

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ОМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРИРОДНО-  
ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ»  
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ  
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Самойленко Ирина Евгеньевна

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

1.5.11. – микробиология

Диссертация  
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:  
доктор медицинских наук, профессор  
Н.В. Рудаков

Омск – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| Введение                                                               | 6  |
| Актуальность темы исследования                                         | 6  |
| Степень разработанности темы исследования                              | 7  |
| Цель исследования                                                      | 8  |
| Задачи исследования                                                    | 9  |
| Научная новизна                                                        | 9  |
| Теоретическая и практическая значимость                                | 11 |
| Методология и методы исследования                                      | 14 |
| Объекты исследования                                                   | 14 |
| Клещи из природных станций                                             | 14 |
| Клещи из лабораторных линий                                            | 16 |
| Клещи, снятые с людей                                                  | 17 |
| Дикие мелкие млекопитающие из природных станций                        | 17 |
| Животные, использованные для кормления иксодовых клещей                | 17 |
| Животные, использованные для биопробы                                  | 18 |
| Штаммы риккетсий                                                       | 18 |
| Культуры клеток                                                        | 18 |
| Образцы сывороток крови                                                | 19 |
| Биопсийные образцы крови и головного мозга                             | 19 |
| Риккетсиологические методы                                             | 19 |
| Молекулярно-генетические методы                                        | 22 |
| Культивирование риккетсий с использованием перевиваемых культур клеток | 30 |
| Методы статистической обработки                                        | 30 |
| Личное участие автора в получении результатов                          | 30 |
| Основные положения, выносимые на защиту                                | 31 |
| Степень достоверности и апробация результатов исследования             | 32 |
| ГЛАВА 1 СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕНИЯ «НОВЫХ» КЛЕЩЕВЫХ                            |    |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)                                                                    | 35 |
| 1.1. «Новые» клещевые риккетсиозы: история изучения, роль в<br>инфекционной патологии                        | 35 |
| 1.1.1. <i>Rickettsia aeschlimannii</i>                                                                       | 35 |
| 1.1.2. <i>Rickettsia africae</i>                                                                             | 36 |
| 1.1.3. <i>Rickettsia asiatica</i>                                                                            | 37 |
| 1.1.4. <i>Rickettsia buchneri</i>                                                                            | 37 |
| 1.1.5. <i>Rickettsia felis</i>                                                                               | 38 |
| 1.1.6. <i>Rickettsia gravesii</i>                                                                            | 39 |
| 1.1.7. <i>Rickettsia heilongjiangensis</i>                                                                   | 39 |
| 1.1.8. <i>Rickettsia helvetica</i>                                                                           | 40 |
| 1.1.9. <i>Rickettsia honei</i>                                                                               | 41 |
| 1.1.10. <i>Rickettsia hoogstraalii</i>                                                                       | 42 |
| 1.1.11. <i>Rickettsia japonica</i>                                                                           | 42 |
| 1.1.12. <i>Rickettsia massiliae</i>                                                                          | 43 |
| 1.1.13. <i>Rickettsia monacensis</i>                                                                         | 44 |
| 1.1.14. <i>Rickettsia monteiroi</i>                                                                          | 45 |
| 1.1.15. <i>Rickettsia peacockii</i>                                                                          | 45 |
| 1.1.16. <i>Rickettsia raoultii</i>                                                                           | 46 |
| 1.1.17. <i>Rickettsia slovaca</i>                                                                            | 48 |
| 1.1.18. <i>Rickettsia tamure</i>                                                                             | 49 |
| 1.1.19. <i>Candidatus Rickettsia tarasevichiae</i>                                                           | 50 |
| 1.1.20. Критерии видовой дифференциации риккетсий                                                            | 52 |
| 1.2. Современное состояние проблемы бартонеллезов                                                            | 55 |
| 1.2.1. <i>Bartonella bacilliformis</i>                                                                       | 56 |
| 1.2.2. <i>Bartonella quintana</i>                                                                            | 57 |
| 1.2.3. <i>Bartonella henselae</i>                                                                            | 58 |
| 1.2.4. Критерии для определения видов бартонелл, основанные на<br>сравнении нуклеотидных последовательностей | 66 |

|        |                                                                                       |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3.   | Биологические модели, используемые для изоляции, культивирования и изучения риккетсий | 67 |
| 1.3.1. | Морские свинки                                                                        | 67 |
| 1.3.2. | Мыши                                                                                  | 70 |
| 1.3.3. | Куриные эмбрионы                                                                      | 72 |
| 1.3.4. | Сирийские хомячки                                                                     | 73 |
| 1.3.5. | Культуры клеток                                                                       | 73 |
| 1.3.6. | Лабораторные клещевые линии                                                           | 75 |

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

|                                                                                                                       |                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ГЛАВА 2. Выявление и описание <i>R. raoultii</i> – нового вида риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки          |                                                                                                                                                                               | 89  |
| 2.1.                                                                                                                  | Характеристика генотипов <i>R. raoultii</i>                                                                                                                                   | 89  |
| 2.2.                                                                                                                  | Особенности культивирования <i>R. raoultii</i> с использованием биологических моделей (морские свинки, куриные эмбрионы, культуры клеток и экспериментальная клещевая модель) | 95  |
| 2.3.                                                                                                                  | Изучение взаимоотношений риккетсий нового вида <i>R. raoultii</i> и переносчиков с использованием клещевой экспериментальной модели                                           | 100 |
| 2.4.                                                                                                                  | Экспериментальное изучение межвидового взаимодействия риккетсий на примере <i>R. raoultii</i> и <i>R. sibirica</i>                                                            | 104 |
| ГЛАВА 3. Изучение биологических свойств <i>Candidatus R. tarasevichiae</i> с использованием экспериментальных методов |                                                                                                                                                                               | 108 |
| ГЛАВА 4. Роль новых видов риккетсий в инфекционной патологии человека                                                 |                                                                                                                                                                               | 114 |
| 4.1.                                                                                                                  | Описание случаев клещевого риккетсиоза, ассоциированных с <i>R. raoultii</i> в Омской области                                                                                 | 114 |
| 4.2.                                                                                                                  | Описание случая клещевого риккетсиоза с летальным исходом, ассоциированного с <i>Candidatus R. tarasevichiae</i> и <i>R. sibirica</i> в Красноярском крае                     | 116 |

|                                                                                                                                                                           |                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.                                                                                                                                                                      | Описание нового очага клещевых риккетсиозов в Омской области                                                                  | 119 |
| ГЛАВА 5. Изучение спектра альфа-протеобактерий, циркулирующих среди мелких млекопитающих в природных очагах Омской области с применением молекулярно-генетических методов |                                                                                                                               | 125 |
| 5.1.                                                                                                                                                                      | Скрининг риккетсий в органах диких мелких млекопитающих с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР)                    | 126 |
| 5.2.                                                                                                                                                                      | Изучение спектра бартонелл, циркулирующих на территории Омской области, с использованием молекулярно-генетических методов     | 131 |
| 5.3.                                                                                                                                                                      | Изучение генотипических характеристик бартонелл, не принадлежащих к известным видам, с использованием мультилокусного анализа | 136 |
| ГЛАВА 6. Новые подходы к микробиологическому мониторингу природных очагов риккетсиозов с использованием экспериментальных и молекулярно-биологических методов             |                                                                                                                               | 144 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ                                                                                                                                                                |                                                                                                                               | 152 |
| ВЫВОДЫ                                                                                                                                                                    |                                                                                                                               | 169 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ                                                                                                                                                 |                                                                                                                               | 171 |
| ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ                                                                                                                                    |                                                                                                                               | 172 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ                                                                                                                                                         |                                                                                                                               | 173 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ                                                                                                                                                         |                                                                                                                               | 175 |
| БЛАГОДАРНОСТИ                                                                                                                                                             |                                                                                                                               | 234 |

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [154]. В органах диких мелких млекопитающих и клещах выявлены бартоanelлы [18, 23]. 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 бартонелл 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. [28].

В 1949 году этот инфекционный агент был идентифицирован как представитель группы клещевых пятнистых лихорадок и описан как самостоятельный вид *Dermacentroxenus sibiricus* П.Ф. Здродовским [19], 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» регистрируется под названием «сибирский клещевой тиф».

На протяжении нескольких десятилетий считалось, что на территории РФ наличествует один клещевой риккетсиоз, вызываемый *R. sibirica* subsp. *sibirica*, пока в 80-х годах в Астраханской области не была выявлена неизвестная ранее лихорадка риккетсиальной этиологии. Под руководством И.В. Тарасевич были изолированы первые штаммы инфекционного агента, установлено его принадлежность к *R. conorii* – комплексу группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ). Заболевание было названо астраханской пятнистой лихорадкой (АПЛ), а его возбудитель - *R. conorii* subsp. *caspia*. Установлено, что основным переносчиком этого вида риккетсий являются клещи *Rhipicephalus pumilio*. В настоящее время заболеваемость астраханской пятнистой лихорадкой (код по МКБ-10 A77.1) регистрируется на стабильно высоком уровне.

В 1999 году Е. Rydkina с соавторами [309] в Астраханской области в клещах

*Rh. pumilio* и в республике Алтай в клещах *D. nuttalli* молекулярно-биологическими методами впервые идентифицировали риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки трех новых генотипов – *R. sp. RpA4* (*Rh. pumilio* Астрахань №4), *R. sp. DnS14* (*D. nuttalli* Сибирь №14) и *R. sp. DnS28* (*D. nuttalli* Сибирь №28). 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* [154, 396, 397, 400].

В азиатской части России выявлены очаги клещевого риккетсиоза, связанные с патогенным видом *R. heilongjiangensis* [28, 51, 214], *H. concinna* является основным переносчиком этого вида, который ранее был выявлен в Китае [477] и формально описан как новый вид Fournier P.E с соавторами в 2003 году [211].

Также в РФ установлена циркуляция *R. aeschlimannii*, *R. helvetica*, *R. slovacae*, *R. conorii* subsp. *conorii*, *R. sibirica* генотип *DJ-90*, «*Candidatus R. tarasevichiae*» и ряд кандидатов в новые виды риккетсий [10, 11, 12, 214, 242, 321].

На протяжении десятилетий изучение штаммов риккетсий строилось на схеме, которая была предложена П.Ф. Здродовским и Е.М. Голиневич (1972) [20], основанной на фенотипических признаках. Изоляция инфекционного агента проводилась с использованием лабораторных животных и развивающихся куриных эмбрионов. Позднее с этой целью применяли культуры клеток [283, 434, 472]. При культивировании в организме биопробного животного и развивающихся куриных эмбрионах селективное преимущество имеют высоковирулентные штаммы.

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. Трудности культивирования некоторых новых видов требуют 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 рРНК (*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 рРНК (*rrs*), *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* генов (номера доступа EU036982, EU036985, EU036986, EU036984 и EU036983 соответственно), 3 последовательности *R. sibirica* изолят «Кисляки-

63/14» фрагментов генов *ompB*, *gltA* и 16S рРНК (*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 бартонелл, 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**

#### **Клещи из природных станций.**

*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 природе по стандартной методике в Омской, Новосибирской, Тюменской, Иркутской областях, Республиках Алтай, Бурятия (Таблицы 1, 2) (экспедиционная группа ФБУН ОНИИПОИ, часть сборов выполнена при участии автора), Ставропольском (Пурмак К.А., ЦГиЭ по Ставропольскому краю) и Красноярском краях (А.В. Тимошкин, ЦГиЭ по Красноярскому краю), Республике Крым (Товинец Н.Н., ЦГиЭ по республике Крым), Казахстан (Танкибаев М.А., Егембердиева Р.А.).

Таблица 1 – Места сбора и количество иксодовых клещей, исследованных в биопробах на самцах морских свинок

| Территория                                                                        | Вид клещей                      | Количество клещей |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| Омская область, Называевский район                                                | <i>Dermacentor marginatus</i>   | 497               |
|                                                                                   | <i>Dermacentor reticulatus</i>  | 50                |
| Омская область, Оконешниковский район                                             | <i>Dermacentor marginatus</i>   | 50                |
| Республика Казахстан, Кызыл-Ординская область                                     | <i>Dermacentor niveus</i>       | 150               |
| Тюменская область, Армизонский район                                              | <i>Dermacentor marginatus</i>   | 50                |
| Красноярский край, Минусинский район<br><br><br><br>Идринский район               | <i>Dermacentor nuttalli</i>     | 69                |
|                                                                                   | <i>Dermacentor reticulatus</i>  | 35                |
|                                                                                   | <i>Haemaphysalis concinna</i>   | 24                |
|                                                                                   | <i>Dermacentor nuttalli</i>     | 130               |
|                                                                                   | <i>Haemaphysalis concinna</i>   | 25                |
| Новосибирская область, Татарский район<br>Искитимский район<br>Чистозерский район | <i>Dermacentor marginatus</i>   | 25                |
|                                                                                   | <i>Dermacentor marginatus</i>   | 50                |
|                                                                                   | <i>Dermacentor marginatus</i>   | 48                |
|                                                                                   |                                 |                   |
| Республика Крым                                                                   | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | 156               |
| Республика Алтай                                                                  | <i>Dermacentor nuttalli</i>     | 285               |
| Итого                                                                             | Клещей всех видов               | 1644              |

Таблица 2 – Места сбора и количество иксодовых клещей, исследованных в РНИФ с целью отбора образцов для культивирования риккетсий в экспериментальных линиях клещей и культурах клеток

| Территория                  | Вид клещей                     | Количество клещей |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------------|
| Ставропольский край         | <i>Dermacentor reticulatus</i> | 81                |
|                             | <i>Dermacentor marginatus</i>  | 147               |
| Омская область (Подгородка) | <i>Dermacentor reticulatus</i> | 135               |
|                             | <i>Ixodes persulcatus</i>      | 93                |
| Иркутская область           | <i>Dermacentor silvarum</i>    | 48                |
| Красноярский край           | <i>Haemaphysalis concinna</i>  | 35                |
|                             | <i>Ixodes persulcatus</i>      | 11                |
| Республика Алтай            | <i>Dermacentor marginatus</i>  | 120               |
| Итого                       |                                | 670               |

### Клещи из лабораторных линий

Для изучения особенностей экологии риккетсий нового вида *R. raoultii* использованы естественно инфицированные в природе данным видом лабораторные линии четырех видов клещей рода *Dermacentor*: *D. nuttall* Olenov, *D. silvarum* Olenov, *D. marginatus* Shulze и *D. reticulatus* Fabricius (Таблица 3).

Таблица 3 – Данные об объеме материала, исследованного в экспериментальных линиях клещей

| Объекты исследования                  | Использованный метод | Количество исследованного материала |
|---------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Личинки иксодовых клещей голодные     | РНИФ                 | 1800                                |
| Личинки иксодовых клещей напивавшиеся | РНИФ                 | 500                                 |
| Нимфы иксодовых клещей голодные       | РНИФ                 | 561                                 |
| Нимфы иксодовых клещей напивавшиеся   | РНИФ                 | 380                                 |
| Имаго                                 | РНИФ                 | 82                                  |
| Итого                                 |                      | 3323                                |

### **Клещи, снятые с людей**

Нами проведен скрининг ДНК бартоонелл в снятых с людей в Омской области иксодовых клещах для выяснения их роли в качестве резервуара. С этой целью 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.

### **Дикие мелкие млекопитающие из природных станций**

Нами проведен скрининг ДНК риккетсий и бартоонелл в органах (селезенка и печень) мелких диких млекопитающих для выяснения их роли в качестве резервуара альфа-протеобактерий. С этой целью весной и осенью (май, октябрь) в северной лесостепной зоне и осенью (сентябрь) в южной лесостепной зоне Омской области проведен отлов следующих видов животных: 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), бурозубки - *Sorex* sp. (21 экземпляр). Всего исследовано 175 образцов селезенок и 93 образца печени мелких диких млекопитающих.

### **Животные, использованные для кормления иксодовых клещей**

Поддерживание 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. Используемые 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 (Таблица 1) 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 риккетсий**

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 (Таблица 2) и культивирование риккетсий проводили с использованием перевиваемых культур клеток Vero и Нер-2. Культуры клеток были получены в и «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).

### **Риккетсиологические методы**

**Паразитологические методы.** С целью уточнения фауны иксодовых клещей в Омской области и их инфицированности риккетсиями с участием автора сборы иксодид были проведены в августе 2019 и в начале мая в 2020 гг. в Называевском районе. Сбор клещей выполняли в период сезонного пика численности на стандартную волокушу (флаг) согласно Методическим указаниям МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней».

**Серологические методы исследования.** Наличие антител к *R. sibirica* определяли в реакции связывания комплемента (РСК) с использованием коммерческого «Диагностикума риккетсиозного Сибирика сухого для РСК». Реакцию ставили микрометодом согласно инструкции производителя.

Для выявления антител методом прямой флюоресценции использовали иммуноглобулины диагностические для выявления риккетсий группы КПЛ, люминесцирующие, сухие (НПО «Биомед», Россия). Реакцию выполняли согласно инструкции производителя. Выявление антител методом непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) проводили по методу R. N. Philip [429].

### **Экспериментальные методы работы с переносчиками риккетсий**

Использование метода, предложенного Тагильцевым и соавт. (1990) [33] для содержания лабораторных линий иксодовых клещей, позволило нам культивировать риккетсии в нескольких поколениях переносчиков. Данный подход

позволяет воспроизводить естественный цикл метаморфоза переносчиков в лабораторных условиях, что дало возможность определить уровень вертикальной, а именно трансвариальной (ТОП) и трансфазовой (ТФП) передачи изучаемых риккетсий, а также выяснить особенности их биологических свойств на разных стадиях метаморфоза клещей. Применение современных методов исследования (использование моноклональных антител, генотипирование) расширяют возможности использования лабораторных линий клещей как биологической модели для культивирования и изучения риккетсий.

В данной работе в качестве резервуара и вектора риккетсий были использованы четыре вида клещей рода *Dermacentor*, естественно инфицированные в природе риккетсиями группы КПЛ: *D. nuttalli*, *D. marginatus* и *D. silvarum*, собранные с растительности в республике Алтай, в Центральном Казахстане, в республике Бурятия, а также напитавшиеся клещи *D. reticulatus*, снятые с собаки в Омской области.

Критерием отбора переносчиков для экспериментальных линий служило выявление риккетсий в гемолимфе. При использовании гемоцитового теста (взятие гемолимфы из ампутированной конечности) необходимо учитывать, что передние конечности клещи используют при присасывании для кормления и в процессе копуляции. Поэтому для взятия гемолимфы допустима ампутация только задних конечностей.

С целью воспроизведения цикла метаморфоза клещей подсаживали для питания на лабораторных животных. В качестве прокормителей пар имаго (самец и самка) использовали взрослых морских свинок и белых беспородных мышей, в качестве прокормителей преимагинальных форм (личинки и нимфы) - сосунков белых мышей. Для предотвращения расползания имаго и поедания их животными-прокормителями клещей помещали под наклеенный коллодием на спину животного полистироловый колпачок. Жесткий воротник, ограничивая подвижность прокормителя, не позволяет животному снять колпачок. Клещам давали возможность кормиться до полного напивания самок. После этого колпак снимали, клещей удаляли с тела животного, самца исследовали на наличие

риккетсий. Самку помещали в стеклянный контейнер до окончания яйцекладки, после чего извлекали и определяли наличие в ней риккетсий с помощью люминесцентной микроскопии. Контейнер представляет собой стеклянную трубку, один конец которой закрыт сухой ватно-марлевой пробкой, другой – влажной ватной пробкой [33].

После выхода личинок проводили подсчет их численности. 100-150 экземпляров голодных личинок исследовали в РНИФ на наличие риккетсий. Часть личинок для кормления кисточкой наносили на сосунков белых мышей, помещенных в стеклянные контейнеры, в количестве 20-25 экземпляров на одного сосунка. Часть напитавшихся личинок (50 экземпляров) исследовали в РНИФ на наличие риккетсий, остальным давали возможность перелинять в нимф. Таким же образом поступали с нимфами: исследовали голодных нимф (50 экземпляров), остальных прокармливали на сосунках белых мышей (по 5 экземпляров), исследовали напитавшихся (50 экземпляров), остальным давали возможность перелинять в имаго.

Изучение возможности конкурентных взаимоотношений между двумя наиболее распространенными на территории России видами риккетсий группы КПЛ проведено в эксперименте при моделировании естественного цикла метаморфоза переносчиков. В опытной группе клещи, инфицированные в природе *R. raoultii*, были дополнительно заражены высоковирулентным штаммом *R. sibirica* путем инокуляции в основание четвертой коксы [32] объемом 0,2-0,3 мкл не менее 10 DL 50 в мл для куриных эмбрионов. Клещи, не подвергшиеся суперинфицированию, составили контрольную группу.

### ***Изучение распределения R. raoultii в организме переносчиков***

Изучение распределения риккетсий двух генотипов *R. raoultii*, в клещах лабораторных линий *D. reticulatus* и *D. marginatus*, инфицированных R.sp.RpA4 и R.sp.DnS28, соответственно, осуществляли исследованием мазков из органов переносчиков в РНИФ. Частично напитавшихся самок клещей умерщвляли эфиром, фиксировали в слое парафина, залитого в чашку Петри, брюшной поверхностью вниз, заливали стерильным физиологическим раствором. Вскрытие

полости тела иксодид проводили в соответствии с МУ 3.1.3012-12. После удаления верхней поверхности хитина клубок внутренних органов разъединяли струей физиологического раствора из пипетки и иссекали фрагменты слюнных желез, яичников, мальпигиевых сосудов и кишечника для приготовления мазков и исследования в РНИФ на наличие риккетсий.

### **Молекулярно-генетические методы**

#### ***Экстракция ДНК:***

1. Для выделения ДНК из бактериальных клеток был использован метод, основанный на разрушении клеточной стенки и мембраны под воздействием протеиназы К. Данный метод применяли для выделения ДНК риккетсий и бартонелл из клещей, из тканей органов мелких млекопитающих, штаммов риккетсий и культур клеток, зараженных риккетсиями. До исследований иксодовых клещей и образцы органов диких мелких млекопитающих хранили в 70% этиловом спирте.

Выделение суммарных препаратов нуклеиновых кислот из голодных имаго иксодовых клещей проводили следующим образом. Для повышения эффективности экстракции ДНК индивидуальные экземпляры клещей измельчали стерильным одноразовым лезвием в стерильных чашках Петри, предварительно отмыв от спирта фосфатно-солевым буфером и обсушив стерильной фильтровальной бумагой. Полученные кусочки измельченного клеща помещали в стерильную пробирку типа Эппендорф. Выделение ДНК из индивидуальных экземпляров клещей было выполнено с использованием QIAmp Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) согласно инструкции производителя.

Аналогично проводили выделение ДНК из органов диких мелких млекопитающих: индивидуальные образцы печени (по 20 мкг) и селезенки (по 10 мкг) измельчали в стерильных условиях, экстрагировали ДНК с вышеуказанным набором согласно инструкции производителя.

#### ***2. Выделение нуклеиновых кислот из аутопсийного материала.***

Предметом исследования являлись ткани ребёнка, скончавшегося от клещевого риккетсиоза, включая 100 микролитров крови и 100 микролитров головного мозга.

Исследование выполнено с применением двух различных наборов реагентов для экстракции нуклеиновых кислот. Эти наборы, «АмплиПрайм РИБО-преп» от компании «ИнтерЛабСервис» (ООО НекстБио, Россия) и «РеалБест экстракция 100» от ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), были использованы в соответствии с инструкциями производителей. Оба комплекта реагентов являются продукцией российских компаний.

### ***Полимеразная цепная реакция:***

1. Однораундовую ПЦР выполняли в термоциклере Peltier модель PTC-200 (Mj Research, Inc, Watertown, MA). ПЦР амплификация была выполнена в объеме 25 мкл в присутствии 5 пкМ каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы, 2,5 мкл смеси дезоксинуклеотидов трифосфатов (2% dATP, 2% dCTP, 2% dTTP, 2% dGTP в стерильной воде), 1 мкл 25 mM раствора MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл 10<sup>x</sup> реакционного буфера (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). Профиль амплификации включал начальную денатурацию в течение 15 минут при 95<sup>0</sup> C, 39 циклов амплификации (денатурация при 94<sup>0</sup> C – 60 с, отжиг праймеров при 52<sup>0</sup> C – 30 с, элонгация при 72<sup>0</sup> C – 60 с) и финальную элонгацию в течение 5 минут при 72<sup>0</sup> C [413, 455]. Каждая ПЦР включала отрицательный контроль (дистиллированная вода) и положительный контроль (ДНК *Rickettsia montanensis* или *Bartonella henselae* в зависимости от направленности скрининга). Визуализацию продуктов реакции амплификации проводили в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия после электрофоретической миграции. Размеры полученных продуктов ПЦР реакции были определены в сравнении с молекулярным весом стандартного маркера VI (Boehringer Ingelheim, Германия). Все отрицательные контроли оставались отрицательными. Полученные ПЦР-продукты были секвенированы.

2. Выявление НК возбудителей КЭ, ИКБ, ГАЧ, МЭЧ проводили методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторах «CFX96» («Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и «Rotor-Gene 6000» («Qiagen», Германия), при этом использовали наборы: «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris-FL*», применяя предварительно для проведения обратной транскрипции комплект «Реверта-L» компании

«ИнтерЛабСервис» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), наборы «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l./РНК ВКЭ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*» ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) согласно инструкции производителя.

Кроме того, ДНК *Rickettsia* spp. была выявлена с использованием двухраундовой ПЦР с праймерами для гена *gltA*, как описано ранее [242]. В целях корректной идентификации в случае вероятного присутствия смешанных инфекций, были проведены двухраундовые реакции автономно с использованием праймеров, специфичных для *Candidatus R. tarasevichiae* и риккетсий группы КПЛ с последующим секвенированием. Для более детального генотипирования, кроме того, были секвенированы последовательности генов *ompA* и *ompB*. Для получения ампликонов также использовали самостоятельные двухраундовые ПЦР с праймерами, специфичными для *Candidatus R. tarasevichiae* и риккетсий группы КПЛ [214, 242]. Полученные последовательности депонированы в базе данных NCBI GenBank под инвентарными номерами: MK048467 – MK048475.

Образцы были исследованы в двухраундовой ПЦР на присутствие агентов, передающихся клещами, включая вирус клещевого энцефалита (TBEV), вирус Кемерово, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia miyamotoi*, бактерии семейства *Anaplasmataceae*, как описано ранее [458]. Кроме того, образцы подвергали скринингу с помощью ПЦР на наличие НК кишечных вирусов: ротавирусной группы А (RVA) и группы С (RVC), норовируса (NoV GII), астровируса (HAstV) и энтеровируса [131, 198].

Скрининг наличия риккетсиальной ДНК в иксодовых клещах и органах диких мелких млекопитающих выполняли в ПЦР с применением праймеров CS409d и RP1258n для амплификации *gltA* гена. Скрининг наличия бартоnell в органах грызунов и насекомоядных проводили в ПЦР с применением праймеров UrBarto1 (CTT CGT TTC TCT TTC TTC A) и UrBarto 2 (CTT CTC TTC ACA ATT TCA AT) для выявления специфичных для бартоnell участков 16S-23S межгенной спейсерной области (*ITS*) как описано ранее [294].

### Секвенирование

Идентификацию штаммов риккетсий проводили путем амплификации и секвенирования фрагментов генов 16S рНК (*rrs*), *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* (“*gene D*”) [127, 413, 414, 415, 425] (используемые праймеры представлены в таблице 4).

Таблица 4 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации и секвенирования риккетсий

| Ген               | Праймер  | Секвенс (5' – 3')             | Ссылки                             |
|-------------------|----------|-------------------------------|------------------------------------|
| 16SrRNA           | fD1      | AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG    | Roux, and<br>Raoult, 1995<br>[415] |
|                   | rP2      | ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT   |                                    |
|                   | 357f     | TAC GGG AGG CAG CAG           |                                    |
|                   | 536f     | CAG CAG CCG CGG TAA TAC       |                                    |
|                   | 800r     | CTA CCA GGG TAT CTA AT        |                                    |
|                   | 1050r    | CAC GAG CTG ACG ACA           |                                    |
| <i>gltA</i>       | CS1d     | ATG ACT AAT GGC AAT AAT AA    | Roux et al., 1999<br>[127]         |
|                   | CS409d   | CCT ATG GCT ATT ATG CTT GC    |                                    |
|                   | CS428r   | GCA AGC ATA ATA GCC ATA GG    |                                    |
|                   | CS535r   | GAA TAT TTA TAA GAC ATT GC    |                                    |
|                   | Rp1258n  | ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A |                                    |
| <i>ompA</i>       | 190.70   | ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA   | Roux et al., 1996<br>[413]         |
|                   | 190.180  | GCA GCG ATA ATG CTG AGT A     |                                    |
|                   | 190.701  | GTT CCG TTA ATG GCA GCA TCT   |                                    |
| <i>ompB</i>       | 120-M59  | CCG CAG GGT TGG TAA CTG C     | Roux, and<br>Raoult, 2000<br>[414] |
|                   | 120-807  | CCT TTT AGA TTA CCG CCT AA    |                                    |
|                   | 120-607  | AAT ATC GGT GAC GGT CAA GG    |                                    |
|                   | 120-1497 | CCT ATA TCG CCG GTA ATT       |                                    |
|                   | 120-1378 | TAA ACT TGC TGA CGG TAC AG    |                                    |
|                   | 120-2399 | CTT GTT TGT TTA ATG TTA CGG T |                                    |
|                   | 120-3462 | CCA CAG GAA CTA CAA CCA TT    |                                    |
|                   | 120-4346 | CGA AGA AGT AAC GCT GAC TT    |                                    |
| “ <i>gene D</i> ” | D1f      | ATG AGT AAA GAC GGT AAC CT    | Sekeyova et al.,<br>2001<br>[425]  |
|                   | D928r    | AAG CTA TTG CGT CAT CTC CG    |                                    |
|                   | D767f    | CGA TGG TAG CAT TAA AAG CT    |                                    |
|                   | D1390r   | CTT GCT TTT CAG CAA TAT CAC   |                                    |
|                   | D1219f   | CCA AAT CTT CTT AAT ACA GC    |                                    |
|                   | D1876r   | TAG TTT GTT CTG CCA TAA TC    |                                    |
|                   | D1738f   | GTA TCT GAA TTA AGC AAT GCG   |                                    |
|                   | D2482r   | CTA TAA CAG GAT TAA CAG CG    |                                    |

Подготовку ампликонов к автоматическому секвенированию выполняли с использованием QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Германия). Секвенирование проводили на автоматическом анализаторе ДНК ABI 3100 PRISM фирмы «Applied

Biosystems» с использованием набора Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1. (США) в соответствии с инструкцией производителя.

Видовую идентификацию бартонелл проводили путем определения нуклеотидных последовательностей в полученных продуктах амплификации с использованием тех же праймеров UrBarto1 и UrBarto 2, которые были использованы для скрининга. Ряд образцов, уровень различия которых с известными видами бартонелл превышал установленный для внутривидовых различий, был также изучен с использованием амплифицирования и секвенирования фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК (*rrs*), цитрат-синтетазу (*gltA*),  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoB*), белок клеточного деления (*ftsZ*) и специфичные для бартонелл участки 16S-23S межгенной спейсерной области (*ITS*) как описано ранее [68, 86, 97, 232, 471, 489]. Используемые в работе праймеры указаны в таблице 5.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTAL в оболочке BISANCE, процент гомологии нуклеотидных последовательностей определяли, применяя DNADIST software package по методу Kimura [262]. Филогенетический анализ выполняли, применяя neighbour-joining метод и программу DNAPARS в версии PHYLIP с методом максимальной вероятности (maximum-likelihood). Построение филогенетических деревьев выполняли с применением программы ClustalW. Визуализацию дендрограмм осуществляли с помощью программы TreeView, версия 1.61.

Для установления таксономической позиции изучаемых образцов ДНК бартонелл были использованы критерии, предложенные La Scola с соавторами для видовой дифференциации бартонелл [212], основанные на генотипических характеристиках. Уровни 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, основываясь на данных критериях, классифицировать изолят как относящийся к новому виду. Степень сходства последовательностей (в %) рассчитывали путем попарного перехода и трансверсии между последовательностями.

Таблица 5 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации и секвенирования “*Candidatus B. rudakovii*”

| Ген         | Праймер    | Секвенс (5' – 3')               | Ссылки                             |
|-------------|------------|---------------------------------|------------------------------------|
| <i>rpoB</i> | 1400F      | CGC ATT GGC TTA CTT CGT ATG     | Renesto et al., 2001 [471]         |
|             | 2300R      | GTA GAC TGA TTA GAA CGC TG      |                                    |
|             | 1596R*     | GGA CAA ATA CGA CCA TAA TGC G   |                                    |
|             | 2028F*     | GGA AAA TGA TGA TGC GAA TCG TGC |                                    |
| 16S-23S     | URBARTO1   | CTTCGTTTCTCTTTCTTCA             | P. Houpihan, D. Raoult, 2001 [232] |
|             | URBARTO2   | CTTCTCTTCAACAATTTCAAT           |                                    |
|             | 16SF       | AGAGGCAGGCAACCACGGTA            |                                    |
|             | 23S1       | GCCAAGGCATCCACC                 |                                    |
|             | QVE1*      | TTCAGATGATGATCCCAAGC            |                                    |
|             | QVE2*      | TTGGGATCATCATCTGAA              |                                    |
|             | QVE3*      | AACATGTCTGAATATATCTTC           |                                    |
|             | QVE4*      | AACATGTCTGAATATATC              |                                    |
| <i>gltA</i> | CS140f     | TTACTTATGATCCKGGYTTTA           | Birtles, and Raoult, 1996 [97]     |
|             | BhCS.1137n | AATGCAAAAAGAACAGTAAACA          |                                    |
|             | CS443f*    | GCTATGTCTGCATTCTATCA            |                                    |
|             | CSH1f*     | GCGAATGAAGCGTGCCTAAA            |                                    |
| <i>ftsZ</i> | Bfp1       | ATTAATCTGCAYCGGCCAGA            | Zeaiter et al., 2002 [489]         |
|             | Bfp2       | ACVGADACACGAATAACACC            |                                    |
|             | Bfs3*      | TTACAAAAATCYGTTGATAC            |                                    |
|             | Bfs4*      | GTATCAACRGATTTTTGTAA            |                                    |
| 16SrRNA     | P8         | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG            | Heller et al., 1998 [86.].         |
|             | Pc1544     | AGGAGGTGATCCAGCCGCA             |                                    |
|             | Pc535      | GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC          | Bermond et al., 2002 [68].         |
|             | P515       | GTGCCAGCAGCCGCGTAACAC           |                                    |
|             | Pc804      | GACTACCAGGGTATCTAATCC           |                                    |
|             | P784       | GGATTAGATACCCTGGTAGTC           |                                    |
|             | Pc1198     | ACTTGACGTTATCCCCACCTTCC         |                                    |
|             | P1174      | GAGGAAGGTGGGGATGACGTC           |                                    |

### Анализ данных

Нуклеотидные последовательности фрагментов *gltA*, *ompA*, *rpoB* и *ftsZ* генов

были транслированы в протеиновые последовательности с использованием PC/GENE software (IntelliGenetics). Выравнивание нуклеотидных последовательностей для каждого гена осуществляли с использованием программы CLUSTAL W software (Version 1.81) (<http://spiral.genes.nig.ac.jp/homology/clustalw-e.shtml>). Процент гомологии нуклеотидных последовательностей определяли, используя DNADIST software package метод Kimura [262]. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей для сравнения степени гомологии с нуклеотидными последовательностями Банка данных NCBI GenBank проводили с помощью программы BLAST (Таблицы 6, 7).

Таблица 6 – Используемые в работе виды бартоanelл и коды доступа в базе данных NCBI GenBank

| Вид / штамм<br>бартоanelл                            | Код доступа в базе данных NCBI GenBank |            |             |             |             |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
|                                                      | <i>rrs</i>                             | <i>ITS</i> | <i>gltA</i> | <i>rpoB</i> | <i>ftsZ</i> |
| <i>Bartonella alsatica</i> / IBS 382                 | AJ002139                               | AF12506    | AF204273    | AF165987    | AF467763    |
| <i>B. bacilliformis</i> / KC 584                     | Z11683                                 | L26364     | AB292601    | AF165988    | AF007266    |
| <i>B. birtlesii</i> / IBS 325                        | AF204274                               | AY116640   | AF204272    | AF165989    | AF467762    |
| <i>B. bovis</i> / 91-4                               | AF293391                               | AY116638   | AF293394    | AY166581    | AF467761    |
| <i>B. capriole</i> / IBS 193                         | AF293389                               | НД*        | AF293392    | НД          | НД          |
| <i>B. chomelii</i> / A 828                           | AY254309                               | НД         | AY254308    | НД          | НД          |
| <i>B. clarridgeiae</i> / Houston-2                   | U64691                                 | AF167989   | U84386      | AF165990    | AF141018    |
| <i>B. doshiae</i> / R 18                             | Z31351                                 | AJ269786   | AF207827    | AF165991    | AF467754    |
| <i>B. elizabethae</i> / F9251                        | L01260                                 | L35103     | U28072      | AF165992    | AF467760    |
| <i>B. grahamii</i> / V2                              | Z31349                                 | AJ269785   | Z70016      | AF165993    | AF467753    |
| <i>B. henselae</i> / Houston-1                       | M73229                                 | L35101     | L38987      | AF171070    | AF061746    |
| <i>B. koehlerae</i> / C-29                           | AF076237                               | AF312490   | AF176091    | AY166580    | AF467755    |
| <i>B. peromysci</i> / НД                             | U71322                                 | U77057     | НД          | НД          | НД          |
| <i>B. quintana</i> / Fuller                          | M11927                                 | L35100     | Z70014      | AF165994    | AF061747    |
| <i>B. schoenbuchensis</i> / R1                       | AJ278187                               | AY116639   | AJ278183    | AY167409    | AF467409    |
| <i>B. taylorii</i> / M6                              | Z31350                                 | AJ269784   | AF191502    | AF165995    | AF467756    |
| <i>B. tribocorum</i> / IBS 506                       | AJ003070                               | AF312505   | AJ005494    | AF165996    | AF467759    |
| <i>B. vinsonii</i> subsp.<br><i>vinsonii</i> / Baker | M73230                                 | L35102     | Z70015      | AF165997    | AF467757    |

Примечание: \*НД – нет данных

Дендрограммы строили для каждого гена и для объединенных секвенсов пяти изучаемых генов применяя метод объединения ближайших соседей (neighbor-joining) с помощью программы Mega version 3.1 software packages [262]. Оценка достоверности полученных дендрограмм выполнена с помощью бутстрэп-анализа.

Индекс бутстрэпа просчитан при общем числе повторов 100.

Таблица 7 – Используемые в работе виды риккетсий и коды доступа в базе данных NCBI GenBank

| Вид/ штамм риккетсий                               | Код доступа в базе данных NCBI GenBank |             |                  |             |             |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
|                                                    | <i>rrs</i>                             | <i>gltA</i> | <i>ompA</i> (5') | <i>ompB</i> | <i>sca4</i> |
| <i>Rickettsia raoultii</i> sp. nov.                |                                        |             |                  |             |             |
| ➤ Хабаровск <sup>T</sup>                           | DQ 365810                              | DQ 365804   | DQ 365801        | DQ 365798   | DQ 365808   |
| ➤ Marne                                            | DQ 365809                              | DQ 365803   | DQ 365799        | DQ 365797   | DQ 365807   |
| ➤ Elanda – 23/95                                   | EU 036982                              | EU 036985   | EU 036986        | EU 036984   | EU 036983   |
| <i>R. aeschlimannii</i> MC 16 <sup>T</sup>         | U 74757                                |             | U 43800          | AF 123705   | AF 163005   |
| <i>R. africae</i> ESF – 5                          | L 36098                                | U 59722     | U 43790          | AF 123706   | AF 151724   |
| <i>R. akari</i> MK (Kaplan) <sup>T</sup>           | L 36099                                | U 59733     | НД               | AF 123707   | AF 213301   |
| <i>R. asiatica</i> IO – 1 <sup>T</sup>             | AF 394906                              | U 59717     | НД               | DQ 110870   | DQ 110869   |
| <i>R. australis</i> NIAID Phillips 32 <sup>T</sup> | L36101                                 | AF 394901   | AF 149108        | AF 123709   | AF 187982   |
| <i>R. bellii</i> 369L42-1 <sup>T</sup>             | L 36103                                | U 59718     | НД               | НД          | НД          |
| <i>R. canadensis</i> 2678 <sup>T</sup>             | L 36104                                | U59716      | НД               | НД          | НД          |
| <i>R. conorii</i> NIAID Malish 7 <sup>T</sup>      | AF 541999                              | U 59713     | U 43806          | AF 123721   | AF 163008   |
| <i>R. felis</i> URRWXCα 12 <sup>T</sup>            | L 28944                                | U59730      | AF 210694        | AF 210695   | AF 196973   |
| <i>R. heilongjiangensis</i> 054 <sup>T</sup>       | AF 178037                              | AF 210692   | AF 179362        | AY 260451   | AY 331396   |
| <i>R. helvetica</i> C9P9                           | L 36212                                | AF 178034   | НД               | AF 123725   | AF 163009   |
| <i>R. honei</i> RB <sup>T</sup>                    | U 17645                                | U59723      | AF 018075        | AF 123711   | AF 163004   |
| <i>R. japonica</i> YM                              | L 36213                                | AF 018074   | U 43795          | AF 123713   | AF 155055   |
| <i>R. massiliae</i> Mtu1 <sup>T</sup>              | L 36214                                | U 59724     | U 43799          | AF 123714   | AF 163003   |
| <i>R. montanensis</i> M/5-6                        | L 36215                                | U 59719     | U 43801          | AF 123716   | AF 163002   |
| <i>R. parkeri</i> NIAID maculatum 20 <sup>T</sup>  | L 36673                                | U74756      | U 43802          | AF 123717   | AF 155059   |
| <i>R. prowazekii</i> Breinl <sup>T</sup>           | M 21789                                | U 59732     | НД               | AF 123718   | AF 200340   |
| <i>R. rhipicephali</i> Burgdofer                   |                                        | M 17149     |                  |             |             |
| 3-7-female 6 <sup>T</sup>                          | L 36216                                | U 59721     | U 43803          | AF 123719   | AF 155053   |
| <i>R. rickettsii</i> R (Bitterroot)                | L 36217                                | U 59729     | U 43804          | X 16353     | AF 163000   |
| <i>R. sibirica</i> 246 <sup>T</sup>                | L 36218                                | U 59734     | U 43807          | AF 123722   | AF 155057   |
| <i>R. slovacica</i> 13-B                           | L 36224                                | U 59725     | U 43808          | AF 123723   | AF 155054   |
| <i>R. tamurae</i> AT-1 <sup>T</sup>                | AY 049981                              | AF 394896   | DQ 103259        | DQ 113910   | DQ 113911   |
| <i>R. typhi</i> Wilmington                         | L 36221                                | U 59714     | НД               | L 04661     | AF 188482   |

Примечание: НД – нет данных

## **Культивирование риккетсий с использованием перевиваемых культур клеток**

Изоляцию и культивирование риккетсий проводили на культуре клеток Vero с использованием технологии shell vial по методике, описанной ранее [278, 261, 426].

### **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

бартоонелл 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. Пар, 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 бартоanelл в природных очагах. Спектр бартоanelл 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.

## ГЛАВА 1. СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕНИЯ «НОВЫХ» КЛЕЩЕВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

### 1.1. «Новые» клещевые риккетсиозы: история изучения, роль в инфекционной патологии

В настоящее время **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**

– **Genus** *Rickettsia* включает 28 видов риккетсий (<http://www.bacterio.cict.fr/qr/rickettsia.html>). За последние 20 лет этот список дополнили 14 риккетсий, которые получили официальный статус вида: *R. aeschlimannii* (1997), *R. africae* (1996), *R. asiatica* (2006), *R. buchneri* (2015), *R. felis* (2001), *R. gravesii* (2017), *R. heilongjiangensis* (2006), *R. helvetica* (1993), *R. honei* (1998), *R. hoogstraalii* (2010), *R. japonica* (1992), *R. massiliae* (1993), *R. peacockii* (1997), *R. raoultii* (2008), *R. slovacica* (1998), *R. tamure* (2006). *R. monacensis* была описана как вид в 2002 г. [392], но в официальный перечень пока не включена.

**1.1.1. *R. aeschlimannii*.** В 1950-х гг. появились первые сообщения о присутствии в клещах рода *Hyalomma* в Марокко и Судане риккетсиоподобных организмов, которые в тот период не были идентифицированы. В 1992 г. из имаго *H. marginatum marginatum*, собранных в Марокко, на культуре клеток L929 был изолирован штамм MC16<sup>T</sup>. Этот изолят был изучен с использованием серотипирования, электрофореза в сульфат-полиакриламидном геле, Вестерн-иммуноблоттинга, электронной микроскопии, анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК, пульсового гелевого электрофореза и секвенирования генов 16S rRNA (*rrs*) и цитратсинтазы. Все эти методы показали, что штамм MC16<sup>T</sup> отличается от других известных риккетсий группы КПЛ. Наиболее близкородственными организмами являются *R. massiliae*, *R. rhipicephali* и штамм Bar29. В 1997 году этот микроорганизм был описан как новый вид риккетсий группы КПЛ *R. aeschlimannii*, основным переносчиком этой риккетсии являются клещи *H. marginatum marginatum* [374]. Распространение *R. aeschlimannii* установлено в ряде стран Африки и Европы [197, 321, 341, 373].

В Германии у охотников (лица, подверженные нападению клещей) выявлены видоспецифические антитела к *R. aeschlimannii*. Возможно, *R. aeschlimannii* в

Европе распространена в ареале обитания *H. marginatum marginatum*.

*R. aeschlimannii* способна вызывать заболевание, для которого характерны формирование струпа, лихорадка, и генерализованная макулопапулезная сыпь. Данный риккетсиоз был неоднократно выявлен у путешественников, побывавших в Африке. Роль *R. aeschlimannii* как этиологического агента подтверждена выявлением ДНК этого вида риккетсий у пациентов [197, 321, 341].

**1.1.2. *R. africae*.** Можно сказать, что *R. africae* была открыта дважды. В 1911 г. в Южной Африке было выявлено заболевание, названное клещевой лихорадкой [417]. В 1930-х гг. A.Pijper изучал взаимосвязь между клещевой лихорадкой, описанной в Южной Африке и средиземноморской лихорадкой, описанной годом ранее в Северной Африке. На основании клинических и эпидемиологических данных он предположил, что это два разных заболевания и, вероятно, вызываются разными этиологическими агентами [цит. по 327]. Однако, подтвердить свои предположения A.Pijper не смог, изолированный от больного штамм был утерян и, ошибочно, средиземноморскую лихорадку и клещевую лихорадку в Южной Африке долгое время считали одним заболеванием. Таким образом, *R. conorii* оставалась единственным признанным агентом клещевых пятнистых лихорадок в Африке до 1990-х гг. В 1996 г. на основании изучения фенотипических (иммунофлюоресцентное серотипирование, электрофорез в сульфат-полиакриламидном геле, Вестерн-блотт) и генотипических (анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК, пульсовый гелевый электрофорез, секвенирование 16S rRNA гена) характеристик был описан этиологический агент африканской клещевой лихорадки – *R. africae* sp. nov. [375]. Переносчиками этой риккетсии являются клещи *Amblyomma variegatum* (основной вектор) и *A. herbaeum*. Имаго редко нападают на людей, наибольшую опасность представляют нимфы, личинки также могут питаться на людях. *R. africae* широко распространена на Африканском континенте, включая Нигер, Мали, Бурунди, Сенегал, Судан и большинство стран экваториальной и южной Африки [148, 152, 327]. Также *R. africae* была обнаружена на Карибских островах, включая Гваделупу, Мартинику, Антигуа и другие [469].

Заболевание развивается чаще на 6-7 день после заражения, характеризуется сильной головной болью, миалгией, струпом с региональным лимфаденитом, везикулярной или макулопапулезной сыпью и афтозным стоматитом, летальные исходы не зарегистрированы. Сероконверсия к *R. africae* выявляется у значительного числа местного населения, однако острые случаи африканской клещевой лихорадки чаще выявляются у европейских и американских туристов [148, 469].

Штаммы *R. africae* были изолированы из клещей *Amblyomma variegatum* в Эфиопии, от больных клещевой лихорадкой в Зимбабве и от европейским туристам, посетивших эту страну [347, 377].

**1.1.3. *R. asiatica*.** *R. asiatica* - циркулирующая в Японии риккетсия, первые штаммы которой были изолированы из нимф *Ixodes ovatus* в 1993 году [213]. В других видах клещей *R. asiatica* не обнаружена. Как новый вид риккетсий группы КПЛ описана в 2006 году [378]. Недавно молекулярно-биологическими методами *R. asiatica* обнаружена в образцах крови пятнистых оленей.

Уникальность серотипа и генетипа *R. asiatica* подтверждена типированием мышинных сывороток и анализом нуклеотидных последовательностей полных 16S rRNA (*rrs*), *ompB*, *gltA* и *sca4* генов. Ни в одном из исследованных образцов не удалось амплифицировать *ompA* ген. Наиболее близкородственными организмами являются *R. helvetica* и *R. tamurae*. Электронная микроскопия выявила размножение типового штамма IO-1<sup>T</sup> преимущественно в цитоплазме культуры клеток L929, незначительное число этих риккетсий имело внутриядерную локализацию. Известное географическое распространение *R. asiatica* ограничивается Японией. Патогенность для человека в настоящее время неизвестна.

**1.1.4. *R. buchneri*.** Риккетсиозный изолят ISO7T выделен из яичников черноногого клеща *Ixodes scapularis* с использованием эмбриональной клеточной линии *Ixodes ricinus* IRE11. Ранее предположительно непатогенные эндосимбиотические риккетсии часто выявлялись в клещах этого вида с помощью микроскопии [405] и ПЦР-анализа [247, 292, 315, 332]. Этим риккетсиям

присваивалось несколько разных имен: *Rickettsia cooleyi* [293], *Rickettsia midichlorii* [462] и риккетсиозный эндосимбионт *I. scapularis* (REIS) [191]. Анализ полученных данных путем ПЦР-опосредованной амплификации выбранных последовательностей генов указывают на то, что *I. scapularis rickettsia* является единым видом, который отображает ограниченное расхождение последовательности, указывающее, что это предок риккетсий группы пятнистой лихорадки [47].

Филогенетический анализ 11 генов «домашнего хозяйства» показал, что изолят соответствует критериям, позволяющим отнести его к представителям нового вида риккетсий, тесно связанного с *R. monacensis* [379]. Последовательности генов показали, что несколько генов, важных для подвижности, инвазивности и температурной адаптации риккетсиозов, были мутированы (например, *sca2*, *rickA*, *hsp22*, *pldA* и *htrA*). *R. buchneri* успешно культивируется в клеточных линиях клещей IRE11 и ISE6 при температуре 25–28°C, что ниже температуры культивирования патогенных риккетсий.

В эксперименте показано, что передающийся трансвариально эндосимбионт *I. scapularis*, *R. buchneri*, оказывает ингибирующее влияние на рост болезнетворных клещевых бактерий в культуре клеток и имеет два кластера генов, кодирующих предполагаемые структуры биосинтеза антибиотиков, которые не присутствуют у других представителей *Rickettsiaceae* [462]. Это может означать, что помимо того, что *R. buchneri* является не только потенциальным пищевым эндосимбионтом, она также может предотвращать колонизацию яичников патогенными риккетсиями, что может быть вредным для биологии клеща, как было показано в случае с *R. rickettsii* у *D. andersoni* и *D. variabilis* [312, 423].

**1.1.5. *R. felis*.** В 1990г. J.R. Adams с соавторами обнаружил риккетсиоподобные бактерии у блох *Ctenocephalides felis*, которые имели сходство с *R. typhi* [52]. Первоначально новая риккетсия была названа ELB agent в честь компании, из которой были получены блохи (EI Labs, Soquel, CA, USA), позднее получила название *R. felis*. Обнаруженные в результате первых наблюдений способность реагировать с антителами к *R. typhi*, тип переносчика, в котором он

был впервые обнаружен, и первые неудачные попытки амплифицировать *ompA* ген, было предположено, что новый организм принадлежит к риккетсиям группы сыпного тифа. Тем не менее по генетическим характеристикам эта риккетсия относится к группе КПЛ, наиболее генетически близки к ней *R. akari* и *R. australis* [381]. У людей *R. felis* вызывает тифоподобное заболевание. Специфическим переносчиком этой риккетсии являются блохи *Ctenocephalides felis*, паразитирующие на кошках [169, 202, 203, 254].

Одной из заметных особенностей является температурная зависимость роста этой бактерии, которой требуется инкубация при температуре 28-32° для оптимального роста. Однако, самой поразительной особенностью *R. felis* является плазмидная ДНК в ее геноме.

