

## Обнаружение и генотипирование *Anaplasma phagocytophilum* в клещах *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, собранных в г. Томске в 2015–2016 гг.

Карташов М.Ю.<sup>1,2</sup>, Микрюкова Т.П.<sup>1</sup>, Москвитина Н.С.<sup>3</sup>, Кривошеина Е.И.<sup>1</sup>, Кузнецов А.И.<sup>1</sup>, Романенко В.Н.<sup>3</sup>, Большакова Н.П.<sup>3</sup>, Терновой В.А.<sup>1</sup>, Локтев В.Б.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор»  
Россия, 630559, Новосибирская область, р.н. Кольцово

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Новосибирский государственный университет (НГУ)  
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)  
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

<sup>4</sup> Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (ФИЦ ИЦиГ СО РАН)  
Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

### РЕЗЮМЕ

**Введение.** Выявление первых случаев заболевания клещевым гранулоцитарным анаплазмозом человека в Российской Федерации, обнаружение генетических маркеров анаплазмозов в иксодовых клещах, регистрация значительного количества случаев различных клещевых инфекций на юге Западной Сибири ставят вопрос о возможной циркуляции возбудителя анаплазмоза в г. Томске и его пригородах.

**Цель исследования.** Изучение распространения и видового разнообразия *A. phagocytophilum* в иксодовых клещах на территории Томской области.

**Материалы и методы.** Проведен анализ 690 индивидуальных образцов личинок и имаго иксодовых клещей видов *Ixodes persulcatus* ( $n = 530$ ) и *Dermacentor reticulatus* ( $n = 160$ ), собранных в 2015–2016 гг. на территории городских и пригородных биотопов г. Томска. Первичный скрининг клещей на наличие генетического материала *A. phagocytophilum* проводили с помощью двухраундовой полимеразной цепной реакции в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена *16S рРНК*. Для положительных изолятов осуществлялось амплифицирование фрагмента (1 220 пар нуклеотидов) *groESL*-оперона белков теплового шока с последующим определением нуклеотидной последовательности фрагмента гена и проведением филогенетического анализа.

**Результаты.** Уровень инфицированности *A. phagocytophilum* у личинок *I. persulcatus* составил  $(1,2 \pm 0,6)\%$ ; у половозрелых особей *I. persulcatus* –  $(1,8 \pm 0,7)\%$ ; у половозрелых особей *D. reticulatus* –  $(0,6 \pm 0,3)\%$ . Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента *groESL*-оперона для девяти изолятов подтвердил обнаружение генетического материала возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза. Филогенетический анализ показал, что все изоляты относятся к первой группе «нового» кластера *A. phagocytophilum*.

**Вывод.** Возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека впервые обнаружен в клещах *I. persulcatus*, собранных в городских и пригородных биотопах г. Томска, и *D. reticulatus* из городского биотопа.

**Ключевые слова:** гранулоцитарный анаплазмоз человека, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor reticulatus*.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при поддержке Программы повышения конкурентоспособности ТГУ и НИОКТР «Изучение генетического разнообразия клещевых инфекций» (AAAA-A17-117060510019-7).

**Для цитирования:** Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Москвитина Н.С., Кривошеина Е.И., Кузнецов А.И., Романенко В.Н., Большакова Н.П., Терновой В.А., Локтев В.Б. Обнаружение и генотипирование *Anaplasma phagocytophilum* в клещах *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, собранных в г. Томске в 2015–2016 гг. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 89–98. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-89-98](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-89-98).

УДК 579.881.3:595.421](571.16)

[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-89-98](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-89-98)

## Detection and genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* in *I. persulcatus* and *D. reticulatus* ticks collected in Tomsk (Western Siberia) in 2015–2016

Kartashov M.Yu.<sup>1,2</sup>, Mikryukova T.P.<sup>1</sup>, Moskvitina N.S.<sup>3</sup>, Krivosheina E.I.<sup>1</sup>, Kuznetsov A.I.<sup>1</sup>, Romanenko V.N.<sup>3</sup>, Bol'shakova N.P.<sup>3</sup>, Ternovoi V.A.<sup>1</sup>, Loktev V.B.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology (SRC VB) "Vector"  
Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Novosibirsk State University  
2, Pirogova Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

<sup>3</sup> National Research Tomsk State University (NR TSU)  
36, Lenina Ave., Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>4</sup> Federal Research Center (FRC) Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of RAS (SB RAS)  
10, Lavrentyeva Ave., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

### ABSTRACT

**Introduction.** The detection of the first cases of tick-borne human granulocytic anaplasmosis in Russia, discovery of genetic markers for *Anaplasma spp.* in ixodid ticks and reporting of a significant number of cases of tick-borne infections in the southern part of Western Siberia give reason to suppose that causative agents of tick-borne anaplasmosis may be transmitted in Tomsk and its suburbs.

**Objective.** To study the distribution and species biodiversity of *A. phagocytophilum* in ixodid ticks in Tomsk Region.

