального гена, кодирующего цитохромоксидазу субъединицу I (*COXI*).

Гомогенизацию полученных образцов осуществляли с использованием лабораторного гомогенизатора TissueLyserLT (Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл гомогената с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм РИБО-преп» («НексБио», Россия) согласно инструкции производителя. Получение кДНК осуществляли с помощью набора реагентов «РЕВЕРТА-L 100» («ИнтерЛабСервис», Россия).

Скрининг полученных образцов на наличие генетических маркеров изучаемых патогенов и выделение фрагментов для секвенирования проводили с помощью ПЦР. В табл. 1 представлен набор использованных праймеров, в том числе описанных ранее (Sumner et al., 1997; Liz et al., 2000; Fournier, Raoult 2003; Tkachev et al., 2017; Rar et al., 2017). Генотипирование изолятов выявленных патогенов осуществляли путем определения соответствующих нуклеотидных последовательностей и их дальнейшего анализа. Секвенирование продуктов амплификации проводили модифицированным методом Сэнгера на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора 3130x1 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems, США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программного продукта UniproUGENE v. 1.32 (Okonechnikov et al., 2012). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с ранее опубликованными при помощи поискового приложения BLAST.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма MUSCLE в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых фрагментов генома проводили методом максимального правдоподобия с использованием модели эволюции Tamura-Nei. Показатели статистической надежности узлов филогенетического дерева рассчитаны с помощью бутстреп-анализа с использованием 1000 случайных реплик. В базу данных GenBank депонированы определенные нуклеотидные последовательности гена *16S rRNA* (МК304546), *gltA* (МК304547), *ompA* (МК304548), *ompB* (МК304549), *geneD* (МК304550) – для *R. raoultii*, фрагмент гена E изолятов ВКЭ (МК419944-МК419947), фрагмент *groESL*-оперона *A. phagocytophilum* (KY379956).

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для выявления генетического материала клещевых патогенов и генотипирования вида клещей

Вид / Ген	Название	Структура праймера (5' → 3')
<i>D. reticulatus</i> / <i>cox1</i>	DH_f	TCGAWTAGAAAYTAAGACAACCTGG
	DH_r	GGTGRCCAAAAAATCAAAATARATG
TBEV / E-NS1 genes	E7	GGCATAGAAAGGCTGACAGTG
	E10	GATACCTCTCTCCACACAACCAG
	E9	ACAGTGATAGGAGAACACGCCTGGG
	E8	CAGCCAGGAGGAAGCTCATGGAC
KEMV / segment 1	Kem1s_1	TCCGCCACCCTGGAATGAGAC
	Kem1s_2	TCAGGATCGGTCAAGGCCATTC
<i>Borrelia</i> spp. / 5S-23S rRNA	NC1	CCTGTTATCATTCCGAACACAG
	NC2	TACTCCATTCGGTAATCTTGGG
<i>Coxiella burnetii</i> / <i>htpAB</i>	IS111F1	TACTGGGTGTTGATATTGC
	IS111R1	CCGTTTCATCCGCGGTG
<i>Rickettsia</i> spp. / 16S rRNA	r_F88	ТААСТАТАССТАСССАААГСГА
	r_R797	СТТССААСТТАСТАААССССТ
	r_F599	АААГССТГАТССАГСААТАСС
	r_R1293	ГГАСТТААСССААСАТСАСГА
	r_F1167	АААССТАССААСССТТАС
	R_r1702	ГТАССТТГТАСГАСТТАС
<i>Rickettsia</i> spp. / <i>sca4(geneD)</i>	D_1F	ТГАТАСААСАТССГСТТАС
	D_R2	ГГТТТГСАТТАСТТАТТГСГА
	D_2F	АААТГАТГСАГГТГАТГААСТС
	D_3R	ТССГСАТТГСТТААТТАСАГА
	D_F3	ГААСААСССГТААТААСТССА
	R_4R	ААСАГСГТААТТАСТТАСССА
	D_F5	ГГАТТТТАТГААГГСАААГГАГГ
	D_R5	АТСТТАТГАТСАГСГТТГТГГАГ
<i>Rickettsia</i> spp. / <i>gltA</i>	CS1d	АТГАСТААТГГСААТААТАА
	CS535r	ГААТАТТТАААГАСАТТАС
	CS409d	ССТАТГГСТАТТАТГСТТАС
	RP1258n	АТТГСАААААГТАСАГТГААСА
	RgA-f	СААТСССГСТТАСАААТАСГА
<i>Rickettsia</i> spp. / <i>ompA</i>	RgA-r	ГТСААТАААСТТТТСАСАГАТГГ
	rA-F2624	ГТГСТААТГААГГТГАТГТАГТС
	rA-R3292	СТААГАААСССГААТАТТАСС
	rA-F3001	ГСГААТАТАСАСССТГАТААТГАС
	rA-R3771	ГГСТАААГТААСССАССТГ