**1.1.6. *R. gravesii*.** Между 2004 и 2005 годами у нефтяников на острове Барроу в Западной Австралии было обнаружено заболевание похожее на риккетсиоз, характеризующееся лихорадкой, сыпью и струпом (J. Drummond, pers. comm). 32 частично напивавшихся клеща *Amblyomma triguttatum triguttatum*, снятых рабочих, были использованы для изоляции риккетсий в культуре клеток и исследованы молекулярно-биологическими методами. В результате полногеномного сравнения, штамм BWI-1T оказался наиболее тесно связан с *R. raoultii*. *Rickettsia gravesii* sp. nov. растет в клетках L929 и Vero при 32°C в питательной среде с добавлением 2 % инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки и 2 мМ L-глутамина, а также в клетках ХТС-2 при 28°C в среде Leibovitz L-15 с добавлением 5 % инактивированной фетальной телячьей сыворотки, 5 % триптозофосфата и 2 мМ L-глутамина. Окрашивается по методу Гименеса и наблюдается в цитоплазме, но не в ядре клеток ХТС 2, L929 и Vero. Содержание G+C составляет 32,2 мол.%. Ультраструктурный вид культурального изолята подобен внешнему виду других видов риккетсиозов. Патогенность *R. gravesii* для человека окончательно пока неизвестна [382].

**1.1.7. *R. heilongjiangensis*.** В 1982 г. в китайской провинции Heilongjiang был выделен изолят (штамм 054) риккетсий, отличающийся от известных видов, который в 2003 г. описан как новый вид риккетсий группы КПЛ *R. heilongjiangensis*

[211]. Источник выделения штамма 054 – клещи *D. silvarum*. В северо-восточной части Китая, на территории с циркуляцией *R. heilongjiangensis* среди местного населения зарегистрированы случаи инфекций после присасывания клещей с клиническими проявлениями, характерными для риккетсиозов группы КПЛ [487].

Ретроспективно при секвенировании штаммов из коллекции Омского НИИ природно-очаговых инфекций было установлено, что в коллекции хранятся три штамма *R. heilongjiangensis*, которые по фенотипическим характеристикам ранее считали *R. sibirica*: один из штаммов изолирован М.С.Шайманом (год выделения 1966, источник выделения клещи *H. concinna*; место выделения Алтайский край) и два штамма изолированы Т.А.Решетниковой (год выделения 1981, источник выделения клещи *H. concinna*; место выделения Приморский край) [154].

Также ретроспективно, молекулярно-биологическими методами доказана этиологическая роль *R. heilongjiangensis* в развитии заболевания, сходного с КСТ в Хабаровском крае [51].

ДНК *R. heilongjiangensis* выявлена в иксодовых клещах, преимущественно *Haemaphysalis concinna* в Китае и азиатской части России, в основном на Дальнем Востоке [27, 28, 51].

**1.1.8. *R. helvetica*.** Первые штаммы *R. helvetica* были изолированы в Швейцарии из клещей *Ixodes ricinus* [256], позднее эта риккетсия была выявлена в ряде стран Европы и Азии, является единственной передаваемой клещами риккетсией, обнаруженной в Швеции [151, 314]. Так как установлена трансвариальная и трансфазовая передача этой риккетсии в *I. ricinus*, можно утверждать, что этот вид иксодид является и основным вектором, и природным резервуаром *R. helvetica*. Эта риккетсия была обнаружена в клещах *I. ricinus* и *D. reticulatus* в ряде стран Восточной и Западной Европы, а также в Северной Африке, в Японии циркуляция *R. helvetica* установлена в клещах *I. monospinosus* и *I. persulcatus* [57, 134, 161, 180, 195, 196, 384, 403, 436, 445]. Обнаружение *R. helvetica* в клещах, снятых с певчих птиц в Нидерландах и Бельгии, в том числе в личинках, позволяет предполагать, что птицы могут способствовать передаче этого патогена [96, 329]

*R. helvetica* способна вызывать как легкие формы инфекции, характеризующиеся лихорадкой, миалгией, головной болью, с первичным аффектом и сыпью на месте присасывания переносчика, так и более тяжелые: менингит, саркоидоз, перимиокардит (в том числе с летальным исходом). Этиологическая роль *R. helvetica* подтверждена сероконверсией, выявлением ДНК в органах и тканях пациентов (спинномозговая жидкость, секционный материал), изоляцией штаммов от больных [57, 180, 313, 314, 340].

**1.1.9. *R. honei*.** Пятнистая лихорадка острова Флиндерс была описана в 1991 году R.S.Stewart. Он сообщил о 26 случаях сезонного заболевания с лихорадкой и сыпью, которые наблюдал в течение 12 лет на небольшом острове Флиндерс у юго-восточного побережья Австралии около Тасмании. Эритематозная сыпь наблюдалась у большинства пациентов и пурпурная - у двух пациентов с тяжелыми случаями, связанными с тромбоцитопенией [439]. Были также выявлены струп в месте инокуляции и увеличение локальных лимфоузлов в 25% и 55% случаев соответственно. Типичными проявлениями пятнистой лихорадки острова Флиндерс были внезапное повышение температуры, головная боль, артромиалгия с опуханием суставов и легкий кашель. Сыпь, которая появилась несколько дней спустя, была макулопапулезной, везикулезная сыпь при этом заболевании не наблюдалась. В 1992 году от двух пациентов с пятнистой лихорадкой острова Флиндерс были получены изоляты риккетсий [122] после изучения которых молекулярными методами данная риккетсия была описана как новый вид *R. hohei* [216, 385]. Основными клиническими проявлениями заболевания, вызываемого штаммом "*marmionii*" *R. hohei* являются лихорадка, головная боль, реже сыпь и струп. Этиологическая роль этого варианта *R. hohei* доказана генетическими, серологическими методами и изоляцией штаммов от больных. Летальные исходы при данном риккетсиозе не зарегистрированы [205, 235, 319].

В качестве основного переносчика рассматривается *Aponomma hydrosau*. Молекулярно-биологическими методами установлена естественная инфицированность возбудителем пятнистой лихорадкой острова Флиндерс этого вида клещей, питающегося преимущественно на рептилиях. Также ДНК *R. hohei*

обнаружена при использовании ПЦР в яйцах, полученных от напитавшихся самок клещей этого вида, что позволяет предполагать трансвариальную передачу *R. hohei* в данном членистоногом [221].

Кроме острова Флиндерс риккетсиоз, вызываемый *R. hohei*, встречается на юго-востоке Австралии, на острове Тасмания, в Таиланде и на Сицилии, в Индии [220, 221, 234, 385, 437].

**1.1.10. *R. hoogstraalii*.** В клещах *Haemaphysalis sulcata*, собранных с овец и коз в Хорватии и в клещах *Carios capensis* в Джорджии, США, в 2006 году была обнаружена ранее не известная риккетсия группы КПЛ. Как новый вид – *R. hoogstraalii* эта риккетсия была описана в 2010 г. [386]. ДНК этого вида выявляется в клещах в Хорватии, Испании, США, также в Турции, в Южной Африке, Италии, Греции [244, 295, 300, 323]. Патогенность *R. hoogstraalii* для человека и теплокровных животных окончательно не установлена. Наиболее близким видом является *R. felis* [386]. *R. hoogstraalii* способна вызывать цитопатический эффект в некоторых культурах клеток, например в Vero, CCE3, ISE6.

**1.1.11. *R. japonica*.** Первые клинические случаи японской пятнистой лихорадки, характеризующиеся высокой температурой и сыпью, были зарегистрированы в 1984 году, и, первоначально, были ошибочно приняты за лихорадку цуцугамуши. Этиологический агент японской пятнистой лихорадки был впервые изолирован от пациента в 1985 году [251, 465], и назван *Rickettsia japonica* [236, 389].

Установлено, что переносчиками *R. japonica* являются клещи нескольких родов: рода *Haemaphysalis* – *H. longicornis*, *H. flava*, *H. formosensis*, *H. hystricis*, рода *Dermacentor* – *D. taiwanensis* и рода *Ixodes* – *I. ovatus* [213, 281]. Случаи японской пятнистой лихорадки регистрируются ежегодно (30 – 40 эпизодов), наиболее часто заболеваемость встречается в прибрежной зоне юго-западной и центральной Японии, преимущественно с апреля по октябрь. Для японского сыпного тифа характерно острое начало с головной болью, высокой температурой (39 - 40°C), озноб. Макулярная сыпь появляется после двух или трех дней, по всему телу, в том числе на ладонях и подошвах. Струп на месте

присасывания клеща наблюдается в 91% случаев [281, 282]. Японская пятнистая лихорадка может протекать с развитием энцефалита, полиорганной недостаточности, ДВС-синдрома, в редких случаях заканчивается смертью больного [46, 128, 209, 258]. Случаи японской пятнистой лихорадки выявлены также в Южной Корее [260], на Филиппинах и в Таиланде [152, 235]. При проведении скрининга *R. japonica* в Синьяне (Китай) в течение 2014–2017 годов было выявлено 20 случаев этой инфекции. Основными клиническими проявлениями моноинфекции были лихорадка, астения, миалгия, сыпь и анорексия; лабораторные данные включали тромбоцитопению и повышенные концентрации печеночных аминотрансфераз [387, 388]. Штаммы *R. japonica* изолировали от пациентов в Китае из образцов крови острой фазы на клетках HL60 и DH82 при 37°C. Цитопатический эффект не наблюдался с инокулированными клетками HL60, но инокулированные клетки DH82 полностью расслаивались через 4 недели культивирования [389].

**1.1.12. *R. massiliae*.** В 1992 году из клещей *Rhipicephalus sanguineus*, собранных рядом с Марселем (Франция) был изолирован риккетсиальный агент, охарактеризованный как отдельный вид внутри группы КПЛ и названный *R. massiliae* [92]. Переносчиком этого вида риккетсий являются различные представители рода *Rhipicephalus*: *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *R. muhsamae*, *R. lunulatus*, *R. sulcatu* [148, 155, 162, 166, 248].

В 1996 году вариант *R. massiliae* (штамм Bar29) был изолирован из клещей *R. sanguineus* в Каталонии, Испания [331]. ДНК *R. massiliae* обнаружена в указанных клещах в ряде стран Европы (Греция, Португалия, Испания, Швейцария, Румыния, Италия), в США, Аргентине, Китае, в Центральной Африке и Мали [155, 253, 303, 366, 411]. Экспериментально доказана трасовариальная и трансфазовая передача *R. massiliae* Bar29 в клещах вида *Rhipicephalus turanicus*, который также может рассматриваться как резервуар этой риккетсии [461]. *R. massiliae* проявляет естественную резистентность к рифампицину в культуре клеток [246]. Выявление *R. massiliae* Bar29 в слюнных железах клещей позволяет предполагать возможность передачи этой бактерии при присасывании клеща [461]. В 2003 году, при

исследовании 15 больных Средиземноморской лихорадкой в Каталонии, Испания, у восьми из них сыворотки реагировали в высоких титрах только с антигенами *R. conorii* и *R. massiliae* Bar 29, причем титры против *R. massiliae* Bar 29 были явно выше, чем против *R. conorii*, что свидетельствовало о возможной патогенности *R. massiliae* Bar 29 для человека [111]. Впервые признание этиологической роли *R. massiliae* в патологии человека произошло в 2005 году, через 20 после того, как первый изолят этой риккетсии был получен от пациента. Риккетсия группы КПЛ, считавшаяся *R. conorii*, была выделена в 1985 году из крови 45-летнего мужчины, госпитализированного в Палермо, Италия, с лихорадкой, некротическим струпом, макулопапулезной сыпью, распространяющейся на ладони и стопы, и умеренной гепатомегалией. Лечение цефалоспорином не дало результата, но применение тетрациклина привело к выздоровлению. Методом иммунофлюоресценции был выявлен рост титра антител к *R. conorii* от 0 до 80, и пациент рассматривался как больной Средиземноморской лихорадкой, вызванной *R. conorii*. Изолят от этого больного хранился два десятилетия, прежде чем был идентифицирован как *R. massiliae* при секвенировании фрагментов генов *ompA* и *gltA* в Unite 'des Rickettsies [391]. Выявление ДНК *R. massiliae* в образцах из струпа пациента также свидетельствует, что этот вид риккетсий является этиологическим агентом лихорадки с пурпурной сыпью и “tache noire” [46].

**1.1.13. *R. monacensis*.** *R. monacensis* (типовой штамм IrR/Munich<sup>T</sup>) описана как новый вид Simser с соавторами (2002 г.) [392]. Первые штаммы этой риккетсии изолированы из клещей *I. ricinus*, собранных в Германии. *R. monacensis* способна размножаться в культурах клеток млекопитающих, например Vero и L-929 и в и в культурах клеток, полученных из различных видов клещей, например eISE6 из *I. scapularis*, DAE100 из *D. andersoni*, IRE11 из *I. ricinus*. Во всех культурах наблюдается лизис клеток. BLAST анализ нуклеотидных последовательностей генов *rrs* (16S rRNA), цитратсинтазы и *ompA* показал принадлежность данного вида к группе клещевой пятнистой лихорадки.

Роль *R. monacensis* в развитии острого риккетсиоза, проявляющегося лихорадкой, макуло-папулезной или эритематозной сыпью и головной болью при

отсутствии струпа на месте присасывания клеща, доказана идентификацией ДНК в крови больных и изоляцией штаммов также из образцов крови пациентов [391, 392].

В настоящее время распространение *R. monacensis* установлено от Азии (Корея) до северной Африки (Марокко) а также в Северной Америке, основным переносчиком является *Ixodes ricinus* [156, 157, 392, 402, 411, 436, 443].

**1.1.14. *R. monteiroi*.** Первые штаммы *R. monteiroi* были выявлены в клещах *Amblyomma incisum* в Бразилии. Изоляция риккетсий в культуре клеток Vero была подтверждена оптической микроскопией, электронной микроскопией и исследованием молекулярно-биологическими методами (ПЦР + секвенирование) фрагментов генов *gltA*, *HtrA*, *Rrp* и *Sca1*. Установлено, что *R. monteiroi* принадлежит к группе *Canadensis* вместе с видами *R. canadensis*, *R. bellii*, и "*Candidatus R. tarasevichiae*". Серологический анализ показал, что, несмотря на некоторую перекрестную реактивность между *R. monteiroi* и *R. canadensis* в сыворотках морских свинок, гомологичные титры конечных точек были всегда  $\geq 4$  раза выше, чем гетерологичные титры. Патогенность для позвоночных хозяев не установлена. Известное географическое распространение ограничено Бразилией [393].

**1.1.15. *R. peacockii*.** *R. peacockii* (названа в честь риккетсиолога M.G. Peacock), ранее известная как "east side agent" [42], является эндосимбионтом клещей *D. andersoni* и относится к группе клещевой пятнистой лихорадки. Особенностью этой риккетсии является ее локализация в репродуктивных органах клещей *D. andersoni* и отсутствие в слюнных железах, т.е. сохранение в природных очагах происходит путем трансовариальной и трансфазовой передачи в клещах, которые являются резервуаром *R. peacockii* [394]. В течение нескольких лет исследователи относили эту риккетсию к «некультивируемым», однако позднее *R. peacockii* была обнаружена в хронически инфицированных линиях эмбриональных клеток DAE100, полученных из *D. andersoni* [252]. Установлена способность *R. peacockii* вызывать легкий цитопатический эффект и влиять на скорость роста клетки-хозяина. В настоящее время штаммы *R. peacockii* удается успешно культивировать в различных линиях клеток, полученных из клещей. Поскольку *R.*

*peacockii* является эндосимбионтом, длительное пребывание этой риккетсии в клещах не приводит к цитолизу и гибели клеток переносчика, в отличие от патогенных риккетсий. Клеточные клетки, инфицированные *R. peacockii* сохраняли свою жизнеспособность и способность к репликации [188].

Появляются новые данные о механизмах вирулентности и патогенности риккетсий группы КПЛ. *R. peacockii* более тесно связана с высокопатогенной *R. rickettsii*, чем с другими непатогенными риккетсиями, такими как *R. montanensis* или *R. rhipicephali* [188]. Ген *ompA*, продуцирующий белок наружной мембраны, связанный с адгезией риккетсий к клеткам хозяина, у *R. peacockii* амплифицировать не удалось [426]. Ген *rickA* также дефектен у *R. peacockii* из-за инсерционной последовательности или мобильного элемента, присутствующего в кодирующей последовательности [44]. Кроме отсутствия адгезии *R. peacockii* к клеткам клеща установлена ее неспособность образовывать актиновые хвосты. Считается, что дефектные гены *ompA* и *rickA* являются причиной снижения вирулентности *R. peacockii* для клеток-хозяев и медленного роста в культурах клеток клещей, но не делают *R. peacockii* неинфекционной или неспособной распространяться от клетки к клетке. Инфекционность *R. peacockii*, свободной от клеток хозяина, также указывает на то, что эта непатогенная риккетсия сохранила механизм(ы) инфекционности, которые позволяют ей уклоняться от эндосом и лизосом или ускользать от них [188]. *R. peacockii* встречается в клещах *Dermacentor andersoni* в США, Канаде [58, 59, 377], а также в клещах *Rhipicephalus microplus* в Китае [164, 329].

**1.1.16. *R. raoultii*** (в 2020 г. реклассифицирован в *Rickettsia conorii* subsp. *raoultii*). В 1999 году Rydkina E. с соавторами обнаружены два новых генотипа риккетсий в клещах *D. nuttalli*, собранных в Сибири (DnS14 и DnS28) и один новый генотип в клеще *R. pumilio* из Астрахани (DnS14). Идентификацию проводили путем амплификации и секвенирования генов 16S rRNA (*rrs*), *gltA* и *ompA*. Установлено, что данные генотипы относятся к *massiliae* группе, в которую входят *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. aeschlimannii* и *R. montanensis*, и образуют внутри этой группы достоверную ветвь (Rydkina et al., 1999) [309]. Среди прочих

филогенетические и фенотипические свойств, характерных для этой группы риккетсий необходимо особенно отметить устойчивость к рифампицину, которая связана с мутацией в гене *rpoB* [165, 246, 334].

В 2008 году был описан новый вид риккетсий группы КПЛ - *Rickettsia raoultii* sp. nov., в который вошли вышеупомянутые три новые генотипы RpA4, DnS14 и DnS28. Вид назван в честь руководителя лаборатории риккетсиозов Средиземноморского университета профессора Didier Raoult. *R. raoultii* является поливекторным микроорганизмом, различные генотипы этого вида выявлены в природе в следующих родах и видах переносчиков: *Dermacentor* (*D. marginatus*, *D. silvarum*, *D. nuttallii*, *D. reticulatus*), *Rhipicephalus* (*R. pumilio*), *Haemaphysalis* (*H. concinna*), *Ixodes* (*I. persulcatus*). ДНК *R. raoultii* идентифицирована в клещах в Азии, в том числе азиатской части России, большинстве стран Европы, в Северной Африке [179, 348, 396, 397, 400, 403, 406, 436 469]. Клещи рода *Dermacentor* наиболее часто идентифицируются в качестве вектора этой риккетсии, определяя географическое распространение *R. raoultii* [469]. В Японии близкородственная *R. raoultii* риккетсия выявлена в клещах *H. formosensis* [349].

Способность различных генотипов этой риккетсии вызывать синдром TIBOLA / DEBONEL была установлена еще до описания *R. raoultii* в качестве нового вида группы КПЛ. Так, например, ДНК генотипа RpA4 была выявлена во Франции в клеще *D. marginatus*, удаленном у пациента в 2002 году, ДНК генотипов RpA4, DnS14 и DnS28 - в клещах *D. marginatus*, удаленных у пациентов с этим синдромом в Испании [367]. Клинический случай неврологических нарушений, вызванных *R. raoultii*, описан в Китае. В клеще *D. marginatus*, снятом с пастуха, выявлена ДНК *R. raoultii*. Через 8 дней у пациента наблюдался подъем температуры колебалась, которая колебалась в пределах 38,0–41,0, и сопровождалась головной болью, недомоганием и анорексией. У больного постепенно развилось опущение правого века, чувство сдавления в груди, одышка, вялость и тошнота, сопровождающаяся рвотой. ДНК *R. raoultii* обнаружена в образце крови пациента [40]. В Центральной Европе гриппоподобные симптомы (лихорадка, недомогание, головная боль, мышечная боль и лимфаденопатия в области шеи) зарегистрированы

у больных, подвергшихся нападению инфицированных *R. raoultii* клещей рода *Dermacentor* [396, 469].

Предположение о более низкой вирулентности *R. raoultii* в сравнении с *R. slovaca* подтверждается следующими данными: несмотря на то, что по результатам ряда европейских исследователей *R. raoultii* выявляется в клещах чаще, чем *R. slovaca* в соотношении примерно 3 к 1 [179, 201, 284, 343, 400, 459], в качестве этиологического агента синдрома TIBOLA / DEBONEL чаще идентифицируют *R. slovaca* - 57% и 8%, соответственно [396].

В 2020 г. вид *R. raoultii* реклассифицирован в *Rickettsia conorii* subsp. *raoultii* на основании сопоставления результатов филогенетического анализа гена 16S рРНК 1000 геномов (драфт) класса альфа-протеобактерий [56]. По нашему мнению, реклассификация риккетсий только по одному гену вызывает сомнение, также обращает на себя внимание то, что этот «подвид» существенно отличается от остальных представителей вида *R. conorii*, в том числе по вирулентности и чувствительности к рифампицину. Для подгруппы *Rickettsia massiliae*, в которую входят *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia rhipicephali*, а также ранее относили *Rickettsia raoultii*, характерна естественная устойчивость к рифампицину (при МИК от 2 до 4 мкг/мл является фенотипическим маркером подгруппы *R. massiliae*, генетически детерминированной мутацией в гене *ompB*), тогда как риккетсии, принадлежащие к подгруппе *Rickettsia conorii*, от природы чувствительны к рифампицину (Rif<sup>s</sup>) при МИК <1 мкг/мл [165]. В данной главе в разделе 1.1.20. «Таксономические правила и предпосылки для валидации видов или подвидов риккетсий» представлено консолидированное мнение ведущих риккетсиологов мира по поводу классификации риккетсий, изложенное в публикации «Naming of *Rickettsiae* and rickettsial diseases» [307]. Мы считаем, что изложенный в данной публикации комплексный подход, основанный на изучении генотипических и фенотипических характеристик, является более объективным. Генетические и фенотипические характеристики *R. raoultii* представлены в главе 2, разделе 2.1.

**1.1.17. *R. slovaca*.** Впервые *R. slovaca* была изолирована в 1968 году из клещей

*D. marginatus* в Чехословакии [101], но получила свое название и была описана как новый вид позднее [399, 470]. *R. slovaca* можно размножать в развивающихся куриных эмбрионах, клетках HEL, Vero, L929 и клещевых культурах клеток, хотя никаких цитопатологических изменений не наблюдалось ни в одной из инокулированных культур клеток [91, 362].

Циркуляция *R. slovaca* в ареале *D. marginatus* и *D. reticulatus* в большинстве стран Европы подтверждена либо изоляцией штаммов, либо детекцией ДНК [150, 348, 397, 400, 403]. Эта риккетсия обнаружена также в Китае [201].

На протяжении более двух десятилетий после своего открытия *R. slovaca* рассматривалась как риккетсия с неустановленной патогенностью и только с 1997 года эту риккетсию стали ассоциировать с синдромом TIBOLA/DEBONEL [43, 270]. Для данной инфекции характерны струп на месте присасывания клеща (чаще на голове), лимфаденопатия и головная боль, к более редким симптомам относятся умеренная лихорадка, астения, сыпь и алопеция. При лабораторном исследовании – возможны лейкопения или лимфоцитоз, эозинофилия, повышение печеночных трансаминаз. Чаще болеют дети. [39, 200, 398, 418, 452].

ДНК *R. slovaca* идентифицирована в иксодовых клещах *D. marginatus* в Европейской части России. Единственный штамм *R. slovaca*, выделенный в России, изолирован из клещей *D. marginatus* в Курганской области (Зауралье). ДНК *R. slovaca* была выявлена в образце крови пациента, госпитализированного после присасывания клеща в г. Новосибирска. Из клинических проявлений наблюдались только лихорадка и головная боль, сыпь и первичный аффе́кт отсутствовали [321].

**1.1.18. *R. tamurae*.** *Rickettsia* sp. штамм AT-1T изолирована из *Amblyomma testudinarium* в 1993 году в Японии, официально определена в качестве нового вида *R. tamurae* на основании генетического и филогенетического анализа в 2006 году [404]. Серотипирование с использованием мышинных сывороток также показало отличие этой риккетсии от других официально признанных видов. Филогенетически наиболее близким видом является *R. helvetica* [404]. При использовании непрямого иммунофлюоресцентного анализа в крови собак в нескольких префектурах Японии обнаружены антитела к *R. tamurae* [431]. Спустя

пять лет после описания *R. tamurae* было опубликовано сообщение о первом случае заболевания, вызванного этой риккетсией. Накануне визита больной обнаружил «узелок» в левой подколенной области и отек левой ноги. «Узелком» оказалась самка клеща *A. testudinarium* (15 мм в диаметре). У пациента при наличии диффузной эритемы, небольшого отека и боли в левой икроножной области, отсутствовали типичные для клещевых риккетсиозов группы КПЛ симптомы (например, высокая температура, сыпь, лимфаденопатия). Кожные кровоизлияния отсутствовали. ДНК, выделенная из крови пациента, биоптата и удаленного клеща, имела 100% гомологии с *R. tamurae* AT-1 [453].

Присутствие риккетсий группы КПЛ, включая *R. tamurae*, было обнаружено у клещей *Amblyomma* и *Dermacentor* в Таиланде [333] и у клещей *Haemaphysalis* на полуострове Малайзия [410]. Кроме того, *R. tamurae* была обнаружена в клещах *Amblyomma* из эндемичных по бразильской пятнистой лихорадке районов Бразилии [401]. Также доказано присутствие *R. tamurae* у клещей *A. testudinarium* в Республике Корея [301].

**1.1.19. *Candidatus R. tarasevichiae*.** Новый генотип риккетсий - *Candidatus R. tarasevichiae*, названный в честь известного российского риккетсиолога, академика Ирины Владимировны Тарасевич, описан 2003 году [108]. ДНК *Candidatus R. tarasevichiae* обнаружена в иксодовых клещах во многих субъектах РФ, в том числе в Алтайском, Красноярском и Приморском краях, в Вологодской, Омской, Новосибирской, Свердловской, Томской, Тюменской, Челябинской областях и полуострове Камчатка. Основным переносчиком этой риккетсии является *I. persulcatus*, инфицированность вектора в ряде регионов очень высокая и достигает 90% [10, 12, 108, 214, 242, 345], также встречается в Китае и Монголии [123, 163, 241, 160]. Риккетсия, близкородственная *Candidatus R. tarasevichiae*, обнаружена в клещах *I. persulcatus* в Японии [349].

Данный генотип не может быть отнесен ни к одному из известных видов рода *Rickettsia* и принадлежит к предковой группе, в которую входят также *R. canadensis*, *R. bellii*, *R. monteiroi* sp. nov. и *Candidatus R. kingi* [58, 393]. Из клещей *Amblyomma incisum* в Бразилии с использованием культуры клеток Vero удалось выделить

штаммы *R. monteiroi*. *Candidatus R. kingi* в 2011 г. была выявлена в клещах *Ixodes kingi* в канадской провинции Саскачеван (Saskatchewan) без изоляции риккетсии с помощью молекулярно-биологических методов [59].

До настоящего времени окончательно не изучены биологические, в первую очередь фенотипические свойства *Candidatus R. tarasevichiae*. Роль в качестве этиологического агента для человека до недавнего времени считалась не установленной. Однако в 2012 году эта риккетсия была идентифицирована как новый патоген, вызывающий заболевание человека. У 5 больных, обратившихся за медицинской помощью после присасывания клещей в Муданьцзянский Центральный госпиталь в северо-восточном Китае, в образцах струпа и крови при использовании ПЦР и последующим секвенированием в качестве этиологического агента идентифицирована *Candidatus R. tarasevichiae*. Инкубационный период длился от 2-х до 17 дней. Клинически заболевание проявлялось лихорадкой, астенией, анорексией, тошнотой, головной болью, струпом. Сыпь не наблюдалась. У одного из пациентов были менингито-подобные проявления, такие как рвота, ригидность затылочных мышц и симптом Кернига. В дальнейшем у него наступила кома, нарушение функции почек, затем развился респираторный ацидоз, и пациент умер через 4 дня после поступления в больницу [233].

Позднее, в 2014 году, в восточной части центрального Китая от больных с синдромом тромбоцитопении ретроспективно был исследован материал на наличие ДНК *Candidatus R. tarasevichiae* на основе полимеразной цепной реакции и секвенирования. Положительные результаты получены у 56 из 733 обследованных пациентов. У всех пациентов были неспецифические проявления, включая лихорадку (96%), недомогание (88%), миалгию (57%), кашель (25%) и головокружение (14%), сыпь наблюдалась у 2 пациентов. Среди прочих симптомов отмечены: струп - у 16% пациентов, лимфаденопатия - у 29%, гастроинтестинальные симптомы - у 100%, неврологические симптомы - у 34%, геморрагические проявления - у 43%, плазморагия - у 23%. Тромбоцитопения наблюдалась у 70%, лейкопения у 59%; лимфопения у 45%; повышенный уровень лактатдегидрогеназы у 82%, аспартатаминотрансферазы у 70%,

аланинаминотрансферазы у 54% и креатининкиназы у 46%. Коинфекция вирусом тромбоцитопении была зарегистрирована у 66% пациентов, 8 из 56 пациентов умерли [109].

Поскольку фенотипические характеристики *Candidatus R. tarasevichiae* окончательно не изучены, при поиске адекватных биологических моделей для культивирования этой риккетсии целесообразно учитывать какие модели использовались для культивирования других риккетсий предковой группы. Фенотипические свойства *R. canadensis* изучались с использованием лабораторных животных, развивающихся куриных эмбрионов и культуры клеток Vero, для этого вида характерна низкая патогенность для мышей, луговых полевок и морских свинок [288]. *R. bellii* и *R. monteiroi* были успешно выделены в культуре клеток Vero методом shell vial [393]. Вышеуказанные исследователи отмечали наличие перекрестных реакций риккетсий предковой группы с представителями группы сыпного тифа и группы клещевой пятнистой лихорадки.

#### **1.1.20. Критерии видовой дифференциации риккетсий**

На протяжении длительного времени дифференциация риккетсий осуществлялась на основании изучения фенотипических свойств, таких как морфология, особенности культивирования с использованием различных биологических моделей (развивающиеся куриные эмбрионы, лабораторные животные, культуры клеток), иммуногенные свойства, антигенная структура [20]. Четких критериев видовой дифференциации при этом не существовало. С появлением и внедрением молекулярно-биологических методов изменились представления о классификации и таксономии риккетсий. Для видовой классификации по представлению специального комитета по переоценке определения вида в бактериологии (Ad Hoc Committee for Re-Evaluation of the Species Definition in Bacteriology) необходимо определение нуклеотидных последовательностей не менее пяти генов, в том числе кодирующие основные белки. Конкретные генетические критерии для дифференциации риккетсий на уровне рода, вида и группы изложены в работе Fournier с соавторами (2003) [211]. Рекомендуется использовать для классификации риккетсий панбактериальные

гены, кодирующие 16S rRNA (*rrs*) и цитратсинтазу (*gltA*), *Rickettsia* – специфические *OmpA* и *OmpB* гены и ген *D*, кодирующие поверхностные, высокомолекулярные белки rOmpA (190КД) и rOmpB (120 КД), PS120 (термостабильный цитоплазмальный белок) соответственно [211]. Согласно предложенным критериям, для классификации в качестве нового вида *Rickettsia*, изолят не должен демонстрировать более одной из следующих степеней нуклеотидного сходства с наиболее гомологичными валидированными видами:  $\geq 99,8$  и  $\geq 99,9\%$  для генов *rrs* и *gltA* соответственно, и, при амплификации,  $\geq 98,8$ ,  $\geq 99,2$  и  $\geq 99,3\%$  для генов *ompA* и *ompB* и гена *D* соответственно. Для описания нового вида риккетсий недостаточно изучения генетических характеристик, необходимо наличие не менее 5 изолированных штаммов с изученными фенотипическими характеристиками (Рисунок 1), которые должны быть депонированы в двух коллекциях, признанных World Data Centre for Microorganisms. Рекомендуется публиковать описание нового вида риккетсий в International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology или в International journal of systematic bacteriology. Некультивируемые риккетсии следует классифицируются как Candidatus «*Rickettsia* sp.» [307].

В последнее время была предпринята попытка осуществления систематики, классификации и таксономии альфа-протеобактерий, включая представителей рода *Rickettsia*, основанная на сопоставлении результатов филогенетического анализа гена 16S рРНК 1000 геномов (драфт) класса альфа-протеобактерий [56]. Основываясь на значениях ДНК-ДНК гибридизации (ДДГ) между парами видов [365, 290], авторы пришли к выводу, что *R. japonica* [389] лучше всего отнести к подвиду *R. conorii* [102]. Однако типовой штамм *R. japonica* депонирован только в одной коллекции культур, что не позволяет предлагать соответствующее новое название. Кроме того, предложено *R. gravesii*, *R. heilongjiangensis*, *R. raoultii*, *R. buchneri* отнести к категории *R. conorii* subsp. *gravesii*, subsp. nov., *R. conorii* subsp. *heilongjiangensis*, subsp. nov., *R. conorii* subsp. *raoultii*, subsp. nov., *R. tamurae* subsp. *buchneri*, subsp. nov. [56].

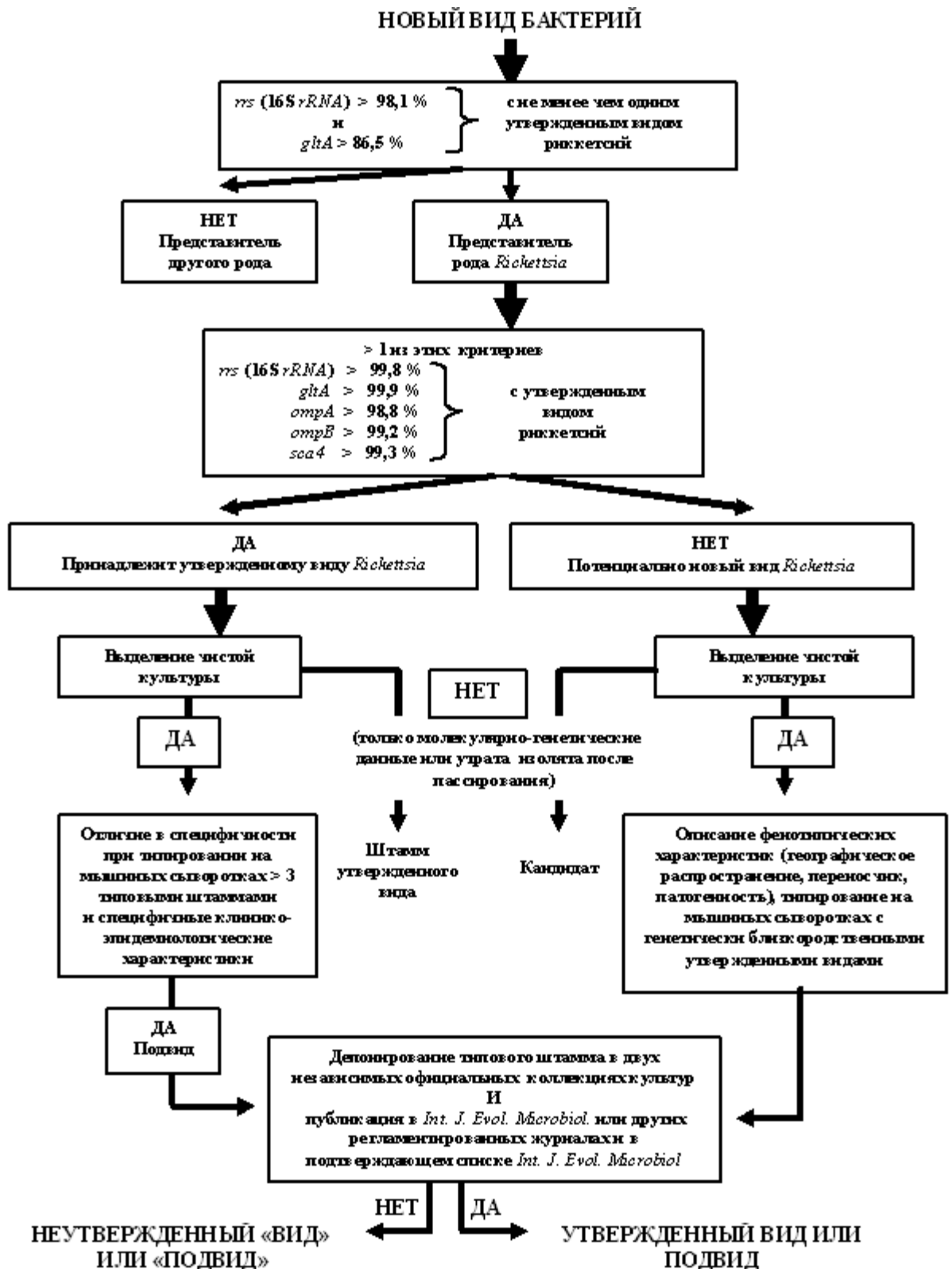


Рисунок 1 - Таксономическая схема для классификации риккетсий до уровня рода и вида (Raoult et al., 2005) [307]

## 1.2. Современное состояние проблемы бартонеллезов

Бартонеллы — это трансмиссивные, факультативно внутриклеточные, грамотрицательные палочковидные бактерии, паразитирующие в эритроцитах человека и других позвоночных, требовательны к питательным средам.

В настоящее время бартонеллы относятся к домену "*Bacteria*", типу "*Proteobacteria*", классу *Alphaproteobacteria*, порядку *Rhizobiales*, семейству *Bartonellaceae*, роду *Bartonella*. Названы в честь Alberto L. Barton, который описал эти микроорганизмы в 1909 г. в ходе исследования возбудителя болезни Карриона. Типовой вид — *Bartonella bacilliformis*. В результате сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК у входящих в род *Bartonella* видов произошла переклассификация из родов *Rochalimaea* [353] и *Grahamella* [354] в род *Bartonella*.

Род *Bartonella* в соответствии с “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Bartonella*” включает к настоящему времени 38 видов (Available online: <https://lpsn.dsmz.de/genus/bartonella> (accessed on 13 April 2021)): *B. acomydis*, *B. alsatica*, *B. ancashensis*, *B. apis*, *B. bacilliformis*, *B. birtlesii*, *B. bovis*, *B. callosciuri*, *B. capreoli*, *B. chomelii*, *B. clarridgeiae*, *B. coopersplainsensis*, *B. doshiae*, *B. elizabethae*, *B. florencae*, *B. fuyuanensis*, *B. grahamii*, *B. heixiaziensis*, *B. henselae*, *B. jaculi*, *B. japonica*, *B. koehlerae*, *B. kosoyi*, *B. krasnovii*, *B. pachyuromydis*, *B. peromysci*, *B. queenslandensis*, *B. quintana*, *B. rattaaustraliansi*, *B. refiksaydamii*, *B. rochalimae*, *B. schoenbuchensis*, *B. senegalensis*, *B. silvatica*, *B. talpae*, *B. taylorii*, *B. tribocorum*, *B. vinsonii* (subsp. *arupensis*, subsp. *berkhoffii*, subsp. *vinsonii*). По крайней мере, 13 из них: *B. alsatica*, *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. melophagi*, *B. quintana*, *B. rochalimae*, *B. tamiae*, *B. vinsonii*, *B. washoensis* [125] являются патогенами человека, ассоциируясь с возрастающим разнообразием вызываемой патологии.

Спектр теплокровных хозяев *Bartonella* обширен и разнообразен; наибольшее число видов ассоциированы с грызунами (*B. alsatica*, *B. birtlesii*, *B. doshiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. peromysci*, *B. talpae*, *B. taylorii* и *B. tribocorum*), ряд видов бартонелл используют в качестве хозяев представителей семейства копытных (*B. bovis*, *B. caprioli*, *B. chmetii*, и *B. schoenbuchensis*), домашних и диких кошек (*B.*

*clarridgeiae*, *B. henselae*, и *B. koehlerae*), человека (*B. bacilliformis*, *B. quintana*) и представителей семейства псовых (*B. vinsonii*) [64, 67, 68, 69, 70, 79, 82, 86, 98, 99, 230, 298, 354]. Тринадцать из этих видов признаны патогенами человека. *B. bacilliformis* вызывает болезнь Карриона [230]. *B. henselae* и *B. clarridgeiae* являются этиологическими агентами болезни кошачьей царапины [70, 310], *B. quintana* – траншейной лихорадки [286]. *B. grahamii* может быть причиной нейроритинита [146]. *B. elizabethae* и *B. vinsonii* subsp. *berkhofii* вызывают эндокардиты [87, 412], *B. quintana* и *B. henselae* также могут быть причиной эндокардитов [63, 170]. *B. vinsonii* subsp. *arupensis* была изолирована от больных с атипичной лихорадкой и эндокардитом [24, 250].

Бартонеллы – облигатные внутриклеточные патогены. После фазы адгезии происходит интернализация бартонелл вследствие рецепторного эндоцитоза. Затем следует развитие внутриклеточной эндосомы и репродукция инфекционного агента, которая приводит к гибели пораженных клеток.

*B. bacilliformis*, *B. quintana* и *B. henselae* вызывают большинство инфекций у людей [257, 359]. Эти инфекционные агенты могут вызывать клинические проявления различной степени тяжести: от легких симптомов, таких как лихорадка, головная боль и недомогание, до более тяжелых симптомов, таких как галлюцинации [71, 73, 93, 421]. Способность вызывать сосудистые пролиферативные или гнойные проявления и острые или хронические инфекции является отличительной особенностью *Bartonella* spp. Выраженность клинических проявлений коррелирует с иммунным статусом больного.

**1.2.1. *B. bacilliformis*.** *B. bacilliformis* был первым установленным инфекционным агентом рода *Bartonella* и был официально описан как вид перуанским врачом Альберто Бартоном в 1909 году [287]. Люди являются исключительным резервуаром *B. bacilliformis*, и они служат источником инфекции для moskitov *Lutzomya. verrucarum*, [176], которые являются переносчиками болезни. Сущестующая с доинкских времен [38, 421] *B. bacilliformis* является возбудителем болезни Карриона, которая была названа в 1885 г. в честь Даниэля Карриона, перуанского студента-медика, который умер от лихорадки Оройя после

того, как сделал себе прививку кровью из узелка перуанской бородавки и способствовал пониманию двухфазной природы этого заболевания [210, 422].

Острая гематическая фаза или лихорадка Ороя характеризуется внутриэритроцитарной бактериемией, которая часто приводит к фатальной фебрильной анемии из-за массивного гемолиза инфицированных эритроцитов [145]. Для острой фазы наиболее характерны следующие клинические особенности: лихорадка, недомогание, боль в животе, артралгия и тошнота, лимфаденопатия, гепатомегалия, сердечный шум, бледность и желтуха. Смертность на этом этапе колеблется от близкой к нулю в случае госпитализированных пациентов, получающих быстрое лечение антибиотиками, до 80% в нелеченых случаях [85]. В тяжелых случаях были зарегистрированы неинфекционные осложнения, такие как изменение психического статуса, атаксия, судороги, возбуждение, кома, сердечная недостаточность, перикардальные выпоты, миокардит, острая почечная недостаточность и респираторный дистресс-синдром взрослых [88, 113]. У пациентов, переживших эту острую интраэритроцитарную фазу, может развиваться эруптивная фаза или перуанская бородавка (*verruca peruana*) [477]. Наиболее часто болезнь Карриона встречается в перуанских Андах между юго-западной Колумбией и центральным Перу [279], где имеются экологические условия для развития *L. verrucarum* [330]. Также она регистрируется в Гватемале, Боливии и Чили, на низких высотах в Колумбии и в засушливой прибрежной провинции Эквадора [89].

**1.2.2. *B. quintana*.** *B. quintana* распространена повсеместно и передается платяной вошью (*Pediculus humanus corporis*) [357]. Хорошо известно, что инфицированные выделения платяных вшей на коже человека вызывают зуд, а повреждение кожи, которое следует за расчесыванием, позволяет *B. quintana*, содержащейся в высоких концентрациях в фекалиях инфицированных вшей, попадать в организм человека [357]. Люди являются единственными известными хозяевами и, вероятно, естественными резервуарами для *B. quintana*. Это возбудитель окопной лихорадки, болезни, которая ранее вызвала крупные эпидемии в Европе, но, после ведения мер по борьбе с вшами, как считалось, больше не

представляет угрозы [61, 286]. Однако к концу двадцатого века *B. quintana* вновь стала причиной хронической бактериемии и эндокардита, называемых «городской окопной лихорадкой» среди алкоголиков, наркоманов и бездомных, которые подвергаются более высокому риску заражения человеческими вшами [62, 126, 172, 231].

Окопная лихорадка характеризуется внутриэритроцитарной бактериемией с рецидивирующей пятидневной циклической лихорадкой (периодические лихорадочные рецидивы), сильной головной болью и претибиальной болью. Острые признаки обычно исчезают спонтанно, но могут рецидивировать примерно через 5 дней. У некоторых больных может быть шесть и более рецидивов заболевания. Продолжительная бактериемия, присутствующая при инфекции *B. quintana*, могут быть связаны с развитием бациллярного ангиоматоза (БА) и эндокардита [206]. БА — вазопролиферативное заболевание, характеризующееся кожными проявлениями сосудистых опухолей кожи и подкожной клетчатки, включая одиночные или множественные обесцвеченные кожные узелки, гиперпигментированные лихеноидные бляшки и подкожные узелки с потенциалом изъязвления, особенно у лиц с ослабленным иммунитетом [264]. Поражения часто неотличимы от наблюдаемых при болезни Карриона и напоминают пиогенные гранулемы, гемангиомы или саркому Капоши [205]. Вазопролиферативная инфекция обычно прогрессирует и приводит к летальному исходу, если ее не лечить антибиотиками.

**1.2.3. *B. henselae*.** Домашние и дикие кошки (*Felis catus*), первичные позвоночные-носители *B. henselae*, заражаются, когда ссадины на коже, царапины или места укусов блох контаминируются фекалиями инфицированных *B. henselae* блох [83, 187, 344, 346]. В периоды внутриэритроцитарной бактериемии кошек кошачьи блохи (*Ctenocephalides felis*) [187], которые являются первичными членистоногими переносчиками *B. henselae*, заражаются при питании кровью и выделяют возбудителя с фекалиями [185, 265, 278, 441]. Бактериемия у кошек может длиться от недель до месяцев [202]. Люди могут заразиться при внутрикожном инокуляция в открытую рану, такую как царапина или укус,

бактерий, содержащихся в кошачьей слюне или фекалиях блох, застрявших под когтями. Предполагается, что собаки также представляют собой резервуар для *B. henselae*, поскольку было обнаружено, что этот микроорганизм явился возбудителем остеомиелита человека после царапины от собаки [84, 119]. Также предполагается передача инфекции другими членистоногими, в частности клещами. ДНК *B. henselae* обнаружена у клещей *Ixodes pacificus* и *I. persulcatus* в Северной Америке и Восточной Европе соответственно [297, 298, 458], а также в клещах *I. ricinus* и *Dermacentor*, питающихся на людях или домашних животных в Центральной Европе [74, 75, 460].

*B. henselae* распространена по всему миру: случаи инфекции *Bartonella* зарегистрированы в Соединенных Штатах [111, 116, 283], Европе: Франции [115, 269], Германии [122], Швейцарии [488], Испании [229], Италии [428], Греции [65, 117, 207, 322, 325], Нидерландах [335, 339, 478], и Великобритании [224], а также в Японии [76, 199, 463], Новой Зеландии [380], Израиле [296] и Австралии [245]. В конце 20-го века было подсчитано, что 22 000 случаев болезни кошачьих царапин (БКЦ) могут возникать каждый год в Соединенных Штатах, и примерно 10% из них требовали госпитализации [256]. Болезнь кошачьих царапин (БКЦ) была впервые описана в 1950 году французским врачом Дебре у пациентов, страдающих гнойным лимфаденитом после кошачьих царапин [267]. Хотя БКЦ может возникать у людей любого возраста, большинство пациентов моложе 18 лет, возможно потому, что у детей чаще возникают близкий контакт с кошками. Для БКЦ характерна сезонность [205], в США [173, 256], Японии [463] и Франции [424] максимальное количество случаев БКЦ регистрируется с сентября по январь.

Первоначально, через 3-10 дней после инокуляции, БКЦ проявляется в виде одной или нескольких небольших красновато-коричневых эритематозных папул, пустул или пятен на месте царапины или укуса. Эти поражения постепенно исчезают и могут быть ошибочно приняты за укусы насекомых. В течение 1-3 недель после заражения развивается регионарная лимфаденопатия, преобладающий клинический признак БКЦ, чаще всего поражая подмышечные и эпитрохлеарные лимфатические узлы, дренирующие первичное место инокуляции

[111]. Лимфатические узлы часто болезненны, подвижны, плотной консистенции. У 20-30% больных воспаленные лимфатические узлы дают нагноение с гнойными свищами на коже и примерно 10% узлов требуют дренажа. БКЦ является одной из наиболее частых причин доброкачественной регионарной лимфаденопатии у детей и взрослых [205]. Другие менее распространенные симптомы БКЦ включают субфебрилитет, недомогание, анорексию, головную боль, спленомегалию, фарингит, конъюнктивит и артралгию [205]. Кроме того, наблюдались дерматологические проявления, такие как макулярная или папуловезикулярная сыпь, крапивница, кольцевидная эритема, узловатая эритема [111] и лейкоцитокластический васкулит [226, 468].

Атипичная БКЦ проявляется у 5-25% иммунокомпетентных пациентов и поражает различные органы, такие как глаза, печень, селезенка, центральная нервная система, кожа и кости. Необычные проявления БКЦ включают окулогландулярный синдром Парино, энцефалит, гепатолиенальные гранулемы [218, 467], остеомиелит [120, 478] и поражение легких [90, 205]. Глазной синдром Парино (ГСП), наиболее распространенная форма атипичной инфекции, возникает после инфицирования глаза, часто от собственной руки пациента. Он встречается примерно в 5% всех случаев БКЦ и характеризуется конъюнктивальной гранулемой вместе с преаурикулярной, подчелюстной или шейной лимфаденопатией [141]. Типичные симптомы включают ощущение инородного тела, одностороннее покраснение глаз, серозные выделения и повышенное слезотечение [65].

Нейроретинит, еще одно оптическое проявление атипичной БКЦ, проявляется безболезненным острым началом односторонней потери поля зрения в сочетании с отеком зрительного нерва и звездчатыми экссудативными поражениями макулы [141, 304]. Энцефалопатия составляет 1-7% случаев БКС и проявляется острым началом в виде сильной головной боли, спутанности сознания, судорог или комы через 1-6 недель после классических симптомов [60, 112, 225, 272, 484]. Как правило, у иммунокомпетентных пациентов течение БКЦ самокупируется и в большинстве случаев разрешается в течение 6-12 недель при отсутствии лечения антибиотиками.

У инфицированных больных микроорганизмы обнаруживаются чаще всего в стенках сосудов, в макрофагах, выстилающих синусы лимфатических узлов, в узловых герминативных центрах, в ненекротических участках воспаления и в участках расширяющегося и нагнаивающегося некроза [90, 306]. Электронная микроскопия инфицированных тканей лимфатических узлов подтверждает, что бактерии имеют высокое сродство к сосудистому эпителию, при этом микроорганизмы видны в виде скоплений в стенках сосудов, внутриклеточно и вне клеток в некротических остатках [168]. Системный бартонеллез проявляется БА, бациллярным паренхиматозным пелиозом и персистирующей бактериемией с возвратной лихорадкой.

Первое указание на то, что *B. grahamii* может инфицировать человека, было получено в 1999 г., когда у больного с нейроретинитом в результате 16S рРНК-специфического ПЦР-анализа образца ДНК, приготовленного из жидкости передней камеры, был получен фрагмент последовательности, сходный с *B. grahamii* [146]. Второе указание на инфицирование человека *B. grahamii* было получено в случае двусторонней окклюзии ветвей артерии сетчатки у иммунокомпетентного пациента [94]. Его сыворотка была положительной (титр 1:50) для IgM *B. grahamii*, но отрицательной для *B. henselae* и *B. quintana*, что указывает на то, что пациент недавно контактировал с бактерией, подобной *B. grahamii*. Первый случай пациента с подтвержденной мультилокусной типизацией последовательностей (МЛТП), описан Oksi J и др. (2013) [114] и демонстрирует, что *B. grahamii* действительно может вызывать инфекции у человека. Клиническая картина у данного пациента была аналогична таковой у пациента с БКЦ, который обычно диагностируют как инфекцию *B. henselae* [72, 356]. При компьютерной томографии у больного выявлены увеличенные лимфатические узлы, характерные для хронического лимфолейкоза. Однако, серийная визуализация помогла обнаружить инфекцию и отличить ситуацию от рецидива ХЛЛ. Визуализация также показала гиподенсивное поражение печени пациента, которое исчезло после антибиотикотерапии. У пациента была тяжелая иммунодепрессия, что могло повлиять на клиническую картину и позволить другим видам бартонелл вызывать

симптомы БКЦ. Посев жидкости, аспирированной из абсцесса, на бактерии, микобактерии и грибы был отрицательным для всех. Образец ДНК, приготовленный из этой жидкости, был подвергнут МЛТП, в качестве мишеней использовались межгенная спейсерная область 16S-23S рРНК (*ITS*), *gltA*, *rpoB* и 16S rRNA (*rrs*) гены. МЛТП однозначно продемонстрировала, что пациент был инфицирован *B. grahamii*. Учитывая распространенность *B. grahamii* в окружающей среде, можно предположить способность этого вида бартоanelл вызывать и другие лихорадочные заболевания у людей. Передача *B. grahamii* у данного пациента была связана с кошачьей царапиной.