**Materials and methods.** The analysis of 690 individual ixodid ticks (larvae and adults) was carried out for *Ixodes persulcatus* ( $n = 530$ ) and *Dermacentor reticulatus* ( $n = 160$ ) ticks collected in 2015–2016 on the territory of urban and suburban biotopes of Tomsk. Primary screening of ticks for the presence of genetic material of *A. phagocytophilum* was conducted using two-round PCR with species-specific primers for the 16S rRNA gene. The amplification (1,220 kB) of the *groESL* fragment of the heat shock protein operon was performed for positive isolates with subsequent determination of the nucleotide sequence in the gene fragment for phylogenetic analysis.

**Results.** The number of *A. phagocytophilum* positive samples for *I. persulcatus* (larvae) was  $1.2 \pm 0.6\%$ , *I. persulcatus* (adult) was  $1.8 \pm 0.7\%$ ; and *D. reticulatus* (adult) was  $0.6 \pm 0.3\%$ . Analysis of the nucleotide sequence of the gene fragments in *groESL* operon for nine isolates confirmed that the genetic material of the granulocytic anaplasmosis was detected. Phylogenetic analysis showed that all the isolates belonged to the first group of the "new cluster" of *A. phagocytophilum*.

**Conclusion.** The causative agent of human granulocytic anaplasmosis has been newly detected in *I. persulcatus* ticks collected in urban and suburban biotopes of Tomsk and in *D. reticulatus* from urban foci.

**Key words:** human granulocytic anaplasmosis, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor reticulatus*.

**Conflict of interest.** The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** The study was supported by the Program on enhancing TSU competitiveness and the research, development and technological work “Studying the genetic diversity of tick-borne infections” (AAAA-A17-117060510019-7).

**For citation:** Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Krivosheina E.I., Kuznetsov A.I., Romanenko V.N., Bol'shakova N.P., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Detection and genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* in *I. persulcatus* and *D. reticulatus* ticks collected in Tomsk (Western Siberia) in 2015–2016. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 89–98. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-89-98>.

## ВВЕДЕНИЕ

Анаплазмозы – распространенная группа заболеваний человека и животных, вызываемых представителями семейства Anaplasmataceae порядка Rickettsiales. Возбудителем гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) является *Anaplasma phagocytophilum* – облигатная внутриклеточная грамотрицательная бактерия округлой формы диаметром до 1 мкм, обладающая высоким тропизмом к лейкоцитарным гранулоцитам (в основном, нейтрофилам). Возбудитель ГАЧ широко распространен в различных регионах мира, где вызывает заболевание у человека, многих видов домашних и диких животных, а также птиц [1]. Анаплазмоз домашних животных, известный под названием «клещевая лихорадка» (tick-borne fever), приносит существенный экономический ущерб [2, 3]. Специфичными переносчиками этой инфекции являются клещи рода *Ixodes*: *I. scapularis* и *I. pacificus* в США, *I. ricinus* и *I. trianguliceps* в Европе, а также *I. persulcatus* в России и некоторых азиатских странах.

После укуса клеща возбудитель ГАЧ со слюной инфицированного клеща поступает в место укуса, далее проникает в кровь, где размножается внутри нейтрофилов. Основным лигандом, который анаплазмы используют для первичного связывания с клеткой-мишенью, является молекула PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) на мембране клетки [4]. Также описано участие  $\beta_2$ -интегрина и липидных «рафтов» в адгезии анаплазм к нейтрофилам [5]. Взаимодействие возбудителя с нейтрофилом сопровождается высвобождением ряда цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ). Принято считать, что *A. phagocytophilum* индуцирует синтез цитокинов за счет рецепторного сигнала посредством воздействия на toll-like рецептор

TLR-2 [6]. В организме человека цитокины синтезируются раньше, чем появляются первые антитела.

Именно цитокины обуславливают такие клинические проявления ГАЧ, как лихорадка, миалгии, артралгии [7]. Наибольшее значение в патогенезе анаплазмоза отводится IL-8, повышение концентрации которого угнетает продукцию гематопоеза.

Инкубационный период ГАЧ варьирует от 2 сут до 3 нед, составляя в среднем 5–10 сут. Клиника ГАЧ для человека очень разнообразна: от легких, субклинических форм до крайне тяжелых, летальных случаев. Постановку диагноза затрудняет отсутствие специфичных признаков заболевания. Клиническая картина ГАЧ включает недомогание, головные и мышечные боли, лихорадку. Менее чем у половины больных могут наблюдаться тошнота, рвота, анорексия, диарея, боли в брюшной области, боли в суставах, кашель. В большинстве случаев у больных ГАЧ отмечают лейкопению, тромбоцитопению, а также повышенный уровень аминотрансфераз печени и С-реактивного белка в сыворотке крови [8, 9]. Летальные исходы составляют 0,5–1,0%, и они обычно связаны с развитием вторичных инфекций. Дифференцировать ГАЧ необходимо со многими заболеваниями, протекающими с лихорадкой, экзантемами, в том числе с природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями, переносимыми клещами (клещевой энцефалит, иксодовый клещевой боррелиоз, клещевые риккетсиозы, туляремия, бабезиоз, моноцитарный эрлихиоз человека и др.). Специфическая иммунопрофилактика человека в отношении ГАЧ пока не разработана, хотя в ветеринарной практике широко используется вакцина против анаплазмоза крупного рогатого скота, вызываемого *A. marginale*.

