

На правах рукописи

Самойленко Ирина Евгеньевна

**ОБОСНОВАНИЕ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО
МОНИТОРИНГА ЗА ПРИРОДНЫМИ ОЧАГАМИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ
РИККЕТСИЯМИ И БАРТОНЕЛЛАМИ**

1.5.11 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Омск - 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный консультант:

Рудаков Николай Викторович, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Червинец Юлия Вячеславовна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующая

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел микробиологии, заведующая, группа эпидемиологии брюшного тифа, ведущий научный сотрудник

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2025 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01. при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы исследования

Клещевые трансмиссивные инфекции (КТИ), к числу которых относятся и клещевые риккетсиозы (КР), представляют серьезную проблему для здравоохранения во многих регионах России и мира. Официальной регистрации в России подлежат сибирский клещевой тиф (СКТ), с этиологическим агентом *Rickettsia sibirica*, Астраханская пятнистая лихорадка (этиологический агент *R. conorii* subsp. *caspia*) и средиземноморская лихорадка (этиологический агент *R. conorii* subsp. *conorii*). Также в РФ установлена циркуляция других патогенных риккетсий – *R. heilongjiangensis*, *R. slovaca*, *R. aeschlimanii*, *R. helvetica*, *R. sibirica* subsp. BG-90, и ряда риккетсий с неустановленной патогенностью.

Среди риккетсиозов, передаваемых клещами в нашей стране, наибольшее распространение имеет сибирский клещевой тиф, с преимущественной локализацией очагов в Северной Азии. В ряду клещевых трансмиссивных инфекций в России по распространенности клещевые риккетсиозы занимают лидирующие позиции вместе с клещевым энцефалитом и иксодовыми клещевыми боррелиозами.

В настоящее время накоплен значительный материал по изучению эпидемиологии передаваемых клещами природно-очаговых инфекций и экологии их возбудителей. Кроме давно известных этиологических агентов выявлен ряд микроорганизмов, относящихся к классу альфа-протеобактерий (эрлихии, анаплазмы, бартоanelлы), в том числе патогенные для человека. В связи с совершенствованием методов лабораторной диагностики появились данные о зараженности *Ixodes persulcatus* анаплазмами и эрлихиями в Азиатской части России (S. Shpynov et al., 2006). В органах диких мелких млекопитающих и клещах выявлены бартоanelлы (О.В. Морозова и др., 2005; А.П. Марков и др., 2006). Роль этих микроорганизмов в патологии человека окончательно не изучена.

В связи с выявлением в одних и тех же переносчиках ряда патогенов человека как вирусной, так и бактериальной природы актуально изучение сочетанных очагов клещевых трансмиссивных инфекций, в том числе совершенствование микробиологического мониторинга за природными очагами. Использование комплекса классических микробиологических и современных экспериментальных методов позволит изучить экологию альфа-протеобактерий на примере риккетсий и бартоanelл и оптимизировать методологические подходы к выявлению спектра и распространения этих инфекционных

агентов, их роли в инфекционной патологии.

Степень разработанности темы исследования

Изучение клещевых риккетсиозов в России началось в 30-х годах 20 столетия, когда было обнаружено, что этиологическим агентом нового заболевания «клещевая сыпная лихорадка», которое впоследствии было выделено в самостоятельную нозологическую форму, являются риккетсии и установлен переносчик этой инфекции: клещи *Dermacentor nuttalli* Ol. (цит. по Н.В. Рудаков, 2016). В 1949 году возбудитель этой лихорадки был идентифицирован как представитель риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок и описан как самостоятельный вид *Dermacentroxenus sibiricus* П.Ф. Здродовским и Е.М. Голиневич (1949), в настоящее время - *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica*. В России вызываемая этой риккетсией инфекция в соответствии с формой № 2 Росстата «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» регистрируют под названием «сибирский клещевой тиф» (СКТ).

В 80-х годах в Астраханской области была выявлена неизвестная ранее лихорадка, возбудитель которой относится к *R. conorii* – комплексу. Заболевание было названо астраханской пятнистой лихорадкой (АПЛ), этиологический агент получил название *R. conorii* subsp. *caspia*, выявлен основной переносчик – *Rhipicephalus pumilio*. В настоящее время заболеваемость астраханской пятнистой лихорадкой (код по МКБ-10 A77.1) регистрируется на стабильно высоком уровне.

В 1999 году в РФ молекулярно-биологическими методами впервые идентифицированы риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки трех новых генотипов – *R. sp. RpA4*, (*Rh. pumilio* Астрахань №4), *R. sp. DnS14* (*D. nuttallii* Сибирь №14) и *R. sp. DnS28* (*D. nuttallii* Сибирь №28) (Е. Rydkina et al., 1999). В дальнейшем описан новый вид *R. raoultii*, включающий в себя три вышеуказанные генотипа. *R. raoultii* является не только самым распространенным видом риккетсий в РФ, но и широко распространен в Евразии в ареале клещей рода *Dermacentor* (S. Shpynov et al., 2006; P. Parola, et al., 2009; M. Selmi et al., 2009; L. Vitirino et al., 2011).

В азиатской части России выявлены очаги клещевого риккетсиоза, связанные с патогенным видом *R. heilongjiangensis* с основным переносчиком *Haemaphysalis concinna* Koch. (О. Mediannikov et al., 2004; Н.В. Рудаков, 2016; Y. Igolkina et al., 2016). Также в РФ установлена циркуляция *R. aeschlimannii*, *R. helvetica*, *R. slovacae*, *R. conorii* subsp. *conorii*, *Rickettsia sibirica* генотип *DJ-90*, *Candidatus R. tarasevichiae* и ряд кандидатов в новые

виды риккетсий (Е. В. Чаусов и др., 2009; Н. М. Пуховская и др., 2010; Т. П. Микрюкова и др., 2012; Y. Igolkina et al., 2015, 2016, 2022).

В настоящее время в микробиологическом мониторинге за риккетсиозами преобладает детекция ДНК риккетсий без изоляции штаммов. В то же время для корректной оценки биологических свойств циркулирующих штаммов и их эпидемической значимости необходима изоляция риккетсий, в том числе новых видов, часть из которых не культивируются на традиционных моделях, что требует совершенствования микробиологического мониторинга.

Цель исследования: установить этиологическую структуру инфекций, вызываемых альфа-протеобактериями в Сибири на основании результатов комплексных микробиологических (риккетсиологических), акарологических, молекулярно-биологических и иммуносерологических исследований и рекомендовать современные алгоритмы микробиологического мониторинга сочетанных природных очагов.

Задачи исследования:

1. Изолировать штаммы новых видов риккетсий (*R. raoultii*, *Candidatus R. tarasevichiae*), провести отбор адекватных биологических моделей для их изоляции и культивирования, а также оптимальных условий культивирования и изучить биологические свойства с использованием биопробы, культуры клеток и экспериментальной клещевой модели.

2. Оценить взаимное влияние риккетсий различных видов в природных очагах на основе полевых и экспериментальных исследований.

3. Обосновать применение клещевой экспериментальной модели для изучения взаимоотношений в системе переносчик – риккетсии, теоретических аспектов природной очаговости.

4. С помощью молекулярно-биологических методов изучить спектр бартонелл в природных очагах на юге Западной Сибири.

5. Разработать алгоритм комплексного микробиологического мониторинга в сочетанных природных очагах в системе эпидемиологического надзора за клещевыми риккетсиозами.

Научная новизна

Описан новый вид риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки - *Rickettsia raoultii* с характеристикой генетических (секвенирование фрагментов генов 16S рРНК

(*rrs*), *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4*) и фенотипических (серотипическая специфичность, особенности культивирования, ультраструктура клетки) свойств.

Впервые с использованием клещевой экспериментальной модели выделены штаммы представителей всех трех генотипов вида *R. raoultii*: DnS14, DnS28, RpA4, проведено экспериментальное изучение их взаимоотношений с переносчиками и изучение фенотипических свойств с использованием биологических моделей (патенты на изобретение RUS 2235769, RUS 2616287, RUS 2704449).

Впервые с использованием клещевой экспериментальной модели на примере *R. raoultii* и *R. sibirica* экспериментально подтверждены конкурентные отношения риккетсий различных видов в паразитарных системах природных очагов. Установлено, что клещи, содержащие *R. raoultii*, не могут быть дополнительно заражены *R. sibirica* (на использованный штамм *R. sibirica* получен патент RUS 2723410).

Впервые с использованием культуры клеток изолированы штаммы *Candidatus R. tarasevichiae* (патент на изобретение RUS 2354691).

На основании молекулярно-генетических исследований выявлены как известные представители рода *Bartonella* - *B. grahamii* и *B. taylorii*, так и не принадлежащий к известным видам новый генотип бартонелл, циркулирующий в популяции мелких диких млекопитающих в Омской области, который идентифицирован с применением молекулярно-биологических методов и описан как *Candidatus Bartonella rudakovii*.

Выявлен и изучен новый природный очаг клещевых риккетсиозов в Называевском районе Омской области. Установлена циркуляция двух видов патогенных риккетсий - *R. sibirica* и *R. raoultii*, установлены переносчики риккетсий в данном очаге – *D. marginatus*, *D. reticulatus*, а также выявлена сероконверсия к *R. sibirica* у пациентов с клиникой сибирского клещевого тифа.

Впервые в России молекулярно-биологическими методами верифицирована смешанная инфекция *R. sibirica* и *Candidatus R. tarasevichiae* в случае риккетсиоза с летальным исходом.

Получены и внесены в базу данных NCBI GenBank 9 нуклеотидных последовательностей фрагментов генов кандидата в новые виды бартонелл *Candidatus B. rudakovii* (номера доступа EF682084-EF682086 для 16S рПНК (*rrs*), EF682087 для *ITS*, EF682088 для *rpoB* гена, EF682089-EF682090 для *gltA* гена и EF682091-EF682092 для *ftsZ* гена); 5 нуклеотидных последовательностей фрагментов генов нового вида риккетсий *R.*

raoultii - для 16S рПНК (*rrs*), *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* генов (номера доступа EU036982, EU036985, EU036986, EU036984 и EU036983 соответственно), 3 последовательности *R. sibirica* изolat «Кисляки-63/14» фрагментов генов *ompB*, *gltA* и 16S рПНК (*rrs*) генов (номера доступа MG458794.1, MG458793.1 и MG450367.1 соответственно); *R. sibirica* из крови и мозга пациента: последовательности *gltA* гена (номера доступа МК048467 и МК048468), *ompB* гена (номера доступа МК048471 и МК048472), *ompA* гена (номера доступа МК048474 и МК048475); *Candidatus R. tarasevichiae* из крови и мозга пациента: последовательности *gltA* гена (номера доступа МК048469 и МК048470), *ompB* гена (номер доступа МК048473), Uncultured *Rickettsia* sp. isolate Omsk_Hb-2 под номером МК248843 из крови пациента.

Разработан "Алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов", включающий четыре этапа: скрининг территории; изучение спектра риккетсий, циркулирующих в очаге; изучение особенностей биологических свойств риккетсий в популяции конкретного очага; изучение механизмов сохранения популяции риккетсий в очаге (патент на промышленный образец № 134323 от 01.12.22 г.).

В результате проведенных исследований сформированы следующие базы данных: «Коллекция штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки ФБУН «Омского НИИ природно-очаговых инфекций» (свидетельство №2022622333 от 23.09.2022 г.), предполагающая аккумуляцию и аналитическую обработку сведений о биологических характеристиках штаммов риккетсий, включая их генотипические и фенотипические свойства, «Результаты серологических исследований на клещевые риккетсиозы по данным ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора» (свидетельство № 2023621833 от 06 июня 2023 г.), которые могут быть использованы для анализа региональных особенностей и изучения разнообразия популяций возбудителей клещевых риккетсиозов.

Теоретическая и практическая значимость

Получены новые экспериментальные данные о конкурентных отношениях различных видов риккетсий на примере *R. sibirica* и *R. raoultii* и их влиянии на лоймопотенциал сочетанных природных очагов риккетсиозов.

В результате проведенных исследований показана значимость и целесообразность использования клещевой экспериментальной модели для изучения экологических связей риккетсий с переносчиками, и изучения механизмов сохранения популяции риккетсий в

природном очаге. Показано, что иксодовые клещи рода *Dermacentor* являются компетентным вектором *R. raoultii*.

Выявлен и изучен новый природный очаг клещевого риккетсиоза в Называевском районе Омской области с циркуляцией как классического патогена *R. sibirica*, так и нового патогена *R. raoultii*, что является подтверждением продолжающегося процесса формирования нозоареала этой инфекции. Установлены особенности клинических проявлений в данном очаге.

Теоретически обоснована и практически подтверждена целесообразность применения комплекса молекулярных и культуральных методов исследования для всестороннего изучения природных очагов клещевых риккетсиозов.

Разработан алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов с использованием комплекса методов: классических риккетсиологических, молекулярно-биологических и экспериментальных методов, в котором даны рекомендации по оценке спектра риккетсий и подходы к повышению эффективности микробиологического мониторинга популяции риккетсий в природных очагах клещевых риккетсиозов.

Материалы, полученные в результате исследований, послужили основой для подготовки методических документов: СП 3.1.33100-15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами», МУ 3.1.1755-03 «Организация эпидемиологического надзора за клещевым риккетсиозом», МР 3.1.0281-22 «Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика лихорадки Ку». Предложения по совершенствованию микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов с различной эпидемической активностью в системе эпидемиологического надзора применяются в работе практических учреждений Роспотребнадзора: ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области» (акт внедрения от 11.10.2023 г.), ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» (акт внедрения от 11.10.2023 г.).

В Государственную коллекцию бактерий II-III групп патогенности Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации депонированы авторские штаммы под номерами: 137, 139-146, 151, 152, 154, 162.