Вид / Ген	Название	Структура праймера (5'→3')
<i>Rickettsia</i> spp. / <i>ompB</i>	rA-F3733	GCCGATACATTCACTAATACAGG
	rA-4599	CTTAGCATCCATATCTTCATCACC
	RrB_1f	GCAGAATAGAACAACAAACGG
	RrB_1r	CTACGCTAACAAACAATCCTG
	RrB_2f	GCAGGATTTGTTGTTAGCGT
	RrB_2r	ACTACCGTCTAAGGTAATAGCAC
	RrB_3f	ATCGGAGTTGTCCAATTATCAG
	RrB_3r	ACCGCTTACTATATTTGTTCCACC
	RrB_4f	ACAGTTCAGTACAATTCGCTC
	RrB_4r	GGAGTATTAGGAACACCACCA
	RrB_5f	GGTGAACAAATATAGTAAGCGG
	RrB_5r	CCAATACCTGTGCCTAAGCC
	RrB_6f	AACGCAACAATTAATGACGG
	RrB_6r	CGGTTACAGCAAAGTTAGGA
	RrB_7f	TAGGTCTTGGAAAGCGATAACGG
	RrB_7r	CAGCCATTTACAGCAGTTTCAG
	RrB_8f	GCTCAACTTGGTAACAGATTAGG
RrB_8r	CGTAACCGATTCCGTACTCC	
<i>Anaplasma</i> spp. / <i>groESL</i> -оперон	HS1-f	CGYCAGTGGGCTGGTAATGAA
	HS6-r	CCWCCWGGTACWACACCTTC
	HS3-f	ATAGTYATGAAGGAGAGTGAT
	HSVR	TCAACAGCAGCTCTAGTWG

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование вошла выборка из 315 клещей вида *D. reticulatus* (187 самок и 128 самцов), собранных с растительности на территории городских биотопов в сентябре 2016 г., и 135 клещей (83 самки и 52 самца), собранных аналогичным образом в 2017 г. Тестирование наличия генетических маркеров ВКЭ, вируса Кемерово, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Anaplasma* spp. в собранных клещах *D. reticulatus* было проведено методами ПЦР для каждой особи клеща индивидуально.

ДНК *Rickettsia* spp. была выявлена в 139 клещах, отловленных в 2016 г.; таким образом уровень инфицированности составил 44.1±2.7 %. В 2017 г. уровень инфицированности составил 48.1±4.3 % (инфицированными оказались 65 из 135 исследуемых клещей). Достоверных различий в уровне инфицированности риккетсиями у самцов и самок клещей *D. reticulatus* не было установлено (в 2016 г. уровень инфицированности самок и самцов соответственно составил 45.4±3.6 % и 42.2±4.2 %; в 2017 г. – у самок составил 49.4±5.4 %, у самцов – 46.1±6.8 %). Все выявленные изоляты риккетсий при предварительном генотипировании по нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитратсинтазы *gltA* (767 п.н.) были отнесены к *R. raoultii*. При сравнении нуклеотидных последовательностей данного локуса все изоляты оказались полностью идентичными друг другу.

Генетический материал ВКЭ был обнаружен в четырех образцах клещей, уровень инфицированности составил 0.9 ± 0.5 % в 2016 г. и 0.7 ± 0.5 % в 2017 г. ВКЭ был обнаружен как у самок (3 особи), так и у самцов (1 особь). На рис. 1 представлены филогенетические взаимоотношения различных штаммов ВКЭ и основных генотипов данного вида вируса. Три изолята были отнесены к сибирскому субтипу ВКЭ, показав уровень гомологии на 99.8 % между собой и 98.5–99.0 % с изолятами Lesopark 11 и Кемерово-134-08, циркулирующими в Новосибирской и Кемеровской областях. Один изолят был отнесен к дальневосточному субтипу ВКЭ, т. к. показал наибольшую гомологию на уровне 98.6 % с изолятами Tomsk-PT12, Tomsk-PT14 и Tomsk-M83, ранее обнаруженными в Томской области (Ternovoi et al., 2019).

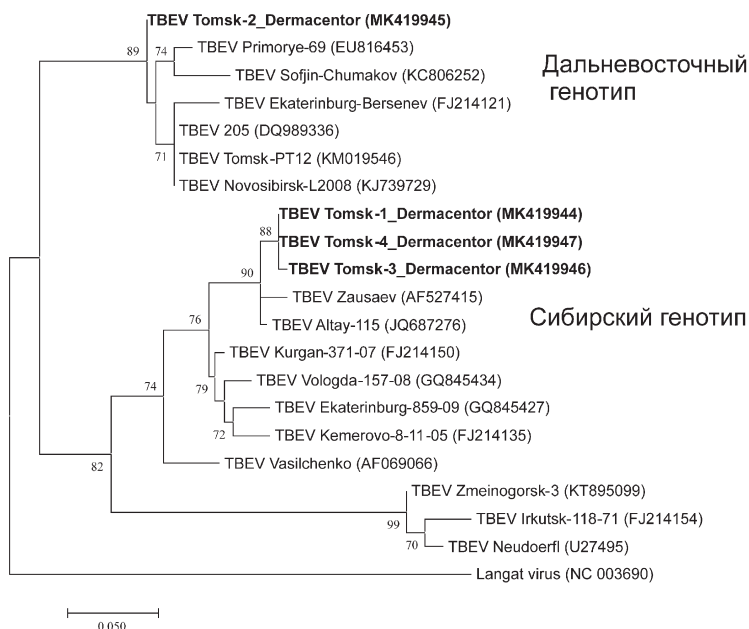


Рис. 1. Филогенетическое дерево для последовательностей ВКЭ.

Дендрограмма, построена на основе нуклеотидных последовательностей ВКЭ для фрагментов гена, кодирующего структурный белок Е и относящихся к трем основным генотипам ВКЭ. Анализ проведен методом максимального правдоподобия с использованием модели Tamura – Nei. Указаны индексы статистической поддержки узлов (>70 %), вирус Лангат использован в качестве внешней группы сравнения, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик. В скобках указаны номера доступа в GenBank.