Впервые случай ГАЧ у человека был зарегистрирован в США в 1994 г. В России первый случай ГАЧ выявлен в 2000 г. на Дальнем Востоке [10], серологически подтвержденные случаи заболевания отмечены также в Пермской и Новосибирской областях, на Алтае [11]. С 2013 г. введена официальная регистрация ГАЧ в Российской Федерации. За 3 года зарегистрировано 542 случая ГАЧ, причем заболевание часто выявляют у больных с клещевыми инфекциями (обычно в сочетании с клещевым энцефалитом или клещевыми боррелиозами).

Томская область и г. Томск относятся к территории с традиционно высокой заболеваемостью клещевым вирусным энцефалитом и клещевым боррелиозом. Ежегодно в весенне-летние периоды в медицинские учреждения Томской области по поводу укуса иксодовыми клещами обращаются 15–22 тыс. человек. Ранее было показано, что в иксодовых клещах, собранных в этом регионе, обнаруживается генетический материал вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила, а также *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. [12]. Выявление генетических маркеров анаплазмозов в иксодовых клещах, собранных в некоторых районах России, регистрация большого количества случаев нападения клещей на человека, изменение численности и популяционного состава иксодовых клещей в мегаполисах юга Западной Сибири ставят вопрос о возможной циркуляции возбудителей анаплазмоза в г. Томске и его пригородах и необходимости расширения исследований клещевых инфекций в этом регионе.

Цель данного исследования – изучение распространения и видового разнообразия *A. phagocytophilum* в иксодовых клещах на территории Томской области. В работе проведен молекулярно-генетический анализ выявленных изолятов *A. phagocytophilum* на основании сравнения

нуклеотидных последовательностей фрагмента *groESL*-оперона белков теплового шока.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования проведен анализ 690 индивидуальных образцов личинок и имаго иксодовых клещей видов *I. persulcatus* ( $n = 530$ ) и *D. reticulatus* ( $n = 160$ ). Сбор образцов проводился в весенне-летний период 2015–2016 гг. на территории городских и пригородных биотопов г. Томска. Сбор образцов клещей проводили с растительности методом «на флаг», а также с мелких млекопитающих. До начала исследования клещи хранились при  $-70^{\circ}\text{C}$  индивидуально. Исследования проводили с соблюдением правил биобезопасности, регламентированных в МУ 1.3.2569–09, СП 1.3.3118–13, СП 3.1.3310–15. С этой целью клещи были дважды обработаны 70%-м этанолом для инактивации инфекционных агентов и промыты фосфатно-солевым буфером. Гомогенизация клещей осуществлялась с использованием лабораторного гомогенизатора Tissue Lyser (Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение нуклеиновых кислот осуществлялось методом фенол-хлороформной экстракции с использованием коммерческого набора («Литех», Россия) согласно инструкции производителя.

Первичный скрининг клещей на наличие генетического материала *A. phagocytophilum* проводили с помощью двухраундовой полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена *16S рРНК*. У выявленных изолятов осуществлялось амплифицирование фрагмента (около 1 220 пар нуклеотидов) *groESL*-оперона белков теплового шока с помощью двухраундовой ПЦР с использованием пары праймеров HS1-f/HS6-r (1-й раунд) и HS3-f/HSVR (2-й раунд).

Таблица 1  
Table 1

| Характеристика олигонуклеотидных праймеров, используемых в работе<br>Characteristics of oligonucleotide primers used |                  |                                        |                                     |                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Ген-мишень<br>Target gene                                                                                            | Название<br>Name | Структура (5'→3')<br>Structure (5'→3') | Т отжига, °C<br>Annealing point, °C | Ссылка<br>Reference |
| 16S рPHK                                                                                                             | Ehr1             | gaacgaacgctggcggaagc                   | 57                                  | [13]                |
|                                                                                                                      | Ehr2             | agtaycgraccagatagccgc                  |                                     |                     |
|                                                                                                                      | HGE1             | cggattattctttatagcttgc                 | 55                                  |                     |
|                                                                                                                      | HGE2             | cttaccgaaccgcctacatg                   |                                     |                     |
| groESL-operon                                                                                                        | HS1-f            | cgycagtgggctggtaatgaa                  | 55                                  | [14]                |
|                                                                                                                      | HS6-r            | ccwccwgggtacwacaccttc                  |                                     |                     |
|                                                                                                                      | HS3-f            | atagtyatgaaggagagtgat                  | 55                                  | [15]                |
|                                                                                                                      | HSVR             | tcaacagcagctctagtwg                    |                                     |                     |

Постановка ПЦР проводилась на термоциклере T-100 (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 10 mM трис-HCl (pH = 9,0), 50 mM KCl, 0,1%-й тритон X-100, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM каждого dNTP, по 10 pM каждого праймера, 1,5 ед. активности HS-Taq-полимеразы («Евроген», Россия) и 1-100 нг ДНК-матрицы. При постановке ПЦР использовали следующие температурные режимы: предварительная активация полимеразы – 95 °C в течение 5 мин; 38 циклов: 95 °C – 20 с, T отжига – 20 с, 72 °C – 1 мин; финальная элонгация при 72 °C – 4 мин.