Сформированные электронные базы данных позволяют проводить молекулярно-генетический и серологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за природно-очаговыми риккетсиозами, а также отслеживать изменения генотипических и фенотипических характеристик риккетсий в очагах с течением времени. Созданные базы данных и "Алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов" внедрены в практику работы референс-центра по мониторингу за риккетсиозами ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (акт внедрения от 25.10.2023 г.).

Результаты исследований включены в монографии: «Клещевой риккетсиоз и риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки в России» (Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2011) и «Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в Сибири» (Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2012), вошли в материалы Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Материалы диссертации используются в учебном процессе в программах высшего образования по специальностям «лечебное дело», «медико-профилактическое дело» и «педиатрия» на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 02.10.2023 г.), в учебном процессе в программах высшего образования по специальностям «лечебное дело», «педиатрия», «медико-профилактическое дело» на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 02.10.2023 г.).

Методология и методы исследования

Методология научной работы основана на современных научно обоснованных принципах изучения популяционной структуры риккетсий и бартоонелл, циркулирующих на территории РФ, и спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования.

В настоящей диссертационной работе использован комплекс эпидемиологических,

паразитологических, риккетсиологических, серологических, молекулярно-генетических и статистических методов исследований.

Предметом исследования являлись биологические (генотипические и фенотипические) характеристики штаммов *R. raoultii* и *Candidatus R. tarasevichiae*. Протокол исследования был одобрен Локальным этическим комитетом (ЛЭК) ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 06 ноября 2019 г.).

Объекты исследования

Иксодовые клещи. *Dermacentor marginatus* Shulzy, *D. reticulatus* Fabricius, *D. silvarum* Olenov, *D. niveus* Neumann, *D. nuttalli* Olenov, *Haemaphysalis concinna* Koch, *Rhipicephalus sanguineus* Latreille) были собраны в сезонах 2000–2019 годов в природных биотопах с растительности с помощью волокуши из фланели по стандартной методике в Омской, Новосибирской, Тюменской областях. С целью изоляции штаммов риккетсий в биопробе на морских свинках исследован 1751 экземпляр иксодид. С целью отбора образцов для культивирования риккетсий в экспериментальных линиях клещей и культурах клеток исследовано в РНИФ 670 экземпляров иксодид. Для изучения особенностей экологии риккетсий нового вида *R. raoultii* исследовано в РНИФ 3306 экземпляров клещей рода *Dermacentor* на всех стадиях метаморфоза. С целью выяснения роли иксодовых клещей в качестве резервуара бартонелл исследовано 510 экземпляров клещей (385 экземпляров имаго *D. reticulatus*, 121 экземпляр имаго *I. persulcatus* и 4 экземпляра нимф, видовая принадлежность которых не определялась) в 2014-2016 гг. и 30 экземпляров клещей (8 экземпляров имаго *D. reticulatus*, 22 экземпляра имаго *I. persulcatus*) в 2023 г., снятых с людей в Омской области.

Образцы органов мелких диких млекопитающих. С целью выяснения роли мелких диких млекопитающих как резервуара альфа-протеобактерий исследовано 175 экземпляров мелких млекопитающих: полевая мышь - *Apodemus agrarius* Pall. (8 экземпляров), малая лесная мышь - *Sylvaemus uralensis* Pall. (8 экземпляров), рыжая полевка - *Myodes glareolus* Schreb. (30 экземпляров), красная полевка - *Myodes rutilus* Pall. (80 экземпляров), темная полевка - *Microtus agrestis* L. (6 экземпляров), узкочерепная полевка - *Microtus gregalis* Pall. (5 экземпляров), полевка-экономка - *Microtus oeconomus* Pall. (35 экземпляров), бурузубки - *Sorex* sp. (21 экземпляр), отловленных в Омской области на двух значительно удаленных друг от друга участках лесостепной зоны.

Животные, использованные для кормления иксодовых клещей.

Поддержание лабораторных линий иксодид осуществляли путем кормления на теплокровных животных: имаго на самцах морских свинок (гладкошерстные метисы) и на взрослых особях беспородных белых мышей, преимагинальные формы (личинки и нимфы) прокармливали на сосунках белых мышей. И использованные в работе морские свинки - гладкошерстные метисы в возрасте 1,5-2 месяцев весом 300-350 граммов были получены в питомнике лабораторных животных АО «НПО «Микроген», г. Омск, беспородные белые мыши получены в питомнике лабораторных животных ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора.

Животные, использованные для биопробы. Для изоляции риккетсий из полевого материала и пассирования полученных изолятов использовано 150 особей самцов морских свинок гладкошерстных метисов в возрасте 1,5-2 месяцев весом 300-350 граммов. Для воспроизведения экспериментальной инфекции, вызываемой исследуемыми выделенными штаммами, использовано 82 особи морских свинок.

Штаммы. В диссертационном исследовании использовано 17 авторских штаммов риккетсий: *R. raoultii* (RpA4), выделенные из клещей *D. marginatus* – 5 штамма; *R. raoultii* (DnS14), выделенный из клещей *D. silvarum* - 1 штамм; *R. raoultii* (DnS28), выделенный из клещей *D. silvarum* - 1 штамм; *R. raoultii* (DnS28), выделенный из клещей *D. nuttallii* - 1 штамм; *R. raoultii* (RpA4), выделенный из клещей *D. reticulatus* - 1 штамм; *Candidatus R. tarasevichiae*, выделенные из клещей *I. persulcatus* – 8 штаммов. Штаммы «Еланда-23/95», «Караганда-8/98» и «Шайман» были использованы при описании нового вида риккетсий группы КПЛ *R. raoultii*. Кроме авторских штаммов риккетсий в исследовании использованы типовой штамм *R. raoultii* «Хабаровск» и штамм *R. sibirica* «Баево-107/87», хранящийся в коллекции референс-центра ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора под №73, который имеет 100% гомологии нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *gltA* и *ompA* с типовым штаммом 246 *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica* и депонирован в Государственную коллекцию бактерий II-III групп патогенности Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации 26 января 1989 г.

Культуры клеток. Изоляцию из клещей и культивирование риккетсий проводили с использованием перевиваемых культур клеток Vero и Нер-2. Культуры клеток были

получены в «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Образцы сывороток крови. В рамках НИР в период 2009 – 2022 гг. исследованы 283 образца сывороток крови от людей, поступившие из Называевского района Омской области.

Биопсийные образцы крови и головного мозга. Образцы крови (100 мкл) и головного мозга (100 мкл), взятые после вскрытия больной клещевым риккетсиозом с летальным исходом, исследованы в рамках работы Референс-центра по мониторингу за риккетсиозами (приказ № 1116 Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 01.12.2017).

Методы исследования

Экспериментальные методы работы с переносчиками риккетсий

Изоляцию штаммов *R. raoultii*, изучение уровней вертикальной передачи риккетсий, изучение возможности взаимовлияния между *R. raoultii* и *R. sibirica* проводили с использованием клещевой экспериментальной модели (КЭМ). Для изучения особенностей экологии риккетсий нового вида *R. raoultii*, в том числе количественной оценки трансвариальной и трансфазовой передачи, использованы лабораторные линии четырех видов клещей рода *Dermacentor*: *D. nuttallii*, *D. silvarum*, *D. marginatus* и *D. reticulatus*, родительские особи которых были естественно инфицированы в природе данным видом риккетсий. Кормление пар клещей (самка и самец) проводили на взрослых лабораторных животных (белые мыши и морские свинки). Появившееся потомство содержали в серийных кормлениях – линьках “личинка – нимфа – имаго” (А.А. Тагильцев и др., 1990). Кормление преимагинальных форм проводили на сосунках белых мышей. Наличие риккетсий определяли в РНИФ, исследуя с этой целью по 100-150 экземпляров голодных личинок и по 50 экземпляров голодных и напитавшихся нимф. Изучение трансвариальной передачи *Candidatus R. tarasevichiae* также проводили с использованием КЭМ.

С целью изучения особенностей культивирования *R. raoultii* и *Candidatus R. tarasevichiae* проводили внутрибрюшинное заражение самцов морских свинок весом 300–350 гр. по стандартной методике (П.Ф. Здродовский, Е.М. Голиневич, 1973). Проведено изучение возможности применения развивающихся куриных эмбрионов для культивирования *R. raoultii* и *Candidatus R. tarasevichiae*. Также нами изучалась

возможность использования в качестве модели для изоляции *Candidatus R. tarasevichiae* сосунков беспородных белых мышей в возрасте 3-5 дней.

Изоляцию и культивирование риккетсий проводили на культуре клеток Vero с использованием технологии shell vial по методике, описанной ранее (M. Marrero, D. Raoult, 1989).

Изучение распределения риккетсий *R. raoultii* (RpA4 и DnS28) в организме переносчиков проводили исследованием в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) мазков из органов клещей *D. reticulatus* и *D. silvarum*, естественно инфицированных *R. raoultii*. Для исследования на наличие риккетсий иссекали фрагменты слюнных желез, мальпигиевых сосудов, яичников и кишечника.

В эксперименте по изучению возможности конкурентных отношений между широко распространенными видами риккетсий группы КПЛ в опытной группе клещи, инфицированные в природе *R. raoultii*, были дополнительно заражены высоковирулентным штаммом *R. sibirica* путем инокуляции в основание четвертой коксы объемом 0,2-0,3 мкл не менее 10 DL 50 в мл для куриных эмбрионов. Клещи, не подвергшиеся суперинфицированию, составили контрольную группу.

Молекулярно-генетические методы

ДНК из штаммов риккетсий и органов диких мелких млекопитающих, отловленных в лесостепной зоне Омской области, была выделена с использованием QIAmp tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) в соответствии с инструкцией изготовителя. Скрининг наличия риккетсиальной ДНК в иксодовых клещах и органах диких мелких млекопитающих выполняли в ПЦР с применением праймеров для амплификации *gltA* гена. Скрининг наличия бартонелл проводили с использованием ПЦР с применением праймеров UrBarto1 и UrBarto 2 для выявления специфичных для бартонелл участков 16S-23S межгенной спейсерной области (*ITS*) как описано ранее (M. Maurin, D. Raoult, 1996). Однораундовую ПЦР выполняли в термоциклере Peltier модель PTC-200 (Mj Research, Inc, Watertown, Wales). Секвенирование фрагментов генов риккетсий 16SrRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* было выполнено с использованием ранее описанных праймеров (V. Roux & D. Raoult, 1995, 2000; V. Roux et al., 1996, 1999; Z. Sekeeva et al., 2001). Секвенирование фрагментов генов бартонелл, кодирующих 16S рРНК (*rrs*), цитрат-синтазу (*gltA*), β -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoB*), белок клеточного деления (*ftsZ*) было проведено с применением ранее описанных праймеров (R. Birtles, and D. Raoult, 1996; P. Renesto et al., 2001; P.

Hourikian, D. Raoult, 2001; Z. Zeaiter et al., 2002; D. Bermond et al., 2002). Секвенирование проводили на автоматическом анализаторе ДНК фирмы «AppliedBiosystems» с использованием набора BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit.

Методы статистической обработки

Материалы исследования подвергались статистической обработке с использованием компьютерной программы Excel (Microsoft Office). Для оценки статистической значимости различий величин применяли однофакторный дисперсионный анализ. Статистически значимыми считали различия при доверительном интервале 95% ($p < 0,05$).

Личное участие автора в получении результатов

Основная часть исследований выполнена в Федеральном бюджетном научном учреждении «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, г. Омск. Лично автором сформулирован дизайн комплексных научных исследований по проблеме, определены цель и задачи работы, выполнены анализ и обобщение материалов, сформулированы выводы и практические рекомендации, проведен обзор отечественных и зарубежных публикаций по теме диссертации. При непосредственном участии автора выполнен сбор основного объема первичного материала из Омской области. Сбор клещей из Омской, Новосибирской, Тюменской, Иркутской областей и Республик Алтай и Бурятия выполнен экспедиционной группой ФБУН ОНИИПОИ (Якименко В.В., Танцев А.К., Малькова М.Г.) из Ставропольского (Пурмак К.А., ЦГиЭ по Ставропольскому краю) и Красноярского краев (Тимошкин А.В., ЦГиЭ по Красноярскому краю), Республики Крым (Товинец Н.Н., ЦГиЭ по Республике Крым), Казахстан (Танкибаев М.А., Егембердиева Р.А.). Молекулярно-генетические исследования (экстракция ДНК, постановка ПЦР с электрофоретической детекцией, секвенирование по Сэнгеру) авторских штаммов риккетсий, использованных для описания нового вида *R. raoultii*, скрининг и идентификация ДНК риккетсий и бартонелл в органах мелких диких млекопитающих выполнены автором лично. Культивирование *R. raoultii* в лабораторных линиях клещей, изучение компетентности клещей рода *Dermacentor* в качестве вектора этой риккетсии, изучение распределения *R. raoultii* в организме переносчика, изучение взаимоотношений *R. raoultii* и *R. sibirica* выполнены автором лично. Молекулярно-генетические исследования секционного материала и изолята *R. sibirica* из ранее неизвестного очага КР проведено совместно с сотрудниками ФГБУН «Институт

химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН д.б.н. В.А. Рар, к.б.н. Я.П. Иголкиной, д.б.н. Н.В. Тикуновой, к.б.н. С.Е. Ткачевым. Изучение особенностей культивирования новых риккетсий: *R. raoultii* и *Candidatus R. tarasevichiae* с использованием различных биологических моделей выполнено совместно с научными сотрудниками ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» к.м.н. Т.А. Решетниковой, к.м.н. Л.В. Кумпан, к.м.н. С.В. Штреком, О.А. Бобровой. Идентификация авторских штаммов *R. raoultii* и *Candidatus R. tarasevichiae* молекулярно-биологическими методами проведена совместно с сотрудником ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» д.м.н. С.Н. Шпыновым.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Для изучения характеристик различных видов риккетсий, отличающихся по уровню патогенности, требуются различные биологические модели и алгоритмы исследования. Наиболее адекватными моделями для изоляции, культивирования и изучения биологических свойств *R. raoultii* являются культуры клеток и клещевая экспериментальная модель, которая также позволяет в лабораторных условиях воспроизводить и изучать закономерности существования природных очагов риккетсиозов.

