

УДК 57.083.18:579.841.95:576.895.42

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОЙ РОЛИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ТУЛЯРЕМИИ ЛЕСОСТЕПНОЙ ЗОНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

© 2020 г. М. И. Кормилицына^{а, *}, Э. И. Коренберг^а,
Т. В. Михайлова^а, Ю. В. Ковалевский^а, А. В. Амирханян^а,
Д. В. Транквилевский^б, Б. В. Ромашов^с,
Д. А. Квасов^д, А. М. Саломатина^е

^а ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, 18, Москва, 123098 Россия

^б ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, Варшавское ш., 19А, Москва, 117105 Россия

^с ФГБУ «Воронежский государственный природный биосферный заповедник имени В.М. Пескова», Воронеж, 394080 Россия

^д ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области», ул. Космонавтов, 21, Воронеж, 394038 Россия

^е Центр профилактики, ул. Мира, 3А, оф.1, Нововоронеж, 396070 Россия

* e-mail: mkormilits@mail.ru

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 25.04.2020 г.

Принята к печати 12.06.2020 г.

Оценена возможная роль взрослых клещей *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1894), *D. marginatus* (Sulzer, 1776) и *Ixodes ricinus* (L., 1758), собранных с растительности в апреле–мае 2018 и 2019 г., в природных очагах туляремии лесного и пойменно-долинного типа в лесостепной зоне Воронежской области.

Ключевые слова: природная очаговость, возбудитель туляремии, типы очагов, иксодовые клещи

DOI: 10.31857/S1234567806040021

Природным очагам туляремии свойственна, как известно (Олсуфьев, Дунаева, 1970), большая устойчивость. В этом отношении показательна территория Воронежской области, где были проведены наши исследования. Ее северная часть занята лесостепными ландшафтами, а южная часть – разнотравной типчаковой степью. Туляремия известна в этой области с 1925 г. Даже после массовой вакцинации населения противотуляремийной вакциной со второй половины 40-х годов постоянно фиксировали спорадические случаи этой инфекции (Сильченко, 1961). Продолжающаяся циркуляция возбудителя туляремии (*Francisella tularensis* McCoy et Chapin) в природных очагах была неоднократно подтверждена выявлением в последние годы его антигена или антител у мелких млекопитающих – резервуарных хозяев микроба, а также спорадическими заболеваниями людей в ряде административных регионов (Мещерякова и др., 2015; Михайлова и др., 2014, 2015, 2017; Транквиловский и др., 2014, 2015, 2016; Кудрявцева и др., 2017, 2018, 2019, 2020). Эти исследования свидетельствуют о том, что в различных ландшафтных условиях Воронежской области существуют природные очаги туляремии лесного, пойменно-долинного и, возможно, луго-полевого типа согласно типизации Олсуфьева (1947).

Помимо возбудителя туляремии, к роду *Francisella* относятся также в высокой степени сходные с ним по нуклеотидной последовательности гена 16S рДНК так называемые *Francisella-like endosymbionts* (FLE), которые обнаружены за пределами России у иксодовых клещей нескольких родов, включая *Dermacentor* и *Ixodes* (National Center for Biotechnology Information, 2020). Различные виды этих родов довольно широко распространены на территории России и могут иметь существенное значение в эпизоотологии туляремии (Олсуфьев, Дунаева, 1970; Филиппова, 2011). Однако сведения о наличии или отсутствии FLE у иксодовых клещей фауны нашей страны пока отсутствуют. Между тем такие данные чрезвычайно важны как для понимания филогении туляремийного микроба, так и для совершенствования методов его лабораторной идентификации.

В связи с изложенным цель нашего исследования состоит в том, чтобы на примере территории Воронежской области оценить возможную роль иксодовых клещей в циркуляции возбудителя туляремии и наличия у них FLE в природных очагах, характерных для лесостепной зоны европейской части центральной России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В апреле–мае 2018 и 2019 г. в Воронежской области на участках четырех исследуемых природных очагов туляремии, где ранее лабораторными методами был выявлен контакт мелких мле-

копитающих с возбудителем этой инфекции (Михайлова и др., 2014, 2015, 2017; Транквилевский и др., 2014, 2017), с растительности на флаг были собраны взрослые голодные иксодовые клещи. В табл. 1 приведены условные номера и географические координаты очагов. Три из них (№ 1–3) находятся в северной, лесостепной части области, а № 4 – в южной, степной. При этом очаг № 1 расположен в Верхнехавском р-не, на территории смешанного хвойно-лиственного лесного массива вблизи с. Большая Приваловка и Биосферного природного заповедника им. В.М. Пескова; очаг № 2 – на границе Каширского и Лискинского районов вблизи г. Нововоронеж, в пойменных сырых биотопах левобережья р. Дон, включая заросли вокруг стариц, а также прибрежные заливные луга, богатые травянистой растительностью; очаг № 3 – в Новохоперском р-не на левобережья р. Савала, в пойменных слабо повышенных по отношению к урезу воды влажных биотопах сходных по характеру растительности с условиями очага № 2; очаг № 4 – в Богучарском р-не на левобережье р. Дон, в сырых пойменных биотопах.