Анализ продуктов амплификации выполняли посредством разделения фрагментов ДНК в 2%-м агарозном геле в трис-боратном буфере, содержащем 0,1% бромида этидия. Очистку продуктов амплификации из агарозного геля проводили с использованием набора на основе микроколонок («Биосилика», Россия) согласно инструкции производителя. Реакцию Сенгера проводили с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) с каждым из праймеров. Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Определенные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программных продуктов DNA STAR Lasergene v. 7.0 [16], Unipro UGENE v. 1.27 [17] и программы NCBI BLAST v. 2.2.26. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филограммы использовали программу MEGA v. 5.1 [18]. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых фрагментов генома проводили методом объединения ближайших соседей по двухпараметрической модели Кимуры. Показатели статистической надежности узлов филогенетического дерева рассчитаны с помощью бутстреп-анализа с использованием 1 000 случайных реплик. Нуклеотидные последовательности фрагмента *groESL*-оперона депонированы в базе данных GenBank под номерами KF701460-KF701462, KY684729-KY684733 и KY379956.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ПЦР ДНК *A. phagocytophilum* была обнаружена в трех исследованных образцах от 250 личинок клещей *I. persulcatus* в пяти образцах от 280 имаго этого вида клещей. Уровень инфицированности *A. phagocytophilum* таким образом составил у личинок –  $(1,2 \pm 0,6)\%$ ; у по-

ловозрелых особей –  $(1,8 \pm 0,7)\%$ . Генетический материал возбудителя ГАЧ был обнаружен как у самок (три образца), так и у самцов (два образца) *I. persulcatus*. Уровень инфицированности клещей *I. persulcatus* возбудителем ГАЧ соответствуют литературным данным о распространении данного возбудителя в других частях ареала таежного клеща. Так, в Новосибирской области данный показатель составляет в среднем 1,7% и может колебаться в различные эпидсезоны от 0,7 до 2,6% [13]. Полученные результаты дополнительно подтверждают широкое распространение *A. phagocytophilum* в ареале *I. persulcatus* на юге Западной Сибири.

Интересно отметить, что *D. reticulatus* на территории Томской области регистрируется только с 2005 г. [19, 20], а в 2015 г. произошло резкое увеличение численности этого вида клеща в городских биотопах г. Томска. Так, в биотопе Лагерный сад *D. reticulatus* встречался в учетах только в 2012 и 2014 гг., а средняя сезонная численность в этот период составляла всего 0,17 особей на учетный километр. В сентябре 2015 г. численность *D. reticulatus* достигла 45 особей на учетный километр в этом городском биотопе. По этой причине возможное участие *D. reticulatus* в распространении клещевых инфекций непосредственно в городской черте г. Томска ранее не исследовано.

Для выявления генетических маркеров анаплазм нами было исследовано 160 имаго клещей *D. reticulatus* (98 самок и 62 самца), отловленных на территории городского биотопа Лагерный сад. ДНК *A. phagocytophilum* была обнаружена в одной пробе от самки клеща *D. reticulatus*, уровень инфицированности таким образом составил  $(0,6 \pm 0,3)\%$ . Принято считать, что иксодовые клещи способны передавать анаплазмы трансфазово (от личинок к нимфам и от нимф к имаго), но не трансвариально (через яйца новому поколению клещей). Это позволяет предположить, что, во-первых, в 2015 г. произошел занос инфицированных клещей в этот городской парк, а во-вторых, создались условия инфицирования клещей от ранее инфицированных животных в этом биотопе на фоне резкого увеличения численности *D. reticulatus* в городских условиях.

У выявленных изолятов *A. phagocytophilum* было проведено определение нуклеотидных последовательностей фрагмента *groESL*-оперона длиной примерно 1 220 пар нуклеотидов с проведением последующего филогенетического анализа (рис.). Нуклеотидные последовательности изолятов *A. phagocytophilum*, выделенные из клещей *I. persulcatus*, оказались идентичными и были

наиболее близки к последовательностям, полученным из этого вида клещей в Новосибирской области, а также от красной полевки в Омской области. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей составил 99,9% (табл. 2). Нуклеотидная последовательность изолята *A. phagocytophilum*, выделенная из клеща *D. reticulatus*, отличалась

от последовательностей изолятов, полученных из *I. persulcatus*, двумя нуклеотидными заменами. Одна из них является синонимичной, а другая приводит к аминокислотному замещению (ATG (Met) у *A. phagocytophilum* из клещей *I. persulcatus* и ACG (Tpe) у *A. phagocytophilum* из клеща *D. reticulatus*).