2. Генотипы *R. raoultii* хорошо адаптированы к клещам рода *Dermacentor*, распространенным на территории РФ: *D. nuttalli*, *D. silvarum*, *D. marginatus* и *D. reticulatus*, что позволяет считать их компетентными векторами для данного вида. Эффективная вертикальная передача риккетсий определяет значимость векторного резервуара и соответствующую его роль в сохранении риккетсий как вида.

3. Для изучения иммунобиологических характеристик *Candidatus R. tarasevichiae* требуется экспериментальный поиск адекватных моделей для их изоляции и культивирования. Наиболее соответствуют этим целям культуры клеток и клещевая экспериментальная модель.

4. Мелкие дикие млекопитающие не имеют существенного значения в качестве резервуара риккетсий, но являются основным резервуаром бартонелл в природных очагах. Спектр бартонелл в Омской области представлен как известными видами *B. grahamii* и *B. taylorii*, так и кандидатом в новые виды *Candidatus B. rudakovii*.

5. Гетерогенность иммунобиологических и генетических свойств риккетсий обуславливает различные технологии и алгоритмы исследования риккетсий в природных

очагах в зависимости от целей и задач исследования.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечивается объемом выполненных исследований и выбором критериев для проведения экспериментального изучения. В работе использован комплекс риккетсиологических и молекулярно-генетических методов исследования; полученные экспериментальные данные обработаны и систематизированы с использованием биоинформационных и статистических методов; представлены в виде таблиц и рисунков.

Работа выполнялась в рамках научно-исследовательской работы ФБУН Омского НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора: «Оптимизация системы эпидемиологического надзора на основе уточнения этиологической роли новых клещевых альфа-протеобактерий и боррелий в инфекционной патологии населения Сибири в сочетанных природных очагах» № ГР. 01.2.007 03766; «Совершенствование системы комплексного мониторинга природных очагов и лабораторной диагностики инфекций, вызываемых альфа-протеобактериями, боррелиями и другими бактериальными патогенами» № ГР: 01.200.1 12522; «Разработка алгоритмов мониторинга природных очагов и лабораторной диагностики клещевых риккетсиозов на основе молекулярно-биологических и твердофазных методов» (01.2016-12.2020) АААА-А16-116021210007-9; «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг и оценка современного состояния очагов клещевых риккетсиозов в Российской Федерации» № ГУ НИОКТР 121020500116-1.

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора (протокол № 9 от 30.11.2023).

Материалы диссертации доложены и представлены на международных, всероссийских и региональных научно-практических конференциях: VIII-XI Всероссийские съезды общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 2002, 2007, 2012, 2017; Вторая научная конференция с международным участием «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера», Новосибирск, 2002; 3 и 4 International conference on rickettsiae and rickettsial diseases, Ljubljana, 2002; Logrono (La Rioja), Spain, 2005; 5 и 6 International meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Marseille, France, 2008; Heraclion, 2011; 7 international Potsdam symposium on tick – borne diseases, Berlin, 2003; Третья международная

конференция «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями», С.-Петербург, 2003; 4 и 7 межрегиональные конференции с международным участием «Актуальные проблемы обеспечения санитарно – эпидемиологического благополучия населения», Омск, 2003, 2007; 5 и 7 межрегиональные конференции с международным участием «Актуальные проблемы здоровья населения Сибири: гигиенические и эпидемиологические аспекты», Омск, 2004, 2008; Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 70-летию теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней «Актуальные проблемы природной очаговости болезней», Омск, 2009; Международная научно – практическая конференция «Современная микробиология в биотехнологии, науке и образовании» – Астана, 2012; Международная научно – практическая конференция, посвященная 100-летию со дня рождения акад. АН Каз. ССР Х. Ж. Жуматова «Актуальные проблемы вирусологии, микробиологии, гигиены, эпидемиологии и иммунобиологии», Алматы, 2012; Научно – практическая конференция с международным участием, посвященная 75-летию теории акад. Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней «Актуальные аспекты природной очаговости болезней», Омск, 2014; Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней», Сочи, 2015; II Национальный конгресс бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях», Санкт-Петербург, 2016; Научно–практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека», Омск, 2016; IV Национальный конгресс бактериологов и Международный симпозиум «Микроорганизмы и биосфера “Microbios-2018”», Омск, 2018; Всероссийский интернет-конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: диагностика, лечение и профилактика», Москва, 2020; Всероссийская научно–практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность», Москва, 2020; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека», посвященной 100-летию Омского НИИ природно-очаговых инфекций, г. Омск, 2021 г.; I Международная научно–практическая конференция «Интеграция наук: биофизика,

биомедицина, нейронаука», Алматы, Казахстан, 2022; Международный симпозиум, посвященный юбилею Санкт-Петербургского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, 2023 г.; Всероссийская научно-практическая конференция «Санитарно-эпидемиологическое благополучие населения: вчера, сегодня, завтра», г. Омск, 2023 г.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 40 печатных работ, в том числе 31 статья в рецензируемых изданиях, 2 статьи - в других изданиях, 3 - тезиса в рецензируемом издании, 2 - монографии в соавторстве, 2 тезиса - в материалах международных конференций. Получено 5 патентов на изобретения, 1 – на промышленный образец, 2 свидетельства о регистрации базы данных.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 234 страницах, содержит 15 рисунков и 13 таблиц. Список литературы содержит 489 источников: 37 отечественных и 452 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Выявление и описание *R. raoultii* – нового вида риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки

Характеристика генотипов *R. raoultii*

В 1999 году в клещах, собранных на территории нескольких регионов России, были идентифицированы три новых генотипа риккетсий: RpA4, DnS14 и DnS28, формирующие достоверный кластер внутри *R. massiliae* группы (E. Rydkina et al., 1999). В 2008 году эти генотипы описаны как принадлежащие к новому виду риккетсий группы КПЛ *Rickettsia raoultii* sp. nov. (вид назван в профессора Didier Raoult). С целью подтверждения принадлежности к новому виду *R. raoultii* sp. nov. на родовом и видовом уровнях, штаммы «Хабаровск», «Шайман» (генотип DnS14), «Marne», «Караганда-8/98» (RpA4) и «Еланда-23/95» (DnS28) были изучены в соответствии с таксономической схемой классификации риккетсий (D. Raoult et al., 2005). Для всех пяти исследованных локусов штаммы «Хабаровск»^T, «Marne» и «Еланда-23/95» имели высокий уровень гомологии с типовым штаммом *R. rhipicephali* (99.5, 99.2, 96.8, 98.1 и 97.7%; и 99.6, 99.1, 97.0, 98.1 и 97.9%; и

99.5, 99.0, 96.6, 98.0 97.3% соответственно для 16SrRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* генов). Тем не менее, эти значения были ниже cut-off, предложенных для определения видов *Rickettsia* (Р.-Е. Fournier et al., 2003). Напротив, уровни подобия выше cut-off были выявлены между штаммами «Хабаровск»^T и «Marne»), «Хабаровск»^T и «Еланда-23/95», «Marne» и «Еланда-23/95» (Рисунок 1).

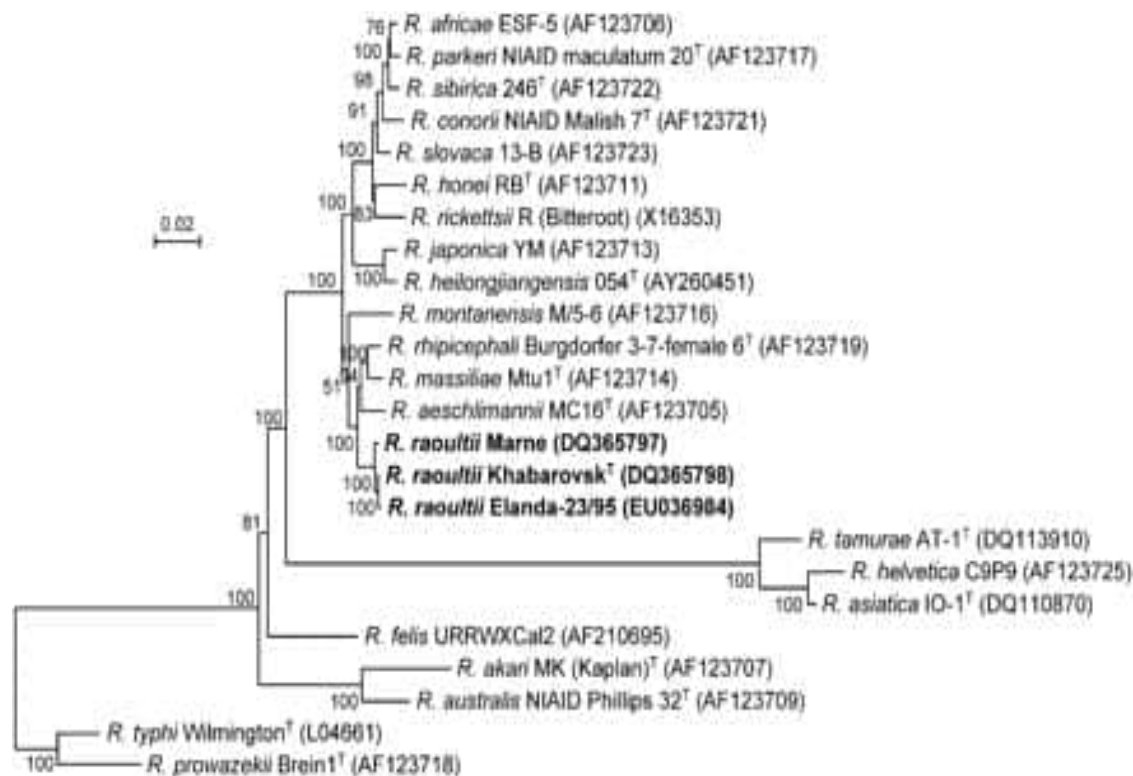


Рисунок 1 – Дендрограмма, показывающая филогенетическую позицию *R. raoultii*. штаммы «Хабаровск»^T, «Marne» и «Еланда-23/95» среди *Rickettsia species*

При секвенировании фрагментов *proB* гена штаммов «Хабаровск»^T и «Marne», как описано ранее, в обоих штаммах выявлена мутация, которая вызывает резистентность к рифампицину, установленную у представителей группы *R. massiliae* (M. Drancourt, D. Raoult, 1999). Типирование мышиных сывороток было выполнено с использованием микроиммунофлюоресценции (МИФ), как описано R. Philip с соавторами (1978). Специфическая разница в титрах антител составила 1, 4, 4, 3 и 4, соответственно между штаммом «Хабаровск»^T и штаммом «Marne», *R. massiliae*, *R. aeschlimannii*, *R. rhipicephali* и *R. montanensis*. Специфическая разница в титрах антител установлена 4, 5, 4 и 3, соответственно между штаммом «Marne» и *R. massiliae*, *R. aeschlimannii*, *R. rhipicephali* и *R. montanensis*. Следовательно, генотипическая и серотипическая специфичность *Rickettsia* sp. штаммов «Хабаровск»^T и «Marne» подтверждают их классификацию в

пределах отдельного вида.

Таким образом, полученные данные о генотипических и фенотипических характеристиках позволили классифицировать *Rickettsia* sp. генотипы RpA4, DnS14 и DnS28, штаммы «Хабаровск», «Шайман», «Марне», «Караганда-8/98» и «Еланда-23/95» как принадлежащие к самостоятельному новому виду *Rickettsia raoultii* sp. nov.

Особенности культивирования риккетсий нового вида *R. raoultii* с использованием биологических моделей (морские свинки, куриные эмбрионы, культуры клеток и экспериментальная клещевая модель)

Для изоляции и культивирования, а также изучения некоторых фенотипических штаммов риккетсий нового вида *R. raoultii* нами использовались различные биологические модели: как классические в риккетсиологической практике модели (морские свинки, куриные эмбрионы, культуры клеток), так и редко используемая КЭМ. Заражение морских свинок штаммами *R. raoultii* проводили двумя способами: внутрибрюшинным введением суспензии инфицированных клещей и кормлением инфицированных клещей на животных.

Для внутрибрюшинного заражения использовали суспензии из естественно инфицированных *R. raoultii* клещей *D. marginatus* и *D. nuttalli* на всех стадиях метаморфоза. Клиническая картина КСТ (повышение температуры и скротальный феномен) у инфицированных морских свинок не наблюдалась.

Для заражения морских свинок путем кормления на них клещей, естественно инфицированных *R. raoultii*, использовали имаго лабораторных линий *D. marginatus*, инфицированных штаммами «Караганда-8/98» и «Караганда-5/98», а также *D. reticulatus*, инфицированных штаммом «Доберман» (все штаммы относятся к генотипу RpA4). Максимальная температура у биопробных животных за период наблюдения не превышала 39,4⁰ С, скротальный феномен не наблюдался. После 15 дней прокармливания инфицированных клещей на фоне применения гидрокортизона у животных отмечалась умеренно выраженная патологоанатомической картины клещевого риккетсиоза.

Развивающиеся куриные эмбрионы остаются эффективной моделью для накопления биомасс патогенных риккетсий. При заражении куриных эмбрионов суспензиями из лиофильно высушенных вышеперечисленных штаммов нами на протяжении 3-х пассажей отмечалось незначительное накопление риккетсий: от единичных в препарате до 3-8 экземпляров в поле зрения. Столь низкая концентрация риккетсий не позволяет отнести развивающиеся куриные эмбрионы к адекватным моделям для культивирования *R. raoultii*.