*B. vinsonii* subsp. *arupensis* впервые был выделен от владельца ранчо крупного рогатого скота в Вайоминге, США, в 1999 г. Пациент — 62-летний мужчина - фермер, который был госпитализирован с внезапно появившейся спутанностью сознания, трудностью при ходьбе и онемением лица. У него также наблюдались головокружение, легкая головная боль, миалгия, при поступлении у больного была температура 38,3°C, пульс 120/мин, частота дыхания 16/мин. У него появилась энцефалопатия, но без острого дистресса. При осмотре кожи васкулит не выявлен. Был паралич правого четвертого черепно-мозгового нерва, двусторонняя диплопия, невнятная речь, сниженная концентрация и эмоциональная лабильность, а также гиперрефлексия и двусторонний клонус. Дефектов поля зрения не было [250].

Более поздние исследования показали, что штаммы, идентичные *B. vinsonii* subsp. *arupensis* были широко распространены среди оленьих мышей (*Peromyscus maniculatus*), североамериканского вида грызунов. Поскольку штаммы *B. vinsonii* subsp. *arupensis* не были обнаружены у других животных в Северной Америке, было высказано предположение, что оленьи мыши являются естественными хозяевами этой бактерии [342]. Однако предполагаемая связь между инфицированными мышами и инфекцией, вызываемой *B. vinsonii* subsp. *arupensis* у человека, была подвергнута сомнению, поскольку эта бактерия была выявлена серологическими и молекулярно-биологическими методами у пациента с эндокардитом во Франции [193] и выделены штаммы *B. vinsonii* subsp. *arupensis* в культуре клеток Vero от 2-х пациентов с атипичной лихорадкой и подозрением на

эндокардит в России [299]. Связь была дополнительно оспорена после идентификации *B. vinsonii* subsp. *arupensis* у 2 человек в Таиланде [237] и безуспешные попытки выявить этот или родственные виды среди местной популяции грызунов, несмотря на интенсивное расследование в разных частях Таиланда [49]. *B. vinsonii* subsp. *arupensis* также был идентифицирован у бездомных собак в Таиланде [171]. Кроме того, специфические антитела к *B. vinsonii* subsp. *arupensis* были зарегистрированы у лихорадящих пациентов из Непала [430]. В совокупности эти данные позволяют предполагать, что спектр животных-хозяев *B. vinsonii* subsp. *arupensis* может быть достаточно широким.

Также сообщается о идентификация *B. vinsonii* subsp. *arupensis* еще у 4 пациентов в Таиланде [237]. Пациенты были включены в исследование лихорадочных заболеваний в 2002–2003 гг. Один из больных был зарегистрирован как пациент без лихорадки. Все 4 пациента имели некоторые общие клинические симптомы, такие как головная боль, миалгии, головокружение и утомляемость, также у отдельных пациентов наблюдались желтуха, боль в глазах и боль в суставах. Кроме того, у 3-х больных был повышен уровень печеночных ферментов. Все пациенты сообщили о том, что ловили крыс или видели крыс внутри или вокруг своих домов в течение 2 недель до появления симптомов, и все являлись владельцами собак и/или кошек. Инфицированность этих больных *B. vinsonii* subsp. *arupensis* установлена в результате исследования сгустков крови молекулярными методами: ПЦР в реальном времени, нестед-ПЦР и однораундовая ПЦР с праймерами, амплифицирующими участки гена транспортной мессенджерной РНК (*ssrA*), гена цитратсинтазы (*gltA*) и межгенной спейсерной области 16S–23S рРНК (*ITS*).

Хотя передача *Bartonella* человеку обычно происходит при травматическом контакте с инфицированными животными или кровососущими насекомыми-переносчиками, эта группа видов также часто выявляется в клещах. Вероятность участия клещей в передаче *Bartonella* spp. было предположено в результате нескольких молекулярных и серологических исследований [158]. Впервые *Bartonella* была обнаружена у квестирующих клещей из США, включая *I. pacificus*,

*Dermacentor* и *R. sanguineus* [139]. Дополнительные обследования, проведенные в Нидерландах, Франции, Польше и Австрии продемонстрировали наличие ДНК *Bartonella* в клещах *Ixodes ricinus*, собранных с растительности [74, 147, 158]. Во Франции вид *B. henselae* был идентифицирован у *Ixodes ricinus*, а также у людей, подвергшихся нападению клещей [239]. В отдельных регионах в клещах родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis* выявляют и другие виды бартонелл - *B. doshiae*, *B. rattimassiliensis* и *B. tribocorum* в Азии, *B. bacilliformis* и *B. capreoli* - в Европе, *B. washoensis*, *B. tamiae* и *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* – в США, часто в сочетании с различными видами передаваемых клещами патогенов [337]. Однако утверждение, что клещи являются переносчиками бартонелл с последующим развитием заболевания у человека, не является бесспорным. В 1992 году Lusey D. с соавторами опубликовал сообщение о двух пациентах, инфицирование которых *B. henselae* связывали с присасыванием клещей [364]. Тем не менее, выявление у пациента сероконверсии к *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* привело к заключению о коинфекции или хронической инфекции, связанной с *B. henselae* [100]. Как оказалось на практике, проблематично четко определить источник заражения (в ряде случаев – кошки). Клинические исследования подтвердили передачу *Bartonella* клещами человеку, так как заражение произошло после присасывания клещей без каких-либо известных контактов с другими членистоногими [25, 158]. Сообщалось о заражении *Bartonella* у трех пациентов со струпом кожи головы и лимфаденопатией шеи после присасывания клещей [337]. Недавнее исследование Vayssier-Taussat и др. (2016) [239] выявило потенциально зоонозные штаммы *Bartonella* у пациентов, сообщивших о присасывании клещей. Естественные коинфекции видами *Bartonella* и другими клещевыми инфекционными агентами, такими как бабезии, анаплазмы и боррелии, также были обнаружены [136, 158, 337]. Эти наблюдения косвенно свидетельствуют о возможности клещевой передачи, даже при отсутствии прямых доказательств компетентного клещевого вектора для *Bartonella* [460, 475]. Кроме того, изучение экспериментальной передачи с использованием инфицированных клещей и восприимчивых животных показало возможность трансстадиальной передачи *B. henselae* у клещей *I. ricinus*, в

то время как трасовариальная передача не была установлена [460, 475]. Хотя ДНК бартонелл неоднократно находили в иксодовых клещах, тем не менее S.R.Telford и G.P.Wormser (2010) [447] считают, что описания неоспоримо доказанных случаев связи бартонеллезов с присасыванием иксодовых клещей в научной литературе отсутствуют. Некоторые публикации данные авторы даже назвали анекдотическими. Анализ встречаемости антител к видам *Bartonella* у охотников и доноров крови в восточной Австрии также привел А. Müller с соавторами (2016) [153] к выводу, что воздействие клещей не представляет существенного риска заражения *Bartonella*. Это свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения эпидемиологической значимости трансмиссивной передачи бартонелл иксодовыми клещами. По имеющимся в настоящее время данным важного значения в поддержании эпидемического процесса она не имеет.

Спектр бартонелл в нашей стране в полной мере не изучен, поскольку исследования в этом направлении начаты сравнительно недавно и проводились только в нескольких областях РФ. Циркуляция бартонелл с использованием молекулярно-биологических методов установлена в Новосибирской (*B. henselae* и *B. quintana* в пробах из иксодовых клещей, комаров и крови больных) и Омской областях (*B. grahamii* и *B. taylorii*, ДНК *Bartonella spp.* в пробах из иксодовых клещей и мелких диких млекопитающих), а также на Дальнем Востоке (*B. grahamii* и *B. taylorii* в пробах из мелких диких млекопитающих) [9, 25, 302, 458]. Кроме того, В Омской области у больных с лимфаденитами обнаружены антитела к бартонеллам [9]. Штаммы бартонелл выделены в Московской области (*B. vinsonii* subsp. *arupensis* от пациентов с эндокардитом; *B. grahamii* и *B. taylorii* в пробах из мелких диких млекопитающих) [23, 24].

Клинические случаи бартонеллезов в РФ описаны, в основном, у детей. По наблюдениям Ф.С. Харламовой и др (2011) [4] в России бартонеллез у детей характеризуется острым течением, преимущественно с выраженными проявлениями интоксикации, системным характером поражения лимфоидной ткани, сосудистой системы, вероятно по типу ангиоматоза, с вовлечением печени, селезенки и в меньшей степени с наличием первичного аффекта или

локализованной формы: болезни кошачьей царапины и ее глазо-железистой формы. Мазанковой Л.Н. и др. (2018) [3] описан случай тяжелой, генерализованной формы БКЦ у ребенка с атипичными проявлениями.

#### 1.2.4. Критерии для определения видов бартонелл, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей

Поскольку бартонеллы являются требовательными к условиям культивирования микроорганизмами, их классификация, основанная на изучении гено- и фенотипических характеристик занимает достаточно много времени. С целью разработки быстрой схемы видовой дифференциации бартонелл La Scola с соавторами (2003) [212] сравнили сходство фрагментов генов, доступных в базе данных NCBI GenBank, среди валидированных видов бартонелл (Таблица 8).

Таблица 8 - Процент гомологии нуклеотидных последовательностей внутри рода *Bartonella*

| Ген           | Степень гомологии (%) |                    |                     |
|---------------|-----------------------|--------------------|---------------------|
|               | Медианное значение    | Наивысшее значение | Наименьшее значение |
| 16S rDNA      | 99.7                  | 99.8               | 98.3                |
| <i>ITS</i>    | 93.9                  | 99.8               | 89.2                |
| <i>GltA</i>   | 93.6                  | 96.0               | 87.1                |
| <i>Gro EL</i> | 92.6                  | 99.4               | 86.2                |
| <i>RpoB</i>   | 92.8                  | 95.4               | 90.9                |
| <i>FtsZ</i>   | 94.4                  | 97.9               | 88.8                |
| <i>RibC</i>   | 86.5                  | 99.5               | 82.8                |

Это сравнение привело к определению значения гомологии, которые различают *Bartonella* на видовом уровне и оценке дискриминационной значимости каждого исследованного гена. В этой перспективе гены *rpoB* и *gltA* оказались наиболее эффективными. Процент для генов 16S рДНК, *gltA*, *gro EL*, *rpoB*, *ftsZ*, *RiBC* и внутренней транскрипции спейсерной области (*ITS*) рассчитывали на основе сайтов 1356, 1340, 327, 1185, 825, 788, 621, соответственно.

Дискриминационная способность (ДС) четко определяется медианным значением межвидовое сходство, тогда как минимальное сходство (МС) определяется как наивысший показатель межвидового сходства.

Специальный комитет, по повторной оценке, определения вида в бактериологии предположил, что в будущем описание новых видов может быть

основано на анализе последовательностей генов домашнего хозяйства со сравнением <5 генов при условии достаточной степени конгруэнтности между используемой техникой и реассоциацией ДНК-ДНК [212].

### **1.3. Биологические модели, используемые для изоляции, культивирования и изучения риккетсий**

Изоляция риккетсий имеет первостепенное значение для описания новых видов риккетсий. Наличие выделенных штаммов также очень важно для изучения физиологии патогенов, генетических описаний и определения чувствительности к антибиотикам, изучения взаимодействия с переносчиками и теплокровными хозяевами-прокормителями, и для улучшения диагностических инструментов [469]. Выделение *Rickettsia* spp. требует соответствующих методов, которые должны выполняться только в специализированных лабораториях.

#### **1.3.1. Морские свинки**

Морские свинки (*Cavia porcellus*) сыграли решающую роль в открытии риккетсий в 1906 году, когда доктор Н. Т. Ricketts ввел кровь пациента с пятнистой лихорадкой Скалистых гор двум морским свинкам. В последующих повторениях этого эксперимента использовали кровь разных пациентов и, наконец, нефiltrованную и филтрованную сыворотку. Во всех случаях, кроме случаев использования сыворотки после филтрации у морских свинок развилась лихорадка и характерные клинические признаки, в том числе отек мошонки; большинство животных умерло [371]. Действительно, поражение мошонки было физическим признаком, указывающим на диагноз пятнистой лихорадки Скалистых гор у морских свинок. Впоследствии Walter King и Ricketts независимо друг от друга использовали морских свинок, чтобы определить, что клещи являются переносчиками микроорганизма, получившего название в честь последнего, *R. rickettsii* [369]. Морские свинки были необходимы для демонстрации вертикального и трансстадиального сохранения риккетсий у клещей, экспериментов по филтрации, демонстрирующих, что риккетсии должны быть достаточно большими, чтобы быть видимыми под микроскопом, и определения того, что активный иммунитет следует за выздоровлением от инфекции, в то время как

пассивный перенос иммунных сывороток обеспечивает защиту морских свинок [369, 370, 371].

В 1916 году S.B. Wolbach использовал морских свинок и специальные методы фиксации и гистохимии для идентификации этиологического агента, морфологически напоминающего мелкие бактерии, и их внутриклеточной локализации [486]. Эти эксперименты привели к важному открытию, что основной мишенью риккетсий являются эндотелиальные клетки и иногда соседние гладкомышечные клетки сосудов. Впоследствии морских свинок использовали для выделения других новых риккетсий, таких как *R. typhi*, которая была признана уникальной по характерному отеку мошонки вследствие размножения риккетсий во влажной оболочке мошонки [305].

Морские свинки использовались для демонстрации того, что профилактические антириккетсиозные антибиотики просто продлевают инкубационный период, но не предотвращают заболевание, вызываемое *R. rickettsii*, что моноклональные антитела к белкам наружной мембраны (Omp) A и B обеспечивают пассивную защиту и что иммунизация рекомбинантным *OmpA* стимулирует защитный иммунитет, но нокаут (удаление) *ompA* не вызывает ослабления *R. rickettsii* [273, 317, 351, 355]. Недавние исследования на морских свинках показали, что нокаут *sca2* ослабляет *R. rickettsii*, что субклиническая инфекция *R. amblyommatis*, которая широко распространена среди клещей-одиночек, обеспечивает полную защиту от болезни после заражения *R. rickettsii*, и что *R. rickettsii* передается при совместном питании инфицированных и неинфицированных клещей [159, 376, 395]. Было установлено, что тигециклин является эффективным противомикробным средством для лечения инфекции, вызванной *R. rickettsii*, а продолжительность прикрепления клеща, приводящего к передаче *R. rickettsii*, составляет менее получаса [291, 444]. Действительно, эти успехи в нашем понимании риккетсиозов были бы невозможны без использования морской свинки.

Скротальный феномен (орхит) у самцов морских свинок является патогномичным симптомом для большинства риккетсиозов, поэтому этих

лабораторных животных обычно используют в качестве биологической модели для проведения биопроб [20]. Оптимально использовать с этой целью животных весом 300-350 граммов. Заражающую суспензии (кровь больного, органы человека или животного, членистоногие) в объеме 3-х - 5-ти мл вводят внутривентрально. В опыте используют 2-3 животных. Измерение ректальной температуры проводят на протяжении 2-х – 3-х недель. Животных вскрывают на высоте лихорадки. Наличие риккетсий в исследуемых органах (паховые лимфоузлы, тестикулы, селезенку, мозг, надпочечники) определяют в ПЦР, в реакции непрямой иммунофлуоресценции и методом световой микроскопии. Для световой микроскопии мазки-отпечатки окрашивают по методу Здродовского. У одного из биопробных животных через 25-30 дней проводят забор крови для серологических исследований.

Тем не менее, в конце 1980-х годов возросла популярность генетически модифицированных мышей, и сократилось использование морских свинок как модели для изучения болезней человека. Однако, недавно были разработаны две линии трансгенных морских свинок с использованием технологии CRISPR, нокаут *RAG2* и нокаут IFN лямбда-рецептора 1 (IL28Ralpha) (личное сообщение, доктор Zhongde Wang, Университет штата Юта). Таким образом, технология CRISPR в сочетании с завершением изучения генома морской свинки позволила расширить возможности использования морских свинок в качестве моделей болезней человека (Broad Institute.org).

Преимущество модели морских свинок для изучения переносимых клещами риккетсиозов обусловлено их базовой биологией. Представитель отряда *Rodentia*, семейства *Caviidae*, *Cavia porcellus*, является относительно крупным грызуном, что позволяет получать большой объем крови, в том числе нетерминально. и дает возможность проследить за одними и теми же животными с повторным сбором образцов в рамках продольного исследования [316, 326]. Более крупные последовательные сборы крови позволяют проводить исследования, аналогичные клиническим испытаниям на людях. Для изучения риккетсиозов желательные анализы могут включать серологический, молекулярный, гематологический (ОАК), биохимический анализ и иммунофенотипирование [48, 319, 440, 449]. Морские

свинки имеют достаточный размер, чтобы легко обеспечить необходимую площадь поверхности для кормления неполовозрелых или взрослых клещей для естественной передачи переносимых клещами риккетсий [182, 189, 217, 312, 448, 485]. Биологические преимущества морских свинок для исследования риккетсиозов не ограничиваются их размером, характером и способностью заражаться естественным путем через передачу риккетсий при кормлении клещей. Мало того, что риккетсиоз человека успешно повторяется у иммунокомпетентной морской свинки с хорошо задокументированным развитием струпа, лихорадки и других клинических признаков, но, что важно, инфекция может также возникать путем естественной передачи при единичном укусе клеща [240, 271, 371, 372, 338]. Способность морских свинок проявлять клинические признаки клещевого риккетсиоза, включая изменения, типичные для заболеваний человека, вероятно, обусловлена генетическим и функциональным сходством иммунной системы морской свинки и человека [324], что имеет решающее значение для моделирования переносимых клещами заболеваний человека, поскольку механическое повреждение кожи в месте укуса, воздействие антигенов слюны клеща и связанное с этим воспаление способствуют внедрению патогена, вызывая тот же иммунный ответ хозяина, что и в природе [261, 320].

### **1.3.2. Мыши**

В 1980-х годах использование морских свинок было значительно сокращено из-за достижений в области более продуктивной и недорогой мышинной модели. Эти достижения включали разработку генетически модифицированных штаммов мышей, что привело к расширению спектра специфичных для мышей реагентов и анализов. В последующие десятилетия нокаутные и нокдаунтные мутации, нацеленные на гены, а также трансгенные и составные трансгенные/нокин-ин способности расширили полезность и кастомизацию генетически модифицированных мышей в качестве моделей заболеваний человека [450]. Генетические манипуляции с использованием мышинной модели были усовершенствованы, что позволило сделать сложные линии мышей более доступными для биомедицинских исследований. Текущий акцент на мышинных

моделях, очевидный в исследовательских публикациях, также отражается в доступных ресурсах, предоставляемых обычными коммерческими поставщиками, включая возможность разработки индивидуальных штаммов мышей (например, The Jackson Laboratory — [jax.org](http://jax.org), Charles River — [criver.com](http://criver.com) и Envigo – [envigo.com](http://envigo.com)). Увеличение количества генетически модифицированных штаммов стимулировало создание специфичных для мышей реагентов и других ресурсов. Широкая доступность мышинных моделей и инструментов, специфичных для мышей, а также относительно низкие суточные затраты на содержание *Mus musculus* по сравнению с другими видами моделей млекопитающих способствовали тому, что мышинная модель стала наиболее распространенной и, следовательно, хорошо зарекомендовавшей себя моделью для изучения болезней человека [440].

Хотя были предприняты попытки экспериментального заражения птиц, грызунов, зайцеобразных и морских свинок и была установлена чувствительность ряда штаммов мышей к *R. conorii*, при введении внутрибрюшинно и подкожно [167], сообщается, что заражение мышей СЗН/HeN при внутривенном введении - это одна из лучших доступных животных моделей повреждения эндотелия, и она очень похожа на многие аспекты человеческого SFG-риккетсиоза [479]. Диссеминированное поражение сосудов при инфекции возникает почти во всех системах органов, о чем свидетельствуют интерстициальная пневмония и васкулитное воспаление легких, гранулематозное воспаление печени, менингоэнцефалит головного мозга, умеренная ретикулоэндотелиальная гиперплазия селезенки и периваскулит почек и яичек. Экспрессия хемокинов Mig (CXCL9) и IP-10 (CXCL10), которые, как известно, нацелены на активированные Т-клетки посредством CXCR3, значительно повышена в легких, печени мышей, инфицированных сублетальными и летальными дозами *R. conorii* [473]. Кроме того, повышенная экспрессия факталкина (CXCL1), по-видимому, совпадает с инфильтрацией макрофагов тканей, инфицированных *R. conorii* [474]. Точно так же внутривенное введение *R. australis*, возбудителя квинслендского клещевого тифа, приводит к диссеминированной эндотелиальной инфекции мышей BALB/c и C57BL/6 с вовлечением почти всех систем жизненно важных органов, включая

легкие, печень, яички, почки и селезенку. [192]. Заслуживает внимания описание мышинной модели инфекции *R. prowazekii*, посвященное лабораторным исследованиям патогенетических механизмов эпидемического сыпного тифа [41, 408]. В этой модели *R. prowazekii* может быть обнаружен в крови, мозге, печени и легких инфицированных мышей через 24 часа и сохраняется в этих тканях до 9 дней. Заболевание характеризуется интерстициальной пневмонией, кровоизлияниями в легкие и головной мозг, мультифокальным гранулематозным воспалением печени и повышенной экспрессией IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и RANTES при инфекционно-индуцированных поражениях тканей. Однако вопрос о том, имитирует ли эта модель эпидемического сыпного тифа *in vivo* характерные черты болезни человека, например, диссеминированную инфекцию, направленную на эндотелий, эндотелиальную активацию и сосудистое воспаление, остается критически важным открытым вопросом [416].

### 1.3.3. Куриные эмбрионы

Предложенный Коксом метод выращивания риккетсий в желточных мешках куриных эмбрионов [137, 138] не утратил своего значения до настоящего времени. Большинство видов риккетсий хорошо размножаются в сосудах желточных мешков развивающихся куриных эмбрионов, однако для изоляции штаммов риккетсий, особенно из клещей, эта модель не является оптимальной так как, несмотря на предварительную отмывку членистоногих, часто наблюдается контаминация суспензии для заражения. Тем не менее, для накопления биомассы патогенных риккетсий, в том числе из органов биопробных животных, куриные эмбрионы являются эффективной моделью.

Заражение и вскрытие куриных эмбрионов проводят в асептических условиях: работа ведется в стерильном микробиологическом боксе, поверхность яйца обрабатывают 70<sup>0</sup> спиртом и стерилизуют фламбированием. Заражение 5-6 дневных эмбрионов проводят через воздушную камеру путем инокуляции во внутреннее пространство желточного мешка суспензии, содержащей риккетсии, в объеме 0,3-0,5 мл с обязательным посевом заражающей суспензии на специальные среды для контроля контаминации посторонней микрофлорой. Оптимальная

температура для роста риккетсий группы пятнистой лихорадки 33,5 С — это компромисс между оптимумом для риккетсий, около 32 С, и минимальной температурой, обычно необходимой эмбрионам для их выживания.

Зараженные эмбрионы ежедневно просматривают на овоскопе, для вскрытия выбирают погибшие эмбрионы, потерявшие подвижность. Риккетсии группы КПЛ обычно вызывают гибель куриных эмбрионов на 4-6 сутки после заражения. Извлеченные желточные мешки исследуют на наличие посторонней микрофлоры при помощи световой микроскопии, анализируют накопление риккетсий при помощи люминесцентной микроскопии и изучения фрагментов желточного мешка (или хориона) в ПЦР.

Куриные эмбрионы оказались полезными для многих видов исследований, но имеют некоторые недостатки: риккетсии, полученные из желточных мешков, можно отделить от хост-компонентов только относительно сложными методами [20, 481, 144], которые нередко приводят к повреждению микроорганизмов.

#### **1.3.4. Сирийские хомячки**

Также для изоляции и изучения биологических свойств риккетсий используются сирийские хомячки. Применение этой биологической модели позволило выделить штаммы *R. slovaca*, которые крайне редко удавалось изолировать на самцах морских свинок и исследовать гуморальный ответ на введение некоторых видов риккетсий: *R. sibirica*, *R. conorii*, *R. slovaca* и *R. akari* [407, 361].

#### **1.3.5. Культуры клеток**

Заражение животных и куриных эмбрионов широко использовались в прошлом для выделения и размножения *Rickettsia spp.* В настоящее время метод культивирования клеток во флаконах (shell vial) [132, 222], широко применяемый в вирусологии и адаптированный для культивирования *R. conorii* La Scola и Raoult (1996) [268], является наиболее распространенным методом выделения риккетсий. Метод включает инокуляцию заражающего материала на монослой клеток, выращенный на покровном стекле в культуральной пробирке shell vial, с последующим центрифугированием и инкубацией.

Повышение эффективности адгезии и проникновения риккетсий в клетки монослоя в процессе центрифугирования приводит к более продуктивному накоплению биомассы этих бактерий. Скорость центрифугирования при работе с риккетсиями составляет 700 g, время – 45-60 минут, при температуре 4 С. Затем необходимо произвести замену культуральной среды с использованием минимальной основной среды, обогащённой 4% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. и 2 mM глутамин без антибиотиков, на свежую. При значительном загрязнении заражающей суспензии в монослой можно добавить антибиотики (0,2% пенициллин+стрептомицин) и 1% фунгизон (амфотерицин В), которые удаляют через 48 часов. Температура и время инкубации зараженных культур клеток зависит от вида культивируемых риккетсий и используемой клеточной линии. Температурный диапазон культивирования риккетсий, как правило, составляет 28–34°C, для некоторых видов, например *R. raoultii*, температурный оптимум (28° С) ниже, чем для большинства видов риккетсий [129, 249]. Культивирование возможно как в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, так и без него.

Показателем роста риккетсий является цитопатический эффект, а также выявление этих микроорганизмов в мазках, окрашенных по Гименезу или по Здродовскому, и/или в иммунофлуоресцентном анализе с использованием специфических поликлональных антител иммунных животных [28, 142, 472]. Однако для идентификации риккетсий определение фенотипических особенностей недостаточно, окончательную идентификацию бактерий необходимо проводить с использованием молекулярно-биологических методов. Для накопления биомассы культивируемых риккетсий выполняют пересев материала во флаконы большего объема.

По мнению некоторых авторов, успешность выделения риккетсий из биоптатов кожи выше, чем из крови [434]. *Rickettsia* spp. могут заражать и развиваться в различных типах клеток, хотя наиболее часто используются клетки Vero. Кроме клеточных линий млекопитающих в работе с риккетсиями используют клеточные линии членистоногих, чаще из родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Rhipicephalus* [457]. Для некоторых видов риккетсий они являются единственным, кроме

лабораторных линий клещей, методом культивирования. Так, при описании *R. peacockii* sp. nov. утверждалось, что попытки культивировать этот новый вид не увенчались успехом [394]. Однако, позднее эта риккетсия была обнаружена в хронически инфицированной эмбриональной клеточной линии DAE100 была обнаружена в хронически инфицированной эмбриональной клеточной линии DAE100, полученной из древесного клеща Скалистых гор *D. andersoni* [252]. Риккетсии существовали свободно в цитозоле клеток DAE100 или внутри аутофаголизосом. Экзоцитированные риккетсии накапливались в среде и иногда содержались в мембранах хозяина. *R. peacockii* также размножается в других клеточных линиях твердых клещей *D. andersoni*, *D. albipictus*, *I. scapularis* и *I. ricinus*; мягких клещей *Carios capensis*; и чешуекрылых *Trichoplusiani*. Способность *R. peacockii* вызывать легкий цитопатический эффект предполагает, что его патогенность не полностью подавлена [188]. Клеточным линиям членистоногих обычно требуются среды с большим количеством добавок по сравнению с линиями млекопитающими. Клеточные линии клещей имеют то преимущество, что они частично воспроизводят естественную среду обитания риккетсий, а также демонстрируют широкий температурный диапазон культивирования (28 - 34°C). Недостатком является длительный период культивирования.

Анализ бляшек стал эталонным методом для проверки чувствительности риккетсий к антибиотикам [246], но результаты были также получены с помощью колориметрического анализа микробляшек, культивирования в сочетании с количественной ПЦР [178].

### **1.3.6. Лабораторные клещевые линии**

Как известно, клещи обычно считаются основным резервуаром риккетсий группы КПЛ. Это связано с трансвариальной и трансфазовой передачей, а также длительным сохранением риккетсий в организме клеща.

Лабораторные исследования передачи, поддержания, инфекционности, вирулентности и патогенности переносимых клещами агентов требуют как живых переносчиков (клещей), так и соответствующих животных моделей для воспроизведения естественного пути заражения через укус клеща. Поэтому,

лабораторные клещевые линии можно считать еще одной моделью для культивирования и изучения как генотипических, так и фенотипических характеристик риккетсий.

Метод интрацеломальной инокуляции частично напивавшихся самок клеща (МИИЧНСК) успешно используется как метод с 1948 года. Выращивание *Coxiella burnetii* в гемоцеле аргасового клеща *Ornithodoros mmoubata* (Murray) был выполнен Weyer [483]. Изучено взаимодействие гемоцитов с бруцеллами (*B. mellitensis* и *B. abortus*) у аргасовых клещей [31]. Изучалось развитие *Rickettsia prowazekii* в различных видах иксодовых клещей [14, 104, 107], распространение *R. sibirica* в органах *Ornithodoros lahorensis* Neumann и *Alveonatus canestrini* [30,32]. Выращивание симбионтов из *D. andersoni* Stiles у того же вида хозяина было сделано Burgdorfer и др. (1973) [105]. Двойная инфекция апатогенного и патогенного (подкожное введение мышам) вируса клещевого энцефалита у клещей *I. ricinus* (L.) проведена Weismann и др. (1990) [480]. Также метод интрацеломального инфицирования полностью напивавшихся нимф с последующим обнаружением возбудителя у перелинявших взрослых клещей успешно применялся в экспериментах с использованием *Coxiella burnetii* [360]. Использование частично напивавшихся самок клещей (ЧНСК) для изоляции различных микробных агентов из природы часто оказывалось успешным [363, 466]. Этот подход особенно применим там, где адекватные модели для культивирования еще не установлены.

Исследования передачи, сохранения, инфекционности и патогенности переносимых клещами возбудителей требуют использования большого количества живых клещей, выращенных в лаборатории. Существует несколько протоколов ведения лабораторных линий иксодовых клещей, в которых в качестве теплокровных прокормителей наиболее часто используются кролики, морские свинки или определенные породы белых мышей.

Troughton DR, Levin ML (2007) [462] опубликовали результаты изучения жизненных циклов семи видов иксодовых клещей *Ixodes scapularis* Say, *Ixodes pacificus* Cooley & Kohls, *Amblyomma americanum* (L.), *Dermacentor occidentalis*

Marx, *Dermacentor variabilis* (Say), *Hemaphysalis leporispalustris* (Packard) и *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle). Колонии этих клещей (от 5 до 18 непрерывных поколений) содержались в лаборатории в Центре контроля и профилактики заболеваний. В качестве теплокровных хозяев-прокормителей для всех видов иксодид на всех стадиях метаморфоза использовались Новозеландские белые кролики (*Oryctolagus cuniculus*). Жизненные циклы исследуемых видов клещей изучались при стандартизированных лабораторных условиях: температура 22-24°C, относительная влажность 90%, фотопериод день/ночь 16:8 (Д:Н) ч. Регистрировали продолжительность питания, линьки, продолжительность периода до яйцекладки и периоды развития после линьки. При 22-24° С минимальное время прохождения одного жизненного цикла каждым видом было следующим: *I. scapularis* 204-219 дней; *I. pacificus*, 214 - 229 дней; *R. sanguineus*, 162-177 дней; *H. leporispalustris*, 209 - 224 дней; *D. variabilis*, 176 -191 день; *D. occidentalis*, 180 - 195 дней; и *A. americanum*, 192 - 211 день.

Аналогичный подход к содержанию лабораторных линий клещей использовали Chen X. с соавторами (2012) [276] при изучении жизненного цикла *Haemaphysalis doenitzi*. Колонии из имаго клещей *H. doenitzi*, собранных с растительности выращивали на кроликах, как описано Liu et al. (2005) [95]. Кроликов содержали в помещении с относительной влажностью 50% при температуре 25-27°C и подвергали воздействию дневного света. После открепления клещей собирали и инкубировали в стеклянных пробирках с ватными тампонами, заполненных сложенной фильтровальной бумагой, в инкубаторе с относительной влажностью  $75 \pm 5\%$  и циклом Н/Д 6/18 ч при  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Наблюдения за биологией личинок и нимф.

Ежедневно на ухо кроликам помещали 100 только что появившихся неполовозрелых клещей и определяли их предкормовой период, который определяли как дни со дня вылупления или линьки к началу прикрепления. Через десять дней после линьки 300 некормленных личинок и 300 некормленных нимф взвешивали и кормили на кроликах, а их периоды кормления записывались. После напитывания отделившихся клещей собирали, подсчитывали, взвешивали,

помещали в индивидуальные пробирки, затянутые марлевой сеткой, и выдерживали в инкубаторе, как описано выше, и регистрировали их период перед линькой. После линьки нимф в имаго регистрировали их пол.

Наблюдения за биологией взрослых клещей и яиц.

Ежедневно на кроликов для проведения процедуры кормления размещали по сто особей половозрелого возраста, состоящих из пятидесяти самок и пятидесяти самцов, с целью изучения их способности к прикреплению и питанию. Самки и самцы клещей, прошедшие линьку, после адаптационного периода, продолжительностью десять дней перед началом процесса кормления подвергались взвешиванию.

Напитавшихся самок собирали, взвешивали и помещали в инкубатор. Ежедневно наблюдали за процессом яйцекладки и количеством отложенных яиц. Откладываемые яйца ежедневно собирали, подсчитывали и помещали в отдельные стеклянные пробирки. Для наблюдения за периодом линьки использовали тысячу яиц. После линьки подсчитывали процент появившихся личинок. Индекс репродуктивной эффективности самок (ИРЭ) и индекс репродуктивной пригодности (ИРП) рассчитывали, как отношение числа яиц к весу напитавшейся самки и отношение числа перелинявших до личинок яиц к весу напитавшейся самки соответственно [124].

Эта методика содержания линий клещей в лабораторных условиях также применялась при изучении характеристики развития *Dermacentor everestianus* [275], *Hyalomma rufipes* [455], *D. silvarum* [95].

Stokes, J. и др. (2022) [177] представляют подробные протоколы, которые были ими разработаны или оптимизированы для изучения риккетсиоза пятнистой лихорадки (SFR) на модели морской свинки, уделяя основное внимание клещевой передаче с соответствующими альтернативными методами, если это необходимо. Создание и поддержание колоний естественно инфицированных и неинфицированных клещей проводили как описано ранее [423]. Морская свинка была первоначальной животной моделью, разработанной для исследования риккетсий, вызывающих пятнистую лихорадку скалистых гор (ПЛСГ). Эта

модельная система сохранилась из-за того, что морские свинки поддерживают передачу клещами агентов ПЛСГ и способны воспроизводить ПЛСГ у людей по клиническим признакам. Морская свинка является самой маленькой животной моделью для ПЛСГ, которая позволяет собирать несколько образцов крови и кожи прижизненно для продольных исследований. Это обеспечивает основные протоколы, необходимые для создания, поддержания и использования модели риккетсия – клещ - морская свинка для мониторинга течения инфекции и иммунного ответа на инфекцию риккетсий группы пятнистой лихорадкой. Протоколы охватывают методы кормления клещей и развития колоний, лабораторное заражение клещей, клещевую передачу риккетсий морским свинкам и мониторинг течения инфекции по клиническим признакам, риккетсиозной нагрузке и иммунному ответу.

Протокол 1. Клещевая передача риккетсий группы пятнистой лихорадки (РГПЛ) морским свинкам.

Протокол 2. Мониторинг течения риккетсиозной инфекции морских свинок: клинические признаки.

Протокол 3. Мониторинг течения риккетсиозной инфекции морских свинок: сбор биологических образцов.

Протокол 4. Мониторинг риккетсиозной нагрузки у морских свинок с помощью мультиплексной количественной ПЦР.

Протокол 5. Мониторинг иммунного ответа морской свинки на инфекцию: лейкоциты крови с помощью проточной цитометрии.

Протокол 6. Мониторинг иммунного ответа на риккетсиоз морской свинки: лейкоцитарная инфильтрация кожи в месте укуса клеща с помощью проточной цитометрии.

Протокол 7. Мониторинг иммунного ответа на риккетсиозную инфекцию морских свинок: титр антител с помощью ИФА или иммунофлуоресцентного анализа.

Авторы приводят пошаговую инструкцию по кормлению иксодовых клещей на морских свинках для занесения клещевых *Rickettsia* spp. в организм морской

свинки через укус инфицированного клеща и приобретение клещами патогенов от инфицированных животных.

В исследованиях, связанных с передачей патогенов клещами, всегда предпочтительнее выбирать клещей, которые являются естественными переносчиками исследуемого агента (агентов). Даже при изучении новых ассоциаций клещ-риккетсия (например, переносчик инвазивного клеща), необходимо иметь известного природного переносчика для положительного контроля. Источник клещей является критическим вопросом при выборе клещей: т.е. выращенные в лаборатории или пойманные в дикой природе. Они также не являются взаимоисключающими, поскольку колонии клещей, выращенных в лаборатории, требуют периодического добавления клещей из диких популяций для поддержания генетического разнообразия и предотвращения негативных последствий инбридинга, который может повлиять на жизнеспособность и плодовитость клещей уже в четвертом или пятом поколении [462]. *Rickettsia* spp группы пятнистой лихорадки (SFGR) естественным образом передаются позвоночному хозяину со слюной клещей при питании кровью, как и большинство переносимых клещами возбудителей. Слюна клещей служит средой для переноса патогенов и, что важно, также модулирует иммунные реакции хозяина, создавая благоприятную среду для передачи патогенов и развития инфекции. Это явление усиленной передачи патогенов, называемое «передача через слюну», было задокументировано для нескольких переносимых клещами патогенов. Инокуляция бактерий модельным животным не воспроизводит окружающую среду и условия передачи через слюну. Кроме того, способ и путь инокуляции могут влиять на развитие инфекции у позвоночного хозяина наряду с его физиологическими и иммунологическими реакциями. Таким образом, при изучении взаимоотношений патоген-переносчик-хозяин предпочтение отдается естественному клещевому пути заражения. С другой стороны, кормление неинфицированных клещей на животных необходимо для ксенодиагностики скрытых инфекций.

Ряд исследователей использовал в качестве прокормителей клещей определенные породы белых мышей, например С3Н / HeN [476]. Для изучения

векторной клещевой трансмиссии использовалась поддерживаемая в лабораторных условиях линия клещей *Amblyomma maculatum*, полученная из собранных в полевых условиях клещей, естественно инфицированных *R. parkeri*. В микробиоме *A. maculatum* не обнаружено других патогенов кроме *R. parkeri*. Пять-девять нимф *A. maculatum*, зараженных *R. parkeri* на мышь были использованы для изучения передачи инфекции клещами. Такое же количество незараженных нимф *A. maculatum* использовали для прокармливания на контрольных животных.

Еще один вариант ведения лабораторных линий иксодид представлен в публикации Adegoke A. и др. (2022) [228]. Клещей *A. maculatum*, как инфицированных *R. parkeri*, так и свободных от риккетсий содержали в лабораторных условиях, как описано ранее [53, 103, 456]. Колонии были созданы из полевых взрослых клещей, собранных в природе на волокушу. Для получения сытых имаго, голодным самцам и самкам *A. maculatum* позволили кормиться до полного напивания на зараженных овцах. Затем самкам клещей давали возможность откладывать яйца в индивидуальных флаконах с перфорированными крышками, защищенными воздухопроницаемой сетчатой тканью, которые обеспечивают кислородный обмен, предотвращая их бегство. Голодные личинки, вышедшие из яиц, были подсажены для кормления на золотистых сирийских хомячков до полного насыщения, напивавшимся личинкам давали линять в нимф, а затем вновь подсаживали на золотых сирийских хомячков для кормления. Полностью накормленным нимфам впоследствии давали линять во взрослых особей. Наличие или отсутствие *R. parkeri* в каждой стадии развития было подтверждено с использованием нестед ПЦР, кПЦР и иммунофлуоресценции. Кладки яиц от яйцекладущих самок проверяли на наличие *R. parkeri* и инфицированных самок отделяли от неинфицированных [53, 456].

В работе с лабораторными линиями переносчиков используются как естественно инфицированные клещи, так и зараженные в лабораторных условиях. Так, например, Matsumoto K. и др. (2005) [183] использовали клещей группы *Rhipicephalus sanguineus*, которые содержались в лаборатории в течение нескольких поколений для тестирования методов заражения этих клещей *R. conorii*,

возбудителем средиземноморской пятнистой лихорадки. Ими были протестированы три метода: 1) заражение взрослых особей и нимф через искусственно индуцированную бактериемию кролика, 2) капиллярное введение взрослой самке раствора, содержащего  $5 \times 10^3$  и  $5 \times 10^5$  БОЕ/мл *R. conorii* и 3) погружение напивавшихся нимф, которые были «с отсечением одной лапки», «с отсечением двух лапок» или «с отсечением кутикулы» в раствор, содержащий *R. conorii*. Наиболее эффективным способом заражения имаго *R. conorii* было заражение клещей кормлением на кролике с риккетсиемией (71,4%). Наилучшим методом заражения нимф *R. conorii* было погружение напивавшихся нимф с «отсечением одной лапки» в раствор, содержащий *R. conorii* (30%). Интересно, что высокая смертность клещей, зараженных *R. conorii*, наблюдалась независимо от используемого метода, что свидетельствует вредоносном действии *R. conorii* на *Rh. sanguineus*.

Исследование мазков из органов зараженных клещей показало, что риккетсии активно размножаются в эпителиальных клетках кишечника, а затем проникают в полость тела (обнаруживаются клетках гемолимфы и других элементах соединительной ткани), в слюнные железы. Авторы не обнаружили риккетсии в семенниках клещей.

Использование лабораторных линий клещей позволяет решать широкий круг вопросов, связанных с биологией и экологией риккетсий и их переносчиков. Как указывалось ранее, таким образом были изучены жизненные циклы клещей *Ixodes scapularis* Say, *Ixodes pacificus* Cooley & Kohls, *Amblyomma americanum* (L.), *Dermacentor occidentalis* Marx, *Dermacentor variabilis* (Say), *Hemaphysalis leporispalustris* (Packard) и (Latrielle) [462], *Dermacentor everestianus* [275], *Hyalomma rufipes* [455], *Dermacentor silvarum* [95] *Haemaphysalis doenitzi* [276] и др.

Лабораторные линии клещей были использованы для изучения распространения *R. rickettsii* с места укуса клеща и оценки продолжительности «льготного» периода для *R. rickettsii* — времени между прикреплением клеща и передачей инфекционного возбудителя восприимчивому хозяину [291], когда во время эксперимента не только удаляли прикрепившихся клещей, но и иссекали

место прикрепления клеща, взяв биопсию кожи толщиной 2 мм. Это позволило оценить сроки, когда риккетсии из инфицированных клещей способны к диссеминации из места инокуляции. Морские свинки, у которых практически сразу (в течение 30 мин) после прикрепления были удалены и инфицированные клещи, и место присасывания, оставались здоровыми в течение всего периода исследования, у них не было лихорадки, отека мошонки или васкулита. Однако удаление места присасывания через 4 часа или позже после прикрепления клеща, по-видимому, не облегчало какие-либо клинические признаки риккетсиозной инфекции, при этом у большинства животных наблюдалось клиническое заболевание. Также результаты данного исследования показывают, что *R. rickettsii*, обитающие в слюнных железах голодных квестирующих клещей, не обязательно требуют периода реактивации, предшествующего передаче через слюну, и клещи могут передавать инфекционные риккетсии практически сразу после прикрепления к хозяину. Наблюдение за клиническими признаками и выявление ДНК риккетсий у морских свинок, подвергшихся присасыванию клещей менее часа, подтверждает, что жизнеспособные и заразные *R. rickettsii* могут быть заражены инфицированными клещами с самыми первыми порциями клещевой слюны [291].

Количественная оценка уровней вертикальной (трансовариальной и трансстадиальной) передачи инфекционного агента и изучение его влияния на организм переносчика также невозможны без использования лабораторных клещевых линий. Wright CL с соавторами (2015) [186] установил динамику вертикальной передачи *R. parkeri* в колонии *Amblyomma maculatum* Koch, полученной из естественно инфицированных клещей. Трансовариальная и трансстадиальная передача возбудителя наблюдалась в течение трех поколений, при этом эффективность трансовариальной передачи составила в среднем 83,7%, а частота трансстадиальной передачи приближалась к 100%. Векторную компетентность определяли путем сравнения значений воспроизводства колонии *A. maculatum*, инфицированной *R. parkeri*, со значениями колонии, свободной от *R. parkeri*. В колонии *A. maculatum*, инфицированной *R. parkeri*, не было обнаружено негативного влияния на репродуктивную способность клещей-хозяев. Значительно

меньше напитавшихся нимф F1 и личинок F2 из колонии, свободной от *R. parkeri*, преуспели в линьке, что позволяет предположить, что *R. parkeri* может давать данному переносчику некоторое преимущество в выживании. Результаты этого исследования показывают, что *R. parkeri* эффективно поддерживается в популяциях *A. maculatum* за счет трансовариальной и трансстадиальной передачи без какого-либо заметного влияния на размножение или выживаемость клещей.

Векторная трансмиссия *R. parkeri* клещами *A. maculatum* также исследовалась Saito и др. (2019) [476]. С этой целью использовалась поддерживаемая в лабораторных условиях линия, полученная из собранных в полевых условиях клещей, естественно инфицированных *R. parkeri*. В микробиоме *A. maculatum* не обнаружено других патогенов кроме *R. parkeri*. Это исследование показало развитие передачи риккетсий группы КПЛ клещевым переносчиком *A. maculatum*, включая все аспекты естественной инфекции. Бактерии распространяются системно и распространяются на несколько органов через 24 часа после прикрепления клеща, с максимальной бактериальной нагрузкой на 6 день после прикрепления клеща. Важность кормления клещей в усилении инфекции риккетсиальными патогенами также были представлены в других исследованиях, показывая вмешательство *R. parkeri* в экспрессию генов клещей и предполагая потенциальную значимость передачи бактериального источника от клещевого вектора для усиления инфекции [53, 140, 263].

Freitas LH с соавторами (2009) [208] было продемонстрировано, что личинки, нимфы и имаго *H. leporispalustris* способны приобретать и поддерживать инфекцию *R. rickettsii* путем трансстадиальной и трансовариальной передачи в популяции клещей с активной передачей бактерии восприимчивым кроликам на всех паразитарных стадиях. Для установления наличия или отсутствия вредного воздействия *R. rickettsii* на организм клеща-переносчика проведено сравнение активности и репродуктивности инфицированных и неинфицированных линий клещей. Вопреки ожиданиям, все, кроме одной, из четырех экспериментальных групп *R. rickettsii* настоящего исследования показали в целом лучшую биологическую активность, чем их родственные неинфицированные контрольные

клещи. Результаты настоящего исследования показали, что *H. leporispalustris* может поддерживать заражение высоковирулентным штаммом *R. rickettsii* в течение как минимум двух поколений, в которых зараженные линии клещей, как правило, имеют лучшую производительность, чем неинфицированные клещи. Эти результаты подтверждают возможную роль *H. leporispalustris* в энзоотическом поддержании *R. rickettsii* в Латинской Америке.

Векторную компетентность *Amblyomma patinoi* для *R. rickettsii* оценили в лабораторных условиях с использованием клещевых линий, которые прокармливали на морских свинках и кроликах [181]. Это исследование показало, что *A. patinoi*, возможно, не сможет поддерживать инфекцию *R. rickettsii* путем трансвариальной передачи для последовательных поколений клещей без горизонтальной передачи через риккетсемичных хозяев, поскольку менее 50% инфицированных самок передавали *R. rickettsii* трансвариально, и лишь часть потомства была инфицирована. Это условие может привести к низкой частоте инфицирования *R. rickettsii* *A. patinoi* в естественных условиях.

В то же время в ряде публикаций представлены данные о негативном влиянии патогенных риккетсий на клещей. Так, в работе Santos A.S. и др. (2002) [466], посвященной изучению процесса инфицирования *R. conorii* в слюнных железах экспериментально зараженных клещей *Rhipicephalus sanguineus*, указывается, что 75,5% (80 из 106) нимф, инфицированных риккетсиями, погибли во время линьки или вскоре после линьки в имаго; у 50% (12 из 24) оставшихся инфицированных взрослых особей были обнаружены тяжелые пороки развития, ставящие под угрозу их жизнеспособность. У практически здоровых особей время напитывания было больше. Контраст с группами отрицательного контроля был статистически значимым, что позволяет предположить, что *R. conorii* оказывает сильное негативное влияние на клещей-переносчиков. Ультраструктурное исследование показало, что в слюнных железах инфицированных клещей рост риккетсиозов происходит преимущественно в центральных, периферических и интерстициальных ацинозных клетках.

При изучении влияния аутохтонных и неаутохтонных штаммов *R. rickettsii*, на

*Amblyomma sculptum*, который является основным переносчиком бразильской пятнистой лихорадки в Бразилии, Gerardi M и др. (2019) [130] наблюдали, что инфекция *R. rickettsii* вызывает более высокую смертность напивавшихся и нимф и имеет тенденцию снижать репродуктивную способность напивавшихся самок. Эти результаты могут объяснить низкий уровень инфицирования *R. rickettsii* *A. sculptum* в естественных условиях (обычно <1%) и указать на то, что популяция *A. sculptum* вряд ли в состоянии поддерживать инфекцию *R. rickettsii* в течение нескольких лет в последующих поколениях клещей без создания новых когорт инфицированных клещей путем горизонтальной передачи на позвоночных риккетсемичных бразильской пятнистой лихорадки (БПЛ), которая передается в Бразилии преимущественно клещами *A. sculptum* (амплифицирующих хозяевах).

О том, что *R. rickettsii*, возбудитель пятнистой лихорадки Скалистых гор, был смертельным для большинства экспериментально и трансовариально инфицированных лесных клещей Скалистых гор (*Dermacentor andersoni*) сообщали M L Niebylski с соавторами (1999) [312]. В целом, 94,1% нимф, зараженных на стадии личинок при питании на морских свинках с риккетсемией, погибли во время линьки во взрослых особей, а 88,3% взрослых самок клещей, инфицированных на стадии нимф, погибли до кормления. Напротив, только 2,8% неинфицированных личинок не смогли развиться во взрослых особей в течение двух поколений. Зараженные самки клещей, инкубированные при температуре 4°C, имели более низкую смертность (80,9%), чем те, которые содержались при 21°C (96,8%). Риккетсии вертикально передавались 39,0% потомства, и значительно меньшее количество личинок развилось от зараженных клещей. Летальность клещей, инфицированных *R. rickettsii*, может объяснять низкую распространенность зараженных клещей в природе и влиять на энзоотическое поддержание пятнистой лихорадки Скалистых гор.

Необходимость горизонтальной передачи для поддержания в природе популяции *R. rickettsii* экспериментально показана J Moraes-Filho и др. (2018) [395]. В этом исследовании продемонстрировано что горизонтальная передача *R. rickettsii* при совместном кормлении клещей *Amblyomma aureolatum* на иммунных хозяевах

без системной инфекции не возникает, когда неинфицированные личинки кормятся на расстоянии от инфицированных нимф, но в некоторых случаях это происходило, когда неинфицированные личинки кормились бок о бок с зараженными нимфами, предполагая, что они делили одно и то же место кормления.

Лабораторные линии клещей необходимы при изучении взаимоотношений двух разных видов риккетсий в организме переносчика. Так, например, для оценки взаимодействия *R. bellii* и *R. rickettsii* использовалась лабораторная линия *Amblyomma dubitatum*, полученная из напитавшейся самки, естественно инфицированной *R. bellii* [184]. Личинки, нимфы и взрослые особи подвергались воздействию двух штаммов *R. rickettsii*, питаясь на морских свинках, зараженных парентерально, а затем выкармливались на неинфицированных морских свинках. После кормления напитавшиеся личинки и нимфы линяли до нимф и имаго соответственно, которые оказались инфицированными (подтверждая трансстадиальное сохранение) и были способны передавать оба штамма *R. rickettsii* неинфицированным животным, о чем свидетельствуют клинические, серологические, и молекулярные анализы. Однако личиночная, нимфальная и взрослая стадии *A. dubitatum* оказались лишь частично восприимчивыми к инфекции *R. rickettsii*, так как во всех случаях лишь часть клещей заражалась этим возбудителем после контакта с риккетсемичными животными. В то время как трансвариальная передача *R. rickettsii* у напитавшихся самок *A. dubitatum* была неэффективной в настоящем исследовании, 100% этих самок передали *R. bellii* трансвариально. Поскольку сообщалось, что первичная инфекция одним из видов риккетсий предотвращает трансвариальную передачу второго вида риккетсий, вполне вероятно, что неэффективность *A. dubitatum* в отношении сохранения *R. rickettsii* путем трансвариальной передачи была связана с его первичной инфекцией *R. bellii*; однако это также может быть связано с неизвестными факторами, присущими *A. dubitatum* [184].