В ходе исследования в двух образцах *D. reticulatus* была выявлена ДНК *A. phagocytophilum*. Уровень инфицированности в 2016 г. составил 0.6 ± 0.4 %. Нуклеотидные последовательности *groESL*-оперона двух изолятов оказались полностью идентичными друг другу. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей *groESL*-оперона выявленных изолятов составил более 99 % по сравнению с изолятами *A. phagocytophilum*, выделенными из клещей рода *Ixodes* на близлежащих территориях.

Генетический материал вируса Кемерово, *Borrelia* spp., включая *B. miyamotoi* и *Coxiella burnetii*, в собранных образцах клещей методом ПЦР не был выявлен. Вероятно, его отсутствие связано с отсутствием или низкой концентрацией этих патогенов в собранных клещах *D. reticulatus*.

Для определения полноразмерных нуклеотидных последовательностей маркерных генов нами был проведен дизайн олигонуклеотидных праймеров, основанный на доступных последовательностях *R. raoultii* (GenBank). В работе были определены полноразмерные нуклеотидные последовательности 5 маркерных генов: *16SpPHK* (GenBank, номер доступа МК304546), *gltA* (МК304547), *ompA* (МК304548), *ompB* (МК304549), *geneD* (МК304550). На филогенетических деревьях, построенных по каждому из перечисленных генов, все выявленные изоляты риккетсий, кластеризуются в кладу, сформированную прототипными штаммами *R. raoultii* (рис. 2А–2D).

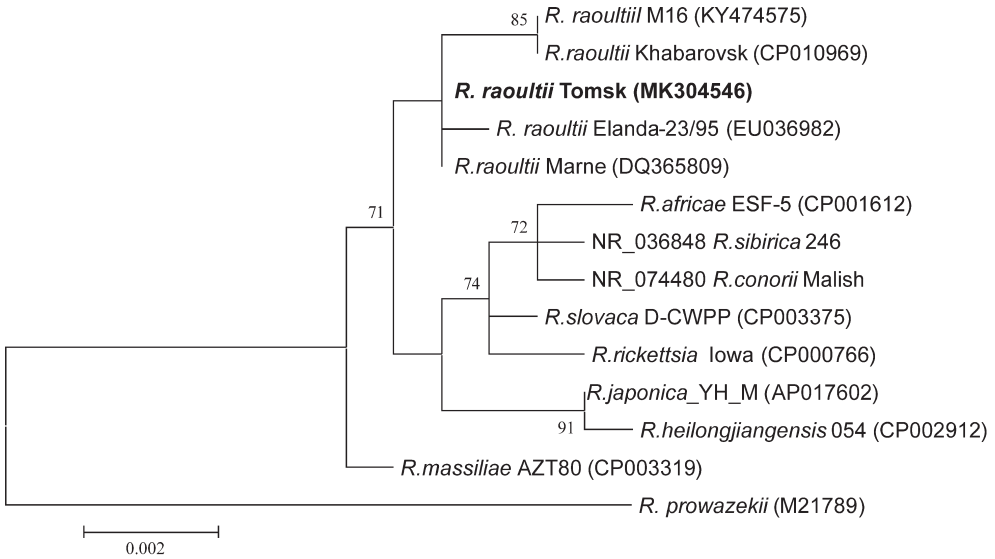


Рис. 2А

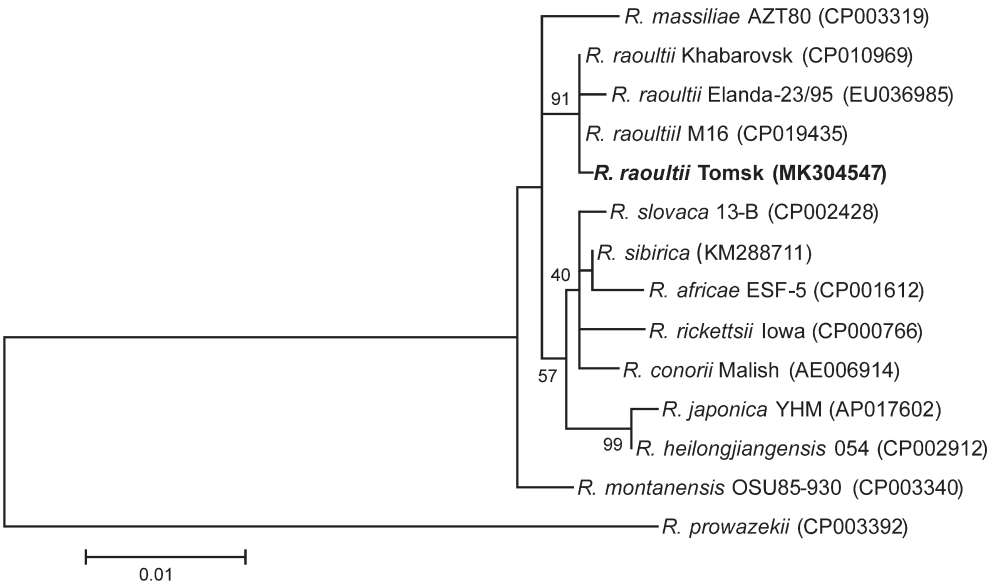


Рис. 2В



Рис. 2С

Рис. 2D

Рис. 2. Филогенетические деревья для последовательностей *Rickettsia* spp.