Нами показана возможность первичной изоляции из переносчиков *R. raoultii* на культурах клеток Vero. Также была изучена возможность культивирования штаммов *R. raoultii* «Еланда-23/95», «Караганда-5/98», «Шайман», «Бурятия-5/2000», «Доберман» в культурах клеток Vero и Нер-2. Заражение культур клеток проводили суспензией из лиофильно высушенных штаммов риккетсий. Статистически значимых различий в уровне накопления риккетсий в культурах клеток Vero и Нер-2 по данным однофакторного дисперсионного анализа не выявлено. При инкубации данных культур клеток, зараженных вышеперечисленными штаммами, на протяжении 8 суток наблюдалось умеренное, но стабильное накопление риккетсий. При увеличении времени инкубации до 14-21 дня число риккетсий увеличилось до 20-30 экземпляров в поле зрения.

Авторские штаммы *R. raoultii* были депонированы во Всероссийский музей риккетсиозных культур НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва) под номерами: 137, 151, 152, 154, 162. На три штамма *R. raoultii* (генотипы RpA4, DnS14 и DnS28) получены патенты на изобретение (RUS 2235769, RUS 2616287, RUS 2704449). Сведения об изолированных штаммах *R. raoultii* включены в базу данных «Коллекция штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки ФБУН «Омского НИИ природно-очаговых инфекций» (свидетельство №2022622333 от 23.09.2022 г.).

Для изучения распределения *R. raoultii* в органах и тканях клещей рода *Dermacentor* были использованы *D. reticulatus*, инфицированные *R. raoultii*, генотип RpA4 и *D. silvarum*, инфицированные *R. raoultii*, генотип DnS28. С этой целью были вскрыты частично напивавшиеся самки указанных видов клещей, извлечены фрагменты следующих органов: слюнные железы, мальпигиевые сосуды, яичники и кишечник. Из указанных органов, а также из гемолимфы были приготовлены мазки, которые были исследованы с помощью световой микроскопии (окраска по методу Здродовского) и в РНИФ. Наибольшая концентрация риккетсий обнаружена в яичниках – до 25 – 50 микробных тел в поле зрения, в то время как в слюнных железах их количество не превышало 10 – 15 м.т. в поле зрения, а в остальных органах колебалось от единичных экземпляров в большинстве полей зрения до 8 – 10 м.т. в поле зрения.

Нами показана возможность культивирования клещей, инфицированных в природе *R. raoultii*, в лабораторных условиях, изучены уровни трансвариальной и трансфазовой передачи *R. raoultii*, а также определено накопление риккетсий в преимагинальных фазах переносчиков.

Изучение взаимоотношений риккетсий нового вида *R. raoultii* и переносчиков с использованием клещевой экспериментальной модели

Риккетсии, облигатные внутриклеточные паразиты, являются частью трехчленной паразитарной системы, включающей также переносчиков (кровососущих членистоногих) и их теплокровных хозяев-прокормителей. По мнению В.Н. Беклемишева (1961 г.) наиболее значимыми показателями экологической специфичности вектора (переносчика) для инфекционного агента являются эффективность трансвариальной передачи и интенсивность репродукции агента в организме вектора.

Культивирование в лабораторных условиях клещей рода *Dermacentor*, инфицированных *R. raoultii* представлено на рисунках 2-5.



Рисунок 2 – Белая мышь, подготовленная для кормления имаго клещей



Рисунок 3 – Личинки клещей рода *Dermacentor* в контейнере



Рисунок 4 – Подсадка преимагинальных стадий клещей на сосунка белой мыши для кормления



Рисунок 5 – Кормление преимагинальных стадий клещей на сосунке белой мыши

Компетентность клещей рода *Dermacentor* в качестве вектора *R. raoultii* изучалась в лабораторных линиях *D. nuttalli*, *D. silvarum*, *D. marginatus* и *D. reticulatus* (Таблица 1), родительские особи которых, собранные в республике Алтай, Омской области, республике Бурятия и республике Казахстан, были инфицированы в природе *R. raoultii* (генотипы RpA4, DnS14, DnS28).

Таблица 1 - Эффективность трансвариальной (ТОП) и трансфазовой (ТФП) передачи и уровень накопления (количество риккетсий в поле зрения) различных генотипов *R. raoultii*

Гено-тип	Вид клещей	Регион	ТОП (%)	ТФП (%)	Накопление риккетсий в личинках до/после кормления	Накопление риккетсий в нимфах до/после кормления
DnS28	<i>D. nuttalli</i>	Алтай	94,7 $\pm$ 1,3%	99,1 $\pm$ 0,8%	6/30	24,5/52
RpA4	<i>D. marginatus</i>	Казахстан	97,4 $\pm$ 0,9%	100%	7,7/47,7	35,6/46,2
DnS28	<i>D. silvarum</i>	Бурятия	94,0 $\pm$ 3,3%	82,0 $\pm$ 5,4%	4,2/43,4	3.6/21,9
DnS14	<i>D. silvarum</i>	Бурятия	98,0 $\pm$ 1,4%	100%	8/50	10/55
RpA4	<i>D. reticulatus</i>	Омск	80,0 $\pm$ 5,6%	98,0 $\pm$ 1,9%	3,4/29,6	7,7/35,9

С этой целью мы сравнили эффективность трансвариальной и трансфазовой передачи и количественное содержание риккетсий в преимагинальных фазах вектора. Для молекулярно-генетической идентификации изучаемых штаммов фрагменты генов *ompA* и *gltA* были амплифицированы, секвенированы и идентифицированы в режиме прямого доступа с NCBI GenBank. Отмеченное повышение концентрации риккетсий после кормления преимагинальных фаз свидетельствует об устойчивой адаптации *R. raoultii* к исследуемым переносчикам.

Исследование риккетсий генотипа RpA4 с помощью люминесцентной микроскопии с моноклональными антителами к группоспецифическому липополисахариду показало изменчивость их антигенной структуры в зависимости от стадии развития переносчика: отсутствие реакции у риккетсий, содержащихся в личинках, и положительная реакция у риккетсий, содержащихся в нимфах четырех из шести исследованных линий.

Результаты наших исследований позволяют утверждать, что наиболее адекватными моделями для изоляции, культивирования и изучения биологических свойств *R. raoultii* являются культуры клеток и клещевая экспериментальная модель. Полученные нами данные позволяют также утверждать, что все четыре выбранные для исследования вида клещей рода *Dermacentor* являются компетентными векторами для *R. raoultii*. Обнаружение *R. raoultii* в яичниках самок иксодовых клещей подтверждает полученные нами данные об успешной вертикальной передаче данного вида риккетсий, а наличие их

в слюнных железах свидетельствует о возможности горизонтальной передачи.

Кормление лабораторных линий клещей, инфицированных *R. raoultii* проводилось нами на всех стадиях метаморфоза на беспородных белых мышах, которые, как известно, не являются высоко восприимчивыми к риккетсиям группы КПЛ животными. Также нам не удалось выявить ДНК риккетсий в 30 образцах селезенки белых мышей, которые были использованы в качестве прокармителей клещей, инфицированных *R. raoultii*, в ПЦР с праймерами, амплифицирующими ген цитратсинтазы (*gltA*)

Экспериментальное изучение межвидового взаимодействия риккетсий на примере *R. raoultii* и *R. sibirica*

Ранее была установлена неспособность *R. rickettsii* поражать эпителиальные и зародышевые клетки, уже инфицированные *R. peacockii*, и высказано предположение, что конкурентные отношения между *R. peacockii* и *R. rickettsia* являются фактором, ограничивающим размножение *R. rickettsii* (W. Burgdorfer et al., 1981).

Изучение характера взаимного влияния между широко распространенными видами риккетсий группы КПЛ, циркулирующими на территории России: *R. raoultii* и *R. sibirica*, проведено в эксперименте при моделировании естественного цикла метаморфоза переносчиков. После суперинфицирования высоковирулентным штаммом *R. sibirica* (патент RUS 2723410) клещей, естественно инфицированных *R. raoultii*, каждая пара клещей (самец и самка) была прокормлена на самцах морских свинок (амплифицирующие животные для *R. sibirica*) до полного напивания самок. У всех самок отмечена яйцекладка с последующим выходом личинок. Затем в серийных кормлениях-линьках получены имаго первого поколения и идентифицированы содержащиеся в них риккетсии. Видовую идентификацию риккетсий, культивирующихся как в контрольных, так и в опытных линиях клещей проводили путем амплификации и секвенирования фрагментов генов *gltA*, *ompA*. Установлено, что имаго первого поколения в одной из опытных линий, в родительской паре которой *R. raoultii* был инфицирован только самец, а самка оказалась свободной от риккетсий, содержали *R. sibirica*. Риккетсии, содержащиеся в имаго первого поколения во всех остальных линиях, относятся к *R. raoultii* (генотип RpA4). Кроме того, эти линии исследованы на наличие ДНК *R. sibirica* методом двухраундовой ПЦР с использованием родо- и видоспецифических праймеров генов *gltA* и *ompA* (Y. Igolkina et al., 2015) с отрицательным результатом. На основании полученных нами экспериментальных данных можно утверждать о возможности конкурентных отношений

различных видов риккетсий группы КПЛ, циркулирующих на территории России. Мы полагаем, что циркуляция *R. raoultii* может ограничивать распространение вирулентной *R. sibirica*.

Таким образом, наиболее адекватными моделями для изоляции и культивирования *R. raoultii* являются КЭМ и культуры клеток. Мы считаем, что беспородных белых мышей можно отнести к неамплифицирующим *R. raoultii* животным, а высокий уровень трансвариальной и трансфазовой передачи на протяжении 5 – 7 поколений в таком случае свидетельствует о том, что иксодовые клещи являются не только вектором, но и основным резервуаром *R. raoultii*, а также о возможности сохранения популяции этого вида риккетсий в очаге за счет только вертикальной передачи.

Изучение биологических свойств *Candidatus R. tarasevichiae* с использованием экспериментальных методов

В 2003 году при исследовании молекулярно-биологическими методами клещей *I. persulcatus*, собранных в различных регионах России, был выявлен новый генотип риккетсий, принадлежащий к предковой (ancestral) группе, который был назван *Candidatus R. tarasevichiae* в честь академика И.В. Тарасевич (S. Shpynov et al., 2003).

Появление кандидатов в новые виды риккетсий приводит к необходимости проведения экспериментальных исследований по отбору оптимальных моделей для их изоляции и культивирования, отработке условий культивирования и накопления биомассы возбудителя, созданию препаратов для диагностики новых риккетсиозов. Фенотипические свойства *Candidatus R. tarasevichiae* в настоящее время окончательно не изучены. В связи с этим нами были изучены особенности культивирования новой риккетсии на биологических моделях: культуре клеток Vero, морских свинках при внутрибрюшинном заражении, сосунков беспородных белых мышей в возрасте 3-5 дней, а также КЭМ.

Нами успешно проведена изоляция из индивидуальных экземпляров клещей *I. persulcatus*, собранных в лесостепи Омской (Подгородка) и Новосибирской (Усть-Тарка) областей, и культивирование *Candidatus R. tarasevichiae* в культуре клеток Vero с использованием технологии shell vial. Весь материал культивировали на протяжении 4 пассажей. Полученные изоляты исследовали в однораундовой ПЦР с применением праймеров, амплифицирующих фрагменты генов цитратсинтазы (*gltA*), 16S

рибосомальной РНК и поверхностного мембранного белка 190 кДа (*ompA*) с последующим секвенированием положительных образцов ДНК.

8 лиофильно высушенных штаммов *Candidatus R. tarasevichiae* были депонированы во Всероссийский музей риккетсиозных культур НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва) под номерами 139-146. Получен патент на изобретение № 2354691 от 10.05.2009 г. Сведения об изолированных штаммах *Candidatus R. tarasevichiae* включены в базу данных «Коллекция штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки ФБУН «Омского НИИ природно-очаговых инфекций» (свидетельство №2022622333 от 23.09.2022 г.).

Изучение возможности воспроизвести экспериментальную инфекцию *Candidatus R. tarasevichiae* на морских свинках проводилось с использованием лиофильно высушенных штаммов «Усть-Тарка–10/2003», «Усть-Тарка–34/2003», «Подгородка-22/2003», «Подгородка-27/2003» в различных дозировках, как с применением гидрокортизона, так и без него. Умеренный подъем температуры на 1-1,2⁰ С отмечался на 9-10-й день после заражения. Скротальный феномен был либо слабо выражен, либо не наблюдался вовсе. У части животных наблюдалось снижение массы тела. У большинства животных при вскрытии отмечалась умеренная гиперемия сосудов брюшины и влагалищных оболочек яичек, паховых лимфоузлов, грануляция селезенки, а также значительная гиперемия и усиление сосудистого рисунка мозга и мозговых оболочек. При микроскопии мазков-отпечатков из лимфатических узлов, влагалищных оболочек яичек и легких, наблюдали незначительное накопление (от 10 до 25 в поле зрения) риккетсий, преимущественно в цитоплазме клеток исследованных органов. Наибольшее их количество (более 50 экземпляров в поле зрения) выявляли в мазках из мозга.

Нами также протестирована возможность использования для изоляции *Candidatus R. tarasevichiae* сосунков беспородных белых мышей. Начиная с 4-го дня после заражения у вскрытых животных наблюдалось усиление сосудистого рисунка мозга и увеличение селезенки, которые сохранялись до 10-го дня после заражения. ДНК риккетсий в ПЦР РТ выявляли в мозге и селезенке на 30-35 циклах реакции у сосунков, вскрытых на 4-й и 7-й день после заражения.