Исследование, тщательно оценивающее трансвариальное вмешательство между двумя видами риккетсий группы КПЛ, было опубликовано Macaluso et al. (2002) [409], где авторы исследовали способность *D. variabilis* поддерживать более

одного вида эндосимбиотических риккетсий посредством трансовариальной передачи. В их исследовании взрослые клещи из ранее созданных колоний, инфицированных *R. montanensis* и *R. rhipicephali*, подвергались взаимному воздействию *R. rhipicephali* и *R. montanensis* через капиллярное питание. Оценка яиц зараженных клещей показала, что клещи, инфицированные как *R. montanensis*, так и *R. rhipicephali*, были невосприимчивы к их соответствующим контрольным риккетсиям, даже несмотря на то, что только часть отдельных яиц (от 20% до 74%) содержала «предварительно установленные» виды риккетсий. Это привело авторов к выводу, что риккетсиозная инфекция яичников клещей может изменять молекулярную экспрессию ооцитов, исключая вторичную инфекцию другими риккетсиями. Эти предполагаемые изменения в молекулярной экспрессии ооцитов еще предстоит выяснить, и неизвестно, имеют ли место и в какой степени подобные изменения между другими риккетсиями группы КПЛ и другими видами клещей. В целом, способность авирулентных штаммов или симбиотов препятствовать передаче ПЛСГ остается недостаточно изученной проблемой [106, 184].

Необходимо отметить, что приведенные здесь примеры отражают далеко не полный спектр возможностей использования клещей в качестве экспериментальной модели для изучения риккетсий и риккетсиозов.

Таким образом, в последние годы выявлено значительное количество новых видов и кандидатов в новые виды риккетсий, нередко с неустановленной патогенностью для человека. Часть из них не культивируется на традиционных для риккетсиологической практики биологических моделях. Это ставит перед исследователями ряд задач: экспериментальный поиск адекватных моделей для изоляции и культивирования новых риккетсий, определение их роли в инфекционной патологии человека и изучение экологических особенностей.

В отношении бартонелл, поскольку исследования в этом направлении в РФ начаты сравнительно недавно, необходимо, в первую очередь, продолжить изучение видового спектра и роли в инфекционной патологии представителей рода *Bartonella*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ГЛАВА 2. ВЫЯВЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ *R. RAOULTII* – НОВОГО ВИДА РИККЕТСИЙ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ ЛИХОРАДКИ

#### 2.1. Характеристика генотипов *R. raoultii*

В 1999 году Rydkina E. с соавторами обнаружили новые генотипы риккетсий группы КПЛ, обозначение генотипа включает вид клеща, место сбора и номер клеща, в котором выявлен ланный генотип: *Rickettsia* sp. DnS14 (*Dermacentor nuttalli* – Siberia 14), *Rickettsia* sp. DnS28 (*Dermacentor nuttalli* – Siberia 28), *Rickettsia* sp. RpA4 (*Rhipicephalus pumillio* Astrakhan 4). Все три генотипа входят в *R. massiliae* группу, которая включает также *R. aeschlimannii*, *R. montanensis*, *R. rhipicephali*, образуя в ней отдельную ветвь [309]. Основной отличительной особенностью этой группы является устойчивость к рифампицину, связанная с мутацией в гене *rpoB* [165, 246, 414].

Все вышеперечисленные генотипы, учитывая их филогенетическую близость, были отнесены к одному виду *R. raoultii* sp. nov. с типовым штаммом «Хабаровск»<sup>T</sup>. Свое название вид получил в честь руководителя лаборатории риккетсиозов Средиземноморского университета профессора Didier Raoult.

Как известно для того, чтобы избежать избыточное описание, а также использование одного и того же названия для более чем одного вида, были установлены специфические правила официального признания, наименования и классифицирования видов [307]. Для утверждения (ратификации) нового бактериального вида необходимо удовлетворение нескольких предварительных условий:

1. Понятие вида применимо только для бактерий, которые изолированы в чистой культуре.
2. Для большей точности описание вида должно основываться минимум на пяти изолятах бактерий из окружающей среды.
3. Новый вид должен иметь как генетические, так и фенотипические отличительные характеристики.

4. Типовой штамм должен быть установлен для каждого вида и быть доступным для научного сообщества посредством депонирования в двух независимых коллекциях культур, официально признанных World Data Centre for Microorganisms.

5. Новое бактериальное название должно быть представлено в утвержденном перечне бактериальных названий.

Также, вся доступная информация (структура, метаболические и репродуктивные особенности, биология организма) должна быть включена в описание вида, которое должно быть опубликовано предпочтительно в Int. J. Syst. Evol. Microbiol. или в Int. J. Syst. Bacteriol. Некультивируемые риккетсии или риккетсии, штаммы которых еще не выделены и, следовательно, фенотипические характеристики не изучены, следует классифицировать как “*Candidatus Rickettsia* sp.”.

Применительно к риккетсиям предложена таксономическая схема классификации на уровне как рода, так и вида, основанная на секвенировании нескольких генов и ряда фенотипических характеристик. Панбактериальные гены, которые рекомендуется изучать для классификации риккетсий [211], указаны в главе I. Фенотипические критерии, используемые для описания видов *Rickettsia*, включают географическое распространение, переносчиков, патогенность для человека, мышей и морских свинок, оптимальную температуру культивирования, время формирования бляшек, размер бляшек, возможность культивирования в развивающихся куриных эмбрионах и гемолитическую активность. В то же время, иммунофлюоресцентная антителная проба с мышинными сыворотками в острой фазе, разработанная Philip в 1978 году, остается стандартным методом для идентификации новых риккетсий группы КПЛ. В соответствии с этим методом, риккетсиальный изолят рассматривается как новый вид, если он проявляет специфическую разницу в  $\geq 3$  раза со всеми другими видами риккетсий группы КПЛ.

Согласно этим принципам, с целью подтверждения принадлежности к новому виду *R. raoultii* sp. nov. изолятов, генетически идентичных *Rickettsia* sp.

генотипам RpA4, DnS14 и DnS28, штаммы «Хабаровск», «Шайман», «Marne», «Караганда-8/98» и «Еланда-23/95» были изучены в соответствии с таксономической схемой классификации риккетсий на родовом и видовом уровнях [307]. Авторские штаммы «Шайман», «Караганда-8/98» и «Еланда-23/95» были депонированы в Collection de souches de l'unité des Rickettsies (CSUR), WHO-Collaborative Centre for Rickettsioses, Borrelioses and Tick-borne Infections, Marseille, France под номерами CSUR R8, CSUR R10 и CSUR R171, соответственно. и во Всероссийском музее риккетсиальных культур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, сотрудничающим с ВОЗ, под номерами 147, 149, 137 и 135, соответственно.

Изучаемые штаммы были выделены с использованием клещевой экспериментальной модели («Шайман», «Караганда-8/98», «Еланда-23/95») и культур клеток («Хабаровск», «Marne») из иксодовых клещей, собранных на территории России, Казахстана, Франции (Таблица 9).

Таблица 9 – Штаммы риккетсий, выделенные из иксодовых клещей и использованные при описании *R. raoultii*

| Штамм                  | Генотип | Источник выделения    | Территория, год          | Авторы                                     |
|------------------------|---------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------------|
| Хабаровск <sup>Т</sup> | DnS14   | <i>D. silvarum</i>    | Дальний Восток, РФ, 2005 | Медяников О.Ю.                             |
| Шайман                 | DnS14   | <i>D. silvarum</i>    | Восточная Сибирь, 2002   | Самойленко И.Е., Шпынов С.Н.               |
| Marne                  | RpA4    | <i>D. reticulatus</i> | Восточная Франция, 2005  | Mediannikov O., Matsumoto K., Fournier P-E |
| Караганда-8/98         | RpA4    | <i>D. marginatus</i>  | Казахстан, 1998          | Самойленко И.Е., Танкибаев М.А.            |
| Еланда-23/95           | DnS28   | <i>D. nuttalli</i>    | Алтай, 1995              | Самойленко И.Е., Рудаков Н.В.              |

ДНК из этих пяти штаммов была выделена с использованием QIAmp tissue kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией изготовителя. Секвенирование генов 16S rRNA (*rrs*), *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* было выполнено для всех пяти штаммов с использованием ранее описанных праймеров и условий проведения ПЦР [127, 413, 414, 415, 425]. Продукты ПЦР предполагаемых размеров были получены для всех пяти генов. Полученные в результате секвенирования

нуклеотидные последовательности были проверены и откорректированы, длина фрагментов составила 1424, 1134, 590, 4890 и 3028 н.о. для 16S rRNA (*rrs*), *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4*, соответственно. Было показано, нуклеотидные последовательности штаммов «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Шайман» полностью совпадают между собой и идентичны последовательностям генов 16S rRNA и *gltA Rickettsia* sp. генотипа DnS14 [309]. Кроме того, выявлена идентичность нуклеотидных последовательностей изолятов «Marne» и «Караганда-8/98» как между собой, так и с последовательностью генов 16S рПНК и *gltA Rickettsia* sp. генотипа RpA4 [309], депонированными в NCBI GenBank.

Нуклеотидные последовательности штамма «Еланда-23/95» были гомологичны нуклеотидным последовательностям генов 16S rRNA и *gltA Rickettsia* sp. генотипа DnS28 [309]. Для определения филогенетических связей штаммов «Хабаровск»<sup>T</sup>, «Marne» и «Еланда-23/95» со всеми официально зарегистрированными видами *Rickettsia*, для которых доступны нуклеотидные последовательности 16S rRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* генов, были использованы методы neighbor-joining и maximum-parsimony с применением программы MEGA 3.1 [266] и метод maximum-likelihood с использованием программы PHYLIP [190].

Для всех изученных генов при использовании трех аналитических методов *Rickettsia* sp. штаммы «Хабаровск»<sup>T</sup>, «Marne» и «Еланда-23/95» кластеризовались с группой *R. massiliae* с высоким значением bootstrap (Рисунок 2).

Для всех пяти рассматриваемых локусов штаммы «Хабаровск»<sup>T</sup>, «Marne» и «Еланда-23/95» имели высокий уровень подобия 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 16S rRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4* генов). Тем не менее, эти значения были ниже cut-offs, предложенных для определения видов *Rickettsia* [211]. Напротив, уровни подобия выше cut-offs были выявлены между штаммами «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne» (99.9, 99.9, 99.5, 99.6 и 99.5%), «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Еланда-23/95» (99.9, 99.7, 99.5, 99.9 и 99.5%), «Marne» и «Еланда-23/95» (99.9, 99.9, 99.3, 99.5 и 99.2%). Вследствие этого, на основании генетических критериев, изученные штаммы всех трех генотипов отнесены к единому

отдельному виду.

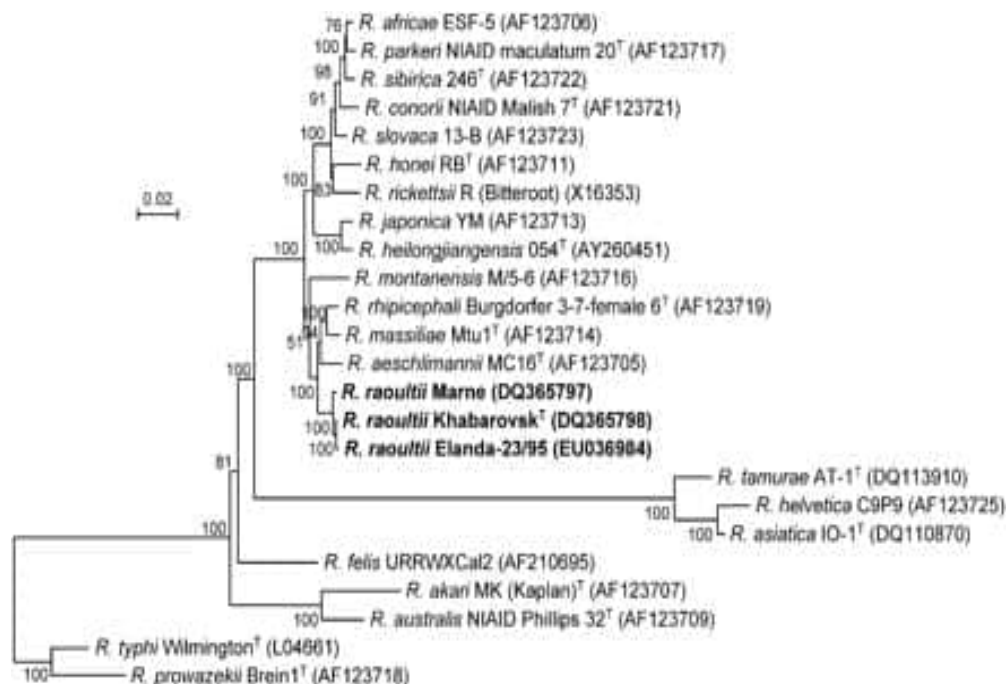


Рисунок 2 – Дендрограмма, показывающая филогенетическую позицию *Rickettsia* sp. штаммы «Хабаровск»<sup>T</sup>, «Marne» и «Еланда-23/95» среди *Rickettsia* species

В дополнение, сравнили *Rickettsia* sp. штаммы «Хабаровск»<sup>T</sup>, «Marne» и «Еланда-23/95» с *R. amblyommii*, также филогенетически принадлежащей к группе *R. massiliae*. Установленная степень подобия нуклеотидных последовательностей *Rickettsia* sp. штаммов «Хабаровск»<sup>T</sup>, «Marne» и «Еланда-23/95» с *R. amblyommii* 99.1, 98.8, 97.3, и 96.3%; 99.3, 98.8, 97.1 и 96.2% и 99.2, 98.6, 97.3 и 96.0% соответственно для 16S rRNA, *gltA*, *ompA* и *ompB* генов, что классифицирует их как разные виды.

Для дальнейших тестов были отобраны штаммы «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne» как представители этого нового вида. Соотношения гуанин/цитозин (Г/Ц) штаммов «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne», подсчитанные при секвенировании *ftsY* гена по описанной ранее методике [175], составили 33,9 и 33,8% соответственно. При амплифицировании и секвенировании 364 н.о. фрагмента *proB* гена штаммов «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne», как описано ранее, в обоих штаммах выявлена мутация, которая вызывает резистентность к рифампицину, установленную у

представителей группы *R. massiliae* [165]. Типирование мышинных сывороток было выполнено с использованием микроиммунофлюоресценции (МИФ) как описано Philip с соавторами (1978) [429]. В качестве антигенов использовали *Rickettsia* sp. штаммы «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne», *R. rhipicephali* Burgdorfer 3-7-female 6<sup>T</sup>, *R. aeschlimannii* MC-16<sup>T</sup>, *R. massiliae* Mtu 1<sup>T</sup> и *R. montanensis* M/5-6, выращенные в культуре клеток L929 как описано ранее [285]. Штаммы «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne» вызывали цитопатический эффект после 5 дней инкубации. Если специфическая разница в титрах антител составляет  $\geq 3$ , предполагается, что изоляты принадлежат к разным серотипам. При использовании сыворотки мышей, иммунизированных штаммом «Хабаровск»<sup>T</sup>, титр антител в МИФ составил 1:512 к гомологичному антигену и к штамму «Marne», и 1:256 к другим четырем тестируемым антигенам. Сыворотки мышей, иммунизированных штаммом «Marne», реагировали в титре 1:512 с гомологичным антигеном и со штаммом «Хабаровск»<sup>T</sup>, и в титре 1:128 с другими тестируемыми антигенами. Сыворотки мышей, иммунизированных штаммом *R. massiliae* Mtu 1<sup>T</sup>, продуцировали антитела в титре 1:1024 к гомологичному антигену и в титре 1:256 к штаммам «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne». Сыворотки мышей, иммунизированных штаммом *R. aeschlimannii* MC-16<sup>T</sup>, продуцировали антитела в титре 1:1024 к гомологичному антигену и в титре 1:256 к штаммам «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne». Сыворотки мышей, иммунизированных штаммом *R. rhipicephali* Burgdorfer 3-7-female 6<sup>T</sup>, продуцировали антитела в титре 1:1024 к гомологичному антигену и в титре 1:256 к штаммам «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne». Сыворотки мышей, иммунизированных штаммом *R. montanensis* M/5-6, реагировали в титре 1:256 с гомологичным антигеном и в титре 1:32 с штаммами «Хабаровск»<sup>T</sup> и «Marne». На основании полученных результатов, специфическая разница в титрах антител составила 1, 4, 4, 3 и 4, соответственно между штаммом «Хабаровск»<sup>T</sup> 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»<sup>T</sup> и «Marne» подтверждают их

классификацию в пределах отдельного вида.

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

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

Способность к культивированию является одним из необходимых условий для исследования микроорганизмов. Это культивирование в различных неклеточных средах, в органах, тканях и клеточных культурах или в различных видах лабораторных животных. Все эти субстраты имеют свои преимущества и недостатки, с учетом их чувствительности к тестируемым микроорганизмам и стоимости, связанной с их использованием, в частности стоимость содержания лабораторных животных.

На протяжении многих лет отечественные риккетсиологи для дифференциации риккетсий пользовались схемой, предложенной П.Ф.Здродовским и Е.М.Голиневич (1972) [20]:

1. Изучение морфологических особенностей.
2. Изучение особенностей размножения риккетсий в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов.
3. Воспроизведение экспериментальной инфекции с использованием подопытных животных в качестве биологической модели.
4. Исследование иммунологических характеристик в экспериментах по изучению перекрёстного иммунитета.
5. Анализ антигенной структуры выделенных штаммов.

Авторы отмечают (“Учение о риккетсиях и риккетсиозах”, М., 1972, стр.168) [20]: “Исследования по указанной выше схеме должны считаться безусловно обязательными при характеристике новых видов риккетсий и штаммов риккетсий

предусматриваемой видовой принадлежности, но впервые выделенных в данной местности.”

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 (морские свинки, куриные эмбрионы, культуры клеток), так и редко используемая модель (экспериментальная клещевая модель).

Заражение самцов 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 на всех стадиях метаморфоза. Для приготовления суспензий использовали по 200 экземпляров личинок, инфицированных штаммами «Караганда-8/98» и «Караганда-1/98», по 50 экземпляров нимф, инфицированных штаммами «Караганда-8/98» и «Караганда-1/98», а также по 10 экземпляров имаго, инфицированных штаммами «Караганда-8/9», «Караганда-7/98», «Караганда-1/98», «Караганда-3/98» и «Еланда-23/95». Имаго были индивидуально исследованы в РНИФ после гемоцитового теста. Концентрация риккетсий варьировала от единичных экземпляров в нескольких полях зрения до 15-20 в поле зрения. Термометрирование и наблюдение за зараженными животными проводили на протяжении 14-15 дней. Клиническая картина КСТ (повышение температуры и скротальный феномен) у инфицированных морских свинок не наблюдалась. В сыворотках крови зараженных животных в РСК перекрестного реагирования с антигеном *R. sibirica* не выявлено.

Также для внутрибрюшинного введения самцам морских свинок использовали лиофильно высушенные штаммы «Караганда-8/9», «Еланда-23/95» и «Шайман», концентрация риккетсий составила  $3 \times 10^9$  микробных тел/мл. Термометрирование и наблюдение за зараженными животными проводили на протяжении 27 дней. Подъем температуры на  $1,2 - 1,7^{\circ}\text{C}$  наблюдался с 9 – 12 дня

после заражения и длительностью 4 – 7 дней. Скротальный феномен либо не наблюдался, либо был очень слабо выражен.

Для заражения морских свинок путем кормления на них клещей, естественно инфицированных *R. raoultii*, использовали имаго лабораторных линий клещей *D. marginatus*, инфицированных штаммами «Караганда-8/98» и «Караганда-5/98», а также линию клещей *D. reticulatus*, инфицированных штаммом «Доберман» (все штаммы относятся к генотипу RpA4). Термометрирование и наблюдение за животными, на которых прокармливали имаго (самка и самец), естественно инфицированных штаммами «Караганда-8/98» и «Караганда-5/98», проводили на протяжении 21 дня. Клиническая картина КСТ (повышение температуры и скротальный феномен) у инфицированных морских свинок не наблюдалось. С целью исследования вирулентности для морских свинок штамма «Доберман» на двух свинках были прокармлиены по две пары имаго (самка и самец) лабораторной линии *D. reticulatus*, инфицированных данным штаммом. Перед подсадкой наличие риккетсий в клещах определяли гемоцитовым тестом. Мазки из гемолимфы исследовали методом световой микроскопии с окраской по Здродовскому. Концентрация риккетсий в среднем составляла 10-15 микробных тел в поле зрения. Поскольку ранее было показано повышение чувствительности к риккетсиозным инфекциям под воздействием гидрокортизона у различных лабораторных животных, в том числе и у морских свинок [28], нами на 4-й день после подсадки инфицированных клещей был внутримышечно введен морским свинкам гидрокортизон по 0,5 мл препарата (25 мг/мл). Максимальная температура у биопробных животных за период наблюдения не превышала 39,4<sup>0</sup> С, скротальный феномен не наблюдался. Одна из морских свинок была вскрыта на 9-й день после подсадки инфицированных клещей, вторая – на 15-й день. У морской свинки, вскрытой после 8 дней прокармливания содержащих *R. raoultii* переносчиков, не наблюдалось характерной патологоанатомической картины клещевого риккетсиоза, за исключением незначительного увеличения размеров и усиления сосудистого рисунка тестикул. У второй свинки на фоне применения гидрокортизона отмечалась умеренно выраженная патологоанатомическая картина клещевого

риккетсиоза.

Одной из важных фенотипических характеристик штаммов риккетсий является способность к культивированию в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионах. Нами было проведено изучение возможности применения развивающихся куриных эмбрионов для первичной изоляции *R. raoultii* из переносчиков. Куриные эмбрионы заражали 15%-ми суспензиями из имаго клещей лабораторных линий *D. marginatus*, инфицированных штаммом «Караганда-5/98» (генотип RpA4), *D. nuttalli*, инфицированных штаммом «Еланда-23/95» (генотип DnS28), и *D. silvarum*, инфицированных штаммом «Шайман» (генотип DnS14). Клещей объединяли в партии по 10 экземпляров и отмывали от поверхностного загрязнения по общепринятой методике. Изолировать риккетсии из клещей с использованием куриных эмбрионов нам не удалось – все образцы были контаминированы посторонней бактериальной микрофлорой, при очень низкой концентрации риккетсий – единичные риккетсии в препарате.

При заражении куриных эмбрионов суспензиями из лиофильно высушенных вышеперечисленных штаммов нами на протяжении 3-х пассажей в РНИФ отмечалось незначительное накопление риккетсий: от единичных в препарате до 10 экземпляров в поле зрения, причем к третьему пассажу наблюдалось снижение количества риккетсий в поле зрения. Столь низкая концентрация риккетсий не позволяет отнести развивающиеся куриные эмбрионы к адекватным моделям для культивирования *R. raoultii*.

В последние десятилетия был открыт целый ряд новых риккетсий, непатогенных для морских свинок и плохо культивируемых в развивающихся куриных эмбрионах, что привело к появлению новых подходов к изоляции и изучению этих микроорганизмов.

В настоящее время в риккетсиологической практике широко применяется выращивание возбудителей различных инфекций в культуре клеток. Для культивирования риккетсий применяют как перевиваемые культуры клеток, так и первично трипсинизированные. К наиболее часто используемым для изоляции и культивирования риккетсий относятся перевиваемые культуры клеток Vero, HeLa,

Нер-2, L929. Нами была изучена возможность культивирования *R. raoultii* в культурах клеток Vero и Нер-2. В качестве заражающего материала использовали суспензии из лиофильно высушенных штаммов «Еланда-23/95», «Караганда-5/98», «Шайман», «Бурятия-5/2000», «Доберман». По данным однофакторного дисперсионного анализа статистически значимых различий в уровне накопления риккетсий в этих культурах клеток 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.

В прошлом столетии как российские, так и зарубежные исследователи начали использовать клещей в качестве лабораторных моделей для некоторых микробиологических исследований. Этот метод успешно применяется с 1948 года, когда Weyer удалось культивировать *Coxiella burnetii* в гемолимфе аргасовых клещей *Ornithodoros m. moubata* (Murray). Было проведено изучение взаимодействия гемоцитов и бруцелл (*Brucella mellitensis* и *B. abortus*) в аргасовых клещах [31]. Было изучено развитие *Rickettsia prowazekii* в различных видах иксодовых клещей [14, 104, 107]. Было изучено распространение *R. sibirica* в органах *O. lahorensis* и *Alveonatus canestrini* [30, 32]. Культивирование симбионтов из *Dermacentor andersoni* Stiles в том же виде хозяев было выполнено Burgdorfer et al. (1973) [105]. Двойное заражение апатогенным и патогенным (подкожное инфицирование мышей) вирусом клещевого энцефалита в клещах *Ixodes ricinus* (L.) было выполнено Weismann с соавторами (1990) [480].

Нами с использованием экспериментальной клещевой модели была показана возможность культивирования *R. raoultii* в лабораторных линиях клещей, установлена эффективность вертикальной передачи (ТОП и ТФП) этой риккетсии, а также изучена концентрация риккетсий в личинках и нимфах иксодид. 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 *R. raoultii* 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, в двух последних патентах, помимо характеристики генетических и фенотипических свойств штаммов, отмечена возможность использования данных штаммов в качестве средства для получения диагностических препаратов). 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.

### **2.3. 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. В связи с высокой адаптацией большинства видов риккетсий к членистоногим, последних рассматривают не только в качестве вектора, но и в качестве основного резервуара клещевых риккетсий. По мнению В.Н. Беклемишева (1961 г.) [5] 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 3-6.



Рисунок 3 – Белая мышь, подготовленная для кормления имаго клещей



Рисунок 4 – Личинки клещей рода *Dermacentor* в контейнере



Рисунок 5 – Подсадка преимагинальных стадий клещей на сосунка белой мыши для кормления



Рисунок 6 – 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 10), родительские особи которых, собранные в республике Алтай, Омской области, республике Бурятия и республике Казахстан, были инфицированы в природе *R. raoultii* (генотипы RpA4, DnS14, DnS28).

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.

Уровень вертикальной передачи генотипа RpA4 исследовали в четырех линиях *D. marginatus* из республики Казахстан и в одной линии *D. reticulatus* из Омской области, DnS28 – в линиях *D. nuttalli* из республики Алтай и *D. silvarum* из республики Бурятия, DnS14 – в линии *D. silvarum* из республики Бурятия. Установлен 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*. Также нами при исследовании мазков из индивидуальных экземпляров преимагинальных форм с помощью люминесцентной микроскопии выявлено различие количественного содержания риккетсий в клещах до и после кормления иксодид на лабораторных животных (Таблица 10).

Таблица 10 – 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                                         |

Статистическая достоверность полученных результатов установлена на основании результатов однофакторного дисперсионного анализа ( $P < 0,001$ ). Устойчивость адаптации *R. raoultii* к исследуемым видам клещей подтверждается интенсивностью размножения риккетсий после кормления преимагинальных фаз переносчиков.

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*)

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

Началом изучения межвидового взаимодействия риккетсий можно считать анализ феномена долины Буттеррут (Западная Монтана), который заключался в том, что заболеваемость лихорадкой Скалистых Гор фиксируется только на западной стороне долины и отсутствует на восточной стороне. Проведенные исследования показали, что инфицированность клещей *D. andersonii* на восточной стороне долины Буттеррут эндосимбионтом *R. peacockii* ("east-side agent") препятствует заражению этих переносчиков патогенной *R. rickettsii*. Оба вида риккетсий являются представителями группы КПЛ. Подобные конкурентные отношения приводят к крайне редкой встречаемости *R. rickettsii* в восточной части долины [106] и являются иллюстрацией воздействия интерференции двух видов на лоймопотенциал природного очага. В дальнейшем в эксперименте было продемонстрировано существование конкурентных взаимоотношений между *R. montanensis* и *R. rhipicephali* с одной стороны и *R. rickettsii* – с другой [цит. по: 273]. Также, как и в предыдущем случае, инфицированность клещей риккетсиями непатогенных видов препятствовала их дополнительному заражению *R. rickettsii*.

Возможно, что феномен межвидовой интерференции, влияющий на эпидемическую ситуацию, встречается достаточно часто, в том числе на территории РФ. Значительный интерес, на наш взгляд, представляет характер взаимоотношений *R. raoultii* и *R. sibirica* - наиболее распространенных представителей группы КПЛ в нашей стране. Основными переносчиками этих видов являются иксодовые клещи рода *Dermacentor*. Изучение особенностей взаимосвязи этих риккетсий проводили с применением КЭМ, в качестве вектора использовали клещей *D. marginatus* из лабораторной линии, родительские особи которой были собраны в Республике Казахстан и естественно инфицированы *R. raoultii* в природе. В качестве второго вида риккетсий в эксперименте использовали штамм *R. sibirica* «Баево-107/87», на который получен патент № 2723410 от 11.06.20 г. (в патенте дана характеристика биологических свойств штамма, а также указана возможность его использования как средства для получения диагностических препаратов). После суперинфицирования высоковирулентным штаммом *R. sibirica* 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 одна из опытных линий, в которой *R. raoultii* был инфицирован только самец, а самка оказалась свободной от риккетсий, содержала *R. sibirica*. Культивировавшиеся во всех остальных линиях риккетсии 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* [242] с отрицательным результатом.

В полученном от всех пар клещей потомстве была изучена по описанному выше алгоритму эффективность вертикальной передачи, а также исследована вирулентность для морских свинок имаго следующего поколения. Обе лабораторные линии, полученные от контрольных пар клещей, были авирулентны для морских свинок. Из четырех линий, полученных от опытных пар клещей, две были авирулентны, одна – слабовирулентна (незначительный подъем температуры - менее 1<sup>0</sup> С и сомнительная скротальная реакция) и одна – вирулентна для морских свинок (подъем температуры на 1,6<sup>0</sup> С, скротальная реакция +++, при вскрытии наблюдалась патологоанатомическая картина, типичная для клещевого риккетсиоза, вызываемого *R. sibirica*, при исследовании в РНИФ мазков-отпечатков риккетсии обнаружены в соскобе с брюшины, яичках, селезенке, мозге, с максимальной концентрацией возбудителя в яичках). Количество жизнеспособных личинок в контрольной группе у спонтанно инфицированных *R. raoultii* клещей составило 2400 и 3300 экземпляров, уровень трансвариальной и трансфазовой передачи риккетсий был близок к 100%. В опытной группе оба этих показателя: и количество жизнеспособных личинок и уровень трансвариальной и трансфазовой передачи риккетсий варьировали - 2100 и 3700 экземпляров в авирулентных линиях, 800 – в слабовирулентной и 500 – в вирулентной. После

интрацеломального заражения высоковирулентным штаммом *R. sibirica* уровень трансвариальной и трансфазовой передачи риккетсий колебался у разных линий: самый низкий (ТОП -  $71,0 \pm 4,5\%$ , ТФП –  $80,0 \pm 8,9\%$ ) отмечался в вирулентной линии, в остальных – 90% и выше.

Полученные нами в результате эксперимента сведения позволяют констатировать возможность конкурентных отношений между различными видами риккетсий группы КПЛ на территории РФ. Известно, что авирулентная для морских свинок *R. raoultii* значительно чаще выявляется на территории России, чем *R. sibirica*. По нашим предположениям широкое распространение *R. raoultii* может ограничивать в природных очагах циркуляцию вирулентной *R. sibirica*.

В результате проведенной работы можно сделать вывод, что применение клеточных культур и клещевой экспериментальной модели является оптимальным инструментом для изоляции, культивирования и изучения биологических характеристик *Rickettsia raoultii*.

Полученные нами данные позволяют также утверждать о хорошей адаптации *R. raoultii* ко всем четырем выбранным для исследования видам клещей рода *Dermacentor*: *D. nuttalli*, *D. silvarum*, *D. marginatus* и *D. reticulatus*. Экспериментально установлена на примере *R. raoultii* и *R. sibirica* возможность конкурентных отношений между различными видами риккетсий группы КПЛ. Можно утверждать, что иксодовые клещи являются не только вектором, но и основным резервуаром *R. raoultii*, а 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.

### ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *CANDIDATUS* *R. TARASEVICHIAE* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МЕТОДОВ

В 2003 году при исследовании молекулярно-биологическими методами 209 экземпляров клещей *I. persulcatus*, собранных в различных регионах России, включающих южный Урал, Западную и Восточную Сибирь, был выявлен новый генотип риккетсий, названный *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* в честь российского риккетсиолога академика И.В. Тарасевич [108]. В составе рода *Rickettsia* ранее выделяли 2 группы; клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и сыпного тифа (СТ). Stochard и Fuerst [339] на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA предложили выделить предковую (ancestral) группу, предшествующую разделению риккетсий на группы КПЛ и СТ. В настоящее время предковая группа риккетсий включает в себя *R. canadensis*, *R. bellii* [288, 184], *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* и *R. montei* [393].

***Особенности культивирования штаммов Candidatus R. tarasevichiae с использованием биологических моделей (культуры клеток, морские свинки, экспериментальная клещевая модель, развивающиеся куриные эмбрионы и белые мыши)***

При анализе полученных нуклеотидных последовательностей гена 16 S рибосомальной РНК (1322 п. о.) и гена цитратсинтазы (*gltA*) (1196 п. о.) *Candidatus R. tarasevichiae* показано, что этот генотип не принадлежит ни одному из валидированных видов [211] и является представителем предковой группы. *R. canadensis* является наиболее филогенетически близким к *Candidatus R. tarasevichiae* видом (96% гомологии по гену *gltA* и 98% гомологии по гену 16S рибосомальной РНК). По результатам филогенетического анализа генов 16S рибосомальной РНК и *gltA* известных видов риккетсий установлено, что *Candidatus R. tarasevichiae* вместе с *R. canadensis* формируют отдельную ветвь в пределах рода *Rickettsia* [108].

При описании *Candidatus R. tarasevichiae* первоначально не были определены нуклеотидные последовательности гена *ompA* [108]. Однако, позднее наличие этого гена у *Candidatus R. tarasevichiae* было доказано, в том числе и нашими данными [11, 21, 233]. В настоящее время в базе данных NCBI GenBank депонированы несколько десятков нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *ompA* *Candidatus R. tarasevichiae* [108].

Роль *R. canadensis* в инфекционной патологии подтверждает выявление антител к этой риккетсии у четырех пациентов с клиникой пятнистой лихорадки Скалистых гор в США: в Техасе и Северной Каролине [427]. *R. canadensis* также считают причиной случаев острого церебрального васкулита в Северной Америке [50, 243]. Учитывая близкое родство этих двух представителей предковой группы риккетсий, можно предположить, что *Candidatus R. tarasevichiae* может оказаться патогеном и быть ответственным за случаи инфекций с клинической картиной, не типичной для известных клещевых инфекций, которые регистрируют в ареале клещей *I. persulcatus*. Антитела к *Candidatus R. tarasevichiae* были выявлены на территориях как эндемичных по СКТ (Алтайский край: в 10,8% случаев - IgM, в 4,6% - IgG), так и неэндемичных (Омская область: в 8,4% случаев – IgM). О вероятной роли *Candidatus R. tarasevichiae* в развитии инфекции также свидетельствуют данные китайских исследователей, (подробнее в гл. 1.1.), выявивших ДНК этой риккетсии у больных, в том числе в случаях с летальным исходом [109, 233].

Первые штаммы *Candidatus R. tarasevichiae* были выделены с применением технологии shell vial в культуре клеток Vero. Изучены особенности их культивирования с использованием данной биологической модели. Материалом для изоляции служили клещи *I. persulcatus* из Омской области (58 экземпляров), Новосибирской области (40 экземпляров) и Красноярского края (11 экземпляров).

Для определения присутствия риккетсий в полученных культурах использовали РНИФ с применением иммуноглобулинов диагностических для выявления риккетсий группы КПЛ, люминесцирующих сухих (НПО «Биомед», Россия). Реакцию выполняли в соответствии с описанием методики,

представленной в инструкции производителя. С учетом предложений, изложенных П.Ф. Здродовским и Е.М. Голиневич (1972) [20], выполняли изучение структурных характеристик выделенных бактерий и их способность вступать в реакцию с красителями.

Для определения видовой принадлежности использовали однораундовую ПЦР с праймерами, амплифицирующими фрагменты генов цитратсинтазы (*gltA*), 16S рибосомальной РНК и поверхностного мембранного белка 190 кДа (*omp A*). Полученные положительные образцы ДНК секвенировали [108]. Нуклеотидные последовательности фрагментов гена цитратсинтазы изучаемых изолятов имели 100% гомологии с размещенными в NCBI GenBank последовательностями *Candidatus R. tarasevichiae*. 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 «Штамм риккетсий генотипа "*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*" – кандидат в новый вид, используемый для идентификации риккетсий и получения диагностических препаратов» № 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 фенотипических свойств *Candidatus R. tarasevichiae* в настоящее время находится на начальном этапе. Появившиеся в последние годы с началом широкого внедрения молекулярно-биологических методов кандидаты в новые виды риккетсий в большинстве своем отличаются от ранее валидированных патогенных видов по культуральным свойствам. Невозможность использования традиционных риккетсиологических моделей для культивирования ряда новых представителей рода *Rickettsia* диктует неизбежность поиска адекватных моделей для их изоляции и культивирования. Надлежит также опытным путем отработать условия культивирования и накопления биомассы возбудителя.

Изучение патогенности *Candidatus R. tarasevichiae* для морских свинок и особенностей инфекционного процесса, вызываемого этой риккетсией, проводили с использованием лиофильно высушенных штаммов в различной концентрации. При заражающей дозе - одна ампула на одну морскую свинку использовали штаммы «Усть-Тарка – 10/2003», «Усть-Тарка – 34/2003» и «Подгородка-27/2003»; две ампулы на одно животное – штамм «Подгородка-27/2003»; три ампулы на одно животное – штамм «Подгородка-22/2003». В каждом опыте были задействованы по 3 самца морских свинок, материал для заражения вводили внутривентрально в объеме 2 мл. При использовании минимальной дозы – по 1 ампуле на животное, двум из трех свинок в каждой партии вводили по 20 мг гидрокортизона внутримышечно за день до заражения и на 5-й день после заражения. При дозе заражения по 1 ампуле на 1 животное без гидрокортизона лихорадка и скротальный феномен не наблюдались. На фоне введения гидрокортизона незначительное (на 0,6° С) повышение температуры через 8 дней после заражения отмечено у одного животного, у части самцов морских свинок наблюдался слабо выраженный орхит. При аутопсии у зараженных животных обнаружены умеренно или слабо выраженные изменения в некоторых внутренних органах (яичках, селезенке, печени) и регионарных (паховых) лимфатических узлах: незначительное увеличение размеров, увеличение наполненности кровью и усиление сосудистого рисунка. Отмечалась также грануляция селезенки. У всех животных наблюдались выраженное полнокровие и выраженное усиление сосудистого рисунка мозга и мозговых оболочек. Методом световой микроскопии в мазках-отпечатках исследуемых органов установлено наличие риккетсий, при введении гидрокортизона – в мозге фиксировалось 10-15 микробных тел в поле зрения и отдельные скопления риккетсий, в остальных органах - единичные риккетсии в поле зрения. У животных, зараженных без гидрокортизона, отмечалось большее количество возбудителя: в мозге - до 75 и более микробных тел в поле зрения, в остальных органах - от 10 до 25 риккетсий в поле зрения.

Удвоение и утроение инфицирующей дозы привело к присоединению полнокровия и очаговых изменений в легких в дополнение к ранее упомянутым

патологоанатомическим изменениям. Методом световой микроскопии количество риккетсий при этом определялось в мозге – до 75 микробных тел в поле зрения, в остальных исследованных препаратах - от единичных до 15 риккетсий в поле зрения.

Учитывая тропизм *Candidatus R. tarasevichiae* к сосудам головного мозга нами проверена допустимость применения для изоляции этой риккетсии сосунков беспородных белых мышей. Суспензия для инокуляции была приготовлена из 15 экземпляров имаго *I. persulcatus* различной степени накормленности из лабораторной линии, родительские особи которой были естественно инфицированы *Candidatus R. tarasevichiae* в природе. В опыте было использовано 32 сосунка беспородных белых мышей весом 3-4 грамма, 17 из которых были инфицированы интрацеребрально, 15 – подкожно. Анатомирование подопытных животных проводили на 3-й, 4-й, 7-й и 10-й день после инфицирования. Патологоанатомические изменения отмечались с четвертого по десятый день после заражения, максимальные изменения – на седьмой день, когда были зафиксированы значительное увеличение размеров селезенки и выраженное усиление сосудистого рисунка мозга. Наличие ДНК риккетсий в мозге и селезенках при использовании ПЦР РТ выявлено на четвертый и седьмой день инфицирования на 30-34 циклах. Подготовленными из органов мышей суспензиями (одна из селезенки и две из мозга) были заражены РКЭ. Пассаж в РКЭ не был успешным, поскольку все исследуемые образцы были контаминированы посторонними микроорганизмами.

Поскольку иксодовые клещи являются естественной средой обитания риккетсий, экспериментальное изучение взаимоотношений риккетсий и переносчиков имеет существенное значение для понимания закономерностей существования популяции возбудителя в природном очаге. В.В. Якименко были любезно предоставлены имаго первого поколения двух лабораторных линий клещей *I. persulcatus*, родительские особи которых были естественно инфицированы *Candidatus R. tarasevichiae* в природе. При исследовании личинок этих линий (F1 – первое поколение) в двухраундовой ПЦР с видоспецифическими

праймерами установлена 100% трансовариальная передача. Нами проведено изучение трансовариальной передачи данной риккетсии во втором поколении клещей в однораундовой ПЦР с применением праймеров RP877p и RP1258n, амплифицирующих фрагменты гена цитратсинтазы (*gltA*). В исследование были включены 50 пулов по 20 личинок каждый из потомства двух самок первого поколения. Уровень трансовариальной передачи во втором поколении самки №1 составил  $100 \pm 0,0\%$ , самки №2 -  $66 \pm 6,8\%$  (33 положительные пробы из 50). Результаты секвенирования свидетельствовали о присутствии в исследуемых пробах ДНК *Candidatus R. tarasevichiae*.

В РНИФ выявлена способность *Candidatus R. tarasevichiae* взаимодействовать с антителами к *R. sibirica* (группа КПЛ) и *R. prowazekii* (группа СТ). Такое же свойство зафиксировано у *R. bellii*, которая также относится к предковой группе. Возможно перекрестное реагирование с антителами к риккетсиям групп КПЛ и СТ является универсальным атрибутом всех риккетсий предковой группы. Нами этот феномен выявлен в 30 исследованных пробах ( $60,0 \pm 7,0\%$ ), личинок, полученных от самки №1, в 26 пробах ( $52,0 \pm 7,1\%$ ) личинок, полученных от самки №2.

Таким образом, оптимальные условия для изоляции и культивирования *Candidatus R. tarasevichiae* наиболее полноценно обеспечивает использование клеточных культур и КЭМ. Самцы морских свинок, инфицированные этой риккетсией, демонстрируют минимальное проявление скротального феномена, но эту модель не следует полностью исключать из исследований. Целесообразно провести дополнительные эксперименты с иммуносупрессивными препаратами, такими как кортикостероиды, для оптимизации условий культивирования. Мы полагаем, что использование беспородных белых мышей в качестве модельных организмов для выделения штаммов *Candidatus R. tarasevichiae* не соответствует оптимальным стандартам. В настоящее время у нас недостаточно данных, чтобы сделать однозначный вывод относительно обоснованности использования куриных эмбрионов для культивирования указанной риккетсии.

## ГЛАВА 4. РОЛЬ НОВЫХ ВИДОВ РИККЕТСИЙ В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

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

В настоящее время Федеральная служба государственной статистики (Росстат) в рамках форм статистической отчетности №1 и №2, предназначенной для предоставления данных об инфекционных и паразитарных заболеваниях, осуществляет сбор информации по инфекциям, классифицируемым в соответствии с Международной классификацией болезней десятого пересмотра (МКБ-10) в группу риккетсиозов (A75-A79). В данную группу включены следующие нозологические формы: эпидемический сыпной тиф (A75.0); болезнь Брилля (A75.1); лихорадка Ку (A78); астраханская пятнистая лихорадка (A77.1); сибирский клещевой тиф (A77.2).

Ранее полагалось, что в России существует только один риккетсиальный патоген, вызывающий заболевание у человека, — *Rickettsia sibirica*, который является возбудителем «сибирского клещевого тифа». Однако в настоящее время идентифицировано еще шесть видов риккетсий, патогенных для человека и ассоциированных с иксодовыми клещами, что приводит к пересмотру существующих представлений о клещевых риккетсиозах на территории Российской Федерации [28].

Связь *Rickettsia* sp. генотипов RpA 4, DnS14 и DnS28 с синдромом TIBOLA / DEBONEL отмечалась еще до описания нового вида *R. raoultii* [343]. Несмотря на более широкое распространение *R. raoultii* в сравнении с *R. slovaca* в клещах рода *Dermacentor* (73% и 27%, соответственно), *R. slovaca* значительно чаще является причиной синдрома TIBOLA / DEBONEL (87,5% и 12,5% соответственно) [343, 179, 284, 459, 400]. Это позволяет предположить, что *R. raoultii* менее патогенна для человека.

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 [28].

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±1,9 %) из Усть-Тарского района Новосибирской области и в 9 сыворотках из 21 (42,8±10,8%) из Алтайского края.

Поскольку клинические симптомы инфекции, вызываемой *R. raoultii*, выражены существенно слабее, чем при СКТ, они часто проходят мимо внимания практических врачей в нашей стране, в том числе и синдром TIBOLA. До сих пор в историях болезни можно встретить определение «реакция на укус клеща», наша практика показывает, что часть этих проблем со здоровьем ассоциирована с риккетсиями.

С учетом патогенеза риккетсиозов группы КПЛ схематично можно выделить следующие фазы развития их инфекционного процесса: первичный аффект («реакция на укус клеща») → лимфангоит и лимфаденит (TIBOLA/ DEBONEL) → лихорадка с сыпью (клещевой риккетсиоз). Инфекционный процесс может остановиться на любой из этих стадий в зависимости от патогенности (вида)

риккетсий и иммунного статуса макроорганизма.

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

Сибирский клещевой тиф, вызываемый *R. sibirica*, крайне редко заканчивается летально. Однако, в мае 2017 года в Красноярском крае зарегистрировано заболевание клещевым риккетсиозом со смертельным исходом. Заболевшая девочка четырех лет постоянно проживала в сельской местности, в Курагинском районе Красноярского края. Присасывание клеща произошло 08.05.2017 в Идринском районе. Локализация присасывания – волосистая часть головы (за ушной раковиной слева). Клещ удален родителями самостоятельно. В 2016 и 2017 гг. ребенок был привит против клещевого вирусного энцефалита (незаконченный курс вакцинации).

11.05.2017 у ребенка появились жалобы на внезапную выраженную астению и цефалгию. При физикальном обследовании было установлено повышение температуры тела до 39,5°C и появление экзантемы розеолезного характера на верхних конечностях. 12 мая 2017 года экзантема распространилась по всей поверхности тела. После обращения к педиатру пациентка была госпитализирована в инфекционное отделение участковой больницы с предварительным диагнозом «клещевой сыпной тиф». Состояние больной при поступлении в стационар средней тяжести, сыпь приобрела розеолезно-папулезный характер, заднешейные лимфатические узлы увеличены до 0,5 см, болезненны, температура тела 38,6° С. Сердце, легкие и органы брюшной полости без особенностей. При исследовании сыворотки крови методом ИФА иммуноглобулины класса М и класса G к вирусу клещевого энцефалита и возбудителю клещевого боррелиоза не выявлены. В ПЦР с использованием набора реагентов для амплификации ДНК *Rickettsia* spp. Gen PAK DNA PCR обнаружена ДНК риккетсий. У ребенка выявлена лейкопения и лимфопения. В качестве этиотропной терапии пациентке был назначен цефотаксим в дозе 650 мг два раза в день. На четвертый день нахождения в лечебном учреждении кратковременное и незначительное улучшение состояния ребенка

сменилось ухудшением: появились судороги и брадикардия. После коррекции этиотропной терапии – замены цефотаксима тетрациклином -  $3 \times 0,05$  г и бензилпенициллином -  $4 \times 500$  т состояние девочки временно стабилизировалось, но ночью изменилось на крайне тяжелое вследствие инфекционно-токсического шока. Ребенок был переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии. В связи с неадекватностью спонтанного дыхания больная была переведена на АИВЛ. Через час у ребенка произошла остановка сердечной деятельности. Реанимационные мероприятия в полном объеме в течение 30 минут оказались безуспешны. Посмертный диагноз: инфекционно-токсический шок. Геморрагический васкулит? Судорожный синдром. Острая надпочечная недостаточность. Результаты патолого-анатомического вскрытия и гистологического исследования подтвердили основной клинический диагноз: клещевой риккетсиоз (гепатоспленомегалия, продуктивный васкулит головного мозга, спинного мозга и кожи, полиморфно-клеточные периваскулярные инфильтраты в печени и легких, серозный менингит, миелоидная гиперплазия селезенки и лимфатических узлов, межуточная лимфоидная инфильтрация в миокарде). Осложнениями основного заболевания явились отек, набухание и сдавление головного мозга, резкая сглаженность и уплощение борозд и извилин головного мозга. Непосредственной причиной смерти послужил отек мозга.

Секционный материал (образцы крови и мозга), переданный в референс-центр по мониторингу за риккетсиозами ФБУН «НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, оказался не пригоден для изоляции возбудителя с использованием биологических моделей. Работа по идентификации инфекционного агента проводилась с использованием молекулярно-биологических методов. Полученные фрагменты органов были исследованы методом двухраундовой ПЦР с последующим секвенированием положительных образцов. В образцах и крови и мозга были обнаружены два вида риккетсий: *R. sibirica* subsp. *sibirica*, и *Candidatus R. tarasevichiae*. Изоляты *R. sibirica* subsp. *sibirica*, которые были охарактеризованы по *gltA*, *ompA* и *ompB* генам, продемонстрировали идентичность типовому штамму 246 (код доступа в NCBI GenBank

AABW01000001). Изоляты *Candidatus R. tarasevichiae*, охарактеризованные по *gltA* и *ompB* генам – идентичны последовательностям *Candidatus R. tarasevichiae* из клещей *I. persulcatus* (AF503167, KR150783). Полученные нуклеотидные последовательности были внесены в базу данных NCBI GenBank под номерами: MK048467 – MK048475.

Эти же образцы секционного материала (кровь и мозг) были исследованы в ПЦР на наличие ДНК ряда клещевых агентов, а именно: вирус клещевого энцефалита, вирус Кемерово, *B. burgdorferi sensu lato*, *B. miyamotoi*, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. и «*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*» и кишечные вирусы (ротавирусы человека групп А и С, норовирус, астровирус, энтеровирус, пикорнавирусы и аденовирус) с отрицательным результатом.

Красноярский край, в котором в 30-е годы прошлого века началось изучение СКТ, является эндемичным регионом для этой инфекции. Идринский район, в котором произошло заражение пациентки, расположен в Западно-Саянской горно-таежной зоне, относится к территории высокого риска заражения СКТ. Среди нескольких видов иксодид, обитающих в Идринском районе, превалирует *Haemaphysalis concinna* (переносчик *R. sibirica*), значительно уступает ему по численности *Ixodes persulcatus* (переносчик *Candidatus R. tarasevichiae*). В некоторых исследованиях *R. sibirica* была обнаружена у клещей *I. persulcatus*, а *Candidatus R. tarasevichiae* - у *H. concinna* [163, 242].

Поскольку СКТ крайне редко приводит к летальному исходу, на протяжении длительного времени морфологические исследования проявления этой инфекции сводились, в основном, к изучению элементов кожной сыпи. Описание патологоанатомических изменений, присущих СКТ, впервые было сделано В.А. Никоновым в 1958 г. [28] при анализе двух случаев СКТ с летальным исходом. Оба случая зафиксированы в 1950-е годы в том же Красноярском крае. У погибших больных установлены следующие изменения: гиперплазия селезенки, дистрофические изменения паренхиматозных органов с острым венозным полнокровием, анемический инфаркт с геморрагическим поясом в левой почке. В спинном мозге зафиксированы перичеллюлярный отек и очень умеренное

набухание клеток, в головном мозге - эндопериваскулит, участки диапедезного кровоизлияния и плазморрагии, тромбо-эндovasкулит с очаговой деструкцией сосудистой стенки и периваскулярным отеком.

Первые случаи инфекции, ассоциированные с *Candidatus R. tarasevichiae*, были зарегистрированы в КНР, когда ретроспективно среди пациентов госпиталя у пяти была выявлена эта риккетсия [234]. Один из этих пациентов, имевший проявления менингита, скончался. Три годами позже [109] было опубликовано сообщение о еще 61 случае инфекции, связанной с *Candidatus R. tarasevichiae*. У 34 человек из числа этих больных была установлена микст-инфекция (*Candidatus R. tarasevichiae* и буньявирус рода *Phlebovirus*, который также передается клещами). У девяти больных заболевание закончилось летально, у восьми погибших зафиксирована коинфекция *Candidatus R. tarasevichiae* с буньявирусом [109].

Наиболее филогенетическим близким к *Candidatus R. tarasevichiae* видом является *R. canadensis*, которая является патогеном человека. В сопоставлении с риккетсиями группы КПЛ, *R. canadensis* демонстрирует более выраженное повреждающее действие на сосуды головного мозга.

Нами описан первый в России случай коинфекции, вызванной двумя видами риккетсий: *R. sibirica* и *Candidatus R. tarasevichiae*, закончившийся смертью заболевшего ребенка. В процессе анализа образцов аутопсийного материала было установлено отсутствие других клещевых патогенов и кишечных вирусов, которые могли бы являться причиной развития менингеального синдрома.