Дендрограммы, построенные на основе нуклеотидных последовательностей генов различных видов риккетсий: (А) для 16S rRNA (1417 п.н.), (В) для гена *gLH4* (1234 п.н.), (С) для гена *ompB* (4746 п.н.), (D) для гена *scd4(geneD)* (2926 п.н.). Анализ проведен методом максимального правдоподобия с использованием модели Tamura – Nei. Указаны индексы статистической поддержки узлов (>40 %), *R. prowazekii* использована в качестве внешней группы сравнения, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик. В скобках указаны номера доступа в GenBank.

Нуклеотидная последовательность гена *16S pPHK* изучаемых изолятов на 100 % идентична последовательности штамма Marne *R. raoultii* (DQ365809), имеет одну нуклеотидную замену по сравнению с последовательностью гена *16S pPHK* штамма Elanda-23/95 (EU036982) и 3 нуклеотидные замены по сравнению с последовательностями штаммов Khabarovsk (CP010969) и IM16 *R. raoultii* (KY474575). Анализ нуклеотидной последовательности гена *16S pPHK* изучаемых изолятов показал наибольшую гомологию (99.9 %) со штаммом Marne (DQ365797), уровень гомологии со штаммами Khabarovsk (CP010969) и IM16 (CP019435) составил около 99.7 %.

Нуклеотидная последовательность гена *gltA R. raoultii* имеет одну нуклеотидную замену по сравнению с прототипным штаммом Khabarovsk (CP010969), выделенным из клеща *D. silvarum* в Хабаровском крае в 2005 г., и штаммом IM16 (CP019435). При проведении филогенетического анализа томские изоляты кластеризуются вместе с этими штаммами на филогенетическом дереве (рис. 2B). По сравнению со штаммом Elanda-23/95 (EU036985), выделенным из клеща *D. nuttalli* на Алтае в 1995 г., в нуклеотидной последовательности гена *gltA* обнаружены три замены. Уровень гомологии соответствующих аминокислотных последовательностей идентичен на 100 % у выявленных нами изолятов риккетсий и прототипных штаммов Khabarovsk и IM16 *R. raoultii*. В аминокислотной последовательности цитратсинтазы штамма Elanda-23/95 выявлены два аминокислотных замещения по сравнению с вышеперечисленными штаммами ($E_{93} \rightarrow K$; $E_{281} \rightarrow K$).

Филогенетическое дерево, представленное на рис. 2C, также показывает кластеризацию томских изолятов по гену *ompB* с описанными выше изолятами риккетсий. Уровень гомологии нуклеотидной последовательности гена *ompB* томских изолятов при сравнении со штаммами Marne (AH015609) и Crimea-1 *R. raoultii* (KU961541) составил 99.9 %; со штаммами Khabarovsk (CP010969) и IM16 (CP019435) – 99.7 %; а для штамма Elanda-23/95 (EU036984) составил 99.5 %.

Уровень гомологии нуклеотидной последовательности гена *geneD* томских изолятов по сравнению с другими географическими вариантами *R. raoultii* составлял от 99.2 % до 99.9 %. Анализ филогенетических взаимоотношений подтвердил данные полученные при анализе генов *16S pPHK*, *gltA*, *ompA*, *ompB* (рис. 2D).

В табл. 2 представлены данные по выявленным несинонимичным заменам в гене *ompB* изолята Tomsk (MK304549) по сравнению с другими изолятами риккетсий. Наименьшее количество замен было обнаружено у штамма Marne по сравнению с томскими изолятами *R. raoultii*. В гене *ompB* было обнаружено всего 3 несинонимичные замены, что показывает фактическую идентичность гена *ompB* для различных географических изолятов риккетсий. Штаммы Khabarovsk и Elanda-23/95 имеют 9 и 13 несинонимичных замен, соответственно. Причем оба штамма имеют делецию триплета в гене *ompB*, что приводит к утрате аминокислотного остатка позиции 529.

Таблица 2. Несинонимичные замены в гене *ompB* изолята Tomsk *R. raoultii* (МК304549) по сравнению с прототипными штаммами.

	№ аминокислотной позиции	Прототипный штамм → изучаемый изолят
Штамм Marne (DQ365797)		
1	976	P (CCT) → T (ACT)
2	1262	K (AAA) → Q (CAA)
3	1490	R (AGA) → S (AGC)
Штамм Khabarovsk (CP010969)		
1	90	S (TCC) → A (GCC)
2	478	F (TTT) → L (CTT)
3	487	G (GGT) → S (AGT)
4	529	S (TCG) → делеция триплета
5	560	T (ACT) → A (GCT)
6	731	L (TT G) → F (TT T)
7	824	V (G TT) → G (G GT)
8	1460	K (AA G) → N (AA T)
9	1529	A (G CC) → V (G TC)
Штамм Elanda-23/95 (EU036984)		
1	10	P (CCA) → T (ACA)
2	90	S (TCC) → A (GCC)
3	229	T (ACT) → A (GCT)
4	478	F (TTT) → L (CTT)
5	487	G (GGT) → S (AGT)
6	529	S (TCG) → делеция триплета
7	560	T (ACT) → A (GCT)
8	731	L (TT G) → F (TT T)
9	824	V (GTT) → G (CGT)
10	1391	N (AA T) → K (AAA)
11	1392	S (TCT) → T (ACT)
12	1409	D (G AT) → G (G GT)
13	1460	K (AA G) → N (AA T)
14	1529	A (G CC) → V (G TC)

Нуклеотидная последовательность *groESL*-оперона томских изолятов *A. phagocytophilum* отличается всего двумя нуклеотидными заменами от последовательности изолята Tomsk-Ipr1 *A. phagocytophilum* (KF701460), выделенного нами ранее на территории Томской области из клеща *I. persulcatus*. Одна из нуклеотидных замен является несинонимичной и приводит к аминокислотному замещению T₁₉₂ → M.