Всего было собрано и исследовано на наличие маркеров бактерий рода *Francisella* 1176 взрослых иксодовых клещей трех видов, из которых 703 экземпляра были *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1894), 261 особь – *D. marginatus* (Sulzer, 1776), 212 особей – *Ixodes ricinus* (L., 1758). Из клещей одного вида, отловленных в конкретном очаге, формировали пробы (пулы) по 2 экземпляра. Лабораторному тестированию в общей сложности подвергнуто 588 пулов (табл. 1).

Гомогенизацию клещей каждого пула и экстракцию ДНК проводили по методике, описанной ранее (Кормилицына и др., 2016, 2019). В связи с малой чувствительностью праймерной пары Fr1530.1/Fr1281R0.1, которая была применена нами для выявления специфической ген-мишени 16s rRNA бактерий рода *Francisella* у клещей *I. trianguliceps* (Кормилицына и др., 2016), в данном исследовании для этой цели использованы праймеры NC-Fran16Sr-F/Fr1281R0.1, амплифицирующие участок гена 16S rRNA размером 218–226 п. н. Он представлен в геноме одной–тремя копиями, что увеличивает вероятность выявления положительных образцов при малом содержании в них ДНК.

Все образцы, у которых была выявлена ДНК бактерий рода *Francisella*, проверены на наличие видоспецифических участков генов-мишеней *F. tularensis* в ПЦР-РВ с праймерами и зондами ISFtu2F/R + ISFtu2P (97 п. н.) и lpnA2F/R + lpnA2P (82 п. н.). Для подтверждения положительных результатов некоторые образцы дополнительно исследовали с парами праймеров iglCft-F/R (226 п. н.) (Кормилицына и др., 2019). Использовали праймеры, зонды и реакционные смеси, изготовленные ЗАО «Синтол» (Россия). ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили в приборе Rotor-GeneQ (QIAGEN, Германия) в лаборатории туляремии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

При оценке возможного количества (доли) клещей с ДНК бактерий мы исходили из того, что все исследованные пулы включали по 2 особи членистоногих. Следовательно, любой ПЦР-положительный пул мог содержать одну или две особи клещей с ДНК бактерий рода *Francisella*. Если допустить, что все положительные пулы включали только по одной особи клеща с ДНК, возможная общая доля таких особей (в % от общего числа исследованных) была бы минимальной (равной числу положительных пулов), а если в каждом положительном пуле идентифицированную ДНК содержали оба клеща, общая доля таких особей в анализируемой выборке должна была быть вдвое большей, т.е. максимально возможной. Эти предельные значения приведены в таблицах. Поскольку соотношение пулов, содержавших одного или двух клещей с ДНК, было неизвестно, мы полагаем, что реальные показатели доли таких членистоногих среди исследованных могут быть между указанными минимальными и максимальными значениями. Этот способ оценки вероятной доли иксодовых клещей с ДНК возбудителя по результатам ПЦР их пулов аналогичной величины применен нами ранее (Кормилицына и др., 2019).

Статистическая обработка выполнена для уровня значимости 0.95. В качестве доверительных интервалов при расчете процентов приняты удвоенные значения предельной ошибки выборочной доли ($2m_p$). Сравнение результатов проведено по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У исследованных взрослых голодных иксодовых клещей трех видов (*D. reticulatus*, *D. marginatus*, *I. ricinus*) из природных очагов туляремии лесостепной и степной зон Воронежской области с той или иной частотой выявлены специфические маркеры генома *F. tularensis* (табл. 1).

Среди клещей, собранных в природном очаге туляремии лесного типа (табл. 1, № 1), оказались два вида: *I. ricinus*, который повсеместно встречается в лесах лесостепной зоны области, расположенных южнее места нашей работы (Баркалова и др., 2012), и *D. reticulatus*, характерный как для ее зональных лесных, так и для интразональных ландшафтов. Исследование репрезентативного количества пулов (или экземпляров) клещей обоих видов показало, что у *I. ricinus* ДНК *F. tularensis* встречается достоверно ($t = 23.0 > 2.0$) реже (примерно в 20 раз), чем у *D. reticulatus*.