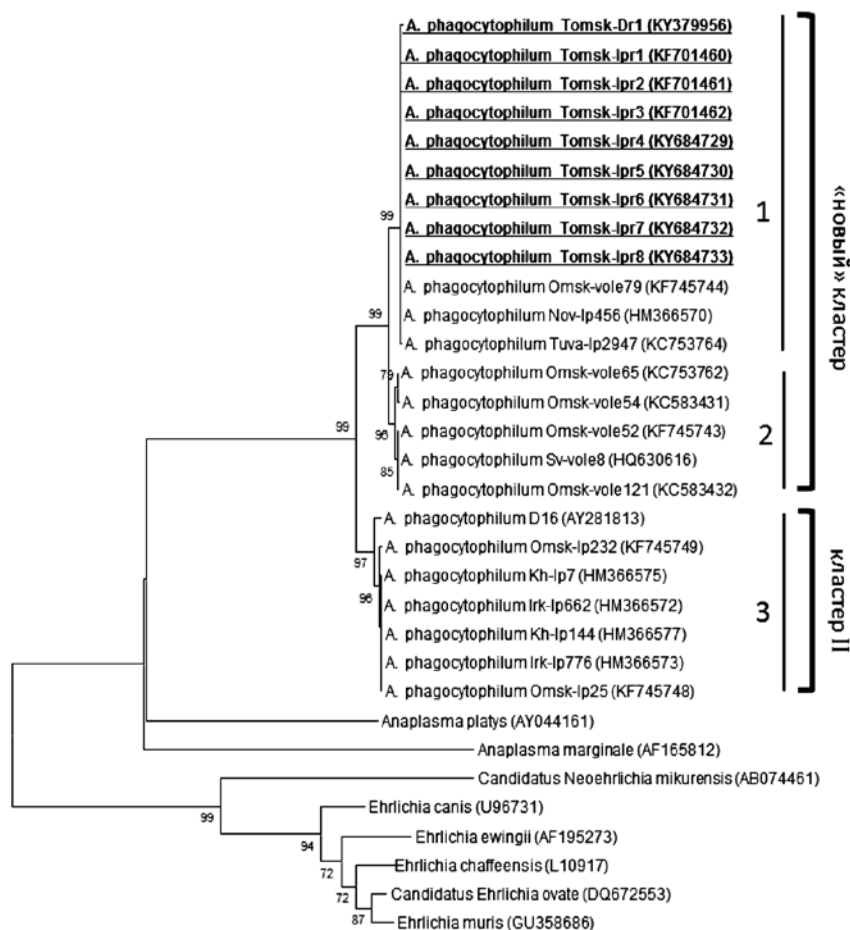


Рисунок. Дендрограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей фрагмента *groESL*-оперона (1 200 пар нуклеотидов). Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием двухпараметрической модели Кимуры. Длина линии отражает генетическую дистанцию. Указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1 000 реплик. Для прототипных последовательностей указаны номера GenBank. Жирным шрифтом с подчеркиванием выделены анализируемые последовательности, полученные в данной работе

Figure. A dendrogram built on the basis of aligned nucleotide sequences of the *groESL* operon fragment (1,200 base pairs). The analysis was carried out using the nearest neighbor method and Kimura's two-parameter model. The length of the line reflects the genetic distance. The indexes of the statistical node support of the nodes are indicated, the bootstrap test is calculated for 1,000 replicas. For prototype sequences, GenBank numbers are indicated. The analyzed sequences obtained in this work are highlighted in bold and underlined

Ранее было описано, что большинство последовательностей *groESL*-оперона *A. phagocytophilum* разделяются на два кластера, к одному из которых относятся последовательности от различных видов клещей и позвоночных хозяев, а ко

второму – только от клещей вида *I. ricinus* и козусль [21]. Сравнительно недавно был описан так называемый новый кластер, подразделяющийся на две группы [22]. Выявленные в ходе исследования изоляты входят в группу 1 «нового» кла-

стера, образованную изолятами, выделенными из клещей *I. persulcatus* в Новосибирской области и Республике Тыва, а также от мелких млекопитающих в Омской области.

В табл. 2 приведены данные сравнения уровня гомологии последовательностей *groESL*-оперона для различных известных изолятов *A. phagocytophilum*. Они подтверждают генетическую общность изолятов *A. phagocytophilum*, циркулирующих на юге Западной Сибири. При этом генетические отличия от изолятов, выделенных в других географических районах, весьма существенны и могут достигать 4–5%. Это позволяет предположить,

что генетическая вариабельность *A. phagocytophilum* связана с адаптацией возбудителя к новым климатогеографическим условиям. По всей вероятности, она может привести к изменению биологических свойств возбудителя, в том числе его патогенности для домашних животных и человека. Важно отметить, что при обнаруженном уровне инфицированности иксодовых клещей в Томской области и наличии постоянных укусов населения клещами можно ожидать значительного количества случаев инфицирования людей *A. phagocytophilum* с высокой вероятностью последующего развития заболевания у человека.