Несмотря на широкое распространение *Candidatus R. tarasevichiae* в клещах *I. persulcatus*, это первый прецедент риккетсиоза, ассоциированного с этой риккетсией в РФ с летальным исходом [154, 214, 458]. По нашему мнению, заслуживает внимания предположение о влиянии смешанной инфекции на тяжесть манифестации заболевания.

#### **4.3. Описание нового очага клещевых риккетсиозов в Омской области**

Изменение эпидемической активности известных и появление новых очагов СКТ является естественным процессом в природе и приводит к трансформации области распространения *R. sibirica*. Новые очаги формируются на границах

активных очагов СКТ. В качестве примера этого процесса можно рассматривать очаги СКТ, изученные сотрудниками Омского НИИ природно-очаговых инфекций в 80-90-х гг. в Сузунском районе Новосибирской области и Сладковском районе Тюменской области [28]. Штаммы, характеризующиеся низкой иммуногенностью и вирулентностью для морских свинок, типичны для популяций риккетсий, циркулирующих в подобных очагах [27]. Заболеваемость СКТ в Омской области ранее не регистрировалась, однако, начиная с 2003 г. в Называевском районе выявляются больные с типичными для СКТ клиническими проявлениями (первичный аффект на месте присасывания клеща, лихорадка, головная боль, слабость, розеолезная или розеолезно-петехиальная сыпь), имеющие в анамнезе присасывание клещей.

Называевский район, административно-территориальная единица, располагается в западной части региона. Его географическое положение характеризуется удаленностью от основных водных артерий, район находится в пределах Ишимо-Иртышского междуречья и входит в состав лесостепной зоны Ишимской равнины. На западе Называевский район имеет административную границу со Сладковским муниципальным районом Тюменской области. В юго-западном направлении район соседствует с Северо-Казахстанской областью Республики Казахстан. В указанных приграничных территориях регулярно фиксируется заболеваемость СКТ. Преобладающий ландшафт района представлен лесостепью, характеризующейся наличием березово-осиновых рощ и остепненных лугов. Площадь лесного массива составляет 21% от общей территории района.

Популяция переносчиков риккетсий представлена двумя видами клещей – степной клещ (*Dermacentor marginatus* Shulz.) и луговой клещ (*Dermacentor reticulatus* Fabr.). В пулах переносчиков, собранных на флаг, весной отмечалось доминирование *D. marginatus* – 61,16% в 2019 г. и 77,78% в 2020 г., в осенних сборах чаще встречался *D. reticulatus* – 69,1%. Инфицированность клещей риккетсиями определяли выявлением антигена, исследуя в РНИФ с поликлональными антителами к *R. sibirica* мазки гемолимфы (гемоцитотый тест) и выявлением ДНК риккетсий в ПЦР с праймерами, амплифицирующими фрагмент гена

цитратсинтазы. Антигены риккетсий группы КПЛ с применением РНИФ были обнаружены в  $49 \pm 0,7\%$  исследованных клещей. ДНК риккетсий найдена в 25 из 133 исследованных экземплярах *D. marginatus* ( $18,8 \pm 3,4\%$ ) и в 2 из 39 экземплярах *D. reticulatus*. При исследовании части клещей в ПЦР с праймерами, амплифицирующими фрагмент *ompA* гена, положительный результат получен в 18 из 69 пробах *D. marginatus* ( $26,1 \pm 5,3\%$ ) и в 1 из 2-х проб *D. reticulatus* (исследовались только образцы положительные по *gltA* гену). *R. raoultii* идентифицирована в двух экземплярах клещей при использовании ПЦР с последующим секвенированием фрагментов гена *ompA*, показавшим 100% и 99,8% сходства с депонентом NCBI GenBank под номером AF120022 *Rickettsia* sp. RpA4 *OmpA* gene.

Первый инцидент заболевания СКТ зафиксирован в Называевском районе в 2003 году, когда у 40-летнего мужчины после присасывания клеща появились характерные для этого риккетсиоза клинические признаки. Первые проявления заболевания появились через 4 дня после контакта с переносчиком (лихорадка до  $39^{\circ}\text{C}$ , первичный аффект). Сыпь появилась спустя 3 дня после начала болезни. На пятый день болезни пациент был госпитализирован в инфекционное отделение Называевской ЦРБ. Ежегодное появление больных с аналогичной симптоматикой фиксируется в данном районе с 2006 года. Всего за период 2003-2015 гг. в инфекционное отделение ЦРБ были госпитализированы 154 пациента с типичной для СКТ клинической картиной из 13 населенных пунктов Называевского района. Только у 5 из 154 заболевших в анамнезе не зафиксирован факт присасывания клеща. Если у взрослых заболевших чаще регистрировалась среднетяжелая форма клинических проявлений, для которой характерны повышение температуры тела в диапазоне  $38-39^{\circ}\text{C}$  на протяжении 8-10 дней, умеренно проявленная общая интоксикация и массивные высыпания розеолезно-папулезного вида [28], то у молодых людей и детей превалировала легкая форма заболевания, для которой свойственно повышение температуры тела до  $38^{\circ}\text{C}$ , слабо выраженная общая интоксикация и незначительно выраженные, преимущественно розеолезные, высыпания [28]. Средняя длительность латентного периода в данном очаге

равняется 2-5 дням, лихорадочный период составляет до 10 дней, при раннем обращении - 5-7 дней, на третий день от начала клинических проявлений в 70% случаев становится заметной розеолезная сыпь. При позднем обращении пациента иногда появляются розеолезно-петехиальные высыпания. Первичный аффе́кт (гемморагическая корочка, расположенная на инфильтрированном основании) с регионарным лимфоденитом, являющийся типичным для СКТ признаком, зафиксирован практически у всех заболевших. Основным клиническим симптомом у детей являлся регионарный лимфаденит (лимфоузлы умеренно-болезненные, плотные), сопровождавшийся субфебрильной или нормальной температурой, при своевременно начатой антибактериальной терапии высыпания не обнаруживались, лимфаденит сохранялся до 2 недель.

Сероконверсия к риккетсиям группы КПЛ установлена в реакции связывания комплемента (РСК) с антигеном *R. sibirica*. Впервые диагноз СКТ у пациента в Называевской ЦРБ был верифицирован серологически в 2009 году. 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). Полученная информация включена в базу данных «Результаты серологических исследований на клещевые риккетсиозы по данным ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора» (свидетельство № 2023621833 от 06 июня 2023 г.).

ДНК риккетсий обнаружена в 3-х из 18-ти исследованных биоптатах и в 15-ти из 32-х переносчиках, снятых с людей, проживающих в Называевском районе, в ПЦР с праймерами, амплифицирующими ген цитратсинтазы.

С целью изоляции штаммов риккетсий методом стандартной биопробы путем внутрибрюшинного заражения самцов морских свинок исследовано 497 экземпляров *D. marginatus* и 50 экземпляров *D. reticulatus*. Все клещи были собраны на флаг в непосредственной близости от населенных пунктов, в которых выявлено наибольшее количество пациентов с клиникой СКТ: Князево, Дурбет и Кисляки.

Всего было сформировано 11 проб, каждая была инокулирована двум животным. Умеренный подъем ректальной температуры, продолжительностью 1-6 дней, наблюдался у свинок, входящих в 6 групп. Двухволновая лихорадка зафиксирована в трех группах. В результате аутопсии установлено, что выраженная патологоанатомическая картина, характерная для СКТ, зафиксирована в двух группах зараженных животных, еще в двух - умеренно выраженная. В РСК антигеном *R. sibirica* антитела были определены в шести группах в титрах 1:20 – 1:40. ДНК риккетсий детектирована в пяти группах по *gltA* гену.

*R. sibirica* детектирована молекулярно-биологическими методами (ПЦР+секвенирование) в образцах паховых лимфатических узлов и яичек самцов морских свинок, которым инокулировали суспензию из *D. marginatus*, собранных в окрестностях н.п. Кисляки. После первичного заражения этим материалом нами выполнено три пассажа через лабораторных животных. В процессе пассажей наблюдалось изменение клинических и патологоанатомических проявлений от слабо до умеренно выраженных: температурный ответ поднялся с 1,4 °С до 1,7 °С от исходной, скротальный феномен от весьма слабо выраженного трансформировался до умеренно выраженного (++). Морфологические изменения в органах, выявленные при аутопсии, также трансформировались и были наиболее выражены во II пассаже. Главным образом это проявилось увеличением размеров, полнокровием и усилением сосудистого рисунка тестикул и значительным увеличением размеров и полнокровием селезенки. Также отмечалось увеличение размеров печени, гиперемия и усиление сосудистого рисунка головного мозга. В мазках-отпечатках из внутренних органов, окрашенных по методу Здродовского, количество риккетсиеподобных микроорганизмов варьировало от единичных (лимфоузлы) до 10 в поле зрения (яички). В РСК антитела к возбудителю СКТ детектированы в I-III пассажах в низких титрах.

Нуклеотидная последовательность гена цитратсинтазы (*gltA*) длиной 550 пар оснований, полученная при генотипировании тестикул, была идентична с депонентом NCBI GenBank под номером KM28871.1.

Последовательность гена 16S рРНК длиной 628 пар оснований была

тождественна депоненту NCBI GenBank под номером NR036848.1:

Нуклеотидная последовательность гена *ompB* длиной 751 пар оснований имела 100% гомологии с депонентом NCBI GenBank под номером JQ582806.

Таким образом, наличие природного очага риккетсиоза 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 у людей, обратившихся за медицинской помощью, выявлением антител к этим видам риккетсий у животных, использованных в биопробе, а также генетической идентификацией культуры, полученной из переносчиков. Сложности, связанные с изоляцией штаммов *R. sibirica*, а также превалирование у пациентов сероконверсии в низких титрах, свидетельствуют в пользу гипотезы о доминировании на периферии нозоареала СКТ штаммов риккетсий, которые характеризуются пониженной способностью вызывать иммунный ответ и вызывать заболевание [27].

Исходя из вышеуказанного, нами с использованием комплекса серологических и молекулярно-биологических методов подтверждено наличие природного очага риккетсиоза с циркуляцией двух видов риккетсий группы КПЛ: классического патогена *R. sibirica* и нового патогена *R. raoultii*.

## **ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА АЛЬФА-ПРОТЕОБАКТЕРИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ МЕЛКИХ ДИКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ОМСКОЙ ОБЛАСТИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

Альфа-протеобактерии, а именно риккетсии и бартонеллы, входящие в круг наших интересов, являются сочленами паразитарных систем (чаще трехчленных: хозяин – паразит – переносчик). Остается малоизученным вопрос о роли теплокровных хозяев в поддержании циркуляции альфа-протеобактерий в природных очагах зоонозных инфекций. Молекулярно-генетические исследования по выявлению риккетсий и бартонелл в органах грызунов и насекомоядных были проведены на базе лаборатории риккетсиозов Средиземноморского университета (Марсель, Франция).

Отлов животных осуществлялся сотрудниками ФБУН НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора В.В. Якименко, М.Г. Мальковой, А.К. Танцевым в двух точках многолетних наблюдений (северная и южная лесостепь), находящихся на расстоянии около 200 км друг от друга. Всего в исследовании использовано 175 экземпляров мелких диких млекопитающих (семь видов грызунов и землеройки рода *Sorex*). Отловы проводились по стандартной методике в весенний (80 особей) и осенний (50 + 45 особей) периоды 2005 г. Консервацию извлеченных органов осуществляли с использованием 70% этанола. Изъятию образцов внутренних органов у зверьков предшествовала стандартная зоологическая процедура. В её рамках определили вид, вес, габариты и пол животных. Также были собраны эктопаразиты путём очеса животных. В ходе исследования были проанализированы репрезентативные выборки мелких млекопитающих, которые соответствовали критериям сопоставимости по численности особей и видовому составу. Эти выборки адекватно отражают фактическое соотношение видов на территории Среднего Прииртышья и соответствуют многолетним данным для этой территории как по общему

количеству видов грызунов в исследуемых местах обитания, так и по соотношению основных видов [1, 22]. Так, весной в населении мелких млекопитающих доминировала красная полевка (доля в отловах и относительная численность, соответственно:  $30.1 \pm 3.7\%$ ; 4.7 экз. на 100 ловушко/суток), ее содоминантами были рыжая полевка ( $15.3 \pm 2.9\%$ ; 2.1 экз.) и полевка-экономка ( $10.3 \pm 2.4\%$ ; 1.7 экз.). Осенью доминировали полевка-экономка ( $24.9 \pm 3.0\%$ ; 10,0-14,0 экз.) и красная полевка ( $23.0 \pm 2.9\%$ ; 9.5-18.0 экз.); их содоминантами в общих отловах были рыжая полевка ( $8.6 \pm 1.9\%$ ; 5.3 экз.) и полевая мышь ( $9.6 \pm 2.0\%$ ; 4.8 экз.). В 2005 г. отмечена ранняя весенняя активность преимагинальных фаз развития таежного клеща *Ixodes persulcatus* Sch. – первые особи отмечены на животных 20 (личинки) – 21 (нимфы) апреля.

В южной лесостепи среди пойманных мелких млекопитающих превалировала красная полевка ( $84.4 \pm 5.4\%$ ; 38.0 экз.), что характерно для данной территории.

### **5.1. Скрининг риккетсий в органах диких мелких млекопитающих с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

Экологические особенности риккетсий детерминированы их облигатным внутриклеточным паразитизмом. Этот феномен обуславливает их способность инфицировать широкий спектр хозяев, которые принадлежат к различным филогенетическим группам. К числу таких хозяев относятся кровососущие членистоногие, такие как клещи, вши и блохи, а также теплокровные организмы, включая грызунов, насекомых, сумчатых, копытных и другие виды млекопитающих и птиц. Высокий уровень абилитации риккетсий к организму членистоногих позволяет рассматривать их в роли не только переносчиков, но и основного резервуара риккетсий.

Роль мелких диких млекопитающих в циркуляции *R. sibirica* в природе активно изучалась в 60-70х гг. прошлого столетия как изоляцией данного возбудителя в биопробах на морских свинках, так и серологическим обследованием животных в РСК и РНГА. Наибольшее количество штаммов *R. sibirica* было выделено из органов дальневосточной полевки, красно-серой полевки,

длиннохвостого суслика. Циркуляция риккетсий в популяциях мелких диких млекопитающих была установлена путем изоляции штаммов в Приморском, Хабаровском, Алтайском и Красноярском краях, в Иркутской, Новосибирской, Кемеровской и Тюменской областях, в Хакаской АО. Естественная зараженность *R. sibirica* также была подтверждена выявлением антител к данному возбудителю на вышеперечисленных территориях, в Томской и Читинской областях у дальневосточной полевки, красно-серой полевки, длиннохвостого суслика, красной полевки, рыжей полевки, узкочерепной полевки, бурозубки, полевой мыши, лесной мыши и других мелких диких млекопитающих [28].

Исследования, выполненные в Приморском крае, показали, что штаммы *R. sibirica* удавалось успешно изолировать от грызунов, отловленных с июня по сентябрь, т.е. в тот период, когда на них паразитировали личинки и нимфы иксодовых клещей [28]. В период с февраля по май не было выделено ни одного штамма. Изучение динамики антител к возбудителю риккетсиоза у грызунов, проведенное с использованием РСК в течение 2,5 лет, указывало на отсутствие антител в период между январем и апрелем. В мае были отмечены спорадические позитивные находки, в июне и июле их количество увеличивалось. Эти результаты предполагают близкую корреляцию между динамикой развития антител у грызунов и сезонной активностью личинок и нимф иксодовых клещей. Мелкие млекопитающие, в том числе грызуны, являются, вероятно, сезонным резервуаром *R. sibirica* в природных очагах.

Н.В. Вожакиной (1963) [8] в условиях эксперимента изучалась восприимчивость и чувствительность к *R. sibirica* краснощеких сусликов, полевых мышей, красных и узкочерепных полевок. Ею была выявлена длительная риккетсиемия после экспериментального заражения сусликов, узкочерепных полевок и полевых мышей. У красных полевок, по ее данным, отсутствовала риккетсиемия, в их крови не было обнаружено специфических комплементсвязывающих антител, постинфекционный иммунитет отсутствовал.

Что касается новых видов риккетсий *R. raoultii* и *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* – в настоящее время известны их членистоногие переносчики, но

отсутствуют данные о резервуарной роли теплокровных животных в жизненном цикле и сохранении популяции этих микроорганизмов в природе.

Роль диких мелких млекопитающих в циркуляции *R. raoultii* и *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* изучалась нами с использованием скрининга ДНК риккетсий в органах диких мелких млекопитающих, собранных на территории Омской области.

ДНК из каждого образца была выделена с использованием QIAmp tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) согласно инструкции производителя. Скрининг наличия риккетсий проводили с использованием ПЦР с применением праймеров CS409d (CCT ATG GCT ATT ATG CTT GC) и RP1258n (ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A) для амплификации фрагмента гена *gltA*, кодирующего цитратсинтазу, поскольку при помощи ПЦР-амплификации было показано присутствие этого гена в хромосомах всех риккетсий.

ПЦР амплификация была выполнена в объеме 25 мкл в присутствии 5 пкМ каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы, 2,5 мкл смеси дезоксинуклеотидов трифосфатов (2% dATP, 2% dCTP, 2% dTTP, 2% dGTP в стерильной воде), 1 мкл 25 mM раствора MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл 10<sup>x</sup> реакционного буфера (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). Профиль амплификации включал начальную денатурацию в течение 15 минут при 95<sup>0</sup> C, 39 циклов амплификации (денатурация при 94<sup>0</sup> C – 60 с, отжиг праймеров при 52<sup>0</sup> C – 30 с, элонгация при 72<sup>0</sup> C – 60 с) и финальную элонгацию в течение 5 минут при 72<sup>0</sup> C. Каждая ПЦР включала отрицательный (дистиллированная вода) и положительный (ДНК *R. montanensis*) контроли. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле, с окраской бромистым этидием. Размеры полученных продуктов ПЦР реакции были определены в сравнении с молекулярным весом стандартного маркера VI (Boehringer, Германия).

В результате проведения ПЦР с использованием специфических праймеров для амплификации гена *gltA* риккетсий, были получены положительные результаты для трёх образцов селезёнки полевок-экономок: №№ 39, 41, 43, изъятых в

окрестностях села Подгородка. Последующее секвенирование выявило 86,5% сходства с видом *R. canadensis*. Эти образцы были дополнительно исследованы методом 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 генетического сходства анализируемых образцов с валидированными видами риккетсий по локусам генов *gltA* и 16S рРНК оказался ниже, чем

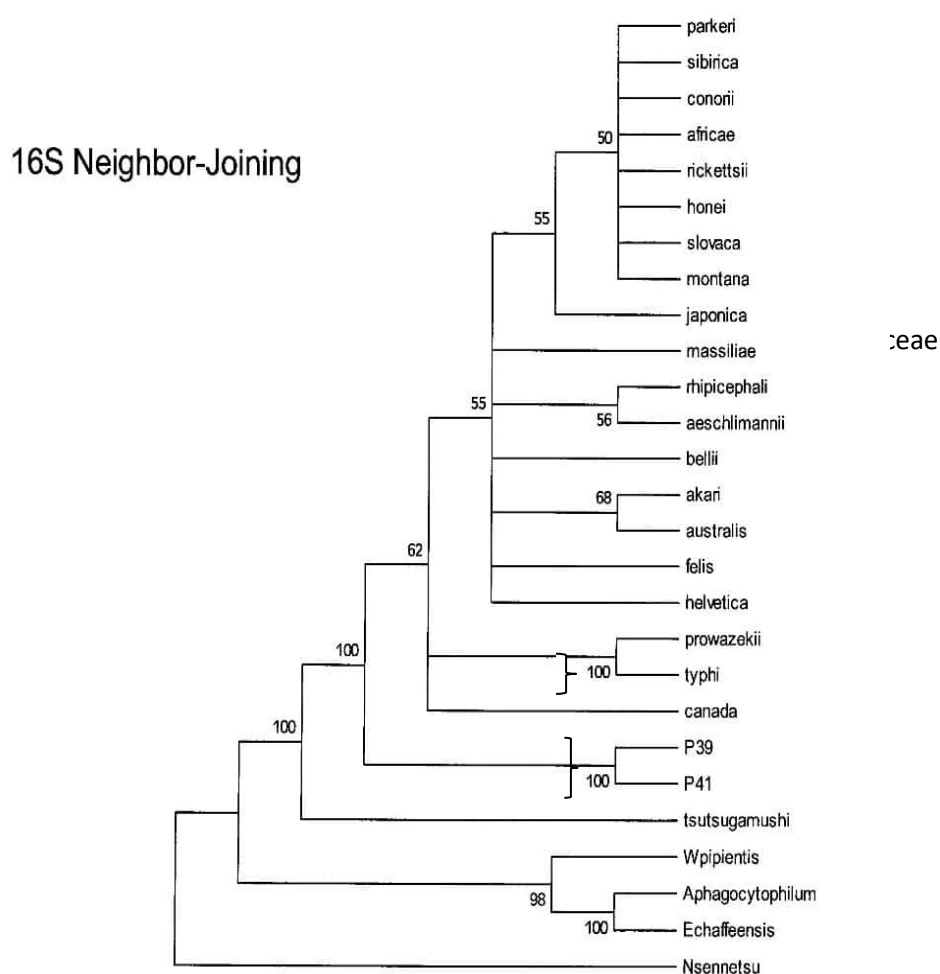


Рисунок 7 – Дендрограмма, отражающая взаимоотношение исследуемых образцов (P39, P41) с известными видами риккетсий и другими представителями порядка *Rickettsiales* (анализ секвенсов *rrs* генов проведен методом «объединения ближайших соседей»)

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

установлено внутри одного вида [211]. Данный факт позволяет сделать вывод о том, что исследуемые образцы не относятся ни к одному из ранее описанных видов риккетсий.

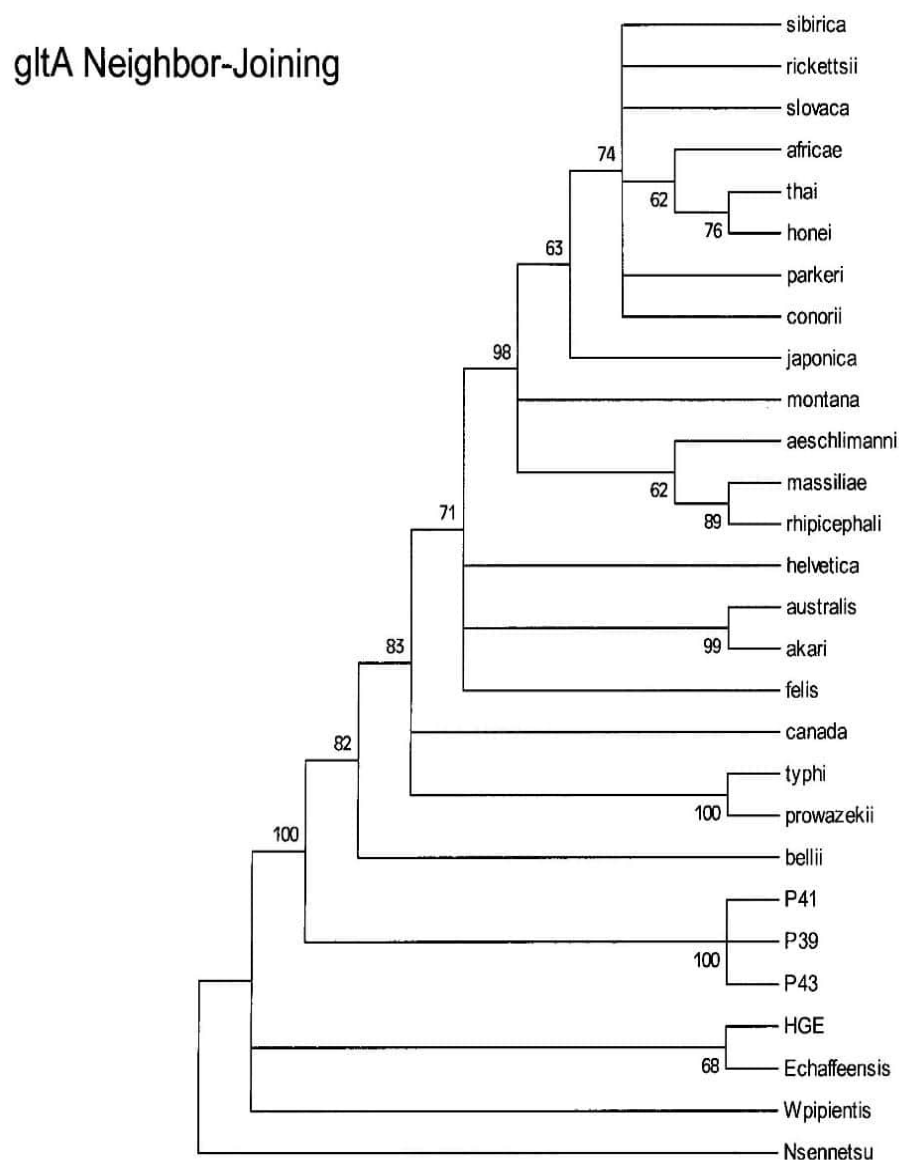


Рисунок 8 – Дендрограмма, отражающая взаимоотношение исследуемых образцов (P39, P41) с известными видами риккетсий и другими представителями порядка *Rickettsiales* (анализ секвенсов *gltA* генов проведен методом «объединения ближайших соседей»)

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

Более того, согласно принятым научным сообществом критериям, опубликованным в статье “Naming of Rickettsiae and Rickettsial Diseases” [307], исследуемая новая бактерия относится к роду *Rickettsia* в том случае, если имеет не менее чем с одним из утвержденных видов риккетсий уровень гомологии по гену 16S rRNA > 98,1% и по гену *gltA* > 86,5%. На дендрограммах, построенных с помощью метода «ближайшего соседа», видно, что исследуемые образцы филогенетически наиболее близки к риккетсиям предковой группы и являются представителями семейства *Rickettsiaceae* (Рисунки 7-8). 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 специально синтезированными для этой цели праймерами.

## **5.2. Изучение спектра бартонелл, циркулирующих на территории Омской области, с использованием молекулярно-генетических методов**

Бартонеллы – грамотрицательные аэробные кокко-бациллы, паразитирующие в эритроцитах и клетках сосудистого эндотелия позвоночных хозяев. Род *Bartonella* был назван в честь A.L. Barton, который описал бактерию *Bartonella bacilliformis* в 1909. В результате таксономического пересмотра представители рода *Rochalimaea* (ранее относившийся к *Rickettsiaceae*), а также родов *Bartonella* и *Grahamella* были включены в один род *Bartonella* [353, 354]. В настоящее время *Bartonella* содержит 19 официально признанных видов (<http://www.bacterio.cict.fr/b/bartonella.html>). Род *Bartonella* относится к альфа-2 подгруппе класса *Proteobacteria*. Спектр теплокровных хозяев *Bartonella* обширен и включает представителей различных систематических групп млекопитающих, но наибольшее число видов ассоциированы с грызунами (*B. alsatica*, *B. birtlesii*, *B. doshiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. peromysci*, *B. talpae*, *B. taylorii* и *B. tribocorum*), ряд видов бартонелл используют в качестве хозяев представителей семейства копытных (*B. bovis*, *B. caprioli*, *B. chmetii*, и *B. schoenbuchensis*), домашних и диких кошек (*B. clarridgeiae*, *B. henselae*, и *B. koehlerae*), человека (*B. bacilliformis*, *B. quintana*) и представителей

семейства псовых (*B. vinsonii*) [64, 67, 68, 69, 70, 79, 82, 86, 98, 99, 139, 230, 354]. Восемь из этих видов признаны патогенами человека. *B. bacilliformis* вызывает болезнь Карриона [230], *B. henselae* и *B. clarridgeiae* являются этиологическими агентами болезни кошачьей царапины [70, 310], *B. quintana* – траншейной лихорадки [286]. *B. grahamii* может быть причиной нейроритинита [146]. *B. elizabethae* и *B. vinsonii* subsp. *berkhofii* вызывают эндокардиты [87, 412], *B. quintana* и *B. henselae* также могут быть причиной эндокардитов [63, 170]. *B. vinsonii* subsp. *arupensis* была изолирована от больных с атипичной лихорадкой и эндокардитом [24, 250].

Изучение распространения бартонелл на территории Российской Федерации началось относительно недавно, и видовой состав этих бактерий в нашей стране ещё не до конца определён. В Московской области от пациентов была выделена бактерия *B. vinsonii* subsp. *arupensis* [25]. В дикой природе, в частности среди мелких млекопитающих, в Московской области и на Дальнем Востоке были обнаружены *B. grahamii* и *B. taylorii* [23, 302]. На Дальнем Востоке также обнаружен генотип бартонелл, который может представлять новый вид [302]. В Новосибирской области в иксодовых клещах, комарах и образцах крови больных были выявлены *B. henselae* и *B. quintana* [18]. Молекулярно-генетическая идентификация видов бартонелл, циркулирующих среди мелких диких млекопитающих в Омской области, с использованием ПЦР и последующим секвенированием ампликонов ранее не проводилась.

Нами проведено исследование, целью которого было изучение генетического разнообразия бактерий рода *Bartonella*. Для этого был осуществлен анализ ДНК данных микроорганизмов в образцах селезёнки диких мелких млекопитающих, отловленных в Омской области. Эти образцы также использовались в качестве материала для изучения видового разнообразия риккетсий.

ДНК из каждого образца была выделена с использованием QIAmp tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) согласно инструкции производителя. Скрининг наличия бартонелл проводили с использованием ПЦР с применением праймеров UrBarto1 (CTT CGT TTC TCT TTC TTC A) и UrBarto 2 (CTT CTC TTC ACA ATT TCA AT) для выявления специфичных для бартонелл участков 16S-23S межгенной

спейсерной области (*ITS*) как описано ранее [294]. ПЦР амплификация была выполнена в объеме 25 мкл в присутствии 5 пкМ каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы, 2,5 мкл смеси дезоксинуклеотидов трифосфатов (2% dATP, 2% dCTP, 2% dTTP, 2% dGTP в стерильной воде), 1 мкл 25 mM раствора  $MgCl_2$ , 2,5 мкл  $10^x$  реакционного буфера (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). Профиль амплификации включал начальную денатурацию в течение 15 минут при  $95^{\circ}C$ , 39 циклов амплификации (денатурация при  $94^{\circ}C$  – 60 с, отжиг праймеров при  $50^{\circ}C$  – 30 с, элонгация при  $72^{\circ}C$  – 60 с) и финальную элонгацию в течение 5 минут при  $72^{\circ}C$ . Каждая ПЦР включала отрицательный (дистиллированная вода) и положительный (ДНК *B. henselae*) контроли. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле, с окраской бромистым этидием. Размеры полученных продуктов ПЦР реакции были определены в сравнении с молекулярным весом стандартного маркера VI (Boehringer, Германия).

Для генетической идентификации продуктов амплификации проведено секвенирование с праймерами UrBarto1 и UrBarto2. Ампликоны очищены с помощью QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование выполнено на анализаторе Applied Biosystems с набором BigDye™ Terminator v3.1 (США).

Из всех исследованных животных инфицированы бартонеллами оказались только представители рода *Myodes*. При этом осенью ДНК бартонелл выявлялась чаще, чем весной: у *M. glareolus* осенью - в трёх из 9 исследованных образцов, весной – в 1 из 16; у *M. rutilus*, осенью – в 6 из 19 образцов, весной - не обнаружена. Инфицированность репрезентантов рода *Myodes* бартонеллами в северной лесостепи составила  $15,4 \pm 3.2\%$  ( $n=65$ ), в южной -  $28.9 \pm 7.3\%$  ( $n=38$ ). (Таблица 11). Общая инфицированность бартонеллами всех исследованных млекопитающих в северной лесостепи составила  $7.6 \pm 2.3\%$  ( $n=130$ ), в южной -  $24.4 \pm 6.4\%$  ( $n=45$ ).

Таксономическое положение полученных образцов ДНК бартонелл было определено в соответствии с критериями, предложенными La Scola с соавторами, для определения видов [212]. Согласно данным критериям, уровень внутривидовой гомологии нуклеотидных последовательностей 16S-23S межгенной спейсерной

области у представителей рода *Bartonella* составляет не менее 99,8%.

Таблица 11 – 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    |

В результате анализа нуклеотидных последовательностей, локализованных между генами 16S и 23S рПНК (Таблица 12), были идентифицированы как фрагменты, сходные с *B. grahamii* и *B. taylorii*, так и последовательности, демонстрирующие уровень дивергенции, превышающий допустимые пределы внутривидовых различий. Это позволяет сделать вывод о принадлежности данных последовательностей к ранее неизвестным видам бартонелл. Положительные результаты при молекулярном скрининге бартонелл в снятых с людей переносчиках с использованием праймеров UrBarto1и UrBarto2 в 2014-2016 гг. получены в  $3,5 \pm 0,8\%$  случаев. В снятых с людей в 2023 г. переносчиках ДНК бартонелл не выявлен.

Таблица 12 - Идентификация в BLAST полученных фрагментов ДНК бартоanelл

| Образец<br>(селезенка)   | Длина<br>получен-<br>ного<br>фрагмента | Идентификация в<br>BLAST <i>ITS</i> гена            | Длина<br>получен-<br>ного<br>фрагмента | Идентификация в<br>BLAST <i>rpoB</i> гена                                               | Длина<br>получен-<br>ного<br>фрагмента | Идентификация в<br>BLAST <i>gltA</i> гена    | Длина<br>получен-<br>ного<br>фрагмента | Идентификация в<br>BLAST 16S гена            |
|--------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>M. rutilus</i> P1     | 601 п.о.                               | 576/603 (95,5%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup        |                                        |                                                                                         |                                        |                                              |                                        |                                              |
| <i>M. rutilus</i> P9     | 714 п.о.                               | 672/717 (93,7%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup        | 883 п.о.                               | 878/881 (99,7%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup                                            | 810 п.о.                               | 809/810 (99,9%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup | 666 п.о.                               | 662/666 (99,4%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup |
| <i>M. rutilus</i><br>P11 | 691 п.о.                               | 301/321 (93,8%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup        |                                        |                                                                                         |                                        |                                              |                                        |                                              |
| <i>M. rutilus</i><br>P19 | 729 п.о.                               | 704/730 (96,4%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup        | 743 п.о.                               | 733/738 (99,3%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup                                            | 821 п.о.                               | 814/821 (99,1%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup |                                        |                                              |
| <i>M. rutilus</i><br>P22 |                                        |                                                     | 895 п.о.                               | 879/895 (98,2%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup                                            |                                        |                                              |                                        |                                              |
| <i>M. rutilus</i><br>P23 | 667 п.о.                               | 270/290 (93,1%)<br><i>B. grahamii</i> as4aup        |                                        |                                                                                         |                                        |                                              |                                        |                                              |
| <i>M. rutilus</i><br>P33 | 552 п.о.                               | 519/525 (98,9%)<br><i>B. taylorii</i> strain<br>WM9 | 770 п.о.                               | 717/740 (96,9%)<br><i>B. taylorii</i><br>734/740 (99,2%)<br><i>Bartonella</i> sp. A 195 |                                        |                                              |                                        |                                              |

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

Видовую принадлежность образцов P28, St42 и St490, которые демонстрировали уровень дивергенции с валидированными видами бартонелл, превышающий принятый для внутривидовых различий, определяли с применением мультилокусного анализа по генам, кодирующим 16S рРНК (*rrs*), цитрат-синтетазу (*gltA*),  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoB*), белок клеточного деления (*ftsZ*) и специфичные для бартонелл участки 16S-23S межгенной спейсерной области (*ITS*) как описано ранее [86, 68, 97, 471, 489, 232]. Использованные в работе праймеры указаны в таблице 5.

Позиционирование данных образцов ДНК в систематической классификации было осуществлено на основании генотипических характеристик, предложенных L. Scola и соавторами для идентификации видов рода *Bartonella* [212]. На основании принятых критериев, установленный уровень сходства анализируемых изолятов с валидированными видами *Bartonella* по отдельным генам менее следующих значений: *rrs* - 99,8%, *ITS* - 99,8%, *gltA* - 96%, *rpoB* - 95,4%, *ftsZ* - 97,9%, позволяет классифицировать представленные изоляты как представителей нового вида (Таблица 8).

Нуклеотидные последовательности фрагментов *gltA*, *rpoB* и *ftsZ* генов были транслированы в протеиновые последовательности с использованием PC/GENE software (IntelliGenetics). Выравнивание нуклеотидных последовательностей для каждого гена осуществляли с использованием программы CLUSTAL W software (Version 1.81) (<http://spiral.genes.nig.ac.jp/homology/clustalw-e.shtml>). Процент гомологии нуклеотидных последовательностей определяли, используя DNADIST software package метод Kimura [262]. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей для сравнения степени гомологии с нуклеотидными последовательностями Банка данных NCBI GenBank проводили с помощью

программы BLAST. Дендрограммы строили для каждого гена и для объединенных секвенсов пяти изучаемых генов, применяя метод объединения ближайших соседей (neighbor-joining) с помощью программы Mega version 2.1 software packages [298]. Оценка достоверности полученных дендрограмм выполнена с помощью бутстрэп-анализа. Индекс бутстрэпа просчитан при общем числе повторов 100.

Среди проанализированных генетических локусов у образцов P28, St42 и St490 определена тождественность между собой по генам *ITS* и *ftsZ* и незначительная вариабельность по генам *rpoB* и *rrs* (99,9-100% и *rrs* 99,4-99,7% соответственно). Минимальная длина анализируемых фрагментов составляла 815 н.о. Полученные нуклеотидные последовательности внесены в базу данных NCBI GenBank под следующими номерами: EF682084-EF682086 для 16S rRNA, EF682087 для *ITS*, EF682088 для *rpoB* гена, EF682089-EF682090 для *gltA* гена и EF682091-EF682092 для *ftsZ* гена.

Степень сходства последовательностей *rrs*, *ITS*, *gltA*, *rpoB* и *ftsZ* генов анализируемых образцов с последовательностями *B. clarridgeiae*, генетически наиболее близкородственного валидированного вида, составил 99,1%-99,2%, 90,8%-91,3%, 95,1%, 93,3%-93,6%, 94,8%-95,1% соответственно, что меньше степени сходства между соответствующими последовательностями известных видов бартонелл (Таблица 13). Следовательно, изучаемые образцы не могут быть отнесены ни к одному из валидированных видов *Bartonella*. Мы назвали эту новую бартонеллу *Candidatus Bartonella rudakovii*. Типовой штамм - St490.

Проведенный по пяти вышеуказанным локусам филогенетический анализ, продемонстрировал, что *Candidatus Bartonella rudakovii* кластеризуется с *B. clarridgeiae* со значением бутстрэп 100%, используя *ITS* (Рисунок 9), *rrs* (Рисунок 10), *rpoB* (Рисунок 11) и *ftsZ* (Рисунок 12) сиквенсы, и со значением бутстрэп 88%, используя *gltA* (Рисунок 13) сиквенсы.

Исследование филогенетических связей на основе объединённых последовательностей экспонирует, что *Candidatus Bartonella rudakovii* образует кластер с *B. clarridgeiae* и входит в группу, которая включает также

Таблица 13 - Уровни гомологии объединенных сиквенсов *rrs*, *gltA*, *ITS*, *rpoB* и *ftsZ* генов исследуемых образцов (P28, St42, St490) и известных видов бартонелл (%)

| Таксон                        | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1) <i>B. alsatica</i>         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 2) <i>B. vinsonii</i> _Baker_ | 90,5 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 3) <i>B. taylorii</i>         | 89,8 | 89,0 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 4) <i>B. bovis</i>            | 84,6 | 84,6 | 83,7 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 5) <i>B. schoenbuchensis</i>  | 85,1 | 85,4 | 84,3 | 95,0 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 6) <i>B. birtlesii</i>        | 86,2 | 86,7 | 85,7 | 92,8 | 94,0 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 7) St42 <b>St42</b>           | 82,6 | 82,3 | 82,7 | 81,9 | 82,0 | 82,3 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 8) St4 <b>St490</b>           | 82,7 | 82,5 | 82,9 | 82,1 | 83,0 | 82,5 | 99,7 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 9) P28 <b>P28</b>             | 82,6 | 82,4 | 82,8 | 82,0 | 83,0 | 82,4 | 99,6 | 99,8 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10) <i>B. clarridgeiae</i>    | 82,6 | 82,0 | 82,4 | 81,9 | 82,0 | 82,3 | 91,4 | 91,5 | 91,4 |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 11) <i>B. bacilliformis</i>   | 83,8 | 84,3 | 83,4 | 88,0 | 89,0 | 88,1 | 82,5 | 82,7 | 82,6 | 82,2 |      |      |      |      |      |      |      |
| 12) <i>B. henselae</i>        | 87,2 | 87,1 | 86,8 | 83,3 | 84,0 | 84,3 | 83,0 | 83,2 | 83,1 | 82,7 | 82,4 |      |      |      |      |      |      |
| 13) <i>B. koehlerae</i>       | 86,9 | 86,6 | 86,7 | 84,0 | 85,0 | 84,8 | 83,1 | 83,2 | 83,1 | 83,0 | 82,8 | 95,3 |      |      |      |      |      |
| 14) <i>B. quintana</i>        | 88,2 | 88,4 | 87,8 | 84,2 | 85,0 | 85,5 | 82,9 | 83,1 | 83,0 | 83,3 | 83,7 | 89,8 | 89,3 |      |      |      |      |
| 15) <i>B. doshiae</i>         | 87,8 | 87,5 | 87,7 | 85,6 | 86,0 | 86,6 | 82,7 | 82,9 | 82,8 | 82,7 | 84,6 | 87,5 | 87,4 | 87,8 |      |      |      |
| 16) <i>B. elizabethae</i>     | 82,8 | 83,  | 82,9 | 78,8 | 80,0 | 80,1 | 79,2 | 79,4 | 79,3 | 78,4 | 78,8 | 83,5 | 82,3 | 83,0 | 82,0 |      |      |
| 17) <i>B. grahamii</i>        | 87,9 | 88,6 | 88,0 | 83,6 | 85,0 | 85,3 | 82,3 | 82,5 | 82,4 | 81,5 | 83,2 | 86,5 | 86,2 | 87,1 | 87,0 | 89,5 |      |
| 18) <i>B. tribocorum</i>      | 86,8 | 86,9 | 86,7 | 82,5 | 83,0 | 84,3 | 82,8 | 82,9 | 82,9 | 82,3 | 82,4 | 86,6 | 86,4 | 86,6 | 86,0 | 90,9 | 93,2 |

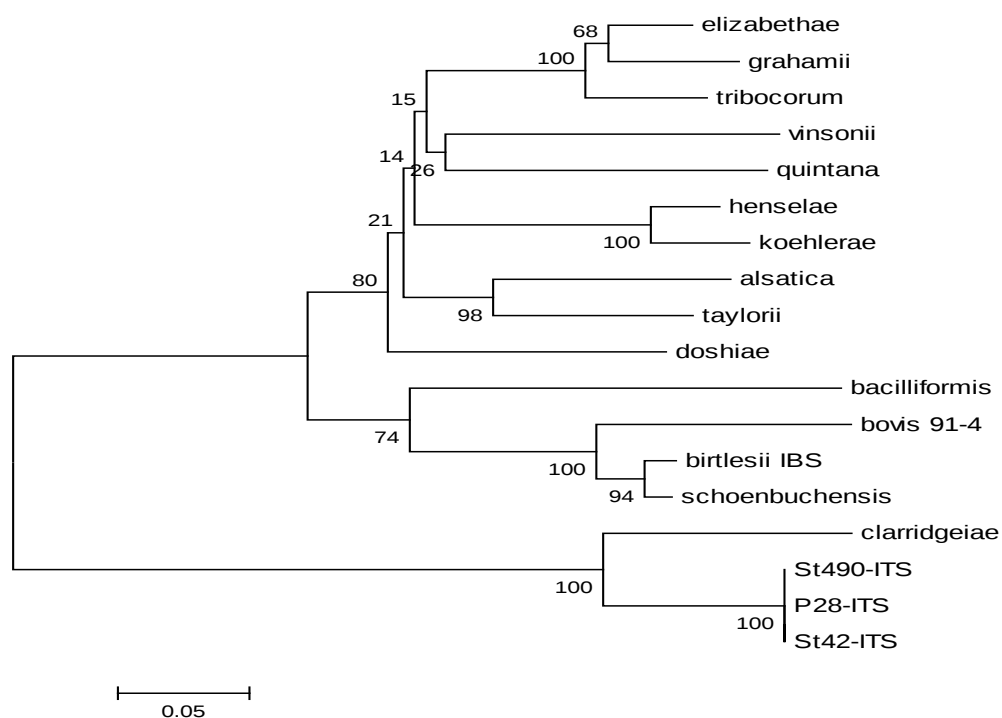


Рисунок 9 - Филогенетические взаимоотношения *Candidatus Bartonella rudakovii* (образцы P28, St42 и St490) и *Bartonella* sp. на основе фрагмента 16S-23S межгенной спейсерной области (анализ проведен методом «объединения ближайших соседей»)

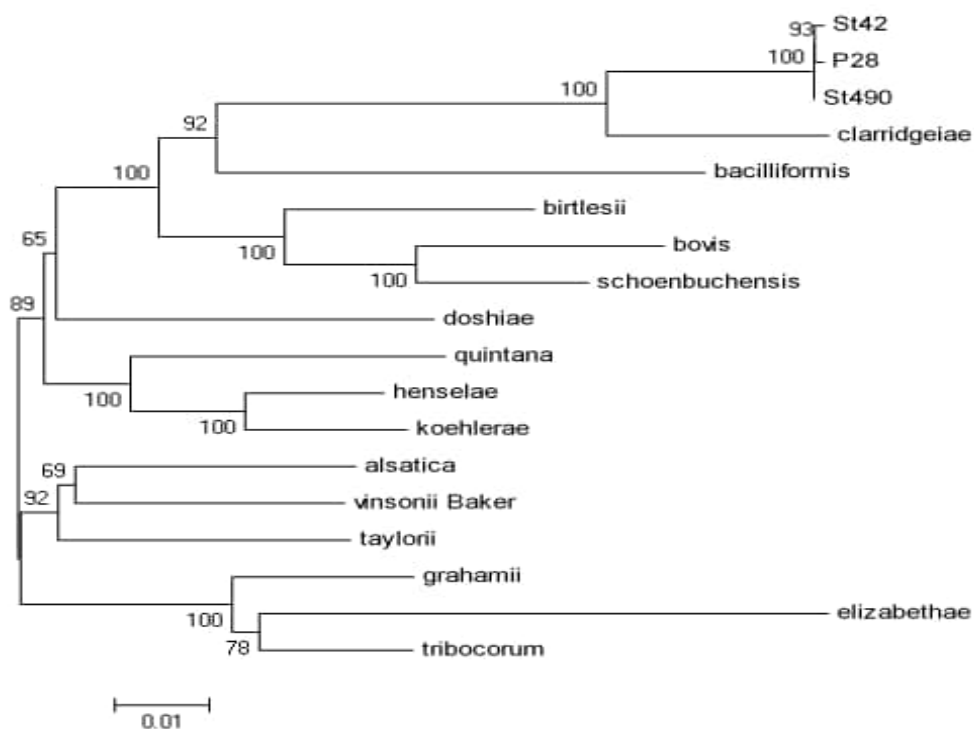


Рисунок 10 – Филогенетические взаимоотношения *Candidatus Bartonella rudakovii* (образцы P28, St42 и St490) и *Bartonella* sp. на основе фрагмента 16S rRNA гена (анализ проведен методом «объединения ближайших соседей»)

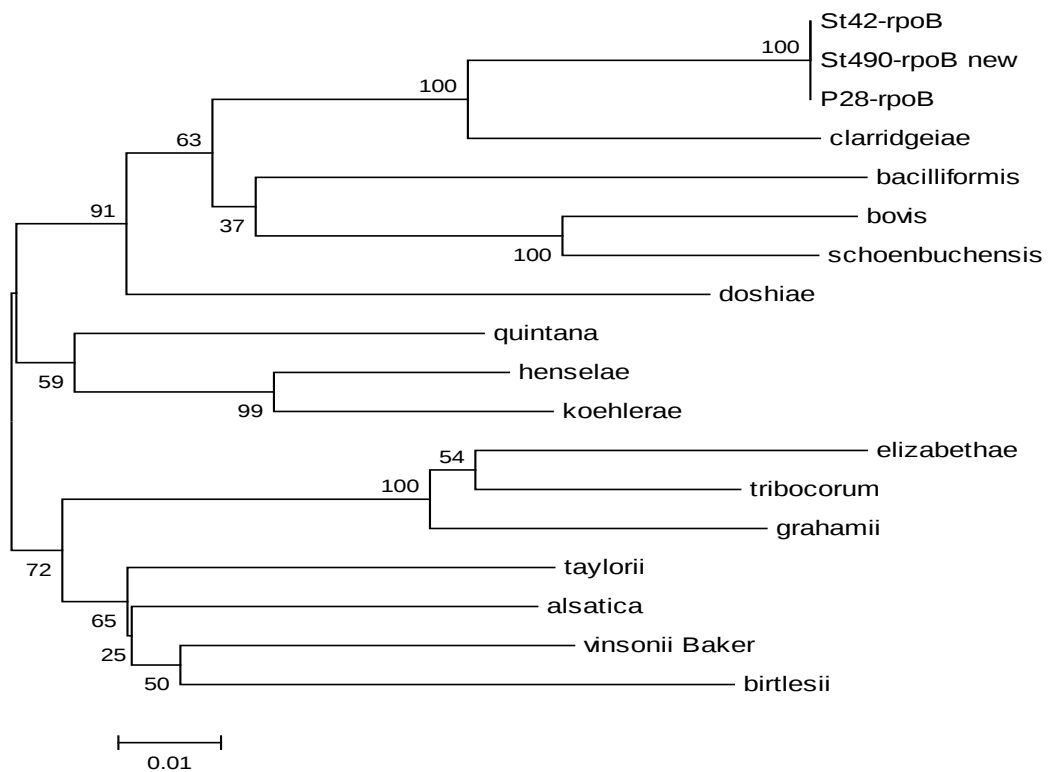


Рисунок 11 – Филогенетические взаимоотношения *Candidatus Bartonella rudakovii* (образцы P28, St42 и St490) и *Bartonella* sp. на основе фрагмента *rpoB* гена (анализ проведен методом «объединения ближайших соседей»)

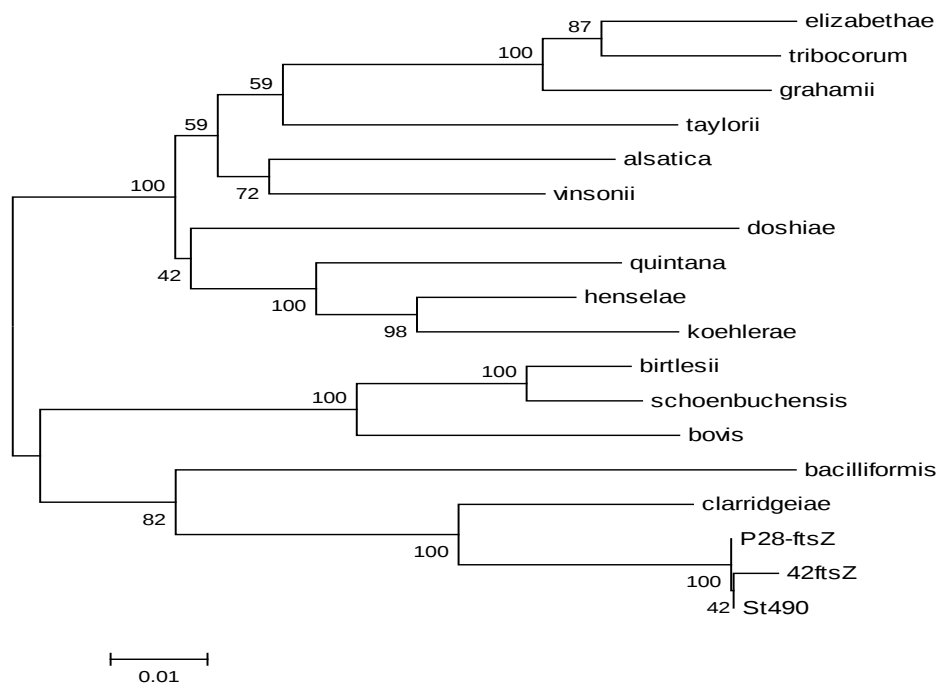


Рисунок 12 – Филогенетические взаимоотношения *Candidatus Bartonella rudakovii* (образцы P28, St42 и St490) и *Bartonella* sp. на основе фрагмента *ftsZ* гена (анализ проведен методом «объединения ближайших соседей»)

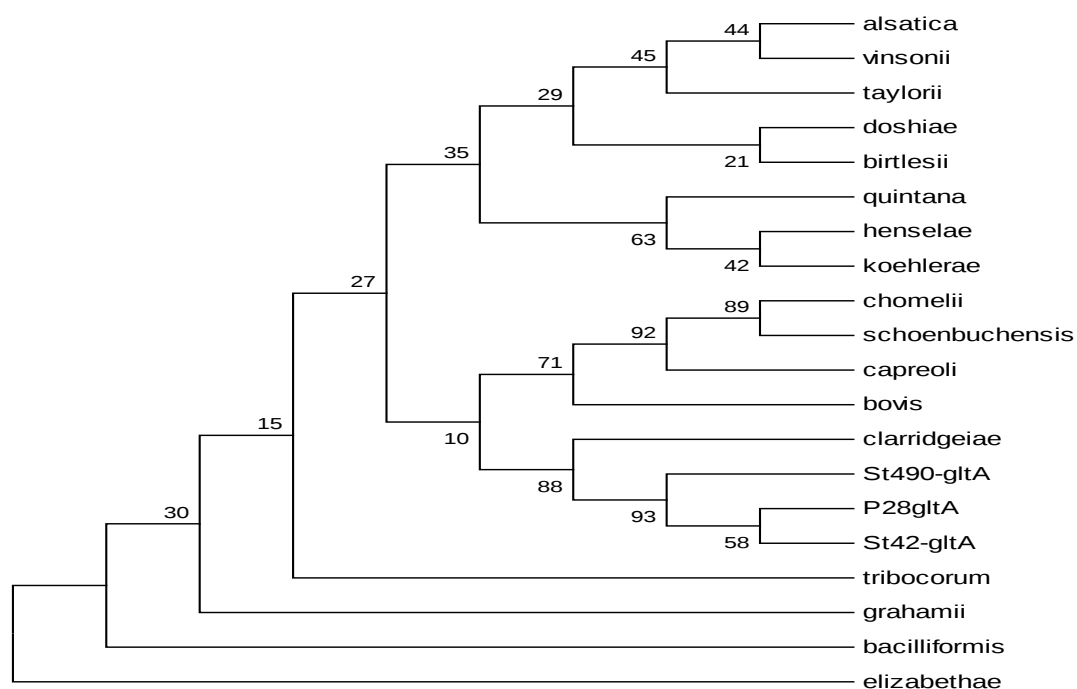


Рисунок 13 – Филогенетические взаимоотношения *Candidatus Bartonella rudakovii* (образцы P28, St42 и St490) и *Bartonella* sp. на основе на основе сиквенсов *gltA* гена (анализ проведен методом «объединения ближайших соседей»)

*B. bacilliformis*, *B. birtlesii*, *B. bovis* и *B. schoenbuchensis*. Данная филогенетическая позиция характеризуется высоким уровнем статистической поддержки (Рисунок 14).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей *gltA* гена новой бартоanelлы демонстрирует более низкий уровень поддержки кластеризации с *B. clarridgeiae*. На данном участке генома она формирует общий кластер с *B. bovis*, *B. capreoli*, *B. schoenbuchensis* и *B. chomelii*. Вероятной причиной этого может являться, на наш взгляд, как низкая консервативность используемых в анализе фрагментов *gltA* гена, так и недостаточность статистического материала для анализа (для некоторых видов *Bartonella* в базе данных NCBI GenBank *gltA* ген представлен только короткими фрагментами).