Сравнение с другими изолятами Nov-Ip456 (HM366570, клещ *I. persulcatus*) и Omsk-vole 79 *A. phagocytophilum* (KF745744, красная полевка) позволяют выявить в ну-

клеотидной последовательности *groESL*-оперона томского изолята 3 нуклеотидные замены, одна из которых является несинонимичной ($T_{192} \rightarrow M$); по сравнению с Tuva-Ip2947 *A. phagocytophilum* (KC753764) (*I. persulcatus*, Республика Тыва); 4 замены, одна из которых является несинонимичной ($T_{192} \rightarrow M$); сравнение с изолятом Kh-Ip144 (HM366577) (*I. persulcatus*, Красноярский край) позволяет выявить 66 нуклеотидных замен, две из которых приводят к аминокислотным замещениям ($T_{192} \rightarrow M$; $S_{242} \rightarrow A$). Таким образом, изолят *A. phagocytophilum*, выделенный из клеща *D. reticulatus*, характеризуется уникальной заменой ACG(T_{192}) \rightarrow ATG(M). Эта замена нехарактерна для других изолятов, ранее выделенных из клещей *I. persulcatus* в Сибири.

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день отмечается тенденция к формированию стойких очагов клещевых инфекций на городских и пригородных территориях. Клещи, заселяющие городские парки и скверы, представляют особую опасность, так как городские жители воспринимают городскую среду как свободную от клещей. Ранее в парках г. Томска обнаруживались клещи, относящиеся к семейству Ixodidae: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskiyi*, *Dermacentor reticulatus*., *Haemaphysalis concinna* при доминировании клещей *I. pavlovskiyi* (Романенко, 2009). При этом их численность была многократно ниже, чем в пригородных биотопах. Неожиданно, осенью 2015 г. было обнаружено более чем 200-кратное увеличение численности клещей *D. reticulatus* в городском парке в центре города (Романенко и др., 2017). Вероятно, высокую численность популяции этого вида обеспечил ряд условий. После разрушительного оползня в 1975 г., снесшего весь растительный покров, были предприняты рекультивационные работы, в итоге которых сформировался террасированный склон, поросший травами и низким кустарником. С учетом хорошей инсоляции создались благоприятные условия для расширения ареала *D. reticulatus*, исходно предпочитающего лесостепные ландшафты. Конкретные погодные условия описываемого периода, когда температура сентября колебалась в пределах 6–23 °C, способствовали массовому метаморфозу нимф, что, вероятно, привело к взрывному росту численности имаго.

Высокая концентрация клещей позволила впервые собрать 450 особей вида *D. reticulatus* в черте г. Томска в течение 2016–2017 гг. Это дало возможность провести методом ПЦР анализ индивидуальных клещей на наличие генетических маркеров возбудителей шести клещевых инфекций вирусной и бактериальной природы, а также выполнить таксономическую идентификацию выявленных возбудителей клещевых инфекций на основе анализа их геномных последовательностей.

Наиболее часто выявлялась ДНК *Rickettsia* spp., при этом уровень инфицированности индивидуальных клещей колебался от 44.1±2.7 до 48.1±4.3 %. Предварительное генотипирование по нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитратсинтазы *gltA* (767 п.н.) позволило отнести томские изоляты к *R. raoultii*. Для более точной генетической характеристики были определены полноразмерные нуклеотидные последовательности 5 маркерных генов: *16S pPHK*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *geneD*. Проведенный анализ по этим генам показал, что изучаемые изоляты *R. raoultii* наиболее близки к штамму Marne, выделенному на востоке Франции из клеща *D. reticulatus*. Изоляты, циркулирующие на близлежащих территориях (*R. raoultii* штамм Elanda-23/95 – Алтай; штамм Khabarovsk – Хабаровский край), но выделенные от клещей других видов

(*D. nuttalli* и *D. silvarum*, соответственно), также кластеризуются вместе с томскими изолятами. *R. raoultii* как новый вид была описана в 2008 г., когда был изучен прототипный штамм Khabarovsk, выделенный в 2005 г. из клеща *D. silvarum* в Хабаровском крае (Mediannikov et al., 2008). Позднее, *R. raoultii* была обнаружена у клещей рода *Dermacentor* (*D. reticulatus*, *D. marginatus* и *D. nuttalli*), отловленных в ряде регионов азиатской части России (Омская и Новосибирская области, Республика Бурятия) и Казахстане (Rydkina et al., 1999; Shrynov et al., 2006). Также имеются сообщения о широком распространении *R. raoultii* на территории Китая (Song et al., 2018; Liu et al., 2016; Jia et al., 2014) и Монголии (Boldbaatar et al., 2017). Помимо хорошо известной циркуляции *R. raoultii* в Европе (Parola et al., 2013), данный вид риккетсий выделен из клещей рода *Dermacentor* в Японии и Таиланде (Nooroong et al., 2018), а также найден в клещах *D. marginatus* в Грузии и Турции (Jiang et al., 2012; Gargili et al., 2012).