Таблица 2

Table 2

| Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей <i>groESL</i> -оперона выявленных изолятов <i>A. phagocytophilum</i> в Томской области с известными изолятами                    |                                                                                                     |                                          |                                                                             |                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| The degree of homology among nucleotide sequences of <i>groESL</i> -operon in the newly detected isolates of <i>A. phagocytophilum</i> in Tomsk region as opposed to known isolates |                                                                                                     |                                          |                                                                             |                                                                             |
| Номер прототипного изолята в GenBank<br>Number of the prototype isolate from GenBank                                                                                                | Источник выделения<br>Source of isolation                                                           | Место выделения<br>Region of isolation   | Уровень гомологии, %<br>Degree of homology, %                               |                                                                             |
|                                                                                                                                                                                     |                                                                                                     |                                          | Изолят из<br><i>I. persulcatus</i><br>Isolate from<br><i>I. persulcatus</i> | Изолят из<br><i>D. reticulatus</i><br>Isolate from<br><i>D. reticulatus</i> |
| KF745744                                                                                                                                                                            | Красная полевка<br>( <i>Myodesrutilus</i> )<br>Northern red-backed vole<br>( <i>Myodesrutilus</i> ) | Омская обл.<br>Omsk region               | 99,9                                                                        | 99,8                                                                        |
| HM366570                                                                                                                                                                            | <i>I. persulcatus</i>                                                                               | Новосибирская обл.<br>Novosibirsk region | 99,9                                                                        | 99,8                                                                        |
| KC753764                                                                                                                                                                            | <i>I. persulcatus</i>                                                                               | Республика Тыва<br>the Tyva Republic     | 99,8                                                                        | 99,7                                                                        |
| KF745743                                                                                                                                                                            | Красная полевка<br>( <i>Myodesrutilus</i> )<br>Northern red-backed vole<br>( <i>Myodesrutilus</i> ) | Омская обл.<br>Omsk region               | 98,3                                                                        | 98,1                                                                        |
| KC753762                                                                                                                                                                            | Красно-серая полевка<br>( <i>Myodesrufocanus</i> )<br>Grey-sided vole<br>( <i>Myodesrufocanus</i> ) | Омская обл.<br>Omsk region               | 98,3                                                                        | 98,1                                                                        |
| HQ630616                                                                                                                                                                            | Красная полевка<br>( <i>Myodesrutilus</i> )<br>Northern red-backed vole<br>( <i>Myodesrutilus</i> ) | Свердловская обл.<br>Sverdlovsk region   | 98,3                                                                        | 98,1                                                                        |
| KC583432                                                                                                                                                                            | Красная полевка<br>( <i>Myodesrutilus</i> )<br>Northern red-backed vole<br>( <i>Myodesrutilus</i> ) | Омская обл.<br>Omsk region               | 98,2                                                                        | 98,0                                                                        |
| KC583431                                                                                                                                                                            | Красно-серая полевка<br>( <i>Myodesrufocanus</i> )<br>Grey-sided vole<br>( <i>Myodesrufocanus</i> ) | Омская обл.<br>Omsk region               | 98,1                                                                        | 98,0                                                                        |
| HM366575                                                                                                                                                                            | <i>I. persulcatus</i>                                                                               | Хабаровский край<br>Khabarovsk Krai      | 94,8                                                                        | 94,7                                                                        |
| KT220194                                                                                                                                                                            | Полевая мышь<br>( <i>Apodemusagrarius</i> )<br>Striped field mouse<br>( <i>Apodemusagrarius</i> )   | Южная Корея<br>South Korea               | 94,8                                                                        | 94,6                                                                        |

| Номер прототипного<br>изолята в GenBank<br>Number of the pro-<br>totype isolate from<br>GenBank | Источник выделения<br>Source of isolation | Место выделения<br>Region of isolation | Уровень гомологии, %<br>Degree of homology, %                               |                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                 |                                           |                                        | Изолят из<br><i>I. persulcatus</i><br>Isolate from<br><i>I. persulcatus</i> | Изолят из<br><i>D. reticulatus</i><br>Isolate from<br><i>D. reticulatus</i> |
| HM366577                                                                                        | <i>I. persulcatus</i>                     | Хабаровский край<br>Khabarovsk Krai    | 94,8                                                                        | 94,6                                                                        |
| HM366573                                                                                        | <i>I. persulcatus</i>                     | Иркутская обл.<br>Irkutsk region       | 94,8                                                                        | 94,6                                                                        |
| HM366572                                                                                        | <i>I. persulcatus</i>                     | Иркутская обл.<br>Irkutsk region       | 94,8                                                                        | 94,7                                                                        |
| KF745749                                                                                        | <i>I. persulcatus</i>                     | Омская обл.<br>Omsk region             | 94,8                                                                        | 94,6                                                                        |
| KF745748                                                                                        | <i>I. persulcatus</i>                     | Омская обл.<br>Omsk region             | 94,8                                                                        | 94,6                                                                        |
| AY281813                                                                                        | <i>I. ricinus</i>                         | Германия<br>Germany                    | 94,8                                                                        | 94,6                                                                        |