*B. clarridgeiae*, актуализируемый как возбудитель болезни кошачьей царапины (cat-scratch disease) и бациллярного ангиоматоза (bacillary angiomatosis), демонстрирует наибольшее генетическое родство с *Candidatus B. rudakovii* среди

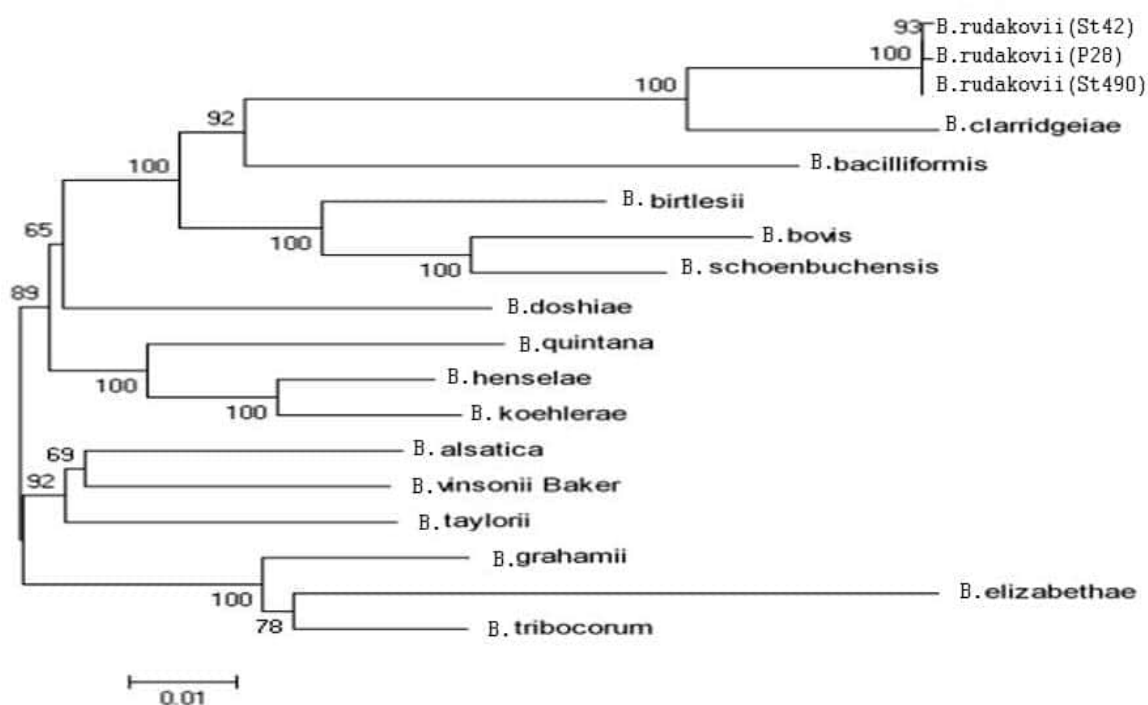


Рисунок 14 – Дендрограмма представляет филогенетические взаимоотношения зарегистрированных видов *Bartonella* и *Candidatus Bartonella rudakovii*

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

валидированных видов рода *Bartonella*. Окончательными хозяевами *B. clarridgeiae* являются домашние кошки, в то время как естественные резервуары и переносчики данного патогена пока не идентифицированы. Другие виды *Bartonella*, входящие в тот же кластер с *Candidatus B. rudakovii*, включают *B. bovis* и *B. schoenbuchensis*, для которых теплокровными хозяевами являются копытные млекопитающие. *B. birtlesii* ассоциируется с грызунами, а *B. bacilliformis* – патоген человека. Членистоногие выступают в роли переносчиков только для *B. bacilliformis*.

Детекция *Candidatus B. rudakovii* у представителей рода *Myodes*, обитающих в северной и южной лесостепных зонах Среднего Прииртышья в точках многолетних наблюдений, отстоящих друг от друга на значительном расстоянии, делает обоснованным предположение о широком распространении этой бартонеллы в данном регионе.

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 бартонеллезозов 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-синтетазу (*gltA*),  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoB*), белок клеточного деления (*ftsZ*).

## **ГЛАВА 6. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ МОНИТОРИНГУ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ РИККЕТСИОЗОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНО- БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

Эпидемиологический надзор как основа борьбы с инфекционными заболеваниями и их профилактики имеет давнюю историю. Однако формирование современной доктрины эпидемиологического надзора произошло во второй половине XX века. Существуют различные определения понятия «эпидемиологический надзор». Чешский исследователь Карел Рашка считал, что надзор — это «динамический процесс, включающий исследование экологии возбудителя инфекции, его хозяев, резервуаров и переносчиков, а также комплексных механизмов распространения инфекции» [358]. По определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) эпидемиологический надзор представляет собой систему, осуществляющую непрерывный и методичный сбор, анализ, оценку данных об инфекционных болезнях и обобщение поступающих материалов, а также распространение информации в виде эпидемиологических отчетов [308]. Позднее, в 80-х годах 20-го века, эпидемический процесс рассматривали как объект эпидемиологического надзора, который, в свою очередь, определяли как способ познания эпидпроцесса. Квинтэссенцию теоретической основы эпидемиологического надзора составляют теория механизма передачи возбудителей инфекции [14], теория природной очаговости [27] и теория саморегуляции эпидемического процесса [30]. По мнению В.Д. Белякова эпидемиологический надзор представляет собой «динамическую оценку состояния и тенденций развития эпидемического (и эпизоотического при зоонозах) процесса в пространстве и времени, обеспечивающую своевременное вмешательство в его ход с целью предупреждения инфекционных заболеваний, снижения инфекционной заболеваемости и ликвидации отдельных инфекций...» [7]. Б.Л. Черкасский рассматривает эпидемиологический надзор как инструмент, предназначенный для анализа и интерпретации данных о распространении

инфекционных заболеваний. Этот инструмент позволяет проводить оценку эпидемиологической ситуации на определённой территории, среди конкретных демографических групп и в определённый временной промежуток [37].

Эпидемиологический надзор представляет собой систему мероприятий, направленных на сбор, обработку, анализ и оценку информации, касающейся эпидемиологической и эпизоотической обстановки. На основе полученных данных осуществляется формулирование выводов и разработка практических рекомендаций по реализации профилактических и противоэпидемических мер. Кроме того, в рамках эпидемиологического надзора проводится прогнозирование потенциальных эпидемических рисков [36]. Эпидемиологический надзор включает в себя две подсистемы, которые обеспечивают его функционирование: подсистему информационного обеспечения и подсистему эпидемиологического анализа [6, 18]. Дальнейшее развитие системного подхода к управлению эпидемическим процессом получило в работах В.В. Далматова и его сотрудников [17, 16]. В предложенной ими системе управления инфекционной заболеваемостью населения информационная подсистема включает ряд информационных потоков, отражающих природу эпидемического процесса. Так, первые два потока содержат характеристику паразитарной системы – популяций паразита и хозяина. Третий поток «о факторах природной и социальной среды» - содержит информацию об условиях, влияющих на процесс формирования инфекционной заболеваемости.

Микробиологический мониторинг – это динамическая оценка циркуляции и биологических свойств возбудителя инфекционного заболевания [38]. Микробиологический и молекулярно-генетический мониторинги включают в себя получение данных о циркулирующих в природном очаге инфекционных агентах, их генетических и фенотипических (вирулентность, культуральные, биохимические и иммунологические свойства) характеристиках, а также дает возможность наблюдать и изучать изменения свойств патогенов, выявлять особенности эпидемического распространения ранее неизвестных и завозных разновидностей возбудителей. Таким образом, микробиологический мониторинг является приоритетным элементом информационной подсистемы эпидемиологического

надзора.

Повышению эффективности и качества микробиологического мониторинга способствует привлечение научных и научно-образовательных учреждений эпидемиологического и микробиологического профиля для организации и проведения исследований, выходящих за рамки стандартных задач ЦГиЭ и ЛПУ.

С развитием методов молекулярно-биологического анализа связано описание значительного количества новых видов риккетсий, которое мы наблюдаем с конца XX века. Кроме того, наблюдающиеся в последние годы изменения в сформировавшихся биоценозах, связанные с отчетливыми климатическими изменениями, оказывают влияние на заболеваемость людей природно-очаговыми инфекциями. Возможными последствиями потепления климата на заболеваемость клещевыми трансмиссивными риккетсиозами могут быть: рост численности переносчиков; рост агрессивности переносчиков; изменение сезонности передачи возбудителя; трансформация нозоареала [35].

Нами разработан «Алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов» (Рисунок 15), включающий четыре этапа, который защищен патентом на промышленный образец (№ 134323 от 01.12.22). Предложенный алгоритм предусматривает применение комплекса классических риккетсиологических, молекулярно-биологических и экспериментальных методов.

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 не исследованных 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



Рисунок 15 – Схема «Алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов»

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

мониторировании 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. После внутрибрюшинного заражения животных проводится термометрия и наблюдение за скротальной реакцией. Обращается внимание на наличие гиперемии, отёка мошонки и увеличения яичек, которые перестают вправляться в брюшную полость. При обнаружении клинических проявлений (лихорадка и скротальный феномен) проводится вскрытие животных с изъятием органов для дальнейшего пассирования на биологических моделях и исследования молекулярно-биологическими методами. Также небольшим кусочком ткани органа делаются мазки-отпечатки для микроскопии. В качестве материала, содержащего риккетсии, наибольший интерес представляют паховые лимфатические узлы, селезенка, яички и мозг. 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. Наиболее широко он применяется с целью накопления биомассы риккетсий, в том числе для приготовления диагностических препаратов. 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. Оптимальные условия культивирования, такие как температура и длительность инкубации, состав питательных сред, концентрация эмбриональной сыворотки, также требуют экспериментального изучения для каждого нового вида.

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 [5]. Уровень вертикальной передачи риккетсий (ТОП и ТПФ) в переносчике позволяет на протяжении нескольких поколений позволять 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. Нами отработана методика кормления преимагинальных форм клещей рода *Dermacentor* на трех видах полевок.

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.

Экспериментальное выявление нами феномена интерференции между *R. raoultii* и *R. sibirica* в клещах *D. marginatus* описано в главе 4. Заражение животных возможно как при кормлении на них микст-инфицированных клещей, так и парентерально.

Таким образом, предлагаемый нами алгоритм микробиологического мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов включающий четыре этапа: скрининг ДНК риккетсий в клещах и мелких диких млекопитающих; изучение видового разнообразия риккетсий, циркулирующих в очаге, в том числе в материале от больных; изучение биологических свойств риккетсий в популяции конкретного очага; изучение механизмов сохранения популяции риккетсий в очаге (в том числе изучение экологической связи риккетсий и переносчиков, изучение характера взаимодействия различных видов риккетсий с выявлением потенциальных синергетических и антагонистических взаимоотношений) позволяет в полном объеме получать адекватную информацию о состоянии природного очага и прогнозировать его развитие.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение методов молекулярной биологии на широком спектре объектов способствовало обнаружению новых видов риккетсий и выявлению значительного числа генотипов риккетсий, которые на текущий момент не обладают статусом валидированного вида. Эти генотипы имеют статус «*Candidatus*» и значительная часть их не культивируется на традиционных моделях. Это ставит перед исследователями новые задачи: необходимо проведение научно-исследовательских работ по изоляции штаммов, представляющих весь спектр циркулирующих в РФ риккетсий, изучение их свойств, поиск оптимальных моделей и экспериментальная отработка условий для культивирования и накопления биомассы новых инфекционных агентов, разработка препаратов для диагностики риккетсиозов, изучение роли новых представителей риккетсий в инфекционной патологии и особенностей клинических проявлений, вызываемых ими заболеваний.

Внедрение молекулярно-биологических методов изменило представления о классификации и таксономии риккетсий. Для разрешения подобных вопросов Специальный комитет по переоценке определения вида в бактериологии рекомендует использовать метод анализа нуклеотидных последовательностей, охватывающих не менее пяти генетических локусов, включая те, которые кодируют ключевые белки, имеющие фундаментальное значение для жизнедеятельности микроорганизмов. Конкретные генетические критерии для дифференциации риккетсий на уровне рода, вида и группы изложены в работе Fournier с соавторами (2003) [211]. Рекомендуется использовать для классификации риккетсий панбактериальные гены, кодирующие 16S rRNA (*rrs*) и цитратсинтазу (*glTA*), *Rickettsia* – специфические *OmpA* и *OmpB* гены и ген *D*, кодирующие поверхностные, высокомолекулярные белки rOmpA (190КД) и rOmpB (120 КД), PS120 (термостабильный цитоплазмальный белок) соответственно [211]. Для описания нового вида риккетсий недостаточно изучения генетических характеристик, необходимо наличие не менее 5 изолированных штаммов с изученными фенотипическими характеристиками. С участием автора описан

новый вид риккетсий группы КПЛ *R. raoultii*, включающий в себя три новых генотипа риккетсий: RpA4, DnS14 и DnS28. Эти риккетсиальные агенты формируют достоверный кластер внутри *Rickettsia massiliae* группы [309] и, так же, как и остальные представители данной группы отличаются от остальных представителей рода *Rickettsia* своей устойчивостью к рифампицину. Используемые в статье по описанию вида *R. raoultii* штаммы были выделены с использованием клещевой экспериментальной модели («Шайман», «Караганда-8/98», «Еланда-23/95») и культур клеток («Хабаровск», «Marne») из иксодовых клещей, собранных на территории России, Казахстана, Франции. Генотипическая и серотипическая специфичность штаммов *R. raoultii* подтверждают их классификацию в пределах отдельного вида [307]. Что касается реклассификации *R. raoultii* в категорию *R. conorii* subsp. *raoultii*, subsp. nov. на основании результатов филогенетического анализа гена 16S рРНК [56], мы считаем это весьма дискуссионным, по нашему мнению, критерии классификации видов риккетсий, предложенные ведущими риккетсиологами мира [307], являются более адекватными для рода *Rickettsia*.

Способность к культивированию является одним из необходимых условий для исследования микроорганизмов. Все биологические модели имеют свои преимущества и недостатки, с учетом их чувствительности к тестируемым микроорганизмам и стоимости, связанной с их использованием.

Нами изучена возможность изоляции и культивирования, а также изучения некоторых фенотипических характеристик штаммов риккетсий нового вида *R. raoultii* с использованием различных биологических моделей: как классических в риккетсиологической практике (морские свинки, куриные эмбрионы, культуры клеток), так и редко применяемой модели (экспериментальная клещевая модель).

Морские свинки (*Cavia porcellus*) была первоначальной животной моделью, разработанной для исследования риккетсий, вызывающих пятнистую лихорадку скалистых гор (ПЛСГ), и сыграли решающую роль в открытии риккетсий в 1906 году. Преимущество модели морских свинок для изучения переносимых клещами риккетсий обусловлено их базовой биологией: способностью заразиться

естественным путем через передачу риккетсий при кормлении клещей, возможностью повторного сбора образцов крови, способностью проявлять клинические признаки клещевого риккетсиоза, включая изменения, типичные для заболеваний человека, иммунным ответом, сходным с человеческим [240, 261, 271, 316, 320, 324, 326, 338, 372, 373].

Заражение самцов морских свинок штаммами *R. raoultii* проводили двумя способами: внутрибрюшинным введением суспензии инфицированных клещей на всех стадиях метаморфоза и кормлением инфицированных клещей на животных. Клиническая картина КСТ (повышение температуры и скротальный феномен) у инфицированных морских свинок и сероконверсия к антигенам *R. sibirica* не зафиксированы.

При внутрибрюшинном введении самцам морских свинок лиофильно высушенных штаммов «Караганда-8/9» (RpA4), «Еланда-23/95» (DnS28) и «Шайман» (DnS14) в концентрации  $3 \times 10^9$  микробных тел/мл у подопытных животных отмечалась умеренная лихорадка в более поздние сроки, чем при заражении *R. sibirica*. Скротальный феномен либо не наблюдался, либо был очень слабо выражен. Инфицирование животных посредством кормления на самцах морских свинок имаго (самка и самец) из лабораторных линий клещей, инфицированных генотипом RpA4 на фоне введения гидрокортизона у части животных, отмечалась слабо или умеренно выраженная патологоанатомическая картина клещевого риккетсиоза.

Предложенный Коксом метод культивирования в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов до сих пор остается актуальным [137, 138, 142], поскольку для большинства видов риккетсий он является более эффективным в отношении накопления биомассы риккетсий, по сравнению с биопробными животными [442]. Однако, при заражении куриных эмбрионов суспензиями из лиофильно высушенных штаммов *R. raoultii* нами на протяжении 3-х пассажей в РНИФ отмечалось незначительное накопление риккетсий: от единичных в препарате до 10 экземпляров в поле зрения, причем к третьему пассажу наблюдалось снижение количества риккетсий в поле зрения. Столь низкая

концентрация риккетсий не позволяет отнести развивающиеся куриные эмбрионы к адекватным моделям для культивирования *R. raoultii*.

В последние десятилетия был открыт целый ряд новых риккетсий, непатогенных для морских свинок и плохо культивируемых в развивающихся куриных эмбрионах, что привело к появлению новых подходов к изоляции и изучению этих микроорганизмов.

В настоящее время в риккетсиологической практике широко применяется выращивание возбудителя в культуре клеток, наиболее распространенным методом выделения риккетсий является метод культивирования клеток во флаконах (shell vial) [132, 222, 285, 434]. Эта техника на основе инокуляции клинических образцов на клеточный монослой, засеваемый в пробирку shell vial [268]. Нами была показана возможность культивирования штаммов *R. raoultii* в культурах клеток Vero и Нер-2. При культивировании культур клеток, зараженных штаммами, относящимися к генотипам RpA4, DnS28 и DnS14, 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.

В прошлом столетии как российские, так и зарубежные исследователи начали использовать клещей в качестве лабораторных моделей для некоторых микробиологических исследований. Клещи считаются основным резервуаром риккетсий группы КПЛ, это связано с их трансовариальной и трансфазовой передачей, а также длительным сохранением риккетсий в организме клеща. Исследования передачи, сохранения, инфекционности, вирулентности переносимых клещами возбудителей требуют использования живых клещей, выращенных в лаборатории, в качестве теплокровных прокормителей наиболее часто используются кролики, морские свинки или определенные породы белых мышей [14, 30, 32, 103, 106, 177, 184, 423,].

Нами было изучено распределение *R. raoultii* по органам переносчика, с этой целью были вскрыты частично напивавшиеся самки клещей *D. reticulatus* и *D. silvarum*, содержащих риккетсии генотипов RpA4 и DnS28. Методом

люминисцентной микроскопии нами обнаружены риккетсии в гемолимфе, слюнных железах, мальпигиевых сосудах и яичниках. Максимальная 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.

Количественная оценка уровней вертикальной (трансовариальной и трансовариальной) передачи инфекционного агента и изучение его влияния на организм переносчика также невозможны без использования лабораторных клещевых линий. По данным М. L. Niebylski с соавторами (1999) [312] трансовариальная передача *R. rickettsii* в клещах *D. andersoni* составила 39,0%, в лабораторных линиях клещей *Amblyomma patinoi* менее 50% инфицированных самок передавали *R. rickettsii* трансовариально, и лишь часть потомства была инфицирована [181].

Wright CL с соавторами (2015) [186] установили, что эффективность трансовариальной передачи *R. parkeri* в колонии *Amblyomma maculatum* Koch составила в среднем 83,7%, а частота трансстадиальной передачи приближалась к 100%.

Нами с использованием экспериментальной клещевой модели была показана возможность культивирования *R. raoultii* в лабораторных линиях клещей, изучены уровни трансовариальной и трансфазовой передачи *R. raoultii* – от 80% до 100% и от 82% до 100% соответственно. Нами определено накопление риккетсий в преимагинальных фазах переносчиков, и установлен феномен повышения концентрации риккетсий после питания голодных переносчиков.

На основании проведенного анализа можно сделать вывод о том, что для изоляции, культивирования и исследования фенотипических характеристик *R. raoultii* наиболее эффективными являются клеточные культуры и экспериментальная клещевая модель. Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о высокой результативности вышеупомянутых биологических моделей. Полученные нами данные свидетельствуют о высокой степени адаптации

*R. raoultii* ко всем четырем выбранным видам клещей рода *Dermacentor*: *D. nuttalli*, *D. silvarum*, *D. marginatus* и *D. reticulatus*. Обнаружение *R. raoultii* в яичниках самок иксодовых клещей подтверждает полученные нами данные об успешной вертикальной передачи 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 восприимчивой к риккетсиям группы КПЛ биологической моделью. Помимо этого, в процессе исследования тридцати образцов селезёнок белых мышей, которые были подвержены воздействию клещей, инфицированных *R. raoultii*, не было выявлено ДНК риккетсий при помощи метода полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, специфичных для гена цитратсинтазы (*gltA*).

Отсутствие у *R. rickettsii* способности проникать в эпителиальные и зародышевые клетки, которые уже были заражены *R. peacockii* ("east-side agent"), послужило основанием для предположения, что наличие конкурентных отношений между этими видами риккетсий ограничивает размножение *R. rickettsii* [106]. Лабораторные линии клещей необходимы при изучении взаимоотношений двух разных видов риккетсий в организме переносчика. Взаимоотношения *R. bellii* и *R. rickettsii* изучали с использованием лабораторной линии *Amblyomma dubitatum*, естественно инфицированной *R. bellii*. Личинки, нимфы и взрослые особи подвергались воздействию двух штаммов *R. rickettsii* путем кормления на морских свинках, зараженных парентерально. Установлено, что трансвариальная передача *R. rickettsii* у напивавшихся самок *A. dubitatum* была неэффективной, при этом 100% этих самок передали *R. bellii* трансвариально [184].

Macaluso с соавторами (2002) [409] на примере *R. montanensis* и *R. rhipicephali* исследовали способность *D. variabilis* поддерживать более одного вида эндосимбиотических риккетсий посредством трансвариальной передачи. Авторы пришли к выводу, что риккетсиозная инфекция яичников клещей может изменять молекулярную экспрессию ооцитов, исключая вторичную инфекцию другими

риккетсиями.

Нами с использованием КЭМ изучен характер взаимоотношений двух видов риккетсий, отличающихся по степени вирулентности: *R. sibirica* и *R. raoultii*. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии конкурентных взаимодействий между представителями группы КПЛ, наиболее часто встречающимися на территории Российской Федерации

Авирулентный для морских свинок вид *R. raoultii* имеет более широкое распространение на территории нашей страны по сравнению с *R. sibirica*. По всей видимости, циркуляция *R. raoultii* оказывает ограничивающее воздействие на распространение вирулентной *R. sibirica*.

На основании данных, полученных в результате проведения полевых и лабораторных исследований, можно сделать правомерные выводы, что иксодовые клещи являются не только вектором, но и основным резервуаром *R. raoultii*, а высокий уровень трансвариальной и трансфазовой передачи на протяжении 5 – 7 поколений при кормлении переносчиков на неамплифицирующих *R. raoultii* животных (беспородные белые мыши) свидетельствует также о возможности сохранения популяции этого вида риккетсий в очаге за счет только вертикальной передачи.

В 2003 году в России в клещах *I. persulcatus* описан новый генотип риккетсий – *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* [108]. Полученные нуклеотидные последовательности гена 16S рибосомальной РНК и гена цитратсинтазы (*glta*) при сравнении их с имеющимися в NCBI GenBank показали свою уникальность и имели наибольший процент гомологии с *R. canadensis*. Нами установлено, что *Candidatus R. tarasevichiae* успешно культивируется с использованием культуры клеток Vero, так же, как и другие представители предковой группы [393], а также изучены особенности культивирования этой риккетсии. Фенотипические свойства *Candidatus R. tarasevichiae* в настоящее время описаны не полностью.

В рамках проведённого исследования была предпринята попытка экспериментального инфицирования морских свинок бактерией *Candidatus R. tarasevichiae* с использованием различных дозровок инфекционного агента, в том

числе с гидрокортизоном. У животных наблюдалось умеренное повышение температуры до 39,6°C при применении гидрокортизона, с фебрильной реакцией на 9–10-й день. Скротальный феномен либо был выражен в минимальной степени, либо не был выявлен вовсе. Патоморфологически наблюдаются спленомегалия, гепатомегалия, орхит, гиперемия головного мозга и его оболочек. При исследовании методом световой микроскопии с окраской по методу Здродовского незначительное накопление риккетсий наблюдали в мазках из лимфатических узлов, влагиалищных оболочек яичек и легких, в селезёнке найдено до 15 риккетсий в поле зрения, в мозге — более 50. Наши данные свидетельствуют о том, что для *Candidatus R. tarasevichiae* характерна низкая патогенность для морских свинок как и для *R. canadensis*.

В рамках данного исследования был проведен эксперимент, направленный на оценку возможности использования сосунков беспородных белых мышей для изоляции микроорганизма *Candidatus R. tarasevichiae*. Для этого мы инфицировали вышеупомянутых мышей суспензией клещей лабораторной линии *I. persulcatus*, применяя интрацеребральный или подкожный метод введения. Максимальная концентрация ДНК риккетсий в РТ ПЦР выявлено на 30-м цикле в мозге и селезенке у сосунков, зараженных интрацеребрально на 4-й день после заражения. Перевод на РКЭ материала от этих животных не удался из-за контаминации посторонней микрофлорой.

С использованием экспериментальной клещевой модели установлен высокий уровень трансвариальной передачи (66 – 100%) *Candidatus R. tarasevichiae* в лабораторных линиях клещей *I. persulcatus*, родительские особи которых были естественно инфицированы данной риккетсией в природе. Высокий уровень трансвариальной передачи - 100% другого представителя предковой группы, *R. bellii* ранее был выявлен в эксперименте с лабораторными линиями *A. dubitatum* [184].

Антитела к риккетсиям клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и сыпного тифа (СТ) перекрестно реагируют с *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. Ранее

аналогичные перекрестные реакции риккетсий предковой группы с представителями групп КПЛ и СТ уже были описаны в литературе [393].

Таким образом, оптимальные условия для изоляции и культивирования *Candidatus R. tarasevichiae* наиболее полноценно обеспечивает использование клеточных культур и КЭМ. Самцы морских свинок, инфицированные этой риккетсией, демонстрируют минимальное проявление скротального феномена, но эту модель не следует полностью исключать из исследований. Рекомендуется провести дополнительные эксперименты с иммуносупрессивными препаратами, такими как кортикостероиды, для оптимизации условий культивирования. Мы полагаем, что использование беспородных белых мышей в качестве модельных организмов для выделения штаммов *Candidatus R. tarasevichiae* не соответствует оптимальным стандартам. В настоящее время у нас недостаточно данных, чтобы сделать однозначный вывод относительно целесообразности использования куриных эмбрионов для культивирования указанной риккетсии.

В последние годы наблюдается значительное поступательное движение в исследовании таксономического разнообразия риккетсий, вызывающих клещевые пятнистые лихорадки. Это позволяет иначе взглянуть на проблему клещевых риккетсиозов в России, учитывая, что роль ряда новых видов риккетсий в инфекционной патологии окончательно не установлена.

Нами выявлены клинические проявления после присасывания клещей *D. reticulatus* инфицированных *R. raoultii* (региональный лимфаденит и эритематозная реакция в месте присасывания клеща) при отрицательных результатах серологических и молекулярно-биологических исследований на наличие вирусу КЭ и боррелий группы ИКБ. Кроме того, выявлены антитела к *R. raoultii* у пациентов, заболевших после присасывания клеща, при отрицательной реакции с антигеном *R. sibirica* [28].

Во Франции и Испании у пациентов с синдромом TIBOLA / DEBONEL ДНК *R. raoultii* была обнаружена в снятом клеще и в крови больного [367]. В Центральной Европе у пациентов после присасывания клещей *D. reticulatus*, инфицированных *R. raoultii*, наблюдались гриппоподобные симптомы, которые

включали лихорадку, головную боль, недомогание, мышечную боль и лимфаденопатия в области шеи [369]. Клинический случай с неврологическими нарушениями, вызванный *R. raoultii*, описан в Китае [40].

Поскольку клинические симптомы инфекции, вызываемой *R. raoultii*, выражены существенно слабее, чем при СКТ, они часто проходят мимо внимания практических врачей в нашей стране, в том числе и синдром TIBOLA. До сих пор в историях болезни можно встретить определение «реакция на укус клеща», наша практика показывает, что часть этих проблем со здоровьем ассоциирована с риккетсиями, что показано нами на примере пациентов из Омской области.

В результате проведенных нами исследований установлена этиология заболевания четырехлетнего ребенка после присасывания клеща и закончившегося летальным исходом в Красноярском крае. Через четыре дня после обнаружения присосавшегося клеща за левым ухом девочку поместили в Идринскую районную больницу. У пациентки наблюдались следующие клинические проявления: гипертермия до 39,5°C, цефалгия, выраженная астения и экзантема на верхних конечностях. На основании данных анамнеза, клинической картины и результатов лабораторных исследований предварительный диагноз был установлен как клещевой риккетсиоз в тяжелой форме.

Результаты патологоанатомического исследования, включающего аутопсию, а также данные гистологического анализа, позволили подтвердить клинический диагноз клещевого риккетсиоза. В ходе аутопсии были выявлены такие патологические изменения, как гепатоспленомегалия, отёк мозга, ставший непосредственной причиной смерти. Гистологическое исследование показало наличие продуктивного васкулита головного и спинного мозга, кожи, а также полиморфно-клеточных периваскулярных инфильтратов в печени и лёгких. Кроме того, были обнаружены серозный менингит, миелоидная гиперплазия селезёнки и лимфатических узлов, а также интерстициальная лимфоидная инфильтрация в миокарде.

В рамках исследования, проведенного в референс-центре ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций», были проанализированы образцы крови и головного мозга, полученные в ходе аутопсии. В результате молекулярно-биологического анализа были идентифицированы два различных вида риккетсий: *R. sibirica* subsp. *sibirica* и *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. Для детекции и идентификации ДНК использовался метод вложенной полимеразной цепной реакции (nested-ПЦР) в сочетании с последующим секвенированием ампликонов. В процессе исследования другие патогены, передаваемые клещами, а также кишечные вирусы, которые могут вызывать менингеальный синдром, не были обнаружены.

Ранее в Китае было зарегистрировано летальное течение менингита, обусловленного *Candidatus R. tarasevichiae* [233]. Впоследствии был зафиксировано 61 случай данной инфекции, из которых 8 завершились летальным исходом. У всех умерших выявлена коинфекция буньявирусом рода *Phlebovirus* [109].

Впервые в России зарегистрирован случай летального риккетсиоза, вызванного *Candidatus R. tarasevichiae*, ранее выявленным в клещах *Ixodes persulcatus* в различных регионах их естественного ареала. Кроме того, зафиксирован первый случай смешанной инфекции, спровоцированной одновременным присутствием *R. sibirica* и *Candidatus R. tarasevichiae*. Предполагается, что смешанная инфекция может быть причиной более тяжёлого течения заболевания по сравнению с моноинфекцией, вызванной *Candidatus R. tarasevichiae*.

Природные и антропогенные факторы влияют на стабильность очагов КР, что приводит к угасанию отдельных очагов и формированию новых [27]. В Омской области до недавнего времени случаи СКТ не регистрировались, однако начиная с 2003 г. в Называевском районе зарегистрированы случаи заболеваний, связанных с присасыванием клещей, которые проявляются клинической картиной, характерной для сыпного клещевого тифа (СКТ). Среди симптомов отмечают первичный аффект в месте укуса, лихорадочное состояние, головная боль, астения, а также розеолезная или розеолезно-петехиальная экзантема.

В период с 2003 по 2015 год в центральную районную больницу Называевского района было госпитализировано 154 человека из 13 населённых пунктов с симптомами, соответствующими клинической картине КР. У взрослых пациентов чаще всего выявлялась средняя степень тяжести заболевания, в то время как у детей и молодых людей преобладала лёгкая форма.

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 году впервые подтверждён серологически диагноз клещевой сибирский тиф (СКТ) с использованием РСК с антигеном *R. sibirica*. С 2013 года в ЦРБ регулярно фиксируется сероконверсия к риккетсиям, с преобладанием антител в низких титрах. При исследовании полевых сборов клещей, биоптатов и переносчиков, снятых с людей, постоянно проживающих в Называевском районе, методом ПЦР обнаружена ДНК риккетсий. Из клещей *Dermacentor*, снятых с людей, выделены фрагменты гена *ompA*, принадлежащие *R. raoultii*. В органах подопытных животных, инфицированных *D. marginatus* из Кисляки, молекулярно-биологическими методами идентифицирована *R. sibirica*.

Таким образом, нами с использованием комплекса серологических и молекулярно-биологических методов подтверждено наличие природного очага риккетсиоза с циркуляцией двух видов риккетсий группы КПЛ: классического патогена *R. sibirica* и нового патогена *R. raoultii*. Сложности, связанные с изоляцией штаммов *R. sibirica*, а также превалирование у пациентов сероконверсии в низких титрах, свидетельствуют в пользу гипотезы о доминировании на периферии нозоареала СКТ штаммов риккетсий, которые характеризуются пониженной способностью вызывать иммунный ответ и вызывать заболевание [27].

Остается малоизученным вопрос о роли теплокровных хозяев в поддержании циркуляции альфа-протеобактерий в природных очагах зоонозных инфекций.

Значение диких млекопитающих в распространении *R. sibirica* в природных очагах давно установлено. Что касается новых представителей риккетсий: *R.*

*raoultii* и *Candidatus R. tarasevichiae* - в настоящее время известны их членистоногие переносчики, но отсутствуют данные о резервуарной роли теплокровных животных в их жизненном цикле. Чтобы восполнить этот недостаток информации, мы провели исследование ДНК риккетсий в органах 175 экземпляров мелких диких млекопитающих, которые были отловлены в двух точках многолетних наблюдений в северной и южной лесостепи Омской области.

В результате проведения ПЦР с использованием специфических праймеров для амплификации гена *gltA* риккетсий, были получены положительные результаты для трёх образцов селезёнки полевок-экономок. Последующий сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *gltA* и 16S рРНК показал, что уровень генетического сходства анализируемых образцов с валидированными видами риккетсий по локусам генов *gltA* и 16S рРНК оказался ниже, чем установлено внутри одного вида [211]. Данный факт позволяет сделать вывод о том, что исследуемые образцы не относятся ни к одному из ранее описанных видов риккетсий.

Более того, согласно принятым научным сообществом критериям, опубликованным в статье “Naming of Rickettsiae and Rickettsial Diseases” [307], исследуемая новая бактерия относится к роду *Rickettsia* в том случае, если имеет не менее чем с одним из утвержденных видов риккетсий уровень гомологии по гену 16S rRNA > 98,1% и по гену *gltA* > 86,5%. На дендрограммах, построенных с помощью метода «ближайшего соседа», видно, что исследуемые образцы филогенетически наиболее близки к риккетсиям предковой группы и являются представителями семейства *Rickettsiaceae*. 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.

Нами проведено исследование, целью которого было изучение генетического разнообразия бактерий рода *Bartonella*. Для этого был осуществлен скрининг ДНК

данных микроорганизмов с праймерами UrBarto1 и UrBarto2 в образцах селезёнки диких мелких млекопитающих, отловленных в Омской области. Для генетической идентификации продуктов амплификации проведено секвенирование с теми же праймерами. Эти образцы также использовались в качестве материала для изучения разнообразия риккетсий. В северной лесостепи ДНК бартонелл выявлена у  $7.6 \pm 2.3\%$  исследованных зверьков, в южной -  $24.4 \pm 6.4\%$ . И в южной, и северной лесостепи ДНК бартонелл обнаружена только в органах представителей рода *Myodes*. В результате анализа нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера 16S-23S рибосомальных РНК были выявлены последовательности, близкие к видам *Bartonella grahamii* и *Bartonella taylorii*, а также последовательности, демонстрирующие уровень дивергенции, превышающий порог, установленный для внутривидовых различий. Это позволяет предположить, что некоторые из выявленных последовательностей могут принадлежать к неизвестным ранее видам бартонелл.

Положительные результаты при молекулярном скрининге бартонелл в снятых с людей переносчиках с использованием праймеров UrBarto1 и UrBarto2 в 2014-2016 гг. получены в  $3.5 \pm 0.8\%$  случаев. В снятых с людей в 2023 г. переносчиках ДНК бартонелл не выявлена.

Видовую принадлежность образцов P28, St42 и St490, которые демонстрировали уровень дивергенции с валидированными видами бартонелл, превышающий принятый для внутривидовых различий, определяли с применением мультилокусного анализа по генам, кодирующим 16S рРНК (*rrs*), цитрат-синтазу (*gltA*),  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoB*), белок клеточного деления (*ftsZ*) и специфичные для бартонелл участки 16S-23S межгенной спейсерной области (*ITS*) как описано ранее [97, 232, 446, 471, 489]. Позиционирование данных образцов ДНК в систематической классификации было осуществлено на основании генотипических характеристик, предложенных L. Scola и соавторами для идентификации видов рода *Bartonella*. [212]. На основании принятых критериев, установленный уровень сходства анализируемых изолятов с валидированными

видами позволяет классифицировать представленные изоляты как представителей нового вида, который мы назвали *Candidatus B. rudakovii*

*B. clarridgeiae*, актуализируемый как возбудитель болезни кошачьей царапины (cat-scratch disease) и бациллярного ангиоматоза (bacillary angiomatosis), демонстрирует наибольшее генетическое родство с *Candidatus B. rudakovii* среди валидированных видов рода *Bartonella*. Детекция *Candidatus B. rudakovii* у представителей рода *Myodes*, обитающих в северной и южной лесостепных зонах Среднего Прииртышья в точках многолетних наблюдений, отстоящих друг от друга на значительном расстоянии, делает обоснованным предположение о широком распространении этой бартонеллы в данном регионе.

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.

Микробиологический мониторинг – это динамическая оценка циркуляции биологических свойств возбудителя инфекционного заболевания. 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. Таким образом, микробиологический мониторинг является важнейшим компонентом информационной подсистемы эпидемиологического надзора.

Мы предлагаем новый подход к мониторингу природных очагов клещевых риккетсиозов, использующий комплекс классических риккетсиологических, молекулярно-биологических и экспериментальных методов.

На первом этапе (особенно это касается не исследованных ранее территорий) мы рекомендуем **скрининг ДНК риккетсий в клещах и мелких диких млекопитающих** с применением ПЦР РТ с использованием тест-системы

«РеалБест ДНК *Rickettsia species*» либо ПЦР с детекцией в электрофоретическом геле с использованием праймеров к гену *gltA*.

При выявлении ДНК риккетсий на втором этапе мониторинга проводится **изучение видового разнообразия риккетсий, циркулирующих в очаге**. Объектами исследования на данном этапе кроме клещей и мелких диких млекопитающих являются также образцы крови и биоптаты от больных с клиническими проявлениями КР. С этой целью необходимо проводить ПЦР с праймерами, амплифицирующими 5 house-keeping генами: *gltA*, *ompA*, *ompB*, 16S rRNA, *sca4* [211] с последующим секвенированием по Сэнгеру.

Всестороннее изучение очага невозможно без изоляции штаммов риккетсий. С целью изоляции риккетсий оптимально использовать метод биопробы на самцах морских свинок для патогенных видов и культуры клеток для риккетсий с низкой вирулентностью или видов (кандидатов в новые виды) с неустановленной патогенностью. Идентификацию выделенных штаммов следует проводить по вышеупомянутым house-keeping генам.

Следующим этапом мы предлагаем проводить **изучение биологических свойств риккетсий в популяции конкретного очага**, которое включает, в первую очередь, исследование вирулентности изолированных штаммов для морских свинок [28]. Также мы считаем обоснованным включение способности новых видов риккетсий культивироваться в куриных эмбрионах в алгоритм мониторинга очагов КР.

Изучение особенностей культивирования изолированных в очаге штаммов включает определение адекватных для различных видов риккетсий культур клеток, а также экспериментальный подбор оптимальных параметров культивирования [129, 249]. При выявлении в результате секвенирования по 5 house-keeping генам отличий от известных видов целесообразно выполнять полногеномное секвенирование и филогенетический анализ.

И, наконец, последним этапом мониторинга мы предлагаем проводить **изучение механизмов сохранения популяции риккетсий в очаге**. Риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами с широким кругом хозяев –

кровеносных 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. Для определения является ли конкретный вид иксодид компетентным вектором, мы предлагаем проводить изучение экологической связи риккетсий и переносчиков с использованием клещевой экспериментальной модели, а именно: определение ТОП и ТФП в голодном состоянии и после кормления на лабораторных животных, как амплифицирующих, так и неамплифицирующих риккетсий. Эффективность трансвариальной и трансфазовой передачи при использовании неамплифицирующих теплокровных прокормителей переносчиков позволяет сделать вывод о возможности сохранения в очаге популяции определенного вида риккетсий только за счет вертикальной передачи.

Роль мелких диких млекопитающих в сохранении популяции риккетсий в очаге напрямую зависит от длительности риккетсемии в их организмах. Оптимально изучать этот процесс с использованием клещевой экспериментальной модели, подсаживая на животное зараженных клещей для кормления. При отсутствии такой возможности допустимо парентеральное заражение животных.

Клещевая экспериментальная модель также позволяет изучать взаимодействие различных видов риккетсий и других клещевых патогенов в организме переносчика и в организме теплокровного прокормителя. Изучение межмикробных взаимодействий на разных стадиях развития клещей позволяет выявлять потенциальные синергетические и антагонистические взаимодействия между бактериальными сообществами.

## 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 бартонеллезов 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 СОКРАЩЕНИЙ

- АлАТ – аланинаминотрансфераза
- АПЛ – Астраханская пятнистая лихорадка
- АсАТ – аспаргатаминотрансфераза
- ГАЧ – гранулоцитарный анаплазмоз человека
- ИКБ – иксодовые клещевые боррелиозы
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КПЛ – группа клещевой пятнистой лихорадки
- КР – клещевой риккетсиоз
- КСТ – клещевой сыпной тиф
- КЭ – клещевой энцефалит
- КЭМ – клещевая экспериментальная модель
- ЛПС – липополисахарид
- МКА – моноклональные антитела
- МФА – метод флюоресцирующих антител
- МЭЧ – моноцитарный эрлихиоз человека
- ПДРФ аДНК ПЦР – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированной в полимеразной цепной реакции ДНК
- ПКА – поликлональные антитела
- ПЛСГ – пятнистая лихорадка Скалистых гор
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНИФ – реакция непрямой флюоресценции
- РСК – реакция связывания комплемента
- СТ – сыпной тиф
- ТОП – трансвариальная передача
- ТПФ – трансфазовая передача
- ФО – федеральный округ
- DEBONEL – Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy
- DL50 (ЛД<sub>50</sub>) – летальная доза, при которой погибает половина подопытных

животны174

*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 – «лимфаденопатия после присасывания клеща»

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ фауны мелких млекопитающих Омской области. Сообщение 2. Особенности биотопического распределения мелких млекопитающих в различных ландшафтах / М. Г. Малькова, В. В. Якименко, А. К. Танцев, А. В. Вахрушев. – Текст : непосредственный // Естественные науки и экология : ежегодник ОмГПУ. – Омск, 1998. – Вып. 3: Фауна и экология иксодовых клещей Западной Сибири. – С. 226-233.
2. Балашов, Ю. С. Взаимоотношения иксодовых клещей (*Ixodidae*) с возбудителями трансмиссивных инфекций позвоночных животных / Ю. С. Балашов. – Текст : непосредственный // Паразитология. – 1995. – Т. 29, № 5. – С. 337.
3. Бартонеллез (болезнь кошачьих царапин) у детей / Л. Н. Мазанкова, Ф. С. Харламова, И. М. Османов [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 112–117.
4. Бартонеллез у детей / Ф. С. Харламова, Н. А. Гусева, Н. Ю. Егорова [и др.]. – Текст : непосредственный // Детские инфекции. – 2011. – № 4. – С. 9–14.
5. Беклемишев, В. Н. К эпидемиологии поражающих человека трансмиссивных болезней диких животных. Комплексы сопряженных очагов, природных и внутриселенных / В. Н. Беклемишев. – Текст : непосредственный // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 1961. – Т. 30, № 4. – 387-393.
6. Беляков, В. Д. Окружающая среда и эпидемиологический процесс / В. Д. Беляков. – Текст : непосредственный // Вестник Академии медицинских наук СССР. – 1981. – № 3. – С. 80-85.
7. Беляков, В. Д. Эпидемиологический надзор – основа современной организации противоэпидемической работы / В. Д. Беляков. – Текст : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1985. – № 5. – С. 53-58.

8. Вожакина, Н. В. Восприимчивость и чувствительность краснощеких сусликов, полевых мышей, красных сибирских полевков и узкочерепных полевков к возбудителю клещевого сыпного тифа Северной Азии / Н. В. Вожакина. – Текст : непосредственный // Природноочаговые болезни : материалы научной конференции. – Тюмень, 1963. – С. 132-134.
9. Выявление антител к бартоanelлам у больных с лимфаденитами в Омской области / Г. В. Березкина, О. А. Колот, О. П. Мурзина [и др.]. – Текст : непосредственный // Журнал инфекционной патологии. – 2010. – Т. 17, № 3. – С. 164.
10. Выявление методом ПЦР возбудителей природно-очаговых инфекций, переносимых клещами, на полуострове Камчатка / Н. М. Пуховская, В. А. Рар, Л. И. Иванов [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – № 4. – С. 36-39.
11. Генетические варианты риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки из различных эпидемически активных очагов / Т. П. Микрюкова, М. Ю. Карташов, Е. В. Протопопова [и др.]. – Текст : непосредственный // IV Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням. – Москва, 2012. – С. 249.
12. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах / Е. В. Чаусов, В. А. Терновой, Е. В. Протопопова [и др.]. – Текст : непосредственный // Паразитология. – 2009. – Т. 43, № 5. – С. 374–388.
13. Громашевский, Л. В. Механизмы передачи инфекции (учение о механизме передачи возбудителей инфекционных болезней и его значение в эпидемиологии) / Л. В. Громашевский. – Киев : МЕДГИЗ УССР, 1958. – 332 с. – Текст : непосредственный.
14. Гроховская, И. М. Восприимчивость клещей надсемейства *Ixodoidea* к риккетсиям Провачека / И. М. Гроховская, В. Ф. Игнатович, В. Е. Сидоров. – Текст : непосредственный // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 1966. – Т. 35, № 3. – С. 299-304.

15. Далматов, В. В. Современная эпидемиология: предмет, метод, цель / В. В. Далматов, В. Л. Стасенко. – Текст : непосредственный // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2008. – № 5. – С. 8-14.
16. Далматов, В. В. Эпидемиологический надзор за инфекциями с широким диапазоном клинического проявления: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Далматов Виктор Васильевич. – Омск, 1987. – 226 с.
17. Дегтярев, А. А. Основы эпидемиологического анализа : учебное пособие / А. А. Дегтярев ; под ред. В. Д. Белякова. – Ленинград : ВМА, 1982. – 284 с. – Текст : непосредственный.
18. Детекция ДНК бартоanelл в иксодовых клещах, комарах и в крови больных в Новосибирской области / О. В. Морозова, Л. В. Петрожицкая, Н. Я. Черноусова [и др.]. – Текст : непосредственный // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 1. – С. 106-110.
19. Здродовский, П. Ф. Систематика и сравнительная характеристика эндемичных риккетсиозов / П. Ф. Здродовский. – Текст : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1949. – № 10. – С. 19-28.
20. Здродовский, П. Ф. Учение о риккетсиях и риккетсиозах / П. Ф. Здродовский, Е. М. Голиневич. – 3-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина 1972. – 496 с. – Текст : непосредственный.
21. Комплексное выявление возбудителей природно-очаговых инфекций методом ПЦР в снятых с людей переносчиках в Омской области / Г. В. Березкина, С. В. Штрек, С. Ю. Зеликман [и др.] // Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости человека : материалы научно-практической конференции с международным участием. – Омск, 2016. – С. 78-85. – (Национальные приоритеты России ; спец. вып. № 4(22)).
22. Малькова, М. Г. Биотопическое распределение и динамика численности мелких млекопитающих - носителей возбудителей природноочаговых заболеваний в северной лесостепи Омской области / М. Г. Малькова, А. К. Танцев, А. В. Вахрушев // Природноочаговые болезни человека : республиканский сборник научных работ. – Омск, 1996. – С. 259-266.

23. Мелкие млекопитающие как резервуарные хозяева бактерий рода *Bartonella* на юге Московской области / А. П. Марков, И. В. Лопырев, А. И. Ирхин [и др.]. – Текст : непосредственный // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2006. – № 4. – С. 8-12.
24. Молекулярно-генетические методы типирования бартонелл / М. Ю. Кириллов, А. П. Марков, И. В. Лопырев [и др.]. – Текст : непосредственный // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2007. – № 1. – С. 8 -15.
25. Морозова, О. В. Детекция ДНК бартонелл методом двухраундовой ПЦР у пациентов после укусов клещами в Новосибирской области / О. В. Морозова, Н. Я. Черноусова, И. В. Морозов. – Текст : непосредственный // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2005. – № 4. – С. 14-16.
26. Павловский, Е. Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов / Е. Н. Павловский. – Москва; Ленинград : Наука, 1964. – 211 с. – Текст : непосредственный.
27. Рудаков, Н. В. Клещевой риккетсиоз / Н. В. Рудаков, А. С. Оберт. – Омск, 2001. – 120 с. – Текст : непосредственный.
28. Рудаков, Н. В. Риккетсии и риккетсиозы: руководство для врачей / Н. В. Рудаков. – Омск: ООО «Издательский центр «Омский научный вестник», 2016. – 424 с. – Текст : непосредственный.
29. Саморегуляция паразитарных систем: (молекулярно-генетические механизмы) / В. Д. Беляков, Д. Б. Голубев, Г. Д. Каминский, В. В. Тец. – Ленинград : Медицина, 1987. – 240 с. – Текст : непосредственный.
30. Сидоров, В. Е. Поддержание штаммов риккетсий *Dermacentroxenus sibiricus* в клещах *Ornithodoros lahorensis* Neumann / В. Е. Сидоров, И. М. Гроховская, В. Н. Крючечников. – Текст : непосредственный // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 1967. – Т. 36, № 3. – С. 323-327.
31. Сидоров, В. Е. Полость тела аргасовых клещей как среда обитания спирохет и бруцелл / В. Е. Сидоров. – Текст : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1960. – Т. 31, № 6. – С. 91-97.