Учитывая роль иксодовых клещей как естественной среды обитания риккетсий, экспериментальное изучение их взаимоотношений имеет существенное значение для понимания закономерностей существования популяции возбудителя в природном очаге.

Нами проведено изучение трансвариальной передачи *Candidatus R. tarasevichiae* в лабораторных линиях клещей *I. persulcatus*, родительские особи которых были естественно инфицированы данной риккетсией в природе. При исследовании потомства двух самок первого поколения (50 пулов по 20 личинок) в однораундовой ПЦР с праймерами RP877p и RP1258n, амплифицирующими фрагмент гена цитрат-синтазы (*gltA*), ДНК риккетсий выявлена во всех 50 пробах голодных личинок, полученных от самки №1 ($100 \pm 0,0\%$), из 50 проб личинок, полученных от самки №2, положительными оказались 33 пробы ($66 \pm 6,8\%$). При секвенировании положительных в ПЦР проб подтверждено наличие ДНК *Candidatus R. tarasevichiae*.

Установлено, что *Candidatus R. tarasevichiae*, также как и *R. bellii*, реагирует с антителами как к риккетсиям группы КПЛ, так и к риккетсиям группы СТ. Перекрестное реагирование с антителами к риккетсиям групп КПЛ и СТ наблюдалось у риккетсий, содержащиеся в личинках, полученных от самки №1, в 30 исследованных пробах ($60,0 \pm 7,0\%$) у риккетсий, содержащиеся в личинках, полученных от самки №2 в 26 пробах ($52,0 \pm 7,1\%$).

Таким образом, можно утверждать, что наиболее адекватной моделью для изоляции и культивирования *Candidatus R. tarasevichiae* являются КЭМ и культура клеток. Самцы морских свинок при заражении этой риккетсией, в отличие от риккетсий группы КПЛ, практически не демонстрируют скротальный феномен. Тем не менее, мы считаем, что полностью отказываться от этой модели не целесообразно. Необходимо экспериментально подбирать подходящие условия, в том числе использование препаратов, подавляющих работу иммунной системы животных, например кортикостероидов, для использования морских свинок в работе с *Candidatus R. tarasevichiae*. Также в настоящее время у нас не сложилось окончательное мнение о возможности использования куриных эмбрионов для культивирования этой риккетсии. Применение сосунков беспородных белых мышей для изоляции *Candidatus R. tarasevichiae* мы считаем нецелесообразным.

Роль новых видов риккетсий в инфекционной патологии человека

Описание случаев клещевого риккетсиоза, ассоциированных с *R. raoultii* в Омской области

В отношении возможной патогенности *R. raoultii* для человека в Европе получены данные о вероятной роли этой новой риккетсии в возникновении синдрома TIBOLA или

DEBONEL, который ранее связывали только с *R. slovaca* (D. Raoult et al., 1997, D. Raoult et al., 2002, V. Ibarra et al., 2006). В Китае описано два случая инфекции, связанной с *Rickettsia raoultii*, при отсутствии классической клиники КР или TIBOLA, с преобладанием местных проявлений на месте присасывания клеща в виде болезненной эритематозной сыпи (Н.В. Рудаков, 2016).

Наши данные также подтверждают способность *R. raoultii* вызывать инфекционный процесс. В Омской области в клещах *D. reticulatus*, снятых с трех пациенток в возрасте 7, 12 и 39 лет, выявлена ДНК *R. raoultii*. В двух случаях уровень гомологии полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *ompA* с последовательностью генотипа RpA 4 составил 100 %, в одном - 99,5 %, а фрагментов гена *gltA* – составил 98,6 % и 100 % гомологии с этим генотипом. Двум пациенткам поставлен диагноз «лимфаденит». У третьей пациентки наблюдалась субфебрильная температура, эритематозная реакция на месте присасывания клеща. У всех больных результаты исследования снятых клещей в ИФА на наличие антигена вируса клещевого энцефалита и в ПЦР на наличие ДНК *Borellia* sp. – отрицательные.

Также нами в РСК выявлены антитела к *R. raoultii* (генотипы RpA 4 и DnS 28) у серонегативных к *R. sibirica* больных с клиническими проявлениями после присасывания клещей. Положительные результаты получены в 12 сыворотках из 174 ($6,8 \pm 1,9$ %) из Усть-Тарского района Новосибирской области и в 9 сыворотках из 21 ($42,8 \pm 10,8$ %) из Алтайского края.

Описание случая клещевого риккетсиоза с летальным исходом, ассоциированного с *Candidatus R. tarasevichiae* и *R. sibirica* в Красноярском крае

Как правило, КР в России имеют умеренные клинические проявления (Н.В. Рудаков и А.С. Оберт, 2001). Тем не менее, в 2017 году в Красноярском крае была зарегистрирована фатальная инфекция четырехлетней девочки с типичными симптомами клещевого риккетсиоза (лихорадка, сыпь, струп в месте укуса клеща, миалгия) и менингеальным синдромом. Данные аутопсии (гепатоспленомегалия, отек мозга) и результаты гистологического обследования (продуктивный васкулит головного мозга, спинного мозга и кожи, полиморфно-клеточные периваскулярные инфильтраты в печени и легких, серозный менингит, миелоидная гиперплазия селезенки и лимфатических узлов, интерстициальный лимфоидный инфильтрация в миокарде) подтвердили клинический диагноз клещевого риккетсиоза.

Все клинические образцы были отрицательными в ПЦР с праймерами, специфичными для других клещевых агентов и кишечных вирусов. ДНК *R. sibirica* subsp. *sibirica* и *Candidatus R. tarasevichiae* были идентифицированы в образцах крови и мозга с использованием двухраундовой ПЦР и секвенирования. Полученные последовательности генов *gltA*, *ompA* и *ompB* *R. sibirica* были идентичны соответствующим последовательностям штамма 246 *R. sibirica* (NCBI GenBank NZ_AABW01000001). Полученные последовательности генов *gltA* и *ompB* *Candidatus R. tarasevichiae* были идентичны известным последовательностям *Candidatus R. tarasevichiae* из клещей *I. persulcatus* (NCBI GenBank AF503167, KR150783).

Клинические симптомы смешанной инфекции, описанные в этом исследовании, отличаются от типичных СКТ наличием выраженного менингеального синдрома, воспаления сосудов головного и спинного мозга и повреждения печени, легких, селезенки и сердца. Примечательно, что проявление менингита было описано в фатальном случае риккетсиоза, вызванного *Candidatus R. tarasevichiae* (N. Jia et al., 2013). Всего было описано 61 случай этой инфекции, смертельный исход был зафиксирован в девяти случаях; восемь из них были вызваны смешанной инфекцией с буньявирусом (N. Jia et al., 2013; W. Liu et al., 2016).

Описание нового очага клещевых риккетсиозов в Омской области

В современный период продолжается формирование ареала *R. sibirica*. Для периферийных участков нозоареала СКТ характерно распространение штаммов риккетсий, отличающихся низкими иммуногенностью и вирулентностью для морских свинок (Н.В. Рудаков и А.С. Оберт, 2001).

В Омской области до недавнего времени случаи СКТ не регистрировались, однако, начиная с 2003 г., когда был выявлен пациент с острым лихорадочным заболеванием, возникшим после присасывания клеща, в Называевском районе наблюдаются случаи заболеваний после присасывания клещей с характерными для СКТ клиническими проявлениями (первичный аффект на месте присасывания клеща, лихорадка, головная боль, слабость, розеолезная или розеолезно-петехиальная сыпь). Всего за период 2003-2015 гг. из 13 населенных пунктов Называевского района в ЦРБ поступило 154 пациента с характерной для КР клинической картиной. У взрослых пациентов преобладала среднетяжелая форма заболевания, у детей и молодых людей – лёгкая.

Практически у всех пациентов обнаружен первичный аффект (корочка с

инфильтратом) с регионарным лимфаденитом. Основным клиническим симптомом у детей являлся регионарный лимфаденит, сопровождавшийся субфебрильной или нормальной температурой. В 2009 г. впервые серологически (в реакции связывания комплемента (РСК) с антигеном *R. sibirica*) был подтвержден случай СКТ. С 2013 г. у пациентов инфекционного отделения ЦРБ сероконверсию к риккетсиям выявляют ежегодно, преимущественно в низких титрах. В период с 2009 по 2023 гг. нами в РСК исследовано 284 образца сывороток крови, положительные результаты получены в $16,19 \pm 0,96\%$ случаев. При исследовании 68 образцов в РНИФ с антигеном *R. sibirica* сероконверсия выявлена в $25,0 \pm 5,2\%$ случаев. Комплементсвязывающие антитела выявлялись, как правило, в низких титрах (1:20-1:40 - 31 человек, 1:80 – 1:320 – 15 человек). Результаты включены в базу данных ««Результаты серологических исследований на клещевые риккетсиозы по данным ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора» (свидетельство № 2023621833).

ДНК риккетсий выявлено в ПЦР в полевых сборах клещей, биоптатах и переносчиках, снятых с людей, постоянно проживающих в Называевском районе. В двух исследованных образцах клещей рода *Dermacentor*, снятых с людей, нам удалось амплифицировать и секвенировать фрагменты гена поверхностного белка *ompA* *R. raoultii*. В органах биопробных животных, зараженных *D. marginatus* из н.п. Кисляки, молекулярно-биологическими методами (ПЦР+секвенирование) идентифицирована *R. sibirica*. Клиническая и патологоанатомическая картина у зараженных морских свинок соответствовала проявлениям СКТ.

Таким образом, наличие природного очага риккетсиозов с циркуляцией двух видов риккетсий группы КПЛ: классического патогена *R. sibirica* и нового патогена *R. raoultii*, подтверждено выявлением в переносчиках группоспецифического антигена риккетсий группы КПЛ методом иммунофлюоресценции, сероконверсией к антигенам указанных видов у пациентов и биопробных животных и идентификацией изолятов из клещей молекулярно-биологическими методами (ПЦР+секвенирование). Трудности изоляции штаммов *R. sibirica*, а также преобладание у пациентов сероконверсии в невысоких титрах подтверждают предположение о преобладании на периферии нозоареала СКТ штаммов риккетсий, отличающихся низкой иммуногенностью и вирулентностью.

Изучение спектра альфа-протеобактерий, циркулирующих среди мелких млекопитающих в природных очагах Омской области, с применением молекулярно-

генетических методов

Остается малоизученным вопрос о роли теплокровных хозяев в поддержании циркуляции α -протеобактерий в природных очагах. Известна роль диких млекопитающих в циркуляции *R. sibirica* в природных очагах. Что касается новых видов *R. raoultii* и *Candidatus R. tarasevichiae*, известны их членистоногие переносчики, но отсутствуют данные о резервуарной роли теплокровных животных в жизненном цикле и сохранении популяции этих микроорганизмов в природе. С целью выяснения роли мелких диких млекопитающих как резервуара альфа-протеобактерий проведен скрининг ДНК риккетсий и бартонелл в органах мелких грызунов 8 видов и *Sorex sp.* Исследовано 175 экземпляров мелких млекопитающих, отловленных в Омской области на двух значительно удаленных друг от друга участках лесостепной зоны весной и осенью 2005г. г. Используемые в работе выборки мелких млекопитающих отражают реальное соотношение видов грызунов на изучаемой территории.

Скрининг риккетсий в органах диких мелких млекопитающих с использованием молекулярно-биологических методов

Три образца селезенки полевок-экономок (*Microtus oeconomus*) были положительны в ПЦР с применением праймеров для амплификации *gltA* риккетсий. Продукты амплификации были секвенированы с теми же праймерами. Полученные нуклеотидные последовательности имели 86,5% гомологии с *R. canadensis*. Все три образца были также исследованы в ПЦР с использованием праймеров, амплифицирующих фрагменты генов 16S рРНК (*rrs*), *ompA*, *ompB*, *Scal* и *D*. Полученные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК имели 96,1 – 97,3% гомологии с *R. bellii*. Уровень гомологии исследуемых образцов с известными видами риккетсий по генам *gltA* и 16S рРНК оказался ниже принятого для внутривидовых различий (P. Fournier, et al., 2003), т.е. данные образцы не принадлежат ни к одному из известных видов риккетсий.