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека обнаружен в клещах *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, обитающих на территории Томской области и г. Томска. Полученные данные подтверждают необходимость мониторинга циркуляции возбудителя ГАЧ в природных очагах клещевых инфекций в Томской области, дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этой инфекции, включая выявление возможных случаев заболевания человека гранулоцитарным анаплазмозом в данном регионе.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Atif F.A. Anaplasma marginale and Anaplasma phagocytophilum: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol. Res.* 2015; 114 (11): 3941–3957. DOI: 10.1007/s00436-015-4698-2.
- Stuen S. Anaplasma phagocytophilum – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet. Res. Commun.* 2007; 31 Suppl. 1: 79–84. DOI: 10.1007/s11259-007-0071-y.
- Grova L., Olesen I., Steinshamn H., Stuen S. Prevalence of Anaplasma phagocytophilum infection and effect on lamb growth. *Acta Vet. Scand.* 2011; 53: 30. DOI: 10.1186/1751-0147-53-30.
- Truchan H.K., Seidman D., Carlyon J.A. Breaking in and grabbing a meal: Anaplasma phagocytophilum cellular invasion, nutrient acquisition, and promising tools for their study. *Microbes Infect.* 2013; 15 (14–15): 1017–1025. DOI: 10.1016/j.micinf.2013.10.010.
- Schaff U.Y., Trott K.A., Chase S., Tam K., Johns J.L. Neutrophils exposed to A. phagocytophilum under

shear stress fail to fully activate, polarize, and trans-migrate across inflamed endothelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010; 299 (1): 87–96. DOI: 10.1152/ajpcell.00165.2009.

- Loewenich F.D., Scorpio D.G., Reischl U., Dumler J.S., Bogdan C. Frontline: control of Anaplasma phagocytophilum, an obligate intracellular pathogen, in the absence of inducible nitric oxide synthase, phagocyte NADPH oxidase, tumor necrosis factor, Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4, or TLR adaptor molecule MyD 88. *Eur. J. Immunol.* 2000; 34 (7): 1789–1797.
- Ohashi N., Gaowa W., Kawamori F., Wu D., Yoshikawa Y. Human granulocytic Anaplasmosis, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19 (2): 289–292. DOI: 10.3201/eid1902.120855.
- Brouqui P., Bacellar F., Baranton G. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (12): 1108–1132. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x
- Strle F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 293 Suppl. 37: 27–35. DOI: 10.1016/s1433-1128(04)80006-8.
- Сидельников Ю.Н., Медяников О.Ю., Иванов Л.И., Здановская Н.И. Первый случай гранулоцитарного эрлихиоза на Дальнем Востоке Российской Федерации. *Клин. мед.* 2003; 81 (2): 67–68. [Sidel'nikov Yu.N., Medyannikov O.Yu., Ivanov L.I., Zdanovskaya N.I. The first case of granulocyte erlichiosis in the Far East of the Russian Federation. *Clinical Medicine.* 2003; 81 (2): 67–68 (in Russ.)].
- Леонова Г.Н., Ястребов В.К., Хазова Т.Г., Шерстнева М.Б., Шпынов С.Н., Егорова Н.В., Рудаков И.В., Федянин А.П. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане. *Мед. паразитол.* 2004; 2: 10–14. [Leonova G.N., Yastreb-ov V.K., Khazova T.G., Sherstneva M.B., Shpynov S.N.,