32. Сидоров, В. Е. Распределение риккетсий *Dermacentroxenus sibiricus* в организме клещей *Alveonassus canesfrini* Bir. (*Argasidae, Ixodoidca*) / В. Е. Сидоров, В. Н. Крючечников. – Текст : непосредственный // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 1968. – Т. 37, № 3. – С. 303-313.
33. Тагильцев, А. А. Изучение членистоногих убежищного комплекса в природных очагах трансмиссивных вирусных инфекций : руководство по работе в полевых и лабораторных условиях / А. А. Тагильцев, Л. Н. Тарасевич, И. И. Богданов, В. В. Якименко. – Томск. – 1990. – 106 с. – Текст : непосредственный.
34. Тарасевич, И. В. Клещевые риккетсиозы и климат / И. В. Тарасевич, Н. Ф. Фетисова, А. И. Ковтунов. – Текст : непосредственный // Изменение климата и здоровье населения России в XXI веке : сборник материалов международного семинара / под ред. Н. Ф. Измерова [и др.]. – Москва, 2004. – С. 138-143.
35. Черкасский, Б. Л. Современные представления о системе управления эпидемическим процессом / Б. Л. Черкасский, Е. Г. Симонова. – Текст : непосредственный // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2006. – № 5. – С. 4-7.
36. Черкасский, Б. Л. Эпидемиологический надзор / Б. Л. Черкасский. – Москва : Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000. – 24 с. Текст : непосредственный
37. Шкарин, В. В. Термины и определения в эпидемиологии / В. В. Шкарин, А. С. Благоданова. – Нижний Новгород : Издательство НГМА, 2015. – 320 с. – Текст : непосредственный
38. A case of Carrion's disease associated with human sacrifice from the Huari culture of Southern Peru / M. J. Allison, A. Pezzia, E. Gerszten, D. Mendoza // American Journal of Physical Anthropology. – 1974. – Vol. 41, № 2. – P. 295-300.
39. A case of tick-transmitted lymphadenopathy in Bulgaria associated with *Rickettsia slovaca* / R. Komitova, A. Lakos, A. Aleksandrov [et al.] - Text : unmediated // Scandinavian Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 35, № 3. – P. 213.

40. A case with neurological abnormalities caused by *Rickettsia raoultii* in northwestern China / Z. Dong, Y. Yang, Q. Wang [et al.]. – Text : electronic // BMC Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 19. – Article number 796. – URL: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4414-4>. – Publication date: 11.09.2019.
41. A murine model of infection with *Rickettsia prowazekii*: implications for pathogenesis of epidemic typhus / Y. Bechah, C. Capo, G. E. Grau [et al.]. – Text : unmediated // Microbes and Infection. – 2007. – Vol. 9, № 7. – P. 898–906.
42. A new spotted fever group rickettsia from the lone star tick, *Amblyomma americanum* / W. Burgdorfer, S. F. Hayes, L. A. Thomas, J. L. Lancaster. – Text : unmediated // Rickettsia and Rickettsial Diseases. – New York : Academic Press, 1981. – P. 595-609.
43. A new tick-borne disease due to *Rickettsia slovaca* / D. Raoult, P. Berbis, V. Roux [et al.]. – Text : unmediated // Lancet. – 1997. – Vol. 350, № 9071. – P. 112-113.
44. A novel and naturally occurring transposon, ISRpe1 in the *Rickettsia peacockii* genome disrupting the *rickA* gene involved in Azad actin-based motility / J. A. Simser, M. S. Rahman, S. M. Dreher-Lesnick, A. F. - Text : unmediated // Molecular Microbiology. – 2005. – Vol. 58, № 1. – P. 71-79.
45. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae* / J. C. García-García, A. Portillo, M. J. Núñez [et al.]. - Text : unmediated // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2010. – Vol. 82, № 4. – P. 691-692.
46. A patient with Japanese spotted fever complicated by meningoencephalitis / K. Kodama, T. Senba, H. Yamauchi [et al.]. - Text : unmediated // Kansenshogaku Zasshi. – 2001. – Vol. 75, № 9. – P. 812–814.
47. A *Rickettsia* genome overrun by mobile genetic elements provides insight into the acquisition of genes characteristic of an obligate intracellular lifestyle / J. J. Gillespie, V. Joardar, K. P. Williams [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Bacteriology. – 2012. – Vol. 194, № 2. – P. 376–394.

48. A single immunogenicity assay for testing potency of combination DTaP vaccines: Simultaneous quantitation of anti-DT, anti-TT, anti-PTxd and anti-FHA antibodies in guinea-pig serum with a Luminex(R)-xMAP(R) bead-based serological assay / S. Bandiera, A. Lebas, L. Canizares-Martinello [et al.]. – Text : unmediated // *Biologicals*. – 2019. – Vol. 61. – P. 15–21.
49. Acquisition of nonspecific *Bartonella* strains by the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*) / Y. Bai, M. Y. Kosoy, J. F. Cully [et al.]. – Text : unmediated // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2007. – Vol. 61, № 3. – P. 438–448.
50. Acute febrile cerebrovasculitis: a syndrome of unknown, perhaps rickettsial, cause / R. P. Wenzel, F. G. Hayden, D. H. Gröschel [et al.]. – Text : unmediated // *Annals of Internal Medicine*. – 1986. – Vol. 104, № 5. – P. 606–615.
51. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. / O. Mediannikov, Y. Sidelnikov, L. Ivanov [et al.]. – Text : unmediated // *Emerging Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 10, № 5. – P. 810–817.
52. Adams, J. R. Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouche), with a rickettsia-like microorganism / J. R. Adams, E. T. Schmidtman, A. F. Azad. – Text : unmediated // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1990. – Vol. 43, № 4. – P. 400–409.
53. An insight into the microbiome of the *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) / K. Budachetri, R. E. Browning, S. W. Adamson [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Medical Entomology*. – 2014. – Vol. 51, № 1. – P. 119–129.
54. An optimized five-color/seven-parameter flow cytometry panel for immunophenotyping guinea pig peripheral blood lymphocytes / J. V. Stokes, A. E. Crawford, C. E. Cross [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Immunological Methods*. – 2020. – Vol. 476. – Article number 112682. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175919303692?via%3Dihub> (access date: 29.04.2024).

55. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998 / B. A. Ellis, L. D. Rotz, J. A. Leake [et al.]. – Text : unmediated // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 1999. – Vol. 61, № 2. – P. 344-349.
56. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of *Alphaproteobacteria* / A. Hördt, M. G. López, J. P. Meier-Kolthoff [et al.]. – Text : electronic // Frontiers In Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – Article number 468. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.00468/full>. – Publication date: 7.04.2020.
57. Aneuphagic fever associated with antibodies to *Rickettsia .helvetica* in Europe and Thailand / P. E. Fournier, C. Allombert, Y. Supputamongkol [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – Vol. 42, № 2. – P. 816-818.
58. Anstead, C. A. A novel Rickettsia species detected in Vole Ticks (*Ixodes angustus*) from Western Canada / C. A. Anstead, N. B. Chilton. – Text : unmediated // Applied and environmental microbiology. – 2013. – Vol. 79, № 24. – P. 7583-7589.
59. Anstead, C. A. Detection of a novel *Rickettsia* (*Alphaproteobacteria: Rickettsiales*) in rotund ticks (*Ixodes kingi*) from Saskatchewan, Canada / C. A. Anstead, N. B. Chilton. – Text : unmediated // Ticks and Tick-borne Disease. – 2013. – Vol. 4, № 3. – P. 202–206.
60. Armengol, C. E. Cat-scratch disease encephalopathy: a cause of status epilepticus in school-aged children / C. E. Armengol, J. O. Hendley. – Text : unmediated // Journal of Pediatrics. – 1999. – Vol. 134, № 5. – P. 635-638.
61. Atenstaedt, R. L. Trench fever: the British medical response in the Great War / R. L. Atenstaedt. – Text : unmediated // Journal of the Royal Society of Medicine. – 2006. – Vol. 99, № 11. – P. 564- 568.
62. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism / D. H. Spach, A. S. Kanter, M. J. Dougherty [et al.]. – Text : unmediated // New England Journal of Medicine. – 1995. – Vol. 332, № 7. – P. 424-428.
63. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* endocarditis in homeless men / M. Drancourt, J. L. Mainardi, P. Brouqui [et al.]. – Text : unmediated // New England Journal of Medicine. – 1995. – Vol. 332, № 7. – P. 419-423.

64. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits / R. Heller, P. Kubina, P. Mariet [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1999. – Vol. 49, pt. 1. – P. 283-288.
65. *Bartonella* and intraocular inflammation: a series of cases and review of literature / C. Kalogeropoulos, I. Koumpoulis, A. Mentis [et al.]. – Text : unmediated // Clinical Ophthalmology. – 2011. – № 5. – P. 817–829.
66. *Bartonella bacilliformis*: a systematic review of the literature to guide the research agenda for elimination. – Text : electronic / N. S. Clemente, C. A. Ugarte-Gil, N. Solórzano [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2012. – Vol. 6, № 10. – Article number e1819. – URL: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001819>. – Publication date: 25.10.2012.
67. *Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* spp.) / D. Bermond, R. Heller, F. Barrat Mariet [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2000. – Vol. 50, pt. 6. – P. 1973-1979.
68. *Bartonella bovis* sp. nov., and *Bartonella capreoli* sp. nov. isolated from European ruminants / D. Bermond, H. J. Boulouis, R. Heller [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2002. – Vol. 52, pt. 2. – P. 383-390.
69. *Bartonella chomelii* sp. nov., isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*) / R. Maillard, P. Riegel, F. Barrat [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2004. – Vol. 54, pt.1. – P. 215-220.
70. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease) / D. L. Kordick, E. J. Hilyard, D. L. Hadfield [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – Vol. 35, № 7. – P. 1813-1818.
71. *Bartonella henselae* and *quintana*-associated uveitis: A case series and approach of a potentially severe disease with a broad spectrum of ocular manifestations / D. Kalogeropoulos, I. Asproudis, M. Stefaniotou [et al.]. – Text : unmediated // International Ophthalmology. – 2019. – Vol. 39, № 11. – C. 2505-2515.

72. *Bartonella henselae* and the potential for arthropod vector-borne transmission / M. E. Mosbacher, S. Klotz, J. Klotz, J. L. Pinna. – Text : unmediated // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2011. – Vol. 11, № 5. – P. 471-477.
73. *Bartonella henselae* bloodstream infection in a boy with pediatric acute-onset neuropsychiatric syndrome / E. B. Breitschwerdt, R. Greenberg, R. G. Maggi [et al.]. – Text : electronic // Journal of Central Nervous System Disease. – 2019. – Vol. 11. – Article number 1179573519832014. – URL: [https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1179573519832014?rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org](https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1179573519832014?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org). – Publication date: 18.03.2019.
74. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodidae*) removed from humans, Belluno province, Italy / Y. O. Sanogo, Z. Zeaiter, G. Caruso [et al.] - Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 9, № 3. – P. 329-332.
75. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks removed from dogs / E. Podsiadly, T. Chmielewski, E. Sochon, S. Tylewska-Wierzbanska – Text : unmediated // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2007. – Vol. 7, № 2. – P. 189-192.
76. *Bartonella henselae* infection as a cause of fever of unknown origin / M. Tsukahara, H. Tsuneoka, H. Iino [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2000. – Vol. 38, № 5. – P. 1990-1991.
77. *Bartonella henselae* infection from a dog / M. Tsukahara, H. Tsuneoka, H. Lino [et al.]. – Text : unmediated // Lancet. – 1998. – Vol. 352, № 9141. – P. 1682.
78. *Bartonella* infections in humans dogs and cats / F. Iannino, S. Salucci, A. Di Provvido [et al.]. – Text : unmediated // Veterinaria Italiana. – 2018. – Vol. 54, № 1. – P. 63–72.
79. *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats / S. Droz, B. Chi, E. Horn [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1999. – Vol. 37, № 4. – P. 1117-1122.
80. *Bartonella quintana* bacteremia among homeless people / C. Foucault, K. Barrau, P. Brouqui, D. Raoult. – Text : unmediated // Clinical Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 35, № 6. – P. 684-689.

81. *Bartonella quintana* endocarditis as a cause of severe aortic insufficiency and heart failure / S. Dimopoulos, E. Eleftherakis, C. Charitos [et al.] - Text : unmediated // Hellenic Journal of Cardiology. – 2012. – Vol. 53, № 6. – P. 476- 479.
82. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer / C. Dehio, C. Lanz, R. Pohl [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2001. – Vol. 51, pt. 4. – P. 1557-1565.
83. *Bartonella* sp. bacteremia in patients with neurological and neurocognitive dysfunction / E. B. Breitschwerdt, R. G. Maggi, W. L. Nicholson [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2008. – Vol. 46, № 9. – P. 2856–2861.
84. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health / B. B. Chomel, H. J. Boulouis, S. Maruyama, E. B. Breitschwerdt. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 12, № 3. – P. 389-394.
85. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections / P. O. Kaiser, T. Riess, F. O'Rourke [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Medical Microbiology. – 2011. – Vol. 301, № 1. – P. 7-15.
86. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats / R. Heller, P. Riegel, Y. Hansman [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic bacteriology. – 1998. – Vol. 48, pt. 4. – P. 1333-1339.
87. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhofii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human / V. S. Roux, J. Eykyn, S. Wyllie, D. Raoult. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2000. – Vol. 38, № 4. – P.16998-1700.
88. Bartonellosis (Carrión's disease) in the modern era / C. Maguiña, P. J. Garcia, E. Gotuzzo [et al.]. – Text : unmediated // Clinical Infectious Diseases. – 2001. – Vol. 33, № 6. – P. 772-779.
89. Bartonellosis in Ecuador: serosurvey and current status of cutaneous verrucous disease / Y. Amano, J. Rumbea, J. Knobloch [et al.]. – Text : unmediated // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 1997. – Vol. 57, № 2. – P. 174-179.
90. Bass, J. W. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat– scratch disease / J. W. Bass, J. F. Vincent, D. A. Person. – Text : unmediated // Pediatric Infectious Disease Journal. – 1997. – Vol. 16, № 2. – P. 163-179.

91. Beati, L. First isolation of *Rickettsia slovaca* from *Derinacentor nzargiizatus* in France / L. Beati, J. P. Finidori, D. Raoult. – Text : unmediated // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 1993. – Vol. 48, № 2. – P. 257-268.
92. Beati, L. *Rickettsia massiiae* sp. nov., a new spotted fever group *Rickettsia* / L. Beati, D. Raoult. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1993. – № 43, № 4. – P. 839-840.
93. Ben-Tekaya, H. *Bartonella* and *Brucella* – Weapons and strategies for stealth attack. Cold Spring Harb / H. Ben-Tekaya, J. P. Gorvel, C. Dehio. – Text : electronic // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2013. – Vol. 3, № 8. – Article number a010231. – URL: <https://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/3/8/a010231.long> (access date: 29.04.2024).
94. Bilateral retinal artery branch occlusions revealing *Bartonella grahamii* infection / J. Serratrice, J. M. Rolain, B. Granel [et al.] // Revue de Medecine Interne. – 2003. – Vol. 24, № 9. – P. 629 –630.
95. Biology of *Dermacentor silvarum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions / J. Liu, Z. Liu, Y. Zhang [et al.]. – Text : unmediated // Experimental and Applied Acarology. – 2005. – Vol. 36, № 1-2. – P. 131–138.
96. Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica* / S. Hornok, D. Kovats, T. Csorgo [et al.]. – Text : electronic // Parasites and vectors. – 2014. – Vol. 7. – Article number 128. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-128>. – Publication date: 28.03.2014.
97. Birtles, R. J. Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species / R. J. Birtles, D. Raoult. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1996. – Vol. 46, № 4. – P. 891-897.
98. Birtles, R. J. *Grahamella* in small woodland mammals in the U.K.: isolation, prevalence and host specificity / R. J. Birtles, T. G. Harrison, D. H. Molyneux. – Text : unmediated // Annals of Tropical Medicine and Parasitology. – 1994. – Vol. 88, № 3. – P. 317-327.

99. Breitschwerdt, E. B. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection / E. B. Breitschwerdt, D. I. Kordick. – Text : unmediated // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2000. – Vol. 13, № 3. – P. 428-438.
100. Breitschwerdt, E. B. Feline bartonellosis and cat scratch disease / E. B. Breitschwerdt. – Text : unmediated // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2008. – Vol. 123, № 1-2. – P. 167-171.
101. Brezina, R. Two strains of *rickettsiae* of Rocky Mountains spotted fever group recovered from *Dermacentor marginatus* ticks in Czechoslovakia. Results of preliminary serological identification / R. Brezina, J. Reháček, M. Majerska. – Text : unmediated // *Acta virologica*. – 1969. – Vol. 13, № 2. – P. 142-145.
102. Brumpt, E. Longévité du virus de la fièvre boutonneuse (*Rickettsia conori*, n. sp.) chez la Tique, *Rhipicephalus sanguineus* / E. Brumpt. – Text : unmediated // *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales*. – 1932. – Vol. 110. – P. 1199–1202.
103. Budachetri, K. Catalase is a determinant of the colonization and transovarial transmission of *Rickettsia parkeri* in the gulf coast tick *Amblyomma maculatum* / K. Budachetri, D. Kumar, S. Karim. – Text : unmediated // *Insect Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 26, № 4. – P. 414–419.
104. Burgdorfer, W. Development of *Rickettsia prowazekii* in certain species of ixodid ticks / W. Burgdorfer, R. S. Ormsbee. – Text : unmediated // *Acta Virologica*. – 1968. – Vol. 12, № 1. – P. 36-40.
105. Burgdorfer, W. Isolation and characterization of symbiotes from the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* / W. Burgdorfer, L. P. Brinton, L. E. Hughes. – Text : unmediated // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1973. – Vol. 22, № 3. – P. 424-434.
106. Burgdorfer, W. Non-pathogenic rickettsiae in *D. andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsia* / W. Burgdorfer, S. F. Hayes, A. J. Mavros. – Text : unmediated // *Rickettsiae and rickettsial diseases* / eds. W. Burgdorfer, L. Anacker. – New York : Academic Press, 1981. – P. 585–594.

107. Burgdorfer, W. Ticks as vectors of *Rickettsia prowazekii* - a controversial issue / W. Burgdorfer, R. A. Ormsbee, H. Hoogstraal. – Text : unmediated // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 1972. – Vol. 21, № 6. – P. 989-998.
108. *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Russia / S. Shpynov, P.-E. Fournier, N. Rudakov, D. Raoult. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2003. – Vol. 990. – P. 162-72.
109. *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* infection in Eastern Central China: a case series / W. Liu, H. Li, Q. B. Lu [et al.]. – Text : unmediated // Annals of Internal Medicine. – 2016. – Vol. 164, № 10. – P. 641-648.
110. Cardenosa, N. Serosurvey among Mediterranean spotted fever patients of a new spotted fever group rickettsial strain (Bar29) / N. Cardenosa, F. Segura, D. Raoult. – Text : unmediated // European Journal of Epidemiology. – 2003. – Vol. 18, № 4. – P. 351-356.
111. Carithers, H. A. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients / H. A. Carithers. – Text : unmediated // American Journal of Diseases of Children. – 1985. – Vol. 139, № 11. – P. 1124-1133.
112. Carithers, H. A. Cat-scratch disease: acute encephalopathy and other neurologic manifestations / H. A. Carithers, A. M. Margileth. – Text : unmediated // American Journal of Diseases of Children. – 1991. – Vol. 145, № 1. – P. 98-101.
113. Carrion's disease (*Bartonellosis bacilliformis*) confirmed by histopathology in the high forest of Peru / V. Maco, C. Maguina, A. Tirado [et al.]. – Text : unmediated // Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. – 2004. – Vol. 46, № 3. – P. 171-174.
114. Cat scratch disease caused by *Bartonella grahamii* in an immunocompromised patient / J. Oksi, S. Rantala, S. Kilpinen [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. – Vol. 51, № 8. – P. 2781-2784.
115. Cat scratch disease due to *Bartonella henselae* serotype Marseille (Swiss cat) in a seronegative patient / J. L. Mainardi, C. Figliolini, F. W. Goldstein [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1998. – Vol. 36, № 9. – P. 2800.
116. Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test / K. M. Zangwill, D. H. Hamilton, B. A. Perkins [et al.]. – Text : unmediated // New England Journal of Medicine. – 1993. – Vol. 329, № 1. – P. 8-13.

117. Cat scratch disease in Greece / T. Karpathios, C. Golphinos, P. Psychou [et al.]. – Text : unmediated // Archives of Disease in Childhood. – 1998. – Vol. 78, № 1. – P. 64–66.
118. Cat-scratch disease in Crete: an update / G. Minadakis, E. Angelakis, D. Chochlakis [et al.]. – Text : electronic. – Text : unmediated // Infectious Disease Reports. – 2011. – Vol. 3, № 2. – Article number 15. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3892593/>. – Publication date: 7.09.2011.
119. Cat-scratch disease osteomyelitis from a dog scratch / D. Keret, M. Giladi, Y. Kletter, S. Weintroub. – Text : unmediated // The Journal of Bone and Joint Surgery. – 1998. – Vol. 80, № 5. – P. 766-767.
120. Cat-scratch disease with paravertebral mass and osteomyelitis / J. M. Robson, G. J. Harte, D. R. Osborne, J. G. McCormack. – Text : unmediated // Clinical Infectious Diseases. – 1999. – Vol. 28, № 2. – P. 274-278.
121. Characterization and comparison of Australian human spotted fever group rickettsiae / R. W. Baird, M. Lloyd, J. Stenos [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1992. – Vol. 30, № 11. – P. 2896–2902.
122. Characterization of *Bartonella henselae* isolated from bacillary angiomatosis lesions in a human immunodeficiency virus infected patient in Germany / M. Arvand, C. Wendt, T. Regnath [et al.]. – Text : unmediated // Clinical Infectious Diseases. – 1998. – Vol. 26, № 6. – P. 1296-1299.
123. Characterization of rickettsiae in ticks in northeastern China / H. Liu, Q. Li, X. Zhang [et al.]. – Text : electronic // Parasites and vectors. – 2016. – Vol. 9, № 1. – Article number 498. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1764-2>. – Publication date: 13.06.2016.
124. Chilton, N. B. An index to assess the reproductive fitness of female ticks / N. B. Chilton. – Text : unmediated // International Journal for Parasitology. – 1992. – Vol. 22, № 1. – P. 109–111.
125. Chomel, B. B. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis / B. B Chomel, R. W Kasten. – Text : unmediated // Journal of Applied Microbiology. – 2010. – Vol. 109, № 3. – P. 743–750.

126. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients / P. Brouqui, B. Lascola, V. Roux, D. Raoult. – Text : unmediated // New England Journal of Medicine. – 1999. – Vol. 340, № 3. – P. 184-189.
127. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae / V. Roux, E. Rydkina, M. Ereemeeva, D. Raoult. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1997. – P. 47, № 2. – P. 252-261.
128. Clinical study of Japanese spotted fever and its aggravating factors / K. Kodama, T. Senba, H. Yamauchi [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Infection and Chemotherapy. – 2003. – Vol. 9, № 1. – P. 83–87.
129. Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal / N. Milhano, I. L. de Carvalho, A. S. Alves [et al.]. – Text : unmediated // Ticks and Tick-borne Disease. – 2010. – Vol. 1, № 4. – P. 172-177.
130. Comparative susceptibility of different populations of *Amblyomma sculptum* to *Rickettsia rickettsii* / M. Gerardi, A. Ramírez-Hernández, L. C. Binder [et al.]. – Text : unmediated // Frontiers in Physiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 653.
131. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses / M. S. Oberste, K. Maher, M. R. Flemister [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2000. – Vol 38. – P. 1170-1174.
132. Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging Rickettsioses / E. Angelakis, H. Richet, J. M. Rolain [et al.]. – Text : electronic // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2012. – Vol. 6, № 3. – Article number e1540. – URL: <https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0001540&type=printable>. – Publication date: 6.03.2012.
133. Comparison of serologic typing, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis protein analysis, and genetic restriction fragment length polymorphism analysis for identification of rickettsiae: characterization of two new rickettsial strains / L. Beati, J. P. Finidori, B. Gilot, D. Raoult. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1992. – Vol. 30, № 8. – P. 1922–1930.

134. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of *Rickettsiae* / L. Beati, O. Peter, W. Burgdorfer [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1993. – Vol. 43, № 3. – P. 521-526.
135. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae / L. Beati, O. Peter, W. Burgdorfer [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1993. – Vol. 43, № 3. – P. 521-526.
136. Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus* / E. K. Hofmeister, C. P. Kolbert, A. S. Abdulkarim [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 1998. – Vol. 177, № 2. – P. 409–416.
137. Cox, H. R. Cultivation of rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever, typhus and Q fever groups in the embryonic tissues of developing chicks / H. R. Cox. – Text : unmediated // Science. – 1941. – Vol. 94, № 2444. – P. 399-403.
138. Cox, H. R. Use of yolk sac of developing chick embryo as medium for growing rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever and typhus groups / H. R. Cox. – Text : unmediated // Public Health Reports. – 1938. – Vol. 53, № 51. – P. 2241-2247.
139. Coyotes (*Canis latrans*) as the reservoir for a human-pathogenic *Bartonella* sp.: molecular epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhofii* infection in coyotes from central coastal California / C. C. Chang, R. W. Kasten, B. B. Chomel [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2000. – Vol. 38, № 11. – P. 4193-4200.
140. Crispell, G. *Rickettsia parkeri* colonization in *Amblyomma maculatum*: the role of superoxide dismutases / G. Crispell, K. Budachetri, S. Karim. – Text : electronic // Parasites and Vectors. – 2016. – Vol. 9, № 1. – Article number 291. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1579-1>. – Publication date: 20.05.2016.
141. Cunningham, E. T. Ocular bartonellosis / E. T. Cunningham, J. E. Koehler. – Text : unmediated // American Journal of Ophthalmology. – 2000. – Vol. 130, № 3. – P. 340-349.

142. Current and past strategies for bacterial culture in clinical Microbiology / J. C. Lagier, S. Edouard, I. Pagnier [et al.]. – Text : unmediated // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2015. – Vol. 28, № 1. – P. 208–236.
143. Dana, A. N. Diagnosis and treatment of tick infestation and tick-borne diseases with cutaneous manifestations / A. N. Dana. – Text : unmediated // *Dermatologic Therapy*. – 2009. – Vol. 22, № 4. – P. 293-326.
144. Dasch, G. Characterization of the Madrid E strain of *Rickettsia prowazekii* Purified by Renografin Density Gradient Centrifugation / G. Dasch, E. Weiss. – Text : unmediated // *Infection and Immunity*. – 1977. – Vol. 15, № 1. – P. 280-286.
145. Dehio, C. *Bartonella* – host-cell interactions and vascular tumour formation / C. Dehio. – Text : unmediated // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – Vol. 3, № 8. – P. 621-631.
146. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of patient with neuroretinitis / F. T. Kerkhoff, A. M. Bergmans, A. Van der Zee, A. Rothova. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1999. – Vol. 37, № 12. – P. 4034-4038.
147. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks / L. M. Schouls, I. Van De Pol, S. G. Rijpkema, C. S. Schot. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1999. – Vol. 37, № 7. – P. 2215-2222.
148. Detection and identification of spotted fever group *Rickettsiae* and *Erhlichiae* in African ticks / P. Parola, H. Inokuma, J. I. Camicas [et al.]. – Text : unmediated // *Emerging Infectious Diseases*. – 2001. – Vol. 7, № 6. – P. 1014-1017.
149. Detection and identification of spotted fever group *Rickettsiae* in *Dermacentor* ticks from Russia and Central Kazakhstan / S. Shpynov, P. Parola, N. Rudakov [et al.]. – Text : unmediated // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 2001. – Vol. 20, № 12. – P. 903-905.
150. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia / V. Punda-Polic, M. Petrovec, T. Trilar [et al.]. – Text : unmediated // *Experimental and Applied Acarology*. – 2002. – Vol. 28, № 1-4. – P.169-176.

151. Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden / K. Severinsson, T. G. Jaenson, J. Pettersson [et al.]. – Text : electronic // Parasites and Vectors. – 2010. – Vol. 3. – Article number 66. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-3-66>. – Publication date: 4.08.2010.
152. Detection of antibodies against spotted fever group *Rickettsia* (SFGR), typhus group *Rickettsia* (TGR), and *Coxiella burnetii* in human febrile patients in the Philippines / G. A. Camer, M. Alejandria, M. Amor [et al.]. – Text : unmediated // Japanese Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 56, № 1. – P. 26–28.
153. Detection of *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* ticks and *Bartonella* seroprevalence in human populations / A. Müller, M. Reiter, A. M. Schötta [et al.]. – Text : unmediated // Ticks Tick-Borne Dis. – 2016. – Vol. 7, № 5. – P. 763–767.
154. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia / S. Shpynov, P.-E. Fournier, N. Rudakov [et al.]. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 1078. – P. 378-383.
155. Detection of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus* from the eastern United States / C. M. Fornadel, J. D. Smith, S. E. Zawada [et al.]. – Text : unmediated // Vector Borne and Zoonotic Diseases. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 67-69.
156. Detection of *Rickettsia monacensis* and *Rickettsia amblyommatis* in ticks collected from dogs in Costa Rica and Nicaragua / A Springer, VM Montenegro, S Schicht [et al.]. – Text : unmediated // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2018. – Vol. 9, № 6. – P. 1565-1572.
157. Detection of *Rickettsia monacensis* from *Ixodes nipponensis* collected from rodents in Gyeonggi and Gangwon Provinces, Republic of Korea / S. H. Shin, H. J. Seo, Y. J. Choi [et al.]. – Text : unmediated // Experimental and Applied Acarology. – 2013. – Vol. 61, № 3. – P. 337-347.

158. Detection of two *Bartonella tamiae*-like sequences in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) using 16S-23S intergenic spacer region-specific primers / S. A. Billeter, M. K. Miller, E. B. Breitschwerdt, M. G. Levy. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2008. – Vol. 45, № 1. – P. 176–179.
159. Disruption of the *Rickettsia rickettsii* *Sca2* autotransporter inhibits actin-based motility / B. Kleba, T. R. Clark, E. I. Lutter [et al.]. – Text : unmediated // Infection and Immunity. – 2010. – Vol. 78, № 5. – P. 2240–2247.
160. Distribution and molecular characteristics of rickettsiae found in ticks across Central Mongolia / B. Boldbaatar, R. R. Jiang, M. E. von Fricken [et al.]. – Text : electronic // Parasites and Vectors. – 2017. – Vol. 10, № 1. – Article number 61. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-1981-3>. – Publication date: 02.02.2017.
161. Distribution of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* tick populations in Poland / J. Stanczak, M. Racewicz, J. Michalik, A. Buczek. – Text : unmediated // International Journal of Medical Microbiology. – 2008. – Vol. 298, suppl. 1. – P. 231–234.
162. Diversity of *Rickettsia* species in border regions of northwestern China / S. Song, C. Chen, M. Yang [et al.]. – Text : electronic // Parasites and Vectors. – 2018. – Vol. 11. – Article number 634. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3233-6>. – Publication date: 13.12.2018.
163. Diversity of spotted fever group *Rickettsia* infection in hard ticks from Suifenhe, Chinese-Russian border / C. Cheng, W. Fu, W. Ju [et al.]. – Text : unmediated // Ticks and tick-borne diseases. – 2016. – Vol. 7, № 5. – P. 715-719.
164. Diversity of spotted fever group *Rickettsia* infection in hard ticks from Suifenhe, Chinese-Russian border / C. Cheng, W. Fu, W. Ju [et al.]. – Text : unmediated // Ticks and Tick-borne Diseases. – 2016. – Vol. 7, № 5. – P. 715-719.
165. Drancourt, M. Characterization of mutations in the *rpoB* gene in naturally rifampin-resistant *Rickettsia* species / M. Drancourt, D. Raoult. – Text : unmediated // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1999. – Vol. 43, № 10. – P. 2400-2403.

166. Dupont, H. T. Identification of rickettsiae from ticks collected in the Central African Republic using the polymerase chain reaction / H. T. Dupont, J. P. Cornet, D. Raoult . – Text : unmediated // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 1994. – Vol. 50, № 3. – P. 373–380.
167. Eisemann, C. S. Susceptibility of inbred mice to *Rickettsiae* of the spotted fever group / C. S. Eisemann, M. J. Nypaver, J. V. Osterman. – Text : unmediated // Infection and Immunity. – 1984. – Vol. 43, № 1. – P. 143–148.
168. Electron microscopy of the bacilli causing cat-scratch disease / T. L. Hadfield, R. H. Malaty, A. Van Dellen [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 1985. – Vol. 152, № 3. – P. 643- 645.
169. Emended description of *Rickettsia felis* (Bouyer et al. 2001), a temperature-dependent cultured bacterium / B. La. Scola, S. Meconi, F. Fenollar [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2002. – Vol. 52, pt 6. – P. 2035-2041.
170. Endocarditis caused by *Rochalimaea hensela* / T. L. Hadfield, R. Warren, M. Kass [et al.]. – Text : unmediated // Human Pathology. – 1993. – Vol. 24, № 10. – P. 1140-1141.
171. Enrichment-culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs / Y. Bai, M. Y. Kosoy, S. Boonmar [et al.]. – Text : unmediated // Veterinary Microbiology. – 2010. – Vol. 146, № 3-4. – P. 314–319.
172. Epidemiological studies on *Bartonella quintana* infections among homeless people in Tokyo, Japan / N. Seki, T. Sasaki, K. Sawabe [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 59, № 1. – P. 31-35.
173. Epidemiology of cat-scratch disease hospitalizations among children in the United States / M. G. Reynolds, R. C. Holman, A. T. Curns [et al.]. – Text : unmediated // Pediatric Infectious Disease Journal. – 2005. – Vol. 24, № 8. – P. 700-704.
174. Epidemiology of endemic *Bartonella bacilliformis*: a prospective cohort study in a Peruvian mountain valley community / J. Chamberlin, L. W. Laughlin, S. Romero [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 186, № 7. – P. 983-990.

175. Estimation of prokaryote genomic DNA G+C content by sequencing universally conserved genes / P. E. Fournier, K. Suhre, G. Fournous, D. Raoult. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2006. – Vol. 56, pt. 5. – P. 1025-1029.
176. Etiology of Oroya fever. XIV. The insect vectors of Carrion's disease / H. Noguchi, R. C. Shannon, E. B. Tilden, J. R. Tyler. – Text : unmediated // Journal of Experimental Medicine. – 1929. – Vol. 49, № 6. – P. 993-1008.
177. Evaluating the clinical and immune responses to spotted fever rickettsioses in the guinea pig-tick-*Rickettsia* system. – Text : electronic / J. V. Stokes, M. L. Levin, C. E. Cross [et al.] // Current Protocols In Immunology. – 2022. – Vol. 2, № 11. – Article number e584. – URL: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpz1.584>. – Publication date: 16.11.2022.
178. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay / J. M. Rolain, L. Stuhl, M. Maurin, D. Raoult. – Text : unmediated // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2002. – Vol. 46, № 9. – P. 2747–2751.
179. Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4 / H. Dautel, C. Dippel, R. Oehme [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Medical Microbiology. – 2006. – Vol. 296, suppl. 40. – P. 149–156.
180. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France / P. E. Fournier, F. Grunnenberger, B. Jaulhac [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2000. – Vol. 6, № 4. – P. 389-392.
181. Experimental infection and vector competence of *Amblyomma patinoi*, a member of the *Amblyomma cajennense* species complex, for the human pathogen *Rickettsia rickettsii* / H. C. Martínez-Díaz, E. Forero-Becerra, M. Hidalgo, M. B. Labruna. – Text : electronic // Ticks and Tick-borne Disease. – 2021. – Vol. 12, № 5. – Article number 101751. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X21001047?via%3Dihub> (access date: 29.04.2024 ).

182. Experimental infection in *Cavia porcellus* by infected *Amblyomma ovale* nymphs with *Rickettsia* sp. (Atlantic rainforest strain) / J. M. Brustolin, F. da Silva Krawczak, M. E. M. Alves [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Parasitology Research. – 2018. – Vol. 117, № 3. – P. 713–720.
183. Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii* / K. Matsumoto, P. Brouqui, D. Raoult, P. Parola. – Text : unmediated // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2005. – Vol. 5, № 4. – P. 363-372.
184. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii* / R. K. Sakai, F. B. Costa, T. E. Ueno [et al.]. – Text : unmediated // Ticks and Tick-borne Disease. – 2014. – Vol. 5, № 6. – P. 917-923.
185. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea / B. B. Chomel, R. W. Kasten, K. Floyd-Hawkins [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1996. – Vol. 34, № 8. – P. 1952-1956.
186. Experimental vertical transmission of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* / C. L. Wright, H. D. Gaff, D. E. Sonenshine, W. L. Hynes. – Text : unmediated // Ticks and Tick-borne Disease. – 2015. – Vol. 6, № 5. – P. 568-573.
187. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections / H. J. Boulouis, C. C. Chang, J. B. Henn [et al.]. – Text : unmediated // Veterinary research. – 2005. – Vol. 36, № 3. – P. 383-410.
188. Factors influencing in vitro infectivity and growth of *Rickettsia peacockii* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*), an endosymbiont of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* (*Acari, Ixodidae*) / T. J. Kurtti, J. A. Simser, G. D. Baldrige [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Invertebrate Pathology. – 2005. – Vol. 90, № 3. – P. 177-186.
189. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts / D. G. Saraiva, H. S. Soares, J. F. Soares, M. B. Labruna. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 20, № 9. – P. 1504–1510.
190. Felsenstein, J. PHYLIP – phylogeny inference package (version 3.2) / J. Felsenstein. – Text : unmediated // Cladistics. – 1989. – Vol. 5. – P. 164-166.

191. Felsheim, R. F. Genome sequence of the endosymbiont *Rickettsia peacockii* and comparison with virulent *Rickettsia rickettsii*: identification of virulence factors / R. F. Felsheim, T. J. Kurti, U. G. Munderloh. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, № 12. – Article number e8361. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008361>. – Publication date: 21.12.2009.
192. Feng, H. M. *Rickettsia australis* infection: a murine model of a highly invasive vasculopathic rickettsiosis / H. M. Feng, J. Wen, D. H. Walker. – Text : unmediated // American Journal of Pathology. – 1993. – Vol. 142, № 5. – P. 1471–1482.
193. Fenollar, F. *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* as agent of blood culture-negative endocarditis in a human / F. Fenollar, S. Sire, D. Raoult. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – Vol. 43, № 2. – P. 945–947.
194. Fernandez-Soto, P. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans / P. Fernandez-Soto, A. Encinas Grandes, R. Perez-Sanchez. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 9, № 7. – P. 889-890.
195. First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy / T. Beninati, N. Lo, H. Noda [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 8, № 9. – P. 983-986.
196. First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the UK / E. Tjisse-Klasen, L. J. Jameson, M. Fonville [et al.]. – Text : unmediated // Epidemiology and Infection. – 2011. – Vol. 139, № 4. – P. 524-529.
197. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection / D. Raoult, P.-E. Fournier, P. Abboud, F. Caron. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 8, № 7. – P. 748-749.
198. First genetic characterization of rotavirus C in Russia / E. Zhirakovskaia, A. Tikunov, V. Klemesheva [et al.]. – Text : unmediated // Infection Genetigs and Evolution. – 2016. - Vol. 39. – P. 1-8.

199. First isolation of *Bartonella henselae* type I from a cat scratch disease patient in Japan and its molecular analysis / S. Maruyama, K. Izumikawa, M. Miyashita [et al.]. – Text : unmediated // Microbiology and Immunology. – 2004. – Vol. 48, № 2. – P. 103-109.
200. First isolation of *Rickettsia slovaca* from a patient, France / C. Cazorla, M. Enea, F. Lucht, D. Raoult. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 9, № 1. – P. 135.
201. First report on the occurrence of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor silvarum* in China / Z. C. Tian, G. Y. Liu, H. Shen [et al.]. – Text : electronic // Parasites and Vectors. – 2012. – Vol. 5. – Article number 19. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-19>. – Publication date: 19.01.2012.
202. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague / K. M. McElroy, B. L. Blagburn, E. B. Breitschwerdt [et al.]. – Text : unmediated // Trends in Parasitology. – 2010. – Vol. 26, № 4. – P. 197-204.
203. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations / A. F. Azad, S. Radulovic, J. A. Higgins [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 1997. – Vol. 3, № 3. – P. 319-327.
204. Flinders Island spotted fever rickettsioses caused by “*marmionii*”. Strain of *R. hochei*, Eastern Australia / N. B. Unsworth, J. Stenos, S. R. Graves [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 13, № 4. – P. 566-573.
205. Florin, T. A. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection / T. A. Florin, T. E. Zaoutis, L. B. Zaoutis. – Text : electronic // Pediatrics. – 2008. – Vol. 121, № 5. – P. e1413-1425. – URL: <https://publications.aap.org/pediatrics/article-abstract/121/5/e1413/73467/Beyond-Cat-Scratch-Disease-Widening-Spectrum-of?redirectedFrom=fulltext>. – Publication date: 28.04.2008.
206. Foucault, C. *Bartonella quintana* characteristics and clinical management / C. Foucault, P. Brouqui, D. Raoult. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 12, № 2. – P. 217-223.

207. Fourteen-year seroepidemiological study of zoonoses in a Greek village / M. Antoniou, I. Economou, X. Wang [et al.]. – Text : unmediated // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2002. – Vol. 66, № 1. – P. 80–85.
208. Freitas, L. H. Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, and comparative biology of infected and uninfected tick lineages / L. H. Freitas, J. L. Faccini, M. B. Labruna. – Text : unmediated // *Experimental and Applied Acarology*. – 2009. – Vol. 47, № 4. – P. 321-345.
209. Fulminant Japanese spotted fever – the second fatal case in Japan / K. Wada, H. Sakaeda, R. Aono, S. Chiya. – Text : unmediated // *Kansenshogaku Zasshi*. – 2008. – Vol. 82, № 2. – P. 77-81.
210. Garcia-Caceres, U. Bartonellosis. An immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrión / U. Garcia-Caceres, F.U. Garcia. – Text : unmediated // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1991. – Vol. 95, № 4, suppl. 1. – P. 58-66.
211. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New *Rickettsia* Isolates and Description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp.nov / P. E. Fournier, J. S. Dumler, G. Greub [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol. 41, № 12. – P. 5456-5465.
212. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm / B. La Scola, Z. Zeaiter, A. Khamis, D. Raoult. – Text : unmediated // *Trends in Microbiology*. – 2003. – Vol. 11, № 7. – P. 318-321.
213. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan / P.-E. Fournier, H. Fujita, N. Takada, D. Raoult. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002. – Vol. 40, № 6. – P. 2176-2181.
214. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus* ticks from continental and island areas of the Russian Far East / Y. Igolkina, E. Bondarenko, V. Rar [et al.]. – Text : unmediated // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. – 2016. – Vol. 7, № 6. – P. 1284-1289.
215. Genetic variation in Australian spotted fever group rickettsiae / R. W. Baird, J. Stenos, R. Stewart [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1996. – Vol. 34, № 6. – P. 1526–1530.

216. Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal / F. Bacellar, R. L. Regnery, M. S. Nuncio, A. R. Filipe. – Text : unmediated // *Epidemiology and Infection*. – 1995. – Vol. 114, № 1. – P. 169–178.
217. Goddard, J. Experimental infection of lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent / J. Goddard. – Text : unmediated // *Journal of Medical Entomology*. – 2003. – Vol. 40, № 5. – P. 686–689.
218. Golden, S. E. Hepatosplenic cat-scratch disease associated with elevated anti-*Rochalimaea* antibody titers / S. E. Golden. – Text : unmediated // *Pediatric Infectious Disease Journal*. – 1993. – Vol. 12, № 10. – P. 868-871.
219. Gramman, C. C. The reactivation phenomenon of *Rickettsia rickettsii* involves the expression of virulence factor proteins / C. C. Gramman, G. A. McDonald. – Text : unmediated // 11-th Sesqui – Annual Meeting, American Society for Rickettsiology and Rickettsial Diseases : abstracts. – St. Simons Island, Georgia, USA, 1994. – P. 355-367.
220. Graves, S. R. Rickettsioses in Australia / S. R. Graves, N. B. Unsworth, J. Stenos. – Text : unmediated // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 1078. – P. 74-79.
221. Graves, S. *Rickettsia honei* – a spotted fever group *Rickettsia* on three continents / S. Graves, J. Stenos. – Text : unmediated // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 990. – P. 62–66.
222. Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp / A. Portillo, R. de Sousa, S. Santibanez [et al.]. – Text : unmediated // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 23-32.
223. Hallucinations, sensory neuropathy, and peripheral visual deficits in a young woman infected with *Bartonella koehlerae* / E. B. Breitschwerdt, P. E. Mascarelli, L. A. Schweickert [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011 – Vol. 49, № 9. – P. 3415–3417.
224. Harrison, T. G. Serological evidence of *Bartonella* spp. infection in the UK / T. G. Harrison, N. Doshi. – Text : unmediated // *Epidemiology and Infection*. – 1999. – Vol. 123, № 2. – P. 233-240.

225. Harvey, R. A. Cat scratch disease: an unusual cause of combative behavior / R. A. Harvey, W. J. Misselbeck, R. E. Uphold. – Text : unmediated // American Journal of Emergency Medicine. – 1991. – Vol. 9, № 1. – P. 52-53.
226. Hashkes, P. J. Systemic cat scratch disease presenting as leukocytoclastic vasculitis / P. J. Hashkes, A. Trabulsi, M. H. Passo. – Text : unmediated // Pediatric Infectious Disease Journal. – 1996. – Vol. 15, № 1. – P. 93-95.
227. Haye, S. F. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis / S. F. Hayes, W. Burgdorfer. – Text : unmediated // Infection and Immunity. – 1982. – Vol. 37, № 2. – P. 779-785.
228. Hematophagy and tick-borne Rickettsial pathogen shape the microbial community structure and predicted functions within the tick vector, *Amblyomma maculatum* / A. Adegoke, D. Kumar, K. Budachetri, S. Karim. – Text : electronic // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2022. – Vol. 12. – Article number 1037387. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.1037387/full>. – Publication date: 21.11.2022.
229. Hepatosplenic cat scratch disease diagnosed by serology / B. Fortuño, J. A. Uriel, E. Lomba [et al.]. – Text : unmediated // European Journal of Pediatrics. – 1999. – Vol. 158, № 5. – P. 432.
230. Herrer, A. Carrion's disease. II. Presence of *Bartonella bacilliformis* in the peripheral blood of patients with the benign form / A. Herrer. – Text : unmediated // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 1953. – Vol. 2, № 4. – P. 645-649.
231. Hotez, P. J. Neglected infections of poverty in the United States of America / P. J. Hotez. – Text : electronic // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2008. – Vol. 2, № 6. – Article number e256. – URL: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000256>. – Publication date: 25.06.2008.
232. Houpikian, P. 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* species / P. Houpikian, D. Raoult. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2001. – Vol. 39, № 8. – P. 2768-2778.

233. Human infection with *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* / N. Jia, Y. C. Zheng, J. F. Yiang [et al.]. – Text : unmediated // New England Journal of Medicine. – 2013. – Vol. 369, № 12. – P. 1178-1180.
234. Human Infection with *Rickettsia honei*, Thailand / J. Jiang, V. Sangkasuwan, K. Lerdthusnee [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2005. – Vol. 11, № 9. – P. 1473-1475.
235. Human infection with *Rickettsia* sp. related to *R. japonica*, Thailand / J. Gaywee, P. Sunyakumthorn, W. Rodkvamtook [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 13, № 4. – P. 671–673.
236. Identification of a unique spotted fever group rickettsia from humans in Japan / T. Uchida, X. J. Yu, T. Uchiyama, D. Walker. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 1989. – Vol. 159, № 6. – P. 1122–1126.
237. Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs / M. Kosoy, Y. Bai, K. Sheff [et al.]. – Text : unmediated // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2010. – Vol. 82, № 6. – P. 1140–1145.
238. Identification of intestinal bacterial flora in *Rhipicephalus microplus* ticks by conventional methods and PCR-DGGE analysis / X.-Li Xu, T.-Y. Cheng, H. Yang, F. Yan. – Text : unmediated // Experimental and Applied Acarology. – 2015. – Vol. 66, № 2. – P. 257-268.
239. Identification of novel zoonotic activity of *Bartonella* spp., France / M. Vayssier-Taussat, S. Moutailler, F. Femenia [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2016. – Vol. 22, № 3. – P. 457–462.
240. Identification of *Rickettsia rickettsii* in a guinea pig model by immunofluorescent and electron microscopic techniques / D. H. Walker, A. Harrison, F. Henderson, F. A. Murphy. – Text : unmediated // American Journal of Pathology. – 1977. – Vol. 86, № 2. – P. 343–358.

241. Identification of tick-borne pathogens by metagenomic next-generation sequencing in *Dermacentor nuttalli* and *Ixodes persulcatus* in Inner Mongolia, China. / J. Jiao, Z. Lu, Y. Yu [et al.] // *Parasites and Vectors*. – 2021. – Text : electronic – Vol. 14, № 1. – Article number 287. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-021-04740-3>. – Publication date: 27.05.2021.
242. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia: Identification of a new *Candidatus Rickettsia* species / Y. P. Igolkina, V. A. Rar, V. V. Yakimenko [et al.]. – Text : unmediated // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2015. - № 34. – P. 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.015>
243. Immunoblot studies to analyze antibody to the *Rickettsia typhi* group antigen in sera from patients with acute febrile cerebrovasculitis / K. E. Hechemy, J. A. Fox, D. H. Gröschel [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1991. – Vol. 29, № 11. – P. 2559–2565.
244. Importance of Common Wall Lizards in the Transmission Dynamics of Tick-Borne Pathogens in the Northern Apennine Mountains, Italy / L. Tomassone, L. A. Ceballos, C. Ragagli [et al.]. – Text : unmediated // *Microbial Ecology*. – 2017. – Vol. 74, № 4. – P. 961-968.
245. Improved culture from lymph nodes of patients with cat scratch disease and genotypic characterization of *Bartonella henselae* isolates in Australia / P. E. Fournier, J. Robson, Z. Zeaiter [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002. – Vol. 40, № 10. – P. 3620-3624.
246. In vitro susceptibilities of 27 rickettsiae to 13 antimicrobials / J. M. Rolain, M. Maurin, G. Vestris, D. Raoult. – Text : unmediated // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1998. – Vol. 42, № 7. – P. 1537–1541.
247. Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts / M. J. Benson, J. D. Gawronski, D. E. Eveleigh, D. R. Benson. – Text : unmediated // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – Vol. 70, № 1. – P. 616–620.

248. Isolation and identification of a rickettsial strain related to *Rickettsia massiliae* in Greek ticks / T. Babalis, Y. Tselentis, V. Roux [et al.]. – Text : unmediated // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 1994. – Vol. 50, № 3. – P. 365–372.
249. Isolation and maintenance of *Rickettsia raoultii* in a *Rhipicephalus sanguineus* tick cell line / S. Santibanez, A. Portillo, A. M. Palomar [et al.]. – Text : unmediated // Microbes and Infection. – 2015. – Vol. 17, № 11-12. – P. 866–869.
250. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice / D. F. Welch, K. C. Carroll, E. K. Hofmeiste [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1999. – Vol. 37, № 8. – P. 2598-2601.
251. Isolation of a spotted fever group *Rickettsia* from a patient with febrile exanthematous illness in Shikoku, Japan / T. Uchida, F. Tashiro, T. Funato, Y. Kitamura. – Text : unmediated // Microbiology and Immunology. – 1986. – Vol. 30, № 12. – P. 1323–1326.
252. Isolation of a spotted fever group *Rickettsia*, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*, cell line / J. A. Simser, A. T. Palmer, U. G. Munderloh, T. J. Kurtti. – Text : unmediated // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67, № 2. – P. 546-552.
253. Isolation of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks, Buenos Aires (Argentina) / G. L. Cicuttin, M. N. De Salvo, I. La Rosa, F. E. Gury Dohmen. – Text : unmediated // The Journal of Parasitology. – 2015. – Vol. 101, № 6. – P. 711-712.
254. Isolation, cultivation, and partial characterization of the ELB agent associated with cat fleas / S. Radulovic, J. A. Higgins, D. C. Jaworski [et al.]. – Text : unmediated // Infection and Immunity. – 1995. – Vol. 63, № 12. – P. 4826–4829.
255. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland / W. Burgdorfer, A. Aeschlimann, O. Peter [et al.]. – Text : unmediated // Acta Tropica. – 1979. – Vol. 36, № 4. – P. 357–367.
256. Jackson, L. A. Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases / L. A. Jackson, B. A. Perkins, J. D. Wenger - Text : unmediated // American Journal of Public Health. – 1993. – Vol. 83, № 12. – P. 1707-1711.

257. Jacomo, V. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate) / V. Jacomo, P. J. Kelly, D. Raoult. – Text : unmediated // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2002. – Vol. 9, № 1. – P. 8-18.
258. Japanese spotted fever associated with multiorgan failure / K. Kodama, T. Senba, H. Yamauchi [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Infection and Chemotherapy. – 2001. – Vol. 7, № 4. – P. 247–250.
259. Japanese spotted fever involving the central nervous system: two case reports and a literature review / M. Araki, K. Takatsuka, J. Kawamura, Y. Kanno. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40, № 10. – P. 3874-3876.
260. Japanese spotted fever, South Korea / M. H. Chung, S. H. Lee, M. J. Kim [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 12, № 7. – P. 1122–1124.
261. Kazimirova, M. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission / M. Kazimirova, I. Stibraniova. – Text : electronic // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2013. – Vol. 3. – Article number 43. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00043/full>. – Publication date: 20.08.2013.
262. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura. – Text : unmediated // Journal of Molecular Evolution. – 1980. – Vol. 16, № 2. – P. 111-120.
263. Knockdown of selenocysteine-specific elongation factor in *Amblyomma maculatum* alters the pathogen burden of *Rickettsia parkeri* with epigenetic control by the Sin3 histone deacetylase corepressor complex / S. W. Adamson, R. E. Browning, K. Budachetri [et al.]. – Text : electronic // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 11. – Article number e82012. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082012>. – Publication date: 25.11.2013.
264. Koehler, J. E. *Bacillary angiomatosis* and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus / J. E. Koehler, J. W. Tappero. – Text : unmediated // Clinical infectious Diseases. – 1993. – Vol. 17, № 4 – P. 612-624.