На дендрограммах, построенных с помощью метода «ближайшего соседа», видно, что исследуемые образцы филогенетически наиболее близки к риккетсиям предковой группы и являются представителями семейства *Rickettsiaceae* (Рисунок 6). Для окончательного заключения, входит ли эта новая бактерия в род *Rickettsia* или является кандидатом в новый род, необходимо ее дальнейшее изучение. К сожалению, выявить гены *ompA*, *ompB*, *Scal* и *D* у данных агентов не удалось, несмотря на неоднократные

попытки амплифицировать фрагменты этих генов как с общеизвестными, так и со специально синтезированными для этой цели праймерами

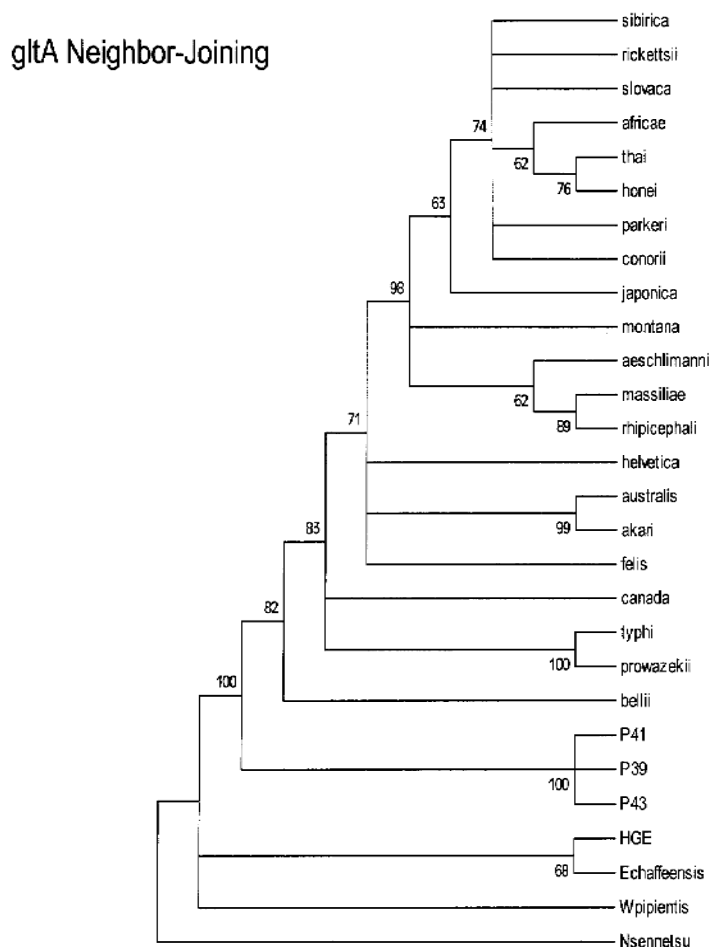


Рисунок 6 – Филогенетическое дерево, демонстрирующее позицию исследуемых образцов (P39, P41, 43) среди известных видов риккетсий и других представителей порядка *Rickettsiales* (анализ секвенсов *gltA* генов проведен методом «объединения ближайших соседей»)

Примечание: в узлах указаны индексы поддержки кладистических групп при общем числе попыток 100

Изучение спектра бартофель, циркулирующих на территории Омской области, с использованием молекулярно-генетических методов

И в южной, и северной лесостепи ДНК бартофель обнаружена только в органах *Myodes rutilus* и *M. glareolus*. В северной лесостепи ДНК бартофель выявлена у $7.6 \pm 2.3\%$ исследованных зверьков ($n=130$). В рекреационной зоне г. Омска ДНК бартофель выявлены только у красной полевки (пораженность $28.9 \pm 7.3\%$; $n=38$) (Таблица 2).

Таксономическая позиция данных образцов ДНК бартонелл была определена в соответствии с критериями, основанными на генотипических характеристиках,

Таблица 2 – Данные о количестве исследованных животных (n) и выявленных изолятов ДНК бартонелл (Bart.) у мелких млекопитающих из лесостепной зоны Омской области

Виды мелких млекопитающих	Тюкалинский район				Омский район		Всего	
	апрель		октябрь		сентябрь			
	n	Bart.	n	Bart.	n	Bart.	n	Bart.
Полевая мышь - <i>Apodemus agrarius</i> Pall.	0	0	4	0	—	—	4	0
Малая лесная мышь - <i>Sylvaemus uralensis</i> Pall.	8	0	—	—	—	—	8	0
Рыжая полевка - <i>Myodes glareolus</i> Schreb.	16	1	9	3	—	—	25	4
Красная полевка - <i>Myodes rutilus</i> Pall.	21	0	19	6	38	11	78	17
Темная полевка - <i>Microtus agrestis</i> L.	7	0	—	—	—	—	7	0
Узкочерепная полевка - <i>Mirotus gregalis</i> Pall.	2	0	—	—	—	—	2	0
Полевка-экономка - <i>Microtus oeconomus</i> Pall.	7	0	18	0	5	0	30	0
Бурозубки - <i>Sorex sp.</i>	19	0	—	—	2	0	21	0
Всего	80	1	50	8	45	12	175	21

предложенными В. La Scola с соавторами, для определения видов (2003 г.). Среди полученных нуклеотидных последовательностей 16S-23S межгенной спейсерной области выявлены как близкие к *B. grahamii* и *B. taylorii*, так и имевшие уровень различия с известными видами бартонелл, превышающий установленный для внутривидовых различий, т.е. не принадлежащие к известным видам.

Изучение генотипических характеристик бартонелл, не принадлежащих к известным видам, с использованием мультилокусного анализа

Три образца (P28, St42 и St490), имевших уровень различия с известными видами бартонелл, превышающий установленный для внутривидовых различий, были также изучены с использованием мультилокусного анализа. Таксономическая позиция данных образцов ДНК бартонелл была определена в соответствии с критериями, основанными на генотипических характеристиках, предложенными для определения видов (В. La Scola et al., 2003). Согласно данным критериям, уровень гомологии с известными видами *Bartonella* ниже, чем 99.8, 99.8, 96.0, 95.4 и 97.9% для *rrs*, *ITS*, *gltA*, *rpoB* и *ftsZ* генов соответственно, позволяют классифицировать изолят как относящийся к новому виду.

Исследуемые образцы P28, St42 и St490 имели идентичные нуклеотидные

последовательности фрагментов генов ITS и *ftsZ* высокий уровень гомологии нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *rpoB* (99,9-100%) и *rrs* (99,4-99,7%). Полученные нуклеотидные последовательности внесены в базу данных NCBI GenBank (№№ 682084 – 682092). Уровень гомологии изучаемых образцов с *B. clarridgeiae*, наиболее близким официально зарегистрированным видом, составил от 99,1% до 99,2% для *rrs* гена; от 90,8% до 91,3% для ITS; 95,1% для *gltA* гена; от 93,3% до 93,6% для *rpoB* гена; и от 94,8% до 95,1% для *ftsZ* гена. Таким образом, данные образцы не могут быть отнесены ни к одному из известных *Bartonella*, поскольку имеют уровень гомологии с другими видами ниже, чем cut-off, опубликованный для определения видовой принадлежности *Bartonella*. Мы назвали эту новую бартонеллу *Candidatus Bartonella rudakovii*. Типовой штамм - St490.

Среди официально зарегистрированных видов бартонелл наиболее генетически близким к *Candidatus B. rudakovii* является *B. clarridgeiae* - этиологический агент болезни кошачьей царапины и бациллярного ангиоматоза (Рисунок 7). Выявление нового агента у лесных полевок на значительно удаленных друг от друга территориях лесостепной зоны Среднего Прииртышья позволяет предполагать его широкое распространение в регионе.

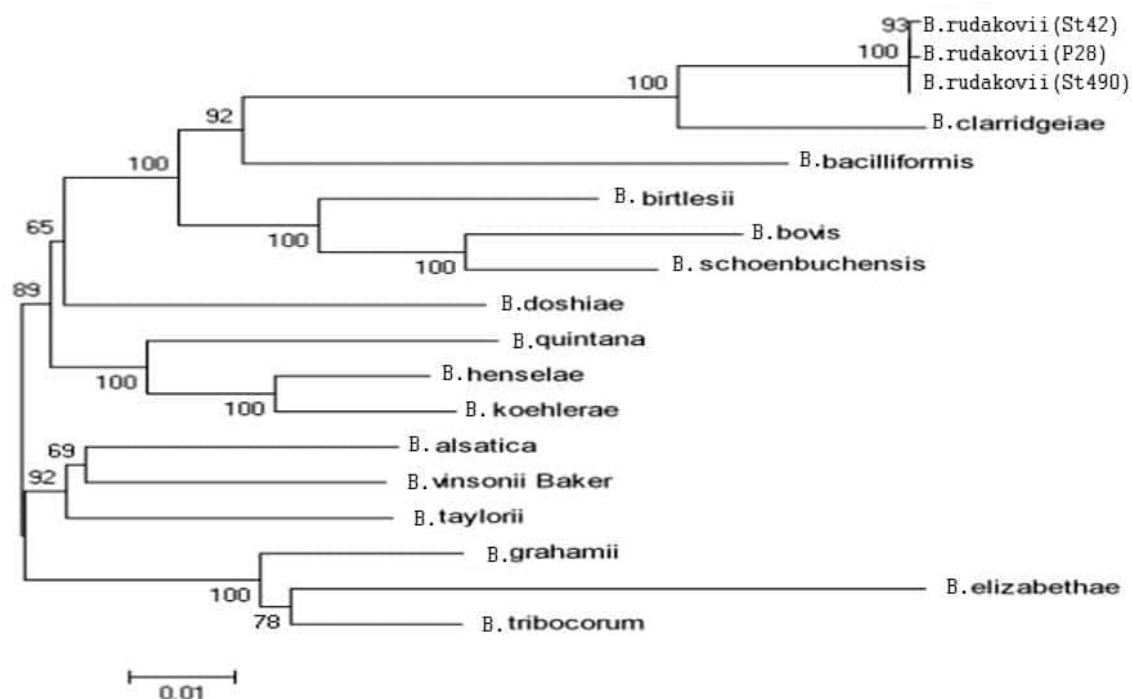


Рисунок 7 – Дендрограмма представляет филогенетические взаимоотношения зарегистрированных видов *Bartonella* и *Candidatus Bartonella rudakovii*

Примечание: дерево построено на основании анализа объединенных сиквентов *rrs*, *gltA*, ITS, *rpoB* и *ftsZ* генов бартонелл с помощью neighbor-joining метода, цифра в узлах означает bootstrap probability при общем числе попыток 100

Результаты наших исследований позволяют предположить, что мелкие дикие млекопитающие не имеют существенного значения в качестве резервуара риккетсий, а также, что они включаются в цикл циркуляции выявленных нами бартонелл, и, возможно, являются их основным резервуаром.

Для осуществления микробиологического мониторинга природных очагов бартонеллезом мы предлагаем следующий алгоритм:

1. Скрининг ДНК бартонелл в органах мелких диких млекопитающих и иксодовых клещах проводить с использованием праймеров UrBarto1 и UrBarto2, направленных на специфичные для бартонелл участки 16S-23S межгенной спейсерной области (*ITS*).

2. С целью идентификации полученные продукты амплификации секвенировать с использованием тех же праймеров UrBarto1 и UrBarto2.

3. Образцы, имевшие уровень различия с известными видами бартонелл, превышающий установленный для внутривидовых различий, должны быть изучены с использованием мультилокусного анализа. С этой целью рекомендуется проводить амплифицирование и секвенирование фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК (*rrs*), цитрат-синтазу (*glta*), β -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoB*), белок клеточного деления (*ftsZ*).

Новые подходы к микробиологическому мониторингу природных очагов риккетсиозов с использованием экспериментальных и молекулярно-биологических методов

Микробиологический мониторинг – это динамическая оценка циркуляции биологических свойств возбудителя инфекционного заболевания (В.В. Шкарин и др., 2015). Микробиологический и молекулярно-генетический мониторинги включают в себя сбор информации о циркулирующих в очаге возбудителях, их вирулентных, культуральных, биохимических, иммунологических и генетических характеристиках, а также позволяют отслеживать изменения свойств возбудителей, определять характер эпидемического распространения новых и завозных вариантов возбудителей.

С развитием методов молекулярно-биологического анализа связано описание значительного количества новых видов риккетсий. В связи с выявленной в результате наших исследований гетерогенности биологических и генетических свойств циркулирующих в РФ риккетсий нами предложен новый алгоритм мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов, включающий четыре этапа: скрининг

территории; изучение спектра риккетсий, циркулирующих в очаге; изучение особенностей биологических свойств риккетсий в популяции конкретного очага; изучение механизмов сохранения популяции риккетсий в очаге, с использованием молекулярно-биологических, классических риккетсиологических и экспериментальных методов, защищенный патентом на промышленный образец (№ 134323), в котором изложены предложения по совершенствованию микробиологического мониторинга за КР с использованием микробиологических, экспериментальных и молекулярно-биологических методов-(Рисунок 8).



Рисунок 8 – Схема «Алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов»

Первый этап данного алгоритма предполагает **скрининг ДНК риккетсий** с использованием ПЦР РТ с применением тест-системы «РеалБест ДНК *Rickettsia species*» либо ПЦР с детекцией в электрофоретическом геле с применением праймеров, амплифицирующих ген цитратсинтазы (*gltA*). Объектами исследования являются клещи и мелкие дикие млекопитающие. Этот этап актуален для неисследованных ранее территорий.

Второй этап мониторинга (в случае выявления ДНК риккетсий в клещах и/или в мелких диких млекопитающих) предусматривает **изучение видового спектра риккетсий, циркулирующих в очаге**. При этом расширяется диапазон объектов исследования, кроме вышеперечисленных рекомендуется изучать биоптаты и образцы крови от больных с клиническими проявлениями КР. Для идентификации риккетсий рекомендуется выполнять ПЦР с праймерами, амплифицирующими 5 house-keeping генами: *gltA*, *ompA*, *ompB*, 16S rRNA, *sca4* с последующим секвенированием по Сэнгеру.

Многолетний опыт работы нашей лаборатории показывает, что при мониторинговании очагов риккетсиозов молекулярно-биологическими методами на эндемичных территориях выявление *R. raoultii* часто «маскирует» присутствие этиологического агента СКТ - *R. sibirica*. Этим можно объяснить редкую выявляемость ДНК *R. sibirica* в иксодовых клещах молекулярно-биологическими методами на территориях с высоким уровнем заболеваемости СКТ. Для получения объективной информации о циркуляции *R. sibirica* в очаге мы рекомендуем использовать ПЦР РТ тест-системы «РеалБест ДНК *R. sibirica* / *R. heilongjiangensis*» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия) либо двухраундовую ПЦР с видоспецифическими праймерами, амплифицирующими гены *gltA* и *ompA* с последующим секвенированием.

Изоляция штаммов риккетсий является необходимым условием для изучения природного очага в полном объеме. Оптимальным методом для изоляции *R. sibirica* и других патогенных видов риккетсий является метод биопробы на самцах морских свинок, классический для риккетсиологии метод, используемый еще с начала прошлого века, но актуальный и в наше время. Суспензиями из органов, содержащих риккетсии, заражают развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) для накопления биомассы инфекционного агента. Однако, этот метод не подходит для изоляции штаммов риккетсий с низкой вирулентностью или видов (кандидатов в новые виды) с неустановленной патогенностью. В этом случае более адекватным подходом является использование культуры клеток. С

целью идентификации выделенных штаммов рекомендуется выполнять ПЦР с праймерами, амплифицирующими 5 house-keeping генами: *gltA*, *ompA*, *ompB*, 16S rRNA, *sca4* с последующим секвенированием по Сэнгеру.