В настоящее время серологическими методами и выявлением ДНК возбудителя в крови больных подтверждена роль *R. raoultii* в качестве этиологического агента синдрома TIBOLA (**t**ick-**b**orne **l**ymphadenopathy), который характеризуется первичным аффектом, окруженным эритемой и развивающимся в месте присасывания клеща, а также болезненностью ближайших лимфоузлов (Świtaj et al., 2012; Silva-Pinto et al., 2014). У больных развивается астенический синдром, в четверти случаев наблюдается лихорадка (>38°C). У большинства пациентов эритема сохраняется до 1–2 месяцев. Недавно генетический материал *R. raoultii* был выделен в клиническом материале от трех пациентов на территории Новосибирской области (Igolkina et al., 2018). Встречаются заболевания с атипичной клинической картиной, причем очень часто существующие тест-системы не выявляют риккетсиозы, вызываемые *R. raoultii*. Это позволяет предположить, что синдром TIBOLA может стать новым инфекционным заболеванием для городских биотопов Томска с высоким уровнем встречаемости клещей *D. reticulatus*.

Генетический материал ВКЭ был обнаружен в 0.7–0.9 % исследованных клещей. Его генотипирование показало, что ВКЭ представлен дальневосточным и сибирским генотипами этого вируса. Циркуляция этих двух генотипов характерна для юга Западной Сибири и Томского региона (Mikryukova et al., 2014; Ternovoi et al., 2019). Ранее занос этого возбудителя в городские биотопы предположительно связывался с клещами *I. persulcatus* и *I. pavlovskiyi* и различными видами птиц. Характерной особенностью этих генотипов ВКЭ является способность сибирского генотипа вызывать хронические формы клещевого энцефалита, а дальневосточный генотип ассоциируется с тяжелыми формами клещевого энцефалита с высоким уровнем смертности.

Генетический материал *A. phagocytophilum* был выявлен в двух клещах, что существенно ниже, чем ранее было описано для клещей *D. reticulatus*, собранных в европейских природных биотопах (Ben, Lozynskiy, 2019). Генотипирование по *groESL*-оперону показало идентичность генетического материала с ранее выделенными вариантами этого возбудителя в Томском регионе. Гранулоцитарный анаплазмоз человека, как и синдром TIBOLA, является возможным новым инфекционным заболеванием для Томска. Полученные данные подтверждают необходимость мониторинга циркуляции *R. raoultii* и *A. phagocytophilum* в природных очагах клещевых инфекций г. Томска и Томской области, дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этой инфекции, включая выявление возможных случаев заболевания человека в этом регионе.

Нам не удалось обнаружить генетический материал вируса Кемерово, *Borrelia* spp. и *Coxiella burnetii* в собранных клещах *D. reticulatus* в городских биотопах сибирского мегаполиса. Тем не менее, имеются сообщения об обнаружении генетического материала этих возбудителей в природных биотопах ряда регионов и стран. Так, ДНК *Borrelia* spp. была обнаружена в клещах *D. reticulatus* в странах Восточной Европы (Mierzejewska et al., 2015; Zajac et al., 2017). В России вирус Кемерово был обнаружен в клещах *D. reticulatus* в Курганской области (Dedkov et al., 2014). ДНК *Coxiella burnetii* была ранее обнаружена в клещах *D. reticulatus* на территории Великобритании, Германии и Нидерландов, Белоруссии (Tijssse-Klasen et al., 2013; Sprong et al., 2019; Reye et al., 2013). Представляется, что занос этих инфекционных агентов на городскую территорию также вполне вероятен.

Таким образом, проведено исследование возможной роли *D. reticulatus* в распространении клещевых инфекций непосредственно в городской черте г. Томска. Выполнено тестирование наличия генетических маркеров ВКЭ, вируса Кемерово, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Anaplasma* spp. в клещах *D. reticulatus*, отловленных в черте г. Томска методом ПЦР. Обнаружены генетические маркеры ВКЭ, *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp. Инфицированность клещей достигала 0.6 %, для *Anaplasma* spp., составила 0.7–0.9 % для ВКЭ и 44–48 % для *Rickettsia* spp. На основе секвенирования выделенных фрагментов генов этих возбудителей проведено генотипирование возбудителей клещевых инфекций. Выявлен генетический материал характерный для сибирского и дальневосточного генотипа ВКЭ, *R. raoultii*, *A. phagocytophilum* в клещах *D. reticulatus*. Определены полные последовательности пяти генов (*gltA*, *16S pPHK*, *ompA*, *ompB*, *geneD*) томских изолятов *Rickettsia raoultii* и *groESL*-оперона *A. phagocytophilum*. Последовательности депонированы в GenBank.

Высказано предположение, что данные возбудители клещевых вирусных и бактериальных инфекций принимают участие в формировании городских очагов клещевых инфекций, в том числе и новых инфекций, в парковой зоне г. Томска.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования поддержаны Российской федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и при поддержке Программы повышения конкурентоспособности ТГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Малькова М.Г., Якименко В.В., Танцев А.К. 2012. Изменение границ ареалов пастбищных иксодовых клещей рода *Ixodes* latr., 1795 (Parasitiformes, Ixodidae) на территории Западной Сибири. *Паразитология* **46** (5): 369–383.
- Романенко В.Н. 2009. Мониторинг видового состава и численности иксодовых клещей (Parasitiformes, Ixodidae) в антропогенных биотопах. *Вестник Томского государственного университета* **324**: 376–379.
- Романенко В.Н., Кондратьева Л.М. 2011. Зараженность иксодовых клещей, снятых с людей, вирусом клещевого энцефалита на территории города Томска и его окрестностей // *Паразитология* **45** (1): 3–10.