В природных очагах пойменно-долинного типа симбиотопично обитают клещи *D. reticulatus* и *D. marginatus*, причем доля первого из них в вылове несколько выше, чем второго. В природном очаге этого типа, расположенном в степной зоне, доля *D. marginatus* в наших сборах составляла около 20%. В табл. 1 сведения о клещах этого вида в данном очаге (№ 4) отсутствуют, поскольку по техническим причинам они не были исследованы на наличие маркеров ДНК бактерий рода *Francisella*.

Таблица 1. Результаты выявления ДНК бактерий рода *Francisella* у иксодовых клещей из природных очагов туляремии различных типов
Table 1. The results of *Francisella* DNA detection in ixodid ticks from natural tularemia foci of different types

Растительная зона, тип и № очага, географические координаты	Вид	Исследовано пулов (по 2 клеща в пуле), абс.	Из них пулов с ДНК, абс.		Возможная доля клещей с ДНК, (предельные показатели в %)	
			<i>Francisella</i>	<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella</i>	<i>F. tularensis</i>
Лесостепь						
Лесной очаг (№ 1) 51°01' N 39°73' W	<i>I. ricinus</i>	106	4	4	2-4	2-4
	<i>D. reticulatus</i>	162	159	135	49-98	43-85
Пойменно-долинный очаг (№ 2) 51°23' N 39°20' W	<i>D. reticulatus</i>	18	18	18	50-100	50-100
	<i>D. marginatus</i>	2	2	2	мало данных	мало данных
Пойменно-долинный очаг (№ 3) 51°10' N 41°50' W	<i>D. reticulatus</i>	159	126	121	40-79	38-76
	<i>D. marginatus</i>	129	26	26	10-20	10-20
Степь						
Пойменно-долинный очаг (№ 4) 50°01' N 40°63' W	<i>D. reticulatus</i>	12	11	8	46-92	34-67

Таблица 2. Суммарные результаты выявления ДНК бактерий рода *Francisella* у клещей рода *Dermacentor* из трех природных очагов пойменно-долинного типа

Table 2. The total results of *Francisella* DNA detection in ticks of the genus *Dermacentor* from three natural foci of the floodplain-valley type

Вид клеща	Всего исследовано пулов (абс.)	Из них число пулов с ДНК		Возможная доля клещей с ДНК (предельные показатели в %)	
		<i>Francisella</i>	<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella</i>	<i>F. tularensis</i>
<i>D. reticulatus</i>	189	155	147	41-82	39-78
<i>D. marginatus</i>	131	28	28	11-21	11-21

Чтобы сравнить вероятное значение двух близких видов клещей рода *Dermacentor* в пойменно-долинных очагах туляремии, мы объединили результаты их исследования, полученные в очагах № 2–4 (табл. 1), которые имеют большое биоценотическое сходство. По ориентировочному подсчету среди клещей *D. reticulatus* особей с ДНК *F. tularensis* достоверно ($t = 12.0 > 2.0$) больше (примерно в 3–4 раза), чем среди *D. marginatus* (табл. 2), хотя такую видоспецифичную ДНК содержали все положительные пулы клещей этого вида. Напротив, она не обнаружена в 24 пулах *D. reticulatus* ($15.1 \pm 5.7\%$) от числа проб с ДНК бактерий рода *Francisella* из лесного очага (№ 1), в пяти пулах ($4.0 \pm 3.5\%$) – из пойменно-долинного очага № 3, а также в трех из 11 пулов из очага № 4 (табл. 1). Суммарно в очагах пойменно-долинного типа выявлено 8 проб из 155 (т. е. $5 \pm 0.9\%$) положительных с маркерами родоспецифичной ДНК, но отрицательных в отношении специфичного фрагмента гена *F. tularensis* (табл. 2). По данным Козорезова и др. (2017), при исследовании пулов клещей из природных очагов Воронежской области туляремийный антиген возбудителя у *D. reticulatus* обнаруживался чаще, чем у *D. marginatus*, что согласуется с нашими результатами, представленными выше.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже было отмечено, в ландшафтно-климатических условиях северной части Воронежской области распространены стойкие природные очаги туляремии двух типов: лесного (зональные) и пойменно-долинного (интразональные). По всей видимости, они характерны для всей лесостепной зоны европейской части России. Нельзя исключить существования природных очагов луго-полевого и пойменно-болотного типов, хотя совокупность необходимых для этого биотических и абиотических условий представляется в этой зоне весьма ограниченной.