Третий этап предлагаемого нами алгоритма предполагает **изучение биологических свойств риккетсий в популяции конкретного очага**. Одним из важнейших биологических свойств штаммов риккетсий является вирулентность для морских свинок. При внутрибрюшинном заражении самцов морских свинок устанавливают время появления после инокуляции и продолжительность лихорадки, максимальный подъем температуры, минимальную инфицирующую дозу, наличие и степень выраженности скротального феномена. При вскрытии животных описывают патологоанатомическую картину.

Культивирование штаммов риккетсий в развивающихся куриных эмбрионах также на протяжении нескольких десятилетий считается классическим риккетсиологическим методом. Однако, было установлено, что часть открытых в последнее время видов не могут развиваться в куриных эмбрионах. Поэтому мы полагаем целесообразным добавить в алгоритм мониторинга очагов КР изучение этого биологического свойства.

Некоторые новые виды риккетсий отличаются по своим культуральным характеристикам от давно известных «классических» патогенных видов, таких как *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. sibirica*, что диктует необходимость экспериментального поиска наиболее адекватных для них биологических моделей. При работе с культурами клеток нужно учитывать, что размножение отдельных видов риккетсий, например *R. peacockii*, возможно только в определенных видах культур клеток.

В случае определения у изолята отличий от известных видов риккетсий по 5 house-keeping генам необходимо осуществлять филогенетический анализ, и, по возможности, полногеномное секвенирование.

Четвертым, завершающим этапом мониторинга мы рекомендуем проводить **изучение механизмов сохранения популяции риккетсий в очаге**.

Риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами с широким кругом хозяев – кровососущих членистоногих и их теплокровных прокормителей. Высокая адаптация к организму членистоногих большинства видов риккетсий позволяет рассматривать клещей не только в качестве переносчиков риккетсий, но и в качестве их резервуара. Одними из важнейших количественных показателей экологической

специфичности вектора для инфекционного агента, по мнению В.Н. Беклемишева (1961), являются эффективность трансвариальной передачи и интенсивность размножения агента в организме вектора. Уровень вертикальной передачи риккетсий (ТОП и ТПФ) в переносчике позволяет на протяжении нескольких поколений позволяет делать вывод является ли определенный вид клещей компетентным вектором для данного вида риккетсий. Рекомендуется исследовать клещей как в голодном состоянии, так и после кормления на всех стадиях метаморфоза (личинки – нимфы – имаго). Целостное представление дает использование в качестве прокормителей как амплифицирующих, так и неамплифицирующих риккетсии животных. Под термином «амплифицирующий теплокровный хозяин» понимают инфицированное теплокровное животное, в организме которого происходит размножение и накопление патогенов. Сохранения в природном очаге популяции конкретного вида риккетсий за счет только/преимущественно вертикальной передачи возможно при эффективной вертикальной передачи риккетсий (ТОП и ТПФ) в условиях кормления переносчиков на неамплифицирующих теплокровных хозяевах.

Длительность риккетсемии в организме теплокровного хозяина влияет на роль мелких диких млекопитающих в сохранении популяции риккетсий в природном очаге. В эксперименте можно изучать этот процесс, подсаживая на животное для кормления зараженных клещей из лабораторных линий.

Изучение межмикробных взаимодействий (синергетические и антагонистические взаимоотношения) различных видов риккетсий, а также риккетсий других клещевых патогенов в организме переносчика на всех стадиях метаморфоза и в организме теплокровного хозяина в лабораторных условиях возможно с использованием клещевой экспериментальной модели.

Таким образом, предлагаемый нами алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов позволяет в полном объеме получать адекватную информацию о состоянии природного очага и прогнозировать его развитие.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены основные иммунобиологические характеристики *Candidatus R. tarasevichiae* и *R. raoultii* с возможностью их культивирования на культуре клеток Vero и в лабораторных линиях клещей. Установлена способность *Candidatus R. tarasevichiae* вызывать у морских свинок нелетальный инфекционный процесс с преимущественным

поражением сосудов головного мозга. Установлена эффективная трансвариальная передача ($66 \pm 6,8\%$ - 100%) данного вида риккетсий на протяжении двух поколений лабораторных линий клещей и наличие антигенных связей как с риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки, так и с риккетсиями группы СТ.

2. На примере *R. raoultii* и *R. sibirica* экспериментально подтверждена гипотеза о возможности конкурентных отношений между видами риккетсий с различной степенью патогенности. Установлено, что инфицированность клещей *R. raoultii* препятствует их заражению *R. sibirica*, что может ограничивать распространение патогенной *R. sibirica*.

3. Высокий уровень как трансвариальной ($80,0 \pm 5,6\%$ - $98,0 \pm 1,4\%$), так и трансфазовой ($82,0 \pm 5,4\%$ - 100%) передачи для всех генотипов *R. raoultii* и повышение концентрации риккетсий после кормления на теплокровных животных свидетельствуют, что иксодовые клещи рода *Dermacentor* являются компетентным вектором *R. raoultii*. Высокий уровень вертикальной передачи на протяжении 5 – 7 поколений при кормлении переносчиков на неамплифицирующих *R. raoultii* животных свидетельствует также о возможности сохранения популяции этого вида риккетсий в очаге за счет только вертикальной передачи.

4. Выявлен ранее неизвестный сочетанный природный очаг с одновременной циркуляцией *R. sibirica* и *R. raoultii* в Омской области. Получены новые данные о вероятной роли новых клещевых риккетсий: *R. raoultii* и *Candidatus R. tarasevichiae* в инфекционной патологии человека и впервые в РФ описан летальный случай смешанной инфекции *R. sibirica* и *Candidatus R. tarasevichiae*.

5. Впервые выявлен спектр бартонелл на юге Западной Сибири, который представлен как известными патогенными для человека видами *B. grahamii* и *B. taylorii*, так и новым генотипом. Выявленный нами новый генотип *Candidatus B. rudakovii* наиболее филогенетически близок к известному патогенному для человека виду - *B. clarridgeiae* (уровень гомологии составил составил от 99,1% до 99,2% для *rrs* гена; от 90,8% до 91,3% для ITS).

6. Разработан алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов бартонеллезоз с учетом ведущей роли диких мелких млекопитающих в циркуляции возбудителя.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентов с лимфаденитами, иммунодефицитными состояниями, предварительным диагнозом «реакция на укус клеща» после нападения иксодид на территории природного очага риккетсиоза необходимо обследовать на инфицированность *R. raoultii*, *R. slovaca*, *Candidatus R. tarasevichiae*.

2. При скрининге природных очагов риккетсиозов молекулярно-биологическими методами необходимо учитывать, что на эндемичных территориях выявление *R. raoultii* часто «маскирует» присутствие этиологического агента сибирского клещевого тифа - *R. sibirica*, предупредить подобную ситуацию позволяет применение ПЦР с использованием видоспецифических праймеров.

3. Для всестороннего изучения природных очагов риккетсиозов рекомендуется использовать предложенный «Алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов», использующий комплекс классических риккетсиологических, молекулярно-биологических и экспериментальных методов и включающий поэтапное исследование - от скрининга ДНК риккетсий в клещах и мелких диких млекопитающих до изучения механизмов сохранения популяции риккетсий в очаге.

4. Изучение экологической связи риккетсий и переносчиков, межмикробных взаимодействий различных видов риккетсий, а также риккетсий и других клещевых патогенов с выявлением потенциальных синергетических и антагонистических взаимоотношений в организме переносчика на всех стадиях метаморфоза и в организме теплокровного хозяина рекомендуется проводить с использованием клещевой экспериментальной модели.

5. В случаях клещевого риккетсиоза с летальным исходом необходимо в обязательном порядке передавать аутопсийные материалы в референс-центр по мониторингу за риккетсиозами для верификации диагноза и выявления случаев микст-инфицирования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования должны быть направлены на оптимизацию комплекса экспериментальных и молекулярно-биологических методов для повышения их информативности. Необходимо продолжить поиск лабораторных животных, амплифицирующих *Candidatus R. tarasevichiae* и провести сравнение уровня

вертикальной передачи этой риккетсии при использовании амплифицирующих и неамплифицирующих теплокровных прокормителей. Необходимо изучить микст-инфекцию *R. sibirica* и *Candidatus R. tarasevichiae* с использованием нескольких биологических моделей: клещевой экспериментальной модели, культуры клеток, лабораторные животные.

Целесообразно провести экспериментальное изучение взаимного влияния различных видов риккетсий, а также риккетсий и других инфекционных агентов, передаваемых клещами с использованием клещевой экспериментальной модели.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Rudakov, N.V. Ecology and epidemiology of spotted fever group rickettsiae and new data from their study in Russia and Kazakhstan / N.V. Rudakov, S.N. Shpynov, I.E. Samoilenko, M.A. Tankibaev // *Annals of the New York Academy of Sciences. Rickettsiology: present and future directions*. - 2003. - Vol. 990, june. - P.12-24.
2. Samoilenko, I.E. Study of biological characteristics of spotted fever group rickettsial genotypes RpA4, DnS14 and DnS28 / I.E. Samoilenko, N.V. Rudakov, S.N. Shpynov, M.A. Tankibaev, V.V. Yakimenko, L.V. Kumpan // *Annals of the New York Academy of Sciences. Rickettsiology: present and future directions*. - 2003. - Vol. 990, june. - P. 612-616.
3. Шпынов, С.Н. Генотипирование риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, выявленных в России и Казахстане / С.Н. Шпынов, Р. Parola, Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, М.А. Танкибаев, И.В. Тарасевич, D. Raoult, Н.Г. Ковалев, М.И. Чубирко, А.П. Гаврилов // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. - 2003. - №3. - С. 20-24.
4. Шпынов, С.Н. Генетическая идентификация риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, изолированных в очагах клещевого риккетсиоза / С.Н. Шпынов, Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, Т.А. Решетникова, В.К. Ястребов, М.С. Шайман, Р.Е. Fournier, D. Raoult // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. - 2004. - № 5. - С.43-48.
5. Самойленко, И.Е. Оптимизация метода экспериментального моделирования естественного цикла метаморфоза переносчиков для изоляции, культивирования и изучения риккетсий новых генотипов / И.Е. Самойленко, С.Н. Шпынов, Н.В. Рудаков // *Омский научный вестник*. - 2006. - № S1. - С. 93-95.
6. Shpynov, S.N. Short report: Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia / S.N. Shpynov, P.E. Fournier, N.V. Rudakov, I.E. Samoilenko, T.A. Reshetnikova, V.K. Yastrebov, M. Schaiman, I.V. Tarasevich, D. Raoult // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. - 2006. - 74 (3). - P. 440-443.
7. Samoylenko, I.E. Methods of isolation and cultivation of new rickettsiae from the nosoarea of the north asian tick typhus in Siberia / I.E. Samoylenko, L.V. Kumpan, S.N. Shpynov, A.S. Obert, O.V. Butakov, N.V. Rudakov // *Annals of the New York Academy of Sciences. Rickettsiology: century of rickettsiology (emerging, reemerging rickettsioses, molecular diagnostics, and emerging veterinary rickettsioses)*. - 2006. - V. 1078. - P. 613-

8. Рудаков, Н.В. Новые методические подходы к изучению *Rickettsiales* / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, **И.Е. Самойленко**, Л.В. Кумпан, Т.А. Решетникова, А.П. Красиков // Уральский медицинский журнал. - 2006. - специальный выпуск № 2: микробиология. - С.16-18.
9. **Mediannikov, O. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia** / O. Mediannikov, K. Matsumoto, I. Samoylenko, M. Drancourt, V. Roux, E. Rydkina, B. Davoust, I. Tarasevich, P. Brouqui, P.-E. Fournier // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2008. - № 58. - P. 1635-1639.
10. **Samoylenko, I.E.** Detection of α -proteobacteria in rodents in a steppe-forest zone of western Siberia / **I.E. Samoylenko**, D. Raoult, M.G. Malkova, A.K. Tantsev, V.V. Yakimenko, N.V. Rudakov, P.-E. Fournier // *Clinical Microbiology & Infection*. - 2009. - V. 15, issue s2: Advances in Rickettsiology. - P. 127-129.
11. Rudakov N.V. Characterisation of the Omsk collection of rickettsial strains // N.V. Rudakov, S.N. Schpynov, **I.E. Samoylenko**, P.-E. Fournier, T.A. Reschetnikova, L.V. Kumpan, D. Raoult // *Clinical Microbiology & Infection*. - 2009. - V. 15, issue s2: Advances in Rickettsiology. - P. 289-299.
12. **Samoylenko, I.E.** Evalution of *Dermacentor* species naturally infected with *Rickettsia raoultii* / **I. Samoylenko**, S. Schpynov, D. Raoult, N. Rudakov, P.-E. Fournier // *Clinical Microbiology & Infection*. - 2009. - V. 15, issue s2: Advances in Rickettsiology. - P. 305-306.
13. **Самойленко, И.Е.** Выявление кандидата в новый вид бартонелл в популяциях диких мелких млекопитающих в Западной Сибири / **И.Е. Самойленко**, P.-E. Fournier, В.В. Якименко, М.Г. Малькова, А.К. Танцев, D. Raoult // *Сибирский медицинский журнал*. - 2011. - №1. - С. 39-42.
14. Рудаков, Н.В. Учение о риккетсиях и риккетсиозах / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, **И.Е. Самойленко**, Т.А. Решетникова, Л.В. Кумпан // *Бюллетень СО РАМН*. - 2011. - №4. - С. 86-92.
15. Рудаков, Н.В. Клещевой риккетсиоз и риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки в России: монография / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, **И.Е. Самойленко**, А.С. Оберт. – Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2011. – 232 с.
16. Кумпан Л.В. Особенности культивирования нового генотипа *Candidatus Rickettsia tarasevichae* на биологических моделях (культуры клеток, морские свинки) / Л.В. Кумпан, **И.Е. Самойленко**, Т.А. Решетникова, С.Н. Шпынов, Н.В. Рудаков // *Уральский медицинский журнал*. – 2011. - № 13 (91). - С. 67-69.
17. **Самойленко, И.Е.** Выявление нового очага клещевого риккетсиоза в Западной Сибири / **И.Е. Самойленко**, Т.А. Решетникова, Е.В. Шаламова, Л.В. Кумпан, М.А. Лебедева // *Здоровье населения и среда обитания*. – 2012. - № 1 (226). – С. 14-15.
18. Шпынов, С.Н. Применение молекулярных методов типирования при изучении штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки и вируса бешенства / С.Н. Шпынов, Е.М. Полещук, Н.В. Рудаков, **И.Е. Самойленко**, Т.А. Решетникова, Л.В. Кумпан, А.Н. Коломеец, Г.Н. Сидоров, С.А. Ткачев, С.В. Грибенча // *Проблемы особо опасных инфекций*. - 2012. - №1 (111). - С.77-80.
19. Рудаков, Н.В. Основные итоги разработки проблемы риккетсиозов, передающихся иксодовыми клещами, в России / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, В.К. Ястребов, **И.Е. Самойленко**, Л.В. Кумпан, Т.А. Решетникова, Н.А. Абрамова, А.Н. Коломеец // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2012. - № 5 (66). – С. 29-33.
20. Рудаков, Н.В.: Риккетсии и риккетсиозы клещевой пятнистой лихорадки в Сибири:

монография / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, И.Е. Самойленко, В.К. Ястребов, А.С. Оберт, Н.Ю. Курепина. – Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2012. – 288 с.