- Egorova N.V., Rudakov I.V., Fedyanin A.P. New data on the detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* in ixodid ticks in Russia and Kazakhstan. *Medical Parasitology*. 2004; 2: 10–14 (in Russ.).
12. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах. *Паразитология*. 2009; 43 (5): 374–388. [Chausov E.V., Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Konovalova S.N., Kononova Yu.V. The genetic diversity of infectious agents, transmitted by ixodid ticks in Tomsk and its suburbs. *Parasitology*. 2009; 43 (5): 374–388 (in Russ.).]
  13. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K. Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in Asian part of Russia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2010; 1 (1): 57–65. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2010.01.002.
  14. Sumner J.W., Nicholson W.L., Massung R.F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heatshock operon of *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35 (8): 2087–2092.
  15. Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (3): 1002–1007.
  16. Burland T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.* 2000; 132: 71–91. DOI: 10.1385/1-59259-192-2:71.
  17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28 (8): 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
  18. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007; 24 (8): 1596–1599. DOI: 10.1093/molbev/msm092.
  19. Романенко В.Н. Мониторинг видового состава и численности иксодовых клещей (Parasitiformes: Ixodidae) в антропогенных биотопах. *Вестн. Том. гос. ун-та*. 2009; 324: 376–379. [Romanenko V.N. Monitoring of species composition and numbers of ixodid ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in anthropogenic biotopes. *Journal of Tomsk State University*. 2009; 324: 376–379 (in Russ.).]
  20. Панкина Т.М., Романенко В.Н., Истраткина С.В., Шихин А.В., Полторацкая Т.Н. Акарологическая ситуация юга Томской области. *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. 2013; 4 (24): 67–76. [Pankina T.M., Romanenko V.N., Istratkina S.V., Shikhin A.V., Poltoratskaya T.N. Acarological situation in the south of Tomsk region. *Journal of Tomsk State University*. 2013; 4 (24): 67–76 (in Russ.).]
  21. Rymaszewska A. Divergence within the marker region of the groESL operon in *Anaplasma phagocytophilum*. *Eu. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2008; 27 (11): 1025–1036. DOI: 10.1007/s10096-008-0539-x.
  22. Rar V.A., Epikhina T.I., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I. Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011; 11 (8): 1013–1021. DOI: 10.1089/vbz.2010.0266.

## Вклад авторов

Карташов М.Ю. – разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, интерпретация данных и написание текста статьи. Микрюкова Т.П. – разработка дизайна исследования, интерпретация данных и написание текста статьи. Москвитина Н.С. – написание текста статьи и окончательное утверждение рукописи для публикации. Кривошеина Е.И. – проведение экспериментов и интерпретация данных. Кузнецов А.И. – проведение экспериментов и интерпретация данных. Романенко В.Н. – написание текста статьи и окончательное утверждение рукописи для публикации. Большакова Н.П. – проведение экспериментов и интерпретация данных. Терновой В.А. – анализ и интерпретация данных. Локтев В.Б. – написание текста статьи и окончательное утверждение рукописи для публикации.

## Сведения об авторах

Карташов Михаил Юрьевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0002-7857-6822.

## Authors contribution

Kartashov M.Yu. – design of the study, carrying out of experiments, interpretation of the data and drafting of the manuscript. Mikryukova T.P. – design of the study, interpretation of the data and drafting of the manuscript. Moskvitina N.S. – drafting of the manuscript and final approval of the manuscript for publication. Krivosheina E.I. – carrying out of experiments and interpretation of the data. Kuznetsov A.I. – carrying out of experiments and interpretation of the data. Romanenko V.N. – drafting of the manuscript and final approval of the manuscript for publication. Bol'shakova N.P. – carrying out of experiments and interpretation of the data. Ternovoi V.A. – analysis and interpretation of the data. Loktev V.B. – drafting of the manuscript and final approval of the manuscript for publication.

## Authors information

Kartashov Mikhail Yu., PhD, Senior Researcher, SRC VB "Vector", Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7857-6822.

**Микрюкова Тамара Петровна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0003-4350-4260.

**Москвитина Нина Сергеевна**, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой зоологии позвоночных, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-3425-7723.

**Кривошеина Екатерина Ильинична**, стажер-исследователь, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0001-5181-0415.

**Кузнецов Александр Иванович**, стажер-исследователь, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0002-4903-0708.

**Романенко Владимир Никифорович**, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой зоологии беспозвоночных, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-6971-4488.

**Большакова Наталия Павловна**, канд. биол. наук, ст. преподаватель, науч. сотрудник, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-7836-3553.

**Терновой Владимир Александрович**, канд. биол. наук, зав. лабораторией, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0003-1275-171X.

**Локтев Валерий Борисович**, д-р биол. наук, профессор, зав. отделом, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0002-0229-321X.

(✉) **Карташов Михаил Юрьевич**, e-mail: mikkartash@yandex.ru.

**Mikryukova Tamara P.**, PhD, Senior Researcher, SRC VB “Vector”, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4350-4260.

**Moskvitina Nina S.**, DBSc, Professor, Head of the Division, NR TPU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-3425-7723.

**Krivosheina Ekaterina I.**, Graduate Scientist, SRC VB “Vector”, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5181-0415.

**Kuznetsov Alexander I.**, Graduate Scientist, SRC VB “Vector”, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4903-0708.

**Romanenko Vladimir N.**, DBSc, Professor, Head of the Division, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6971-4488.

**Bolshakova Nataliya P.**, PhD, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7836-3553.

**Ternovoi Vladimir A.**, PhD, Head of Laboratory, DBSc, Professor, Head of the Division, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1275-171X.

**Loktev Valery B.**, DBSc, Professor, Head of the Department, SRC VB “Vector”, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0229-321X.

(✉) **Kartashov Mikhail Yu.**, e-mail: mikkartash@yandex.ru.

Поступила в редакцию 04.12.2017  
Подписана в печать 14.12.2018

Received 04.12.2017  
Accepted 14.12.2018