- 265.Koehler, J. E. *Rochalimaea henselae* infection: a new zoonosis with the domestic cat as reservoir / J. E. Koehler, C. A. Glaser, J. T.Tappero. – Text : unmediated // JAMA. – 1994. – Vol. 271, № 7. – P. 531-535.
- 266.Kumar, S. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment / S. Kumar, K. Tamura, M. Nei. – Text : unmediated // Briefings in Bioinformatics. – 2004. – Vol. 5, № 2. – P. 150-163.
- 267.La maladie des griffes de chat / R. Debré, M. Lamy, M. L. Jammet [et al.] - Text : unmediated // Bulletins et memoires de la Societe medicale des hopitaux de Paris. – 1950. – Vol. 66. – P. 76-79.
- 268.La Scola, B. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: A 6-year follow-up / B. La Scola, D. Raoult. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1996. – Vol. 34, № 11. – P. 2722–2727.
- 269.La Scola, B. L. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: A 5-year experience (1993 to 1998) / B. L. La Scola, D. Raoult. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1999. – Vol. 37, № 6. – P. 1899-1905.
- 270.Lakos, A. Tick-borne lymphadenopathy – a new rickettsial disease? / A. Lakos. – Text : unmediated // Lancet. – 1997. – Vol. 350, № 9083. – P. 1006.
- 271.Levin, M. L. Comparative value of blood and skin samples for diagnosis of spotted fever group rickettsial infection in model animals / M. L. Levin, A. N. Snellgrove, G. E. Zemtsova. – Text : unmediated // Ticks and Tick-borne Disease. – 2016. – Vol. 7, № 5. – P. 1029–1034.
- 272.Lewis, D. W. Central nervous system involvement in cat scratch disease / D. W. Lewis, S. H. Tucker. – Text : unmediated // Pediatrics. – 1986. – Vol. 77, № 5. – P. 714-721.
- 273.Li, H. Protective monoclonal antibodies recognize heat-labile epitopes on surface proteins of spotted fever group rickettsiae / H. Li, B. Lenz, D.H. Walker. – Text : unmediated // Infection and Immunity. – 1988. – Vol. 56, № 10. – P. 2587–2593.

- 274.Li, H. rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells / H. Li, D. H. Walker. – Text : unmediated // Microbial Pathogenesis. – 1998. – Vol. 24, № 5. – P. 289–298.
- 275.Life cycle of *Dermacentor everestianus* Hirst, 1926 (*Acari: Ixodidae*) under laboratory conditions / T. Wang, T. Li, M. Liu [et al.]. – Text : unmediated // Korean Journal of Parasitology. – 2017. – Vol. 55, № 2. – P. 193-196.
- 276.Life cycle of *Haemaphysalis doenitzi* (*Acari: Ixodidae*) under laboratory conditions and its phylogeny based on mitochondrial 16S rDNA / X. Chen, Z. Yu, L. Guo [et al.]. – Text : unmediated // Experimental and Applied Acarology. – 2012. – Vol. 56, № 2. – P. 143–150.
- 277.List of all isolates of spotted fever group *Rickettsiae* from ticks in Japan 1993-1998 / H. Fujita, Y. Watanabe, M. Ishikura, N. Takada. – Text : unmediated // Ann. Rep. Ohara Hosp. – 1999. – Vol. 42. – P. 45-50.
- 278.Lymph node biopsy specimens and diagnosis of cat-scratch disease / J. M. Rolain, H. Lepidi, M. Zanaret [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 12, № 9. – P. 1338-1344.
- 279.Maguiña, C. Bartonellosis / C. Maguiña, H. Guerra, P. Ventosilla. – Text : unmediated // Clinics in Dermatology. – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 271-280.
- 280.Mahara, F. Japanese spotted fever: report of 31cases and review of the literature / F. Mahara. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 1997. – Vol. 3, № 2. – P. 105–111.
- 281.Mahara, F. Rickettsioses in Japan. – Text : unmediated // Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium / eds. D. Raoult, P. Brouqui. – Paris, 1999. – P. 233–239.
- 282.Margileth, A. M. Antibiotic therapy for cat-scratch disease: clinical study of therapeutic outcome in 268 patients and a review of the literature / A. M. Margileth. – Text : unmediated // Pediatric Infectious Disease Journal. – 1992. – Vol. 11, № 6. – P. 474-478.
- 283.Margileth, A. M. Cat scratch disease / A. M. Margileth. – Text : unmediated // Advances in Pediatric Infectious Diseases. – 1993. – № 8. – P. 1-21.

284. Marquez, F. J. Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks / F. J. Marquez. – Text : unmediated // Experimental and Applied Acarology. – 2008. – Vol. 45, № 3. – P. 185–194.
285. Marrero, M. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture / M. Marrero, D. Raoult. – Text : unmediated // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 1989. – Vol. 40, № 2. – P. 197-199.
286. Maurin, M. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections / M. Maurin, D. Raoult. – Text : unmediated // Clinical Microbiology Reviews. – 1996. – Vol. 9, № 3. – P. 273-292.
287. Maurin, M. Current knowledge of *Bartonella* species / M. Maurin, R. Birtles, D. Raoult. – Text : unmediated // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 1997. – Vol. 16, № 7. – P. 487-506.
288. McKiel, J. A. *Rickettsia canada*: a new member of the typhus group of rickettsiae isolated from *Haemaphysalis leporispolustris* ticks in Canada / J. A. McKiel, E. J. Bell, D. B. Lackman. – Text : unmediated // Canadian Journal of Microbiology. – 1967. – Vol. 13, № 5. – P. 503–510.
289. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software / S. Kumar, K. Tamura, I. B. Jakobsen, M. Nei. – Text : unmediated // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17, № 12. – P. 1244-1245.
290. Meier-Kolthoff, J. P. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age / J. P. Meier-Kolthoff, H.-P. Klenk, M. Göke. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2014. – Vol. 64, pt. 2. – P. 352–356.
291. Minimal duration of tick attachment sufficient for transmission of infectious *Rickettsia rickettsii* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) by its primary vector *Dermacentor variabilis* (*Acari: Ixodidae*): duration of rickettsial reactivation in the vector revisited / M. L. Levin, S. L. Ford, K. Hartzer [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2020. – Vol. 57, № 2. – P. 585–594.

292. Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester / C. X. Moreno, F. Moy, T. J. Daniels [et al.]. – Text : unmediated // Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 8, № 5. – C. 761-772.
293. Molecular characterization of a novel *Rickettsia* species from *Ixodes scapularis* in Texas / A. N. Billings, G. J. Teltow, S. C. Weaver, D. H. Walker. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 1998. – Vol. 4, № 2. – P. 305–309.
294. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France / J. M. Rolain, M. Franc, B. Davoust, D. Raoult. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 9, № 3. – P. 338–342. doi: 10.3201/eid0903.020278.
295. Molecular detection of vector-borne bacteria in bat ticks (*Acari: Ixodidae, Argasidae*) from eight countries of the Old and New Worlds / S. Hornok, K. Szőke, M. L. Meli [et al.]. – Text : electronic // Parasites and Vectors. – 2019. – Vol. 12, № 1. – Article number 50. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3303-4>. – Publication date: 22.01.2019.
296. Molecular diagnosis of cat scratch disease: A two-step approach / B. Avidor, Y. Kletter, S. Abulafia. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – Vol. 35, № 8. – P. 1924-1930.
297. Molecular evidence of *Bartonella* DNA in ixodid ticks in Czechia / K. Hercik, V. Hasova, J. Janecek, P. Branny. – Text : unmediated // Folia Microbiologica. – 2007. – Vol. 52, № 5. – P. 503-509.
298. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California / C. C. Chang, B. B. Chomel, R. W. Kasten [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2001. – Vol. 39, № 4. – P. 1221-1226.
299. Molecular genetic techniques for typing of *Bartonella* isolates / M. Y. Kirillov, A. P. Markov, I. V. Lopyrev [et al.]. – Text : unmediated // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2007. – Vol. 22, № 1. – P. 7–15.

300. Molecular identification of spotted fever group *Rickettsia* in ticks collected from dogs and small ruminants in Greece / A. Moraga-Fernández, I. Chaligiannis, A. Cabezas-Cruz [et al.]. – Text : unmediated // Experimental and Applied Acarology. – 2019. – Vol. 78, № 3. – P. 421-430.
301. Molecular investigation of tickborne pathogens in ticks removed from tick-bitten humans in the southwestern region of the Republic of Korea / M. S. Bang, C.-M. Kim, S.-H. Pyun [et al.]. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2021. – Vol. 16, № 6. – Article number e025299. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0252992>. – Publication date: 15.06.2021.
302. Molecular screening of *Bartonella* species in rodents from the Russian Far East / O. L. Mediannikov, N. Ivanov, N. Zdanovskaya [et al.]. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2005. – № 1063. – P. 308-311.
303. Molecular survey of neglected bacterial pathogens reveals an abundant diversity of species and genotypes in ticks collected from animal hosts across Romania / M. O. Andersson, C. Tolf, P. Tamba [et al.]. – Text : electronic // Parasites and Vectors. – 2018. – Vol. 11, № 1. – Article number 144. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2756-1>. – Publication date: 20.03.2018.
304. Monahan, R. S. Neuroretinitis: a clinical syndrome of cat-scratch disease / R. S. Monahan. – Text : unmediated // Clinical Eye and Vision Care. – 2000. – Vol. 12, № 3-4. – P. 155-159.
305. Mooser, H. On the relation of the organisms in the tunica vaginalis of animals inoculated with Mexican Typhus to *Rickettsia prowazeki* and to the causative agent of that disease / H. Mooser, C. Dummer. – Text : unmediated // Journal of Experimental Medicine. – 1930. – Vol. 51. – P. 189–207.
306. Moriarty, R. A. Cat scratch disease / R. A. Moriarty, A. M. Margileth. – Text : unmediated // Infectious Disease Clinics of North America. – 1987. – Vol. 1, № 3. – P. 575-590.

307. Naming of *Rickettsiae* and rickettsial diseases / D. Raoult, P.-E. Fournier, M. Ereemeeva [et al.]. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 1063. – P. 1-12.
308. National and global surveillance of communicable disease: Report of the Technical Discussions at the Twenty-First World Health Assembly. A21/Technical Discussions/5 / World Health Organization. – Geneva, Switzerland : WHO, 1968. – 15 p. – URL: <https://iris.who.int/handle/10665/143808> (access date: 5.05.2024). – Text : electronic.
309. New rickettsiae in ticks collected in territories of the former Soviet Union / E. Rydkina, V. Roux, N. Fetisova [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 1999. – Vol. 5, № 6. – P. 811-814.
310. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat scratch disease / M. Drancourt, R. Birtles, G. Chaumentin [et al.]. – Text : unmediated // Lancet. – 1996. – Vol. 347, № 8999. – P. 441-443.
311. Next generation sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in ticks in Western Europe / M. Vayssier-Taussat, S. Moutailler, L. Michelet [et al.]. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, issue 11. – Article number e81439. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081439>. – Publication date: 27.11.2013.
312. Niebylski, M. L. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*) / M. L. Niebylski, M. G. Peacock, T. G. Schwan. – Text : unmediated // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – Vol. 65, № 2. – P. 773–778.
313. Nilsson, K. Association of *Rickettsia .helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death / K. Nilsson, O. Lindquist, C. Pahlson. – Text : unmediated // Lancet. – 1999. – Vol. 354, № 9185. – P. 1169-1173.
314. Nilsson, K. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006 / K. Nilsson, K. Elfving, C. Pahlson. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 490-492.

- 315.Noda, H. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals / H. Noda, U. G. Munderloh, T. J. Kurtti. – Text : unmediated // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1997. – Vol. 63, № 10. – P. 3926–3932.
- 316.Non-terminal blood sampling techniques in guinea pigs / M. M. Birck, P. Tveden-Nyborg, M. M. Lindblad, J. Lykkesfeldt. – Text : electronic // *Journal of Visualized Experiments*. – 2014. – Vol. 92. – Article number 51982. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4540092/>. – Publication date: 11.10.2014.
- 317.Noriea, N. F. Targeted knockout of the *Rickettsia rickettsii* OmpA surface antigen does not diminish virulence in a mammalian model system / N. F. Noriea, T. R. Clark, T. Hackstadt. – Text : electronic // *mBio*. – 2015. – Vol. 6, № 2. – Article number e00323-15. – URL: <https://doi.org/10.1128/mbio.00323-15> – Publication date: 31.03.2015.
- 318.Not only “Flinders Island” spotted fever / N. B Unsworth, J. Stenos, A. R. McGregor [et al.]. – Text : unmediated // *Pathology*. – 2005. – Vol. 37, № 3. – P. 242-245.
- 319.Novel two parameter flow cytometry (MIL4/SSC followed by MIL4/CT7) allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs / M. Takizawa, J. Chiba, S. Haga [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Immunological Methods*. – 2006. – Vol. 311, № 1-2. – P. 47–56.
- 320.Nuttall, P. A. Tick-host interactions: saliva- activated transmission / P. A. Nuttall, M. Labuda. – Text : unmediated // *Parasitology*. – 2004. – Vol. 129, suppl. – P. S177–189.
- 321.Occurrence and clinical manifestations of tick-borne rickettsioses in Western Siberia: First Russian cases of *Rickettsia aeschlimannii* and *Rickettsia slovaca* infections / Y. Igolkina, V. Rar, E. Krasnova [et al.]. – Text : electronic // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. – 2022. – Vol. 13, issue 3. – Article number 101927. – URL:<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X2200019X?via%3DiHub>. – Publication date 16.02.2022.

322. Occurrence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* among Human Immunodeficiency Virus–infected patients / M. Pape, P. Kollaras, K. Mandravel [et al.]. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 1063. – P. 299–301.
323. Orkun, Ö. Molecular identification of tick-borne bacteria in wild animals and their ticks in Central Anatolia, Turkey / Ö. Orkun, A. Çakmak. – Text : unmediated // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 63. – P. 58-65.
324. Padilla-Carlin, D. J. The guinea pig as a model of infectious diseases / D. J. Padilla-Carlin, D. N. McMurray, A. J. Hickey. – Text : unmediated // Comparative Medicine. – 2008. – Vol. 58, № 4. – P. 324–340.
325. Pape, M. Clinical aspects of *Bartonella* infection in northern Greece / M. Pape, K. Mandraveli, St. Alexiou-Daniel. – Text : unmediated // European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 15, suppl. 2. – P. 91–92.
326. Parasuraman, S. Blood sample collection in small laboratory animals / S. Parasuraman, R. Raveendran, R. Kesavan. – Text : unmediated // Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics. – 2010. – Vol. 1, № 2. – P. 87–93.
327. Parola, P. Rickettsioses in Sub-Saharan Africa / P. Parola. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 1078. – P. 42-47.
328. Pathogen communities of songbird-derived ticks in Europe's low countries / D. Heylen, M. Fonville, A. D. van Leeuwen [et al.]. – Text : electronic // Parasites and Vectors. – 2017. – Vol. 10, № 1. – Article number 497. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2423-y>. – Publication date: 18.10.2017.
329. PCR-DGGE test for direct identification of intestinal bacterial flora in blood feeding ticks in China / T.Y. Cheng, Z.B. Li, A.D. Zou, G.H. Liu. – Text : unmediated // Tropical Biomedicine. – 2016. – Vol. 33, № 4. – P. 663-667.
330. Perez, J. E. Historical aspects of the vectors of Bartonellosis and Leishmaniasis in Peru / J. E Perez, E. Ogasukio. – Text : unmediated // Bol Dir Malariol y San Amb. – 1995. – № 35. – P. 277-294.

331. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group *Rickettsiae* isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks / L. Beati, V. Roux, A. Ortuno [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1996. – Vol. 34, № 11. – P. 2688–2694.
332. Phylogenetic placement of rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* / S. J. Weller, G. D. Baldrige, U. G. Munderloh [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1998. – Vol. 36, № 5. – P. 1305–1317.
333. Phylogenetic studies of bacteria (*Rickettsia*, *Coxiella*, and *Anaplasma*) in *Amblyomma* and *Dermacentor* ticks in Thailand and their co-infection / P. Nooroong, W. Trinachartvanit, V. Baimai, A. Ahantarig. – Text : unmediated // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2018. – Vol. 9, № 4. – P. 963–971.
334. Phylogenetic study of the rickettsiae / V. Roux, P.E. Fournier, E. Rydkina, D. Raoult. – Text : unmediated // Rickettsia and Rickettsial Diseases. – Bratislava, 1996. – P. 34-42.
335. Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: Evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assay and enzyme-linked immunoassay / A. M. Bergmans, M. F. Peeters, J. F. Schellekens [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – Vol. 35, № 8. – P. 1931-1937.
336. Poor unstable midgut microbiome of hard ticks contrasts with abundant and stable monospecific microbiome in ovaries. – Text : electronic / M. G. Guizzo, S. Neupane, M. Kucera [et al.] // Frontiers in cellular and infection Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – Article number 211. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00211/full>. – Publication date: 8.05.202.
337. Potential for tick-borne bartonellosis / E. Angelakis, S. A. Billeter, E. B. Breitschwerdt [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 385–391.
338. Prediction of rickettsial skin eschars in humans using an experimental guinea pig model / B. La Scola, Y. Bechah, H. Lepidi, D. Raoult. – Text : unmediated // Microbial Pathogenesis. – 2009. – Vol. 47, № 3. – P. 128–133.

339. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat scratch disease patients in the Netherlands / A. M. Bergmans, J. F. Schellekens, J. D. van Embden, L. M. Schouls. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1996. – Vol. 34, № 2. – P. 254-260.
340. Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis / K. Nilsson, C. Pahlson, A. Lukinius [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 185, № 8. – P. 1128-1138.
341. Pretorius, A.-M. *Rickettsia aeschlimannii*: a new pathogenic spotted fever group rickettsia, South Africa / A.-M. Pretorius, R. J. Birtles. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 8, № 8. – P. 874.
342. Prevalence and genetic heterogeneity of *Bartonella* strains cultured from rodents from 17 provinces in Thailand / Y. Bai, M. Y. Kosoy, K. Lerdthusnee [et al.]. – Text : unmediated // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2009. – Vol. 81, № 5. – P. 811–816.
343. Prevalence data of *Rickettsia slovaca* and other SFG rickettsiae species in *Dermacentor marginatus* in the southeastern Iberian peninsula / F. J. Marquez, A. Rojas, V. Ibarra [et al.]. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 1078. – P. 328–330.
344. Prevalence of antibodies to *Rochalimaea species* (cat-scratch disease agent) in cats / J. E. Childs, J. G. Olson, A. Wolf [et al.]. – Text : unmediated // Veterinary Record. – 1995. – Vol. 136, № 20. – P. 519-520.
345. Prevalence of bacterial agents in *Ixodes persulcatus* ticks from the Vologda province of Russia / M. E. Ereemeeva, A. Oliveira, J. B. Robinson [et al.]. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 1078 – P. 291-298.
346. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout regions of North America / P. Jameson, C. Greene, R. Regnery [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 1995. – Vol. 172, № 4. – P. 1145-1149.
347. Prevalence of rickettsia-like organisms and spotted fever group rickettsiae in ticks (*Acari: Ixodidae*) from Zimbabwe / L. Beati, P.J. Kelly, L. Matthewman [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 1995. – Vol. 32, № 6. – P. 787-792.

348. Prevalence of spotted fever group *Rickettsia* species detected in ticks in La Rioja, Spain / J. A. Oteo, A. Portillo, S. Santibáñez [et al.]. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 1078. – P. 320-323.
349. Prevalence of Tick-Borne *Rickettsia* and *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* in Tokachi District, Eastern Hokkaido, Japan / H. Inokuma, M. Ohashi, Jilintai [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Veterinary Medical Science. – 2007. – Vol. 69, № 6. – P. 661-664.
350. Price, W. H. Variation in virulence of “*Rickettsia rickettsii*” under natural and experimental conditions / W. H. Price. – Text : unmediated // The dynamics of virus and rickettsial infections / eds. F. W. Hartman [et al.]. – New York, 1954. – P. 164–183.
351. Prophylactic treatment of Rocky Mountain spotted fever / R. H. Kenyon, R. G. Williams, C. N. Oster, C. E. Pedersen Jr. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1978. – Vol. 8, № 1. – P. 102–104.
352. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii* / Y. Zhu, P. E. Fournier, M. Ereemeeva, D. Raoult. – Text : electronic // BMC Microbiology. – 2005. – Vol. 5. – Article number 11. – URL: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-5-11>. – Publication date: 14.03.2015.
353. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimea*, with description of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales* / D. J. Brenner, S. P. O'Connor, H. H. Winkler, A. G. Steigerwalt. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1993. – Vol. 43, № 4. – P. 777-786.
354. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov / R. J. Birtles, T. G. Harrison, N. A. Saunders, D. H. Molyneux. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1995. – Vol. 45, № 1. – P. 1-8.

355. Protection of guinea-pigs from experimental Rocky Mountain spotted fever by immunization with baculovirus-expressed *Rickettsia rickettsii* rOmpA protein / J. W. Sumner, K. G. Sims, D. C. Jones, B. E. Anderson. – Text : unmediated // Vaccine. – 1995. – Vol. 13, № 1. – P. 29–35.
356. Pulliainen, A. T. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation / A. T. Pulliainen, C. Dehio. – Text : unmediated // FEMS Microbiology Reviews. – 2012. – Vol. 36, № 3. – P. 563–599.
357. Raoult, D. The body louse as a vector of reemerging human diseases / D. Raoult, V. Roux. – Text : unmediated // Clinical Infectious Diseases. – 1999. – Vol. 29, № 4. – P. 888-911.
358. Raska, K. National and international surveillance of communicable diseases / K. Raska. – Text : unmediated // WHO Chronicle. – 1966. – Vol. 20, № 9. – P. 315-321.
359. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species / J. M. Rolain, P. Brouqui, J. E. Koehler [et al.]. – Text : unmediated // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2004. – Vol. 48, № 6. – P. 1921-1933.
360. Řeháček, J. Detection of *Coxiella burnetii* in saliva of experimentally infected ticks *Hyalomma dromedarii* Koch / J. Řeháček, R. Brezina. – Text : unmediated // Bulletin of the World Health Organization. – 1968. – Vol. 39, № 6. – P. 974-977.
361. Řeháček, J. Massive occurrence of rickettsiae of the spotted fever group in fowl tick, *Argas persicus*, in the Armenian S.S.R / J. Řeháček, J. Urvölgyi, E. Kováčová. – Text : unmediated // Acta Virologica. – 1977. – Vol. 21, № 5. – P. 431-438.
362. Řeháček, J. *Rickettsia slovaca*, the organism and its ecology / J. Řeháček. – Text : unmediated // Acta Scientiarum Naturalium - Academiae Scientiarum Bohemoslovacae Brno. – 1984. – Vol. 18. – P. 1-50.
363. Řeháček, J. Use of partially engorged female ticks as laboratory animals in Microbiology research / J. Řeháček, G. Šutáková, E. Kocianová. – Text : unmediated // Medical and Veterinary Entomology. – 1994. – Vol. 8, № 2. – P. 165-171.

364. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations / D. Lucey, M. J. Dolan, C. W. Moss [et al.]. – Text : unmediated // *Clinical Infectious Diseases*. – 1992. – Vol. 14, № 3. – P. 683–688.
365. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics / L. G. Wayne, D. J. Brenner, R. R. Colwell [et al.]. – Text : unmediated // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1987. – Vol. 37, № 4. – P. 463–464.
366. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in southern Switzerland (Canton Ticino) / M. V. Bernasconi, S. Casati, S. O. Peter, J. C. Piffaretti. – Text : unmediated // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2002. – Vol. 2, № 2. – P. 111–120.
367. *Rickettsia slovaca* infection. DEBONEL/TIBOLA / V. Ibarra, J. R. Blanco, A. Portillo [et al.]. – Text : unmediated // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 1078. – P. 206–214.
368. Ricketts, H. T. A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain spotted fever: A preliminary report / H. T. Ricketts. – Text : unmediated // *JAMA*. – 1909. – Vol. 52, № 5. – P. 379–380.
369. Ricketts, H. T. Observations on the virus and means of transmission of Rocky Mountain spotted fever / H. T. Ricketts. – Text : unmediated // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1907. – Vol. 4, issue 1. – P. 141–153.
370. Ricketts, H. T. Studies on immunity in Rocky Mountain spotted fever / H. T. Ricketts, L. Gomez. – Text : unmediated // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1908. – Vol. 5, issue 2. – P. 221–244.
371. Ricketts, H. T. The study of “Rocky Mountain spotted fever” (Tick fever?) by means of animal inoculations: A preliminary communication / H. T. Ricketts. – Text : unmediated // *JAMA*. – 1906. – Vol. 47, issue 1. – P. 33–36.
372. Ricketts, H. T. The transmission of Rocky Mountain spotted fever by the bite of the wood-tick (*Dermacentor occidentalis*) / H. T. Ricketts. – Text : unmediated // *JAMA*. – 1906. – Vol. 47, issue 5. – P. 358.

373. *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma* ticks from Corsica / K. Matsumoto, P. Parola, P. Brouqui, D. Raoult. – Text : unmediated // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2004. – Vol. 23, № 9. – P. 732-734.
374. *Rickettsia aeschlimannii* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia associated with *Hyalomma marginatum* ticks / L. Beati, M. Meskini, B. Thiers, D. Raoult. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1997. – Vol. 47, № 2. – P. 548-554.
375. *Rickettsia africae* sp. nov., the etiological agent of African tick bite fever / P. J. Kelly, L. Beati, P. R. Mason [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1996. – Vol. 46, № 2. – P. 611-614.
376. *Rickettsia amblyommii* induces cross protection against lethal Rocky Mountain spotted fever in a guinea pig model / L. S. Blanton, N. L. Mendell, D. H. Walker, D. H. Bouyer. – Text : unmediated // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2014. – Vol. 14, № 8. – P. 557–562.
377. *Rickettsia* and *Anaplasma* species in *Dermacentor andersoni* ticks from Washington / L. Francis, C. D. Paddock, E. A. Dykstra, S. E. Karpathy. – Text : electronic // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2020. – Vol. 11, issue 4. – Article number 101422. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19304182?via%3DiHub>. – Publication date: 6.04.2020.
378. *Rickettsia asiatica* sp. nov., isolated in Japan / H. Fujita, P.-E. Fournier, N. Takada [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 2006. – № 56, pt. 10. – P. 2365-2368.
379. *Rickettsia buchneri* sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis* / T. J. Kurti, R. F. Felsheim, N. Y. Burkhardt [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2015. – Vol. 65, pt. 3. – P. 965–970.
380. *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. clarridgeiae*, New Zealand / P. J. Kelly, N. Meads, A. Theobald [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2004. – Vol. 10, № 5. – P. 967-968.

381. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group / D. H. Bouyer, J. Stenos, P. Crocquet-Valdes [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 2001. – № 51, pt. 2. – P. 339-347.
382. *Rickettsia gravesii* sp. nov.: a novel spotted fever group rickettsia in Western Australian *Amblyomma triguttatum triguttatum* ticks / M. Abdad , R. Abdallah, K. Karkouri [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2017. – Vol. 67, № 9. – P. 3156-3161.
383. *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks / M. Dobec, D. Golubic, V. Punda-Polic [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 15, № 1. – P. 98-100.
384. *Rickettsia honei* Infection in a Traveler Returning from India / A. M Denison, B. Leitgeb, J. M. Obadiah [et al.]. – Text : electronic // Open Forum Infectious Diseases. – 2021. – Vol. 8, issue 2. – Article number ofaa636. – URL: <https://academic.oup.com/ofid/article/8/2/ofaa636/6044078>. – Published date: 22.12.2020.
385. *Rickettsia honei* sp. nov., the aetiological agent of Flinders Island spotted fever in Australia / J. Stenos, V. Roux, D. Walker, D. Raoult - Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1998. – № 48, pt. 4. – P.1399-1404.
386. *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard- and soft-bodied ticks / D. Duh, V. Punda-Polic, T. Avsic-Zupanc [et al.]. – Text : unmediated // International journal of systematic bacteriology. – 2010. – № 60, pt. 4. – P. 977-984.
387. *Rickettsia japonica* Infections in Humans, Xinyang, China, 2014-2017 / H. Li, P.-H. Zhang, J. Du [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 25, № 9. – P. 1719-1722.
388. *Rickettsia japonica* Infections in Humans, Zhejiang Province, China, 2015 / Q. Lu, J. Yu, L. Yu [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 24, № 11. – P. 2077–2079.
389. *Rickettsia japonica* sp. nov., the etioloical agent of spotted fever group rickettsiosis in Japan / T. Uchida, T. Uchiyama, K. Kumano, D. H. Walker. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1992. – Vol. 42, № 2. – P. 303-305.

390. *Rickettsia massiliae* Human Isolation / G. Vitale, S. Mansueto, J. M. Rolain D. Raoult.  
– Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 12, № 1. – P. 174–175.
391. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain / I. Jado, J. A. Oteo, M. Aldamiz [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 13, № 9. – P. 1405-1407.
392. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in European city park / J. A. Simser, A. T. Palmer, V. Fingerle [et al.]. – Text : unmediated // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68, № 9. – P. 4559-4566.
393. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil / R. C. Pacheco, J. Moraes-Filho, A. Marcili [et al.]. – Text : unmediated // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 77, № 15. – P. 5207–5211.
394. *Rickettsia peacockii* sp. nov., a new species infecting wood ticks, *Dermacentor andersonii*, in Western Montana / M. L. Niebylski, M. E. Schrumpf, W. Burgdorfer [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1997. – Vol. 47, № 2. – P. 446-452.
395. *Rickettsia rickettsii* Co-feeding Transmission among *Amblyomma aureolatum* Ticks / J. Moraes-Filho, F. B. Costa, M. Gerardi [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 24, № 11. – P. 2041–2048.
396. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses / P. Parola, C. Rovero, J. M. Rolain [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 1105-1108.
397. *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* collected on wild boars in Tuscany, Italy / M. Selmi, E. Martello, L. Bertolotti [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2009. – Vol. 46, № 6 – P.1490-1493.
398. *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA / V. Ibarra, J. A. Oteo, A. Portillo [et al.]. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 1078. – P. 206-214.

399. *Rickettsia slovaca* sp. nov., a member of the spotted fever group rickettsiae / Z. Sekeyová, V. Roux, W. Xu [et al.]. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1998. – Vol. 48, pt. 4. – P. 1455-1462.
400. *Rickettsia* sp. strain RpA4 detected in Portuguese *Dermacentor marginatus* ticks / L. Vitirino, R. De Sousa, F. Bacellar, L. Ze-Ze. – Text : unmediated // Vector Borne and Zoonotic Diseases. – 2007. – Vol. 7, № 2. – P. 217-220.
401. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for brazilian spotted fever in Brazil / E. Guedes, R. C. Leite, R. C. Pacheco [et al.]. – Text : unmediated // Brazilian Journal of Veterinary Parasitology. – 2011. – Vol. 20, № 4. – P. 308–311.
402. *Rickettsia* spp. in five tick species collected in Central California / C. J. Osborne, A. J. Wakeman-Hill, S. E. Loa [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2020. – Vol. 57, № 5. – P. 1596-1603.
403. *Rickettsia* spp. in ticks, Poland / T. Chmielewski, E. Podsiadly, G. Karbowiak, S. Tylewska-Wierzbanowska. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 15, № 3. – P. 486-488.
404. *Rickettsia tamurae* sp. nov., isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks / P.-E. Fournier, N. Takada, H. Fujita, D. Raoult. – Text : unmediated // International Journal of Systematic Bacteriology. – 2006. – № 56, pt. 7. – P. 1673-1675.
405. *Rickettsiae* and *Borrelia burgdorferi* in ixodid ticks / L. A. Magnarelli, T. G. Andreadis, K. C. Stafford III, C. J. Holland. – DOI: 10.1128/jcm.29.12.2798-2804.1991 . – Text: electronic // Journal of Clinical Microbiology. – 1991. – Vol. 29, № 12. – P. 2798–2804. URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.29.12.2798-2804.1991> (date assesed: 25.11.2024.).
406. *Rickettsiae* of spotted fever group in ixodid ticks from Hungary: identification of a new genotype (*Candidatus Rickettsia kotlanii*) / Z. Sreter-Lancz, Z. Szell, G. Kovacs [et al.]. – Text : unmediated // Annals of Tropical Medicine and Parasitology. – 2006. – Vol. 100, № 3. – P. 229-236.

407. *Rickettsiae* of the spotted fever isolated from *Dermacentor marginatus* ticks in South Germany / J. Reháček, A. Liebisch, J. Urvölgyi, E. Kováčová. – Text : unmediated // Central Journal for bacteriology, parasitology, infectious diseases and hygiene. First Department Originals. Series A: Medical Microbiology and Parasitology. – 1977. – Vol. 239, № 2. – P. 275-81.
408. Rickettsial diseases: from *Rickettsia*–arthropod relationships to pathophysiology and animal models / Y. Bechah, C. Capo, J. L. Mege, D. Raoult. – Text : unmediated // Future Microbiology. – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. 223–236.
409. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia* / K. Macaluso, D. Sonenshine, Sh. Ceraul, A. Azad. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2002. – Vol. 39, № 6. – P. 809-813.
410. Rickettsial seropositivity in the indigenous community and animal farm workers, and vector surveillance in Peninsular Malaysia / K. L. Kho, F. X. Koh, L. I. M. Hasan [et al.]. – Text : electronic // Emerging Microbes and Infections. – 2017. – Vol. 6, № 4. – Article number e18. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2017.4>. – Publication date: 15.01.2019.
411. *Rickettsiales* in Italy / C. Guccione, C. Colomba, M. Tolomeo [et al.]. – Text : electronic // Pathogens. – 2021. – Vol. 10, № 2. – Article number 181. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/2/181>. – Publication date: 8.02.2021.
412. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis / J. S. Daly, M. G. Worthington, D. J. Brenner [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1993. – Vol. 31, № 4. – P. 872-881.
413. Roux, V. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA / V. Roux, P. E. Fournier, D. Raoult. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1996. – Vol. 34, № 9. – P. 2058-2065.

- 414.Roux, V. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* by using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*) / V. Roux, D. Raoult. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2000. – Vol. 50, pt. 4. – P. 1449-1455.
- 415.Roux, V. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing / V. Roux, D. Raoult. – Text : unmediated // Research in Microbiology. – 1995. – Vol. 146, № 5. – P. 385-396.
- 416.Sahni, S. Host-cell interactions with pathogenic *Rickettsia* species / S. Sahni, E. Rydkina. – Text : unmediated // Future Microbiology. – 2009. – Vol. 4, № 3. – P. 323-339.
- 417.Sant'Anna, J. F. On a disease in man following tick-bites and occurring in Lourenço Marques / J. F. Sant'Anna. – Text : unmediated // Parasitology. – 1911. – Vol. 4, № 2. – P. 87-88.
- 418.Scalp eschar and neck lymphadenopathy by *Rickettsia slovaca* after *Dermacentor marginatus* tick bite case report: multidisciplinary approach to a tick-borne disease / G. Barlozzari, F. Romiti, M. Zini [et al.]. – Text : electronic // BMC Infectious Diseases. – 2021. – Vol. 21, № 1. – Article number 103. – URL: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-021-05807-3>. – Publication date: 22.01.2021.
- 419.Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Bartonella henselae* after tick bite / E. Angelakis, C. Pulcini, J. Waton [et al.]. – Text : unmediated // Clinical Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 50, № 4. – P. 549-551.
- 420.Schicht, S. *Rickettsia* spp. and coinfections with other pathogenic microorganisms in hard ticks from northern Germany / S. Schicht, T. Schnieder, C. Strube. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2012. – Vol. 49, № 3. – P. 766-771.
- 421.Schultz, M. G. A history of bartonellosis (Carrion's disease) / M. G. Schultz. – Text : unmediated // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 1968. – Vol. 17, № 4. – P. 503-515.
- 422.Schultz, N. G. Daniel Carrion's experiment / N. G. Schultz. – Text : unmediated // New England Journal of Medicine. – 1968. – Vol. 278, № 24. – P. 1323-1326.

- 423.Schumacher, L. Effect of *Rickettsia rickettsia* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) infection on the biological parameters and survival of its tick vector - *Dermacentor variabilis* (*Acari: Ixodidae*) / L. Schumacher, A. Snellgrove, M. L. Levin. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2016. – Vol. 53, № 1. – P. 172–176.
- 424.Seasonality of Cat Scratch Disease, France, 1999-2009 / D. Sanguinetti-Morelli, E. Angelakis, H. Richet [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 17, № 4. – P. 705-707.
- 425.Sekeyova, Z. Phylogeny of *Rickettsia* spp. Inferred by comparing sequences of ‘gene D’, which encodes an intracytoplasmic protein / Z. Sekeyova, V. Roux, D. Raoult. – Text : unmediated // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2001. – Vol. 51, pt. 4. – P. 1353-1360.
- 426.Sequence and expression analysis of the *ompA* gene of *Rickettsia peacockii*, an endosymbiont of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* / G. D. Baldridge, N. Y. Burkhardt, J. A. Simser [et al.]. – Text : unmediated // Applied and environmental microbiology. – 2004. – Vol. 70, № 11. – P. 6628-6636.
- 427.Serologic evidence of *Rickettsia canada* infection of man / F. M. Bozeman, B. L. Elisberg, J. W. Humphries [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 1970. – Vol. 121, № 4. – P. 367–371.
- 428.Serologic response to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in sick and healthy children / T. Not, M. Canciani, E. Buratti [et al.]. – Text : unmediated // Acta paediatrica. – 1999. – Vol. 88, № 3. – P. 284-289.
- 429.Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by micro-immunofluorescence / R. N. Philip, E. A. Casper, W. Burgdorfer [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Immunology. – 1978. – Vol. 121, № 5. – P. 1961-1968.
- 430.Serological response to *Bartonella* species in febrile patients from Nepal / K. S. Aye Myint, R. V. Gibbons, J. Iverson [et al.]. – Text : unmediated // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2011. – Vol. 105, № 12. – P. 740–742.
- 431.Serological Survey of *Rickettsia japonica* Infection in Dogs and Cats in Japan / M. Tabuchi, Jilintai, Y. Sakata [et al.]. – Text : unmediated // Clinical and Vaccine Immunology. – 2007. – Vol. 14, № 11. – P. 1526–1528

432. Serology as a diagnostic tool for the detection of *Bartonella henselae* infection / M. Mavrouli, G. Vrioni, V. Kapsimali, A. Tsakris. – Text : unmediated // 9th Balkan Congress of Microbiology. – Thessaloniki, Greece, 2015. – P. 175.
433. Seroprevalence to *Bartonella quintana* among patients at a community clinic in downtown Seattle / L. A. Jackson, D. H. Spach, D. A. Kippen [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 1996. – Vol. 173, № 4. – P. 1023-1026.
434. Seven years' experience of isolation of *Rickettsia* spp. from clinical specimens using the shell vial cell culture assay / G. Vestris, J. M. Rolain, P.E. Fournier [et al.]. – Text : unmediated // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2003. – Vol. 990. – P. 371–374.
435. Spotted fever group rickettsia sp. closely related to *Rickettsia japonica*, Thailand / N. Takada, H. Fujita, H. Kawabata [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 15, № 4. – P. 610-611.
436. Spotted fever group rickettsiae in ticks, Morocco / M. Sarih, C. Socolovschi, N. Boudebouch [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 14, № 7. – P. 1067-1073.
437. Spotted fever group rickettsial infection in South-Eastern Australia: isolation of rickettsiae / S. R. Graves, L. Stewart, J. Stenos [et al.]. – Text : unmediated // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 1993. – Vol. 16, № 3. – P. 223-233.
438. Stewart, R. S. Flinders Island spotted fever: a newly recognized endemic focus of tick typhus in Bass Strait. Part 1. Clinical and epidemiological features / R. S. Stewart. – Text : unmediated // The Medical Journal of Australia. – 1991. – Vol. 154, № 2. – P. 94–99.
439. Stochard, D. R. Evolutionary analysis of spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* using 16S rRNA gene sequences / D. R. Stochard, P. A. Fuerst. – Text : unmediated // Systematic and Applied Microbiology. – 1995 – Vol. 18, issue 1. – P. 52-61.

440. Stokes, J. The Guinea Pig Model for Tick-Borne Spotted Fever Rickettsioses: A Second Look / J. Stokes, D. Walker, A. Varela-Stokes. – Text : electronic // Ticks and Tick-borne Disease. – 2020. – Vol. 11, issue 6. – Article number 101538. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X20303083?via%3Dihub>. – Publication date: 7.08.2020.
441. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (*Siphonaptera: Pulicidae*) / J. L. Finkelstein, T. P. Brown, K. L. O'Reilly [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2002. – Vol. 39, № 6. – P. 915-919.
442. Studies on the rickettsial plaque assay technique / D. A. Wike, G. Tallent, M. G. Peacock, R. A. Ormsbee. – Text : unmediated // Infection and Immunity. – 1972. – Vol. 5, № 5. – P. 715-722.
443. Study on ticks and tick-borne zoonoses in public parks in Italy / R. Corrain, M. Drigo, M. Fenati [et al.]. – Text : unmediated // Zoonoses Public Health. – 2012. – Vol. 59, № 7. – P. 468-476.
444. Susceptibility of *Rickettsia rickettsii* to Tigecycline in a cell culture assay and animal model for Rocky Mountain Spotted Fever / L. S. Blanton, N. M. Wilson, B. R. Quade, D. H. Walker. – Text : unmediated // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2019. – Vol. 101, № 5. – P. 1091–1095.
445. Svendsen, C. B. Detection of *Rickettsia* spp. in Danish ticks (*Acari: Ixodes ricinus*) using real-time PCR / C. B. Svendsen, K. A. Krogfelt, P. M. Jensen - Text : unmediated // Scandinavian Journal of Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 41, № 1. – P. 70–72.
446. Taxonomic considerations of *Bartonella bacilliformis* based on phylogenetic and phenotypic characteristics / R. J. Birtles, T. G. Harrison, N. K. Fry [et al.]. – Text : unmediated // FEMS Microbiology Letters. – 1991. – Vol. 67, № 2. – P. 187-191.
447. Telford 3rd, S. R. *Bartonella* spp. Transmission by Ticks Not Established / S. R. Telford 3rd, G. P. Wormser. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 379-384.

448. The ability of the invasive Asian Longhorned tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) to acquire and transmit *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae), the agent of Rocky Mountain spotted fever, under laboratory conditions / H. M. Stanley, S. L. Ford, A. N. Snellgrove [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2020. – Vol. 57, № 5. – P. 1635-1639.
449. The cellular immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in the guinea pig / D. Ordway, G. Palanisamy, M. Henao-Tamayo [et al.]. – Text : unmediated // Journal of Immunology. – 2007. – Vol. 179, № 4. – P. 2532–2541.
450. The construction of transgenic and gene knockout/ knockin mouse models of human disease / A. Doyle, M. P. McGarry, N. A. Lee, J. J. Lee. – Text : unmediated / Transgenic Research. – 2012. – Vol. 21, № 2. – P. 327–349.
451. The first fatal case of Japanese spotted fever confirmed by serological and Microbiologyogical tests in Awaji Island, Japan / T. Nomuda, T. Fujimoto, C. Ebisutani [et al.]. – Text : unmediated // The Journal of Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 60, № 4. – P. 241-243.
452. The first human case of *Rickettsia slovaca* from Turkey / M. Emiroglu, B. Celebi, G. Alkan, Y. Yilmaz. – Text : electronic // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2021. – Vol. 12, № 5. – Article number 101755. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X21001084?via%3DiHub>. – Publication date: 3.06.2021.
453. The first human case of *Rickettsia tamurae* infection in Japan / K. Imaoka, S. Kaneko, K. Tabara [et al.]. – Text : unmediated // Case Reports in Dermatology. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 68–73.
454. The *Ixodes scapularis* Symbiont *Rickettsia buchneri* Inhibits Growth of pathogenic *Rickettsiaceae* in tick cells: implications for vector competence / B. Cull, N. Y. Burkhardt, X.-R. Wang [et al.]. – Text : electronic // Frontiers in Veterinary Science. – 2022. – Vol. 8. – Article number 748427. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8770908/>. – Publication date: 6.01.2022.

455. The life cycle of *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions / Z. Chen, Y. Q. Li, Z. J. Liu [et al.]. – Text : unmediated // Experimental and Applied Acarology. – 2012. – Vol. 56, № 1. – P. 85–92.
456. The tick endosymbiont *Candidatus midichloria mitochondrii* and selenoproteins are essential for the growth of *Rickettsia parkeri* in the gulf coast tick vector / K. Budachetri, D. Kumar, G. Crispell [et al.]. – Text : unmediated // Microbiome. – 2018. – Vol. 6, № 1. – P. 141.
457. Tick cell lines: Tools for tick and tick-borne disease research / L. Bell-Sakyi, E. Zweggarth, E. F. Blouin [et al.]. – Text : unmediated // Trends in Parasitology. – 2007. – Vol. 23, № 9. – P. 450–457.
458. Tick-borne pathogen detection, Western Siberia, Russia / V. A. Rar, N. V. Fomenko, A. K. Dobrotvorsky [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2005. – Vol. 11, № 11. – P. 1708-1715.
459. Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands / A. M. Nijhof, C. Bodaan, M. Postigo [et al.]. – Text : unmediated // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2007. – Vol. 7, № 4. – P. 585–595.
460. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus* / V. Cotte, S. Bonnet, D. Le Rhun [et al.]. – Text : unmediated // Emerging Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 14, № 7. – P. 1074-1080.
461. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus* / K. Matsumoto, P. Brouqui, D. Raoult, P. Parola. – Text : unmediated // Medical and Veterinary Entomology. – 2005. – Vol. 19, № 3. – P. 263–270.
462. Troughton, D. R. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions / D. R. Troughton, M. L. Levin. – Text : unmediated // Journal of Medical Entomology. – 2007. – Vol. 44, № 5. – P. 732–740.
463. Tsukahara, M. Cat scratch disease in Japan / M. Tsukahara. – Text : unmediated // Journal of Infection and Chemotherapy. – 2002. – Vol. 8, № 4. – P. 321-325.

464. Two strains of rickettsiae of Rocky Mountains spotted fever group recovered from *Dermacentor marginatus* ticks in Czechoslovakia. Results of preliminary serological identification / R. Brezina, J. Reháček, P. Ac, M. Majerska. – Text : unmediated // *Acta Virologica*. – 1969. – Vol. 13, № 2. – P. 142-145.
465. Uchida, T. Isolation of spotted fever group rickettsiae from humans in Japan / T. Uchida, T. Uchiyama, A. H. Koyama. – Text : unmediated // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1988. – Vol. 158, № 3. – P. 664–665.
466. Ultrastructural study of the infection process of *Rickettsia conorii* in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus sanguineus* / A. S. Santos, F. Bacellar, M. Santos-Silva [et al.]. – Text : unmediated // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2002. – Vol. 2, № 3. – P. 165-77.
467. Unsuspected hepatosplenic involvement in patients hospitalized with cat-scratch disease / B. Estrada, M. Silio, R. E. Begue, R. B. Van Dyke. – Text : unmediated // *Pediatric Infectious Disease Journal*. – 1996. – Vol. 15, № 8. – P. 720-721.
468. Unusual eruption as a presenting symptom of cat scratch disease / M. Landau, Y. Kletter, B. Avidor [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 1999. – № 41, pt. 2. – P. 833-836.
469. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach / P. Parola, C. D. Paddock, C. Socolovschi [et al.]. – Text : unmediated // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2013. – Vol. 26, № 4. – P. 657–702.
470. Urvolgyi, J. *Rickettsia slovaca*: a new member of spotted fever group rickettsiae // J. Urvolgyi, R. Brezina. – Text : unmediated // *Proceedings of the 2nd International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases* / eds. J. Kazar [et al.]. – Bratislava, 1978. – P. 299-305.
471. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species / P. Renesto, J. Gouvernet, M. Drancourt [et al.]. – Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2001. – Vol. 39, № 2. – P. 430-437.
472. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience / F. Gouriet, F. Fenollar, J.Y. Patrice [et al.] - Text : unmediated // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2005. – Vol. 43, № 10. – P. 4993–5002.

473. Valbuena, G. Expression analysis of the T-cell-targeting chemokines CXCL9 and CXCL10 in mice and humans with endothelial infections caused by *Rickettsiae* of the spotted fever group / G. Valbuena, W. Bradford, D. H. Walker. – Text : unmediated // American Journal of Pathology. – 2003. – Vol. 163, № 4. – P. 1357–1369.
474. Valbuena, G. Expression of CX3CL1 (fractalkine) in mice with endothelial-target Rickettsial infection of the spotted-fever group / G. Valbuena, D. H. Walker. – Text : unmediated // Virchows Archiv. – 2005. – Vol. 446, № 1. – P. 21–27.
475. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii* / C. Reis, M. Cote, D. Le Rhun [et al.]. – Text : electronic // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2011. – Vol. 5, № 5. – Article number e1186. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104967/>. – Publication date: 31.05.2011.
476. Vector tick transmission model of spotted fever rickettsiosis / T. B. Saito, J. Bechelli, C. Smalley [et al.]. – Text : unmediated // The American Journal of Pathology. – 2019. – Vol. 189, № 1. – P. 115–123.
477. Verruga peruana: an infectious endemic angiomasia / H. Cáceres-Ríos, J. Rodríguez-Tafur, F. Bravo-Puccio [et al.]. – Text : unmediated // Critical Reviews in Oncogenesis. – 1995. – Vol. 6, № 1. – P. 47-56.
478. Vertebral osteomyelitis associated with cat scratch disease / C. V. Hulzebos, H. A. Koetse, J. L. Kimpen, T. F. Wolfs. – Text : unmediated // Clinical Infectious Diseases. – 1999. – Vol. 28, № 6. – P. 1310-1312.
479. Walker, D. H. Endothelial-target Rickettsial infection / D. H. Walker. – Text : unmediated // Laboratory Animal Science. – 1997. – Vol. 47, № 5. – P. 483–485.
480. Weismann, P. Dual infection of *Ixodes ricinus* ticks with two viruses of the tick-borne encephalitis complex / P. Weismann, M. Labuda, O. Koiuch. – Text : unmediated // Acta Virologica. – 1990. – Vol. 34, № 4. – P. 353-357.
481. Weiss, E. Growth and Physiology of *Rickettsiae* / E. Weiss. – Text : unmediated // Bacteriological Reviews. – 1973. – Vol. 37, № 3. – P. 259-283.

482. Weiss, E. Selection of an erythromycin-resistant strain of *Rickettsia prowazekii* / E. Weiss, H. R. Dressler. – Text : unmediated // American Journal of Hygiene. – 1960. – Vol. 71. – P. 292-298.
483. Weyer, F. Die künstliche Infektion von Zecken mit Rickettsien und anderen Krankheitserregern / F. Weyer. – Text : unmediated // Zentralblatt für Bakteriologie, I Abteillung, Original. – 1948. – № 152. – P. 449-457.
484. Wheeler, S. W. Cat-scratch encephalopathy / S. W. Wheeler, S. M. Wolf, E. A. Steinberg. – Text : unmediated // Neurology. – 1997. – Vol. 49, № 3. – P. 876-878.
485. Wike, D. A. Plaque formation in tissue cultures by *Rickettsia rickettsi* isolated directly from whole blood and tick hemolymph / D. A. Wike, W. Burgdorfer. – Text : unmediated // Infection and Immunity. – 1972. – Vol. 6, № 5. – P. 736–738.
486. Wolbach, S. B. The etiology of Rocky Mountain spotted fever: (a preliminary report) / S. B. Wolbach. – Text : unmediated // The Journal of Medical Research. – 1916. – Vol. 34. – P. 121–126.
487. Wu, Y. M. Western-blot analysis of *Rickettsia heilongjiangi*. / Wu, Y. M., S. R. Yu, and D. Lou. – Text : unmediated // J. Prev. Med. P. L. A. - 1994. Vol. 12/ - P. 28–30.
488. Zbinden, R. *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assays are useful for diagnosis of cat scratch disease / R. Zbinden. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 1998. – Vol. 36, № 12. – P. 3741-3742.
489. Zeaiter, Z. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences / Z. Zeaiter, Z. Liang, D. Raoult. – Text : unmediated // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40, № 10. – P. 3641-3647.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность научному консультанту работы д.м.н., профессору Н.В. Рудакову, всем сотрудникам лаборатории зоонозных инфекций, сотрудникам арбовирусной лаборатории ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» д.б.н. В.В. Якименко и д.б.н. М.Г. Мальковой; сотрудникам ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН к.б.н. В.А. Рар и к.б.н. Я.П. Иголкиной за помощь, оказанную при выполнении данной работы. Автор признателен профессору Средиземноморского университета Didier Raoult за возможность провести молекулярно-биологические исследования.