21. Самойленко, И.Е. Изучение адаптации *Rickettsia raoultii* к основным переносчикам – клещам рода *Dermacentor* с использованием экспериментальных методов / И.Е. Самойленко, С.Н. Шпынов, В.В. Якименко, Н.В. Рудаков // Сибирский медицинский журнал. - 2013. - № 5. - С. 59-61.

22. Кумпан, Л.В. Получение и экспериментальное изучение антигенов клещевых α -протеобактерий / Л.В. Кумпан, Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, А.П. Красиков, Н.В. Абрамова, Т.А. Решетникова, Е.В. Матущенко // Здоровье населения и среда обитания. – 2014. - № 12 (261). – С. 36-39.

23. Рудаков, Н.В. Проблемы лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России / Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, Т.А. Решетникова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2015. - № 1. - С. 50-52.

24. Рудаков, Н.В. Актуальные аспекты изучения *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, И.Е. Самойленко, Л.В. Кумпан, А.Н. Коломеец, Н.В. Абрамова, Т.А. Решетникова, Н.А. Околелова // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2015. - № 6. – С. 14-19.

25. Рудаков, Н.В. Алгоритмы выявления риккетсий и лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России / Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, Л.В. Кумпан // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 14, № 2. – (81). – С. 6-9.

26. Самойленко, И.Е. Результаты выявления антител к риккетсиям в сыворотках крови пациентов в Омской области и Западно-Казахстанской области республики Казахстан / И.Е. Самойленко, Н.В. Рудаков, Т.А. Решетникова, Р.А. Егембердиева, Е.В. Шаламова, С.В. Штрек, Л.В. Кумпан // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2015. - № 1 (80). – С. 36-38.

27. Самойленко, И.Е. Выявление генотипов *Rickettsia raoultii* в южном Казахстане / И.Е. Самойленко, Л.В. Кумпан, Н.А. Околелова, Я.П. Иголкина, Ю.А. Тикунов, В.А. Рар, Р.А. Егембердиева, А.Н. Коломеец, Т.А. Решетникова, Н.В. Рудаков // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 15, № 5 (90). – С.43-45.

28. Рудаков, Н.В. Новые эколого-эпидемиологические аспекты изучения очагов клещевых риккетсиозов на основе молекулярно-биологических методов / Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, Т.А. Решетникова, Л.В. Кумпан // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. - № 11 (284). – С. 5-7.

29. Самойленко, И.Е. Результаты микробиологических и молекулярно-биологических исследований в сочетании очаге клещевых риккетсиозов в Омской области / И.Е. Самойленко, Т.А. Решетникова, Я.П. Иголкина, Н.А. Околелова, А.Н. Коломеец, Е.В. Шаламова, А.К. Танцев, С.В. Штрек, Н.В. Рудаков // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. - № 11 (284). – С. 19-21.

30. Рудаков, Н.В. Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки / Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2017. - № 2 (19). – С. 43-48.

31. Рудаков, Н.В. Современное состояние очагов сибирского клещевого тифа / Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, Т.А. Решетникова, Д.А. Савельев, Л.В. Кумпан // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. - № 6 (303). – С. 49-52.

32. Боброва, О.А. Изучение уровня трансовариальной передачи *Candidatus R. tarasevichiae* в лабораторных линиях клещей *Ixodes persulcatus* / О.А. Боброва, И.Е. Самойленко, В.В. Якименко, С.В. Штрек, В.А. Рар, Я.П. Иголкина // В книге: Микроорганизмы и биосфера

“Microbios-2018”. Материалы IV Национального конгресса бактериологов и международного симпозиума. - 2018. - С. 14-15.

33. Рудаков, Н.В. Случай клещевого риккетсиоза с летальным исходом в Красноярском крае / Н.В. Рудаков, И. Е. Самойленко, С.В. Штрек, Л.В. Кумпан, Т.В. Кострыкина, Л.С. Гурьева, П.А. Ленц, Я.П. Иголкина, В.А. Рар, Е.В. Жираковская, С. Е. Ткачев, Н.В. Тикунова // В книге: Микроорганизмы и биосфера “Microbios-2018”. Материалы IV Национального конгресса бактериологов и международного симпозиума. - 2018. - С. 59-60.

34. Штрек, С.В. Оценка эффективности серологических методов для выявления антител у больных клещевыми риккетсиозами на территориях различного риска заражения *Rickettsia sibirica* / С.В. Штрек, Н.В. Рудаков, Н.В. Абрамова, И.Е. Самойленко, Г.В. Березкина, С.Ю. Зеликман, Л.В. Кумпан, Е.В. Матущенко // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63 (11), № 12. – С. 777-782.

35. Рудаков, Н.В. Особенности эпидемической ситуации по сибирскому клещевому тифу и другим клещевым риккетсиозам в Российской Федерации, прогноз на 2019 г. / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, Д.В. Транквилевский, Д.А. Пакскина, Д.А. Савельев, И.Е. Самойленко, Т.А. Решетникова, Л.В. Кумпан, Н.А. Пеньевская // Проблемы особо опасных инфекций. - 2019. - № 1. - С. 89-97.

36. Rudakov, N. A fatal case of tick-borne rickettsiosis caused by mixed *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica* and "*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*" infection in Russia / N. Rudakov, I. Samoylenko, S. Shtrek, Y. Igolkina, V. Rar, E. Zhirakovskaia, S. Tkachev, T. Kostrykina, I. Blokhina, P. Lentz, N. Tikunova // Ticks and Tick-borne Diseases. - 2019. - Vol.10, №6: 101278.

37. Рудаков, Н.В. Особенности эпидемиологической ситуации по клещевым риккетсиозам в Российской Федерации в 2010-2020 гг. и прогноз на 2021 г. / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, Н.А. Пеньевская, А.И. Блох, Т.А. Решетникова, И.Е. Самойленко, Л.В. Кумпан, С.В. Штрек, Д.А. Савельев, Н.В. Абрамова, Д.В. Транквилевский // Проблемы особо опасных инфекций. - 2021. - № 1. - С. 73-80.

38. Штрек, С.В. Валидация ПЦР в режиме реального времени для оценки количества риккетсий в исследуемом биологическом материале / С.В. Штрек, А.И. Блох, И.Е. Самойленко, А.В. Санников, О.А. Боброва, С.Н. Шпынов, Н.В. Рудаков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2022. – Т. 67, № 11. – С. 668-671.

39. Штрек, С.В. Генотипирование риккетсий, циркулирующих на территориях республики Алтай и Хабаровского края / С.В. Штрек, Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, А.В. Санников, И.Е. Самойленко, Л.Д. Щучинова, О.Е. Троценко, А.Г. Драгомерецкая, Е.В. Матущенко // Инфекция и иммунитет. - 2023. - Т. 13, № 1.- С. 100-106.

40. Самойленко, И. Е. Новые подходы к микробиологическому мониторингу природных очагов клещевых риккетсиозов / И. Е. Самойленко, Н. В. Рудаков // Бактериология. – 2024.- Т. 9, № 4. - С. 139–142.

ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ И ПАТЕНТ НА ПРОМЫШЛЕННЫЙ ОБРАЗЕЦ

1. Патент 2235769 Российская Федерация, МПК С 12 N 1/20, С 12 Q 1/04// (С 12 N 1/20, С 12 R 1:00). Апатогенный штамм риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, используемый для дифференциации патогенных и апатогенных риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки / Самойленко И.Е., Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., заявитель и правообладатель ФБУН «Омский научно-

- исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (RU). - № 2001127459; заявл. 09.10.2001; опубл. 27.07.2003, Бюл. № 25. – 4 с.
2. Патент 2354691 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01), A61K 39/395 (2006.01). Штамм риккетсий генотипа "*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*" – кандидат в новый вид, используемый для идентификации риккетсий и получения диагностических препаратов. /Шпынов С.Н., Кумпан Л.В., Самойленко И.Е., Рудаков Н.В. Заявитель и правообладатель ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (RU). - № 2007129411/13; заявл. 31.07.2007; опубл. 10.05.2009, Бюл. № 13. – 2 с.
3. Патент 2616287 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01), C 12 Q 1/04 (2006.01). Средство для получения препаратов для диагностики риккетсиоза, вызываемого *Rickettsia raoultii* генотипа DnS28. / Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., заявитель и правообладатель ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (RU). - № 2015152348; заявл. 07.12.2015; опубл. 13.04.2017, Бюл. № 11. – 2 с.
4. Патент 2704449 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01). Средство для получения препаратов для диагностики риккетсиоза, вызываемого *Rickettsia raoultii* генотипа DnS14. / Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Шпынов С.Н., Решетникова Т.А., Абрамова Н.В., Рудаков Н.В., заявитель и правообладатель ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (RU). - № 2017144336; заявл. 18.12.2017; опубл. 28.10.2019, Бюл. № 31. – 2 с.
5. Патент 2723410 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2019.08), C 12 Q 1/04 (2019.08), A61K 39/02 (2019.08). Средство для получения препаратов для диагностики риккетсиоза, вызываемого *R. sibirica* subsp. *sibirica*. / Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Шпынов С.Н., Кумпан Л.В., Абрамова Н.В., Решетникова Т.А., заявитель и правообладатель ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (RU). - № 2018143566; заявл. 07.12.2018; опубл. 11.06.2020, Бюл. № 17. – 2 с.
6. Патент 134323 Российская Федерация, МКПО 19-07. Схема "Алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов". / Самойленко И. Е.; Штрек С. В.; Шпынов С. Н.; Кумпан Л. В.; Рудаков Н. В., заявитель и правообладатель ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (RU). № 2022501328; заявл. 27.03.2022; опубл. 01.12.2022, Бюл. № 12.

СВИДЕТЕЛЬСТВА О РЕГИСТРАЦИИ

1. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2022622333 (RU) «Коллекция штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки ФБУН «Омского НИИ природно-очаговых инфекций». Штрек С.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Рудаков Н.В., заявитель и правообладатель ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (RU) № 2022622333заявл. 21.09.2022; опубл. 23.09.2022.
2. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023621833 (RU) «Результаты серологических исследований на клещевые риккетсиозы по данным ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора». Абрамова Н.В., Штрек С.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Березкина Г.В., Решетникова Т.А., Санников А.В., Кумпан Л.В., Боброва О.А., Красоткина С.Ю., Рудаков Н.В., заявитель и

правообладатель ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (RU) № 2023621478 заявл. 25.05.2023; опубл. 06 июня 2023.

НОРМАТИВНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

1. Организация эпидемиологического надзора за клещевым риккетсиозом: методические указания. - 3.1.1755-03. – Москва. – 2003. – 20 с.
2. Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами: санитарно-эпидемиологические правила. - СП 3.1.33100-15. – Москва. – 2015. – 19 с.
3. Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика лихорадки Ку: методические рекомендации. - МР 3.1.0281-22. – Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2022. – 47 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПЛ – Астраханская пятнистая лихорадка
ИФА – иммуноферментный анализ
КПЛ – группа клещевой пятнистой лихорадки
КР – клещевой риккетсиоз
СКТ - сибирский клещевой тиф
КЭМ – клещевая экспериментальная модель
ЛПС – липополисахарид
МКА – моноклональные антитела
МФА – метод флюоресцирующих антител
ПКА – поликлональные антитела
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНИФ – реакция непрямой флюоресценции
РСК – реакция связывания комплемента
СТ – сыпной тиф
ТОП – трансвариальная передача
ТПФ – трансфазовая передача
DEBONEL – Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy
DL50 (ЛД₅₀) – летальная доза, при которой погибает половина подопытных животных
gltA – ген кодирующий цитратсинтазу
ompA – ген кодирующий белок наружной мембраны rOmpA (190КД)
ompB – ген кодирующий белок наружной мембраны rOmpB (120 КД)
TIBOLA – англ.- tick borne lymphadenopathy – «лимфоаденопатия после присасывания клеща»