- Романенко В.Н., Соколенко В.В., Максимова Ю.В. 2017. Локальное формирование высокой численности клещей *Dermacentor reticulatus* (Parasitiformes, Ixodidae) в Томске. *Паразитология* **51** (4): 345–353.
- Ястребов В.К., Рудаков Н.В., Шпынов С.Н. 2012. Трансмиссивные клещевые природно-очаговые инфекции в Российской Федерации: тенденции эпидемического процесса, актуальные вопросы профилактики. *Сибирский медицинский журнал* **111** (4): 91–93.
- Ben I., Lozynski I. 2019. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* and coinfection with *Borrelia burgdorferi* and tick-borne encephalitis virus in western Ukraine. *Vector-Borne Zoonotic Diseases* 2019 June 18. DOI: 10.1089/vbz.2019.2450
- Boldbaatar B., Jiang R.-R., von Fricken M.E., Lkhagvatseren S., Nymadawa P., Baigalmaa B., Wang Y.-W., Anderson B. D., Jiang J.-F., Gray G.C. 2017. Distribution and molecular characteristics of rickettsiae found in ticks across Central Mongolia. *Parasites and Vectors* **10** (1): 61. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1981-3>
- Dedkov V.G., Markelov M.L., Gridneva K.A., Bekova M.V., Gmyl A.P., Kozlovskaya L.I., Karganova G.G., Romanova L.I., Pogodina V.V., Yakimenko V.V., Shipullin G.A. 2014. Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **5** (6): 651–655. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.017>
- Fournier P.E., Raoult D. 2003. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(11):5094–5098. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5094-5098.2003
- Gargili A., Palomar A. M., Midilli K., Portillo A., Kar S., Oteo J.A. 2012. Rickettsia species in ticks removed from humans in Istanbul, Turkey. *Vector-Borne Zoonotic Diseases* **12** (11): 938–941. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.0996>
- Igolkina Y., Krasnova E., Rar V., Savelieva M., Epikhina T., Tikunov A., Khokhlova N., Provorova V., Tikunova N. 2018. Detection of causative agents of tick-borne rickettsioses in western Siberia, Russia: Identification of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia sibirica* DNA in clinical samples. *Clinical Microbiology Infection* **24** (2): 199. e9-199.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.003>.
- Jia N., Zheng Y.-C., Ma L., Huo Q.-B., Ni X.-B., Jiang B.-G., Chu Y.-L., Jiang R.-R., Jiang J.-F., Cao W.-C. 2014. Human infections with *Rickettsia raoultii*, China. *Emerging Infectious Diseases* **20** (5): 866–868. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130995>
- Jiang J., You B.J., Liu E., Apte A., Yarina T.R., Myers T.E., Lee J.S., Francesconi S.C., O'Guinn M.L., Tsertsvadze N., Vepkhvadze N., Babuadze G., Sidamonidze K., Kokhreidz M., Donduashvili M., Onashvili T., Ismayilov A., Agayev N., Aliyev M., Muttalibov N., Richards A.L. 2012. Development of three quantitative real-time PCR assays for the detection of *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia slovaca*, and *Rickettsia aeschlimannii* and their validation with ticks from the country of Georgia and the Republic of Azerbaijan. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **3** (5–6): 327–331. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.004>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33** (7): 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Liu H., Li Q., Zhang X., Li Z., Wang Z., Song M., Wei F., Wang S., Liu Q. 2016. Characterization of rickettsiae in ticks in northeastern China. *Parasite and Vectors* **9** (1): 498. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1764-2>
- Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F. 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 1002–1007.
- Mediannikov O., Matsumoto K., Samoilenko I., Drancourt M., Roux V., Rydkina E., Davoust B., Tarasevich I., Brouqui P., Fournier P.-E. 2008. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58** (Pt 7): 1635–1639. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64952-0>
- Mierzejewska E.J., Pawelczyk A., Radkowski M., Welc-Fałęciak R., Bajer A. 2015. Pathogens vectored by the tick, *Dermacentor reticulatus*, in endemic regions and zones of expansion in Poland. *Parasites and Vectors* **8** (1): 490. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1099-4>
- Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Kononova Y.V., Korobitsyn I.G., Kartashov M.Y., Tyutenkov O.Y., Protopopova E.V., Romanenko V.N., Chausov E.V., Gashkov S.I., Konovalova S.N., Moskvitin S.S., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. 2014. Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia). *Ticks and Tick-Borne Diseases* **5** (2):145–151. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.10.004
- Nooroong P., Trinachartvanit W., Baimai V., Ahantari, A. 2018. Phylogenetic studies of bacteria (*Rickettsia*, *Coxiella* and *Anaplasma*) in *Amblyomma* and *Dermacentor* ticks in Thailand and their co-infection. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **9** (4): 963–971. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.027>

- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., 2012. Unipro UGENE: A Unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **28** (8): 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P. E., Raoult D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews* **26** (4): 657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>
- Rar V., Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Y., Igolkina Y., Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I., Tikunova N. 2017. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia. *Parasites and Vectors* **10** (1): 258. DOI: 10.1186/s13071-017-2186-5
- Reye A.L., Stegnyy V., Mishaeva N.P., Velhin S., Hübschen J.M., Ignatyev G., Muller C.P. 2013. Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *PLoS ONE* **8** (1): e54476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054476>
- Rydkina E., Roux V., Fetisova N., Rudakov N., Gafarova M., Tarasevich I., Raoult D. 1999. New *Rickettsiae* in ticks collected in territories of the former Soviet Union. *Emerging Infection Diseases* **5** (6): 811–814. <https://doi.org/10.3201/eid0506.990612>
- Ternovoi V.A., Gladysheva A.V., Ponomareva E.P., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chausov E.V., Loktev V.B. 2019. Variability 3' untranslated region genome of the tick-borne encephalitis viruses as possible factor for viral evolution. *Virus Genes*. **55** (4): 448–457. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01672-0>
- Tijssse-Klasen E., Hansford K. M., Jahfari S., Phipps P., Sprong H., Medlock J. M. 2013. Spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis punctata* ticks in the UK. *Parasites and Vectors* **6** (1): 212. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-212>
- Tkachev S.E., Tikunov A.Y., Babkin I.V., Livanova N.N., Livanov S.G., Panov V.V., Yakimenko V.V., Tantsev A.K., Taranenko D.E., Tikunova N.V. 2017. Occurrence and genetic variability of Kemerovo virus in *Ixodes* ticks from different regions of Western Siberia, Russia and Kazakhstan. *Infection Genetics and Evolution* **47**: 56–63. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.11.007
- Shpynov S., Fournier P.-E., Rudakov N., Tarasevich I., Raoult D. 2006. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1078**: 378–383. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.075>
- Silva-Pinto A., Santos M. de L., Sarmento A. 2014. Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **5** (6): 656–659. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.016>
- Song, S., Chen, C., Yang, M., Zhao, S., Wang, B., Hornok, S., Makhatov, B., Rizabek, K., Wang, Y. 2018. Diversity of *Rickettsia* species in border regions of northwestern China. *Parasites and Vectors* **11** (1): 634. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3233-6>
- Sprong H., Fonville M., Docters van Leeuwen A., Devillers E., Ibañez-Justicia A., Stroo A., Hansford K., Cull B., Medlock J., Heyman P., Cochez C., Weis L., Silaghi C., Moutailler S. 2019. Detection of pathogens in *Dermacentor reticulatus* in northwestern Europe: evaluation of a high-throughput array. *Heliyon* **5** (2): e01270. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01270>
- Sumner J.W., Nicholson W.L., Massung R.F., 1997. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heatshock operon of *Ehrlichia* species. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2087–2092.
- Świtaj K., Chmielewski T., Borkowski P., Tylewska-Wierzbanowska S., Olszynska-Krowicka M., 2012. Spotted fever rickettsiosis caused by *Rickettsia raoultii* – case report. *Przegląd Epidemiologiczny* **66** (2): 347–50.
- Zajac V., Wojcik-Fatla A., Sawczyn A., Cisak E., Sroka J., Kloc A., Zajac Z., Buczek A., Dutkiewicz J., Bartosik K. 2017. Prevalence of infections and co-infections with 6 pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. *Annals of Agricultural Environmental Medicine* **24** (1): 26–32. <https://doi.org/10.5604/12321966.1233893>

GENOTYPING OF TICK-BORNE INFECTIONS IN *DERMACENTOR RETICULATUS* TICKS COLLECTED IN URBAN FOCI OF TOMSK

M. Y. Kartashov, T. P. Mikryukova, E. I. Krivosheina, A. I. Kuznetsov, V. N. Romanenko, N. S. Moskvitina, V. A. Ternovoi, V. B. Loktev

Keywords: *Dermacentor reticulatus*, tick-borne infection, *Rickettsia raoultii*, *Anaplasma phagocytophilum*, tick-borne encephalitis virus, urban foci, Tomsk.

SUMMARY

In autumn 2015, a more than two hundred fold in the number of *Dermacentor reticulatus* (Fabric, 1794) ticks were discovered in urban foci of Tomsk. Therefore, it was possible to collect 450 adult *D. reticulatus* ticks in urban foci of Tomsk during 2016–2017 and to test genetic markers for six viral and bacterial tick-borne infections by PCR analysis of individual ticks. Tick-borne infection genetic markers for *Rickettsia* spp., tick-borne encephalitis virus (TBEV) and *Anaplasma phagocytophilum* were detected in approximately 44–48 %, 0.7–0.9 %, and 0.6 % ticks, respectively. No genetic material of Kemerovo virus, *Borrelia* spp. and *Coxiella burnetii* was revealed.

Rickettsia isolates were genotyped with using of nucleotide sequences for five genes (*gltA*, *16S pPHK*, *ompA*, *ompB*, *geneD*) and all isolates were classified as *Rickettsia raoultii*. The analysis of complete nucleotide sequences these genes demonstrated that Tomsk isolates were genetically close to *R. raoultii* isolates from France. The level of identity for nucleotide sequences *groESL* operon of *A. phagocytophilum* constituted about 99 % with isolates earlier identified in the Tomsk region. Analysis of TBEV sequences has revealed the genetic material of the Siberian and Far Eastern subtypes of TBEV.

Thus, *D. reticulatus* ticks actively participated in the formation of the urban foci of tick-borne infections in Tomsk where they participate in the circulation of *R. raoultii*, *A. phagocytophilum*, Siberian and Far Eastern genotypes of TBEV.