В лесостепной зоне в природных очагах туляремии лесного типа потенциальными хранителями и переносчиками *F. tularensis*, как показывают наши данные, могут быть иксодовые клещи двух видов (*D. reticulatus* и *I. ricinus*), но их возможные роли в эпизоотическом процессе сильно различаются. В этом отношении эти очаги гораздо более сходны с центрально-европейскими очагами лесного типа (Gurycová et al., 1995; Hildebrandt et al., 2011; Gehringer et al., 2013; Genchi et al., 2015), чем с восточноевропейскими, где клещи данных видов отсутствуют, а потенциалом участия в эпизоотическом процессе обладают *I. trianguliceps* и *I. persulcatus* (Олсуфьев, Дунаева, 1970; Кормилицына и др., 2016, 2019).

Даже при массовом бактериологическом исследовании клещей *I. ricinus*, отловленных в природе, от них не всегда удается получить хотя бы единичный изолят туляре-

мийного микроба (Олсуфьев, 1947; Петров, 1968; Олсуфьев, Дунаева, 1970) или же выявить *F. tularensis* иным способом, особенно у взрослых особей (Hildebrandt et al., 2011). Экспериментально инфицированные этим микробом *I. ricinus* в процессе метаморфоза чаще освобождаются от него, чем клещи рода *Dermacentor*, и поэтому «... реже передают возбудителя туляремии восприимчивым животным. Для *F. tularensis*, по-видимому, создаются неблагоприятные условия существования в клеще с сильно продолжительным циклом развития, что свидетельствует о меньшей адаптации туляремийных бактерий к организму *I. ricinus*, особенно к взрослой его фазе» (Петров, 1968, с. 428).

Изложенные результаты экспериментальных и полевых исследований, а также данные о мизерном числе взрослых голодных клещей этого вида с наличием маркеров ДНК возбудителя туляремии, полученные нами в лесостепной части Воронежской области, позволяют считать *I. ricinus* случайным хозяином бактерий *F. tularensis*. Мы предполагаем, что контактам переносчиков с возбудителем может способствовать одновременное паразитирование предимагинальных фаз *I. ricinus* и *D. reticulatus* на высоко восприимчивых к инфекции мелких млекопитающих. Это часто происходит, например, с клещами *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* (в фауне Воронежской области эти виды отсутствуют, Негрбов, 2005) в восточноевропейских южнотаежных природных очагах иксодовых клещевых боррелиозов (Ковалевский и др., 2013; Korenberg et al., 2015), сочетанных с паразитарной системой лесного туляремийного очага (Кормилицына и др., 2016, 2019).

Известно, что в природных очагах нескольких различных типов на территориях Палеарктики и Голарктики с умеренным климатом важное участие в циркуляции туляремийного микроба принимают иксодовые клещи рода *Dermacentor* (Олсуфьев, 1953, 1987; Олсуфьев, Дунаева, 1970; Hubálek, Halouzka, 1997; Hubálek, Rudolf, 2017; Whitten et al., 2019; Zelner, Huntley, 2019 и др.). Этому способствуют способность клещей к восприятию бактерий и их трансфазовой передаче в ходе метаморфоза (Петров, Дунаева, 1955; Олсуфьев, Петров, 1967; Петров, 1968), а также непродолжительность полного цикла развития и смены генераций (Gurycová et al., 1995). Так, у *D. reticulatus* и *D. marginatus*, например, развитие от яйца до взрослой особи может происходить в течение одного вегетационного периода (Rubel et al., 2016).

Оба этих вида – важные хранители и переносчики возбудителя в природных очагах туляремии (Олсуфьев, Дунаева, 1970), в том числе, как показывают представленные нами данные, и на стыке лесостепной и степной зон европейской части России. Однако эта роль ограничена особенностями их ареалов и территориального распределения.

Так, для более влаголюбивого клеща *D. reticulatus* южные пределы существования его плакорных популяций в европейской части России, с которыми в значительной мере связана локализация природных очагов туляремии лесного типа, существенно ограничиваются затененными биотопами смешанных хвойно-лиственных насаждений лесостепной зоны. Но, как показывают наши сборы, клещи этого вида остаются многочисленными в условиях интразональных ландшафтов, где они, вероятно, обеспечивают функционирование природных очагов пойменно-долинного типа. По долинам рек клещ *D. reticulatus* заходит в степную зону (Филиппова, 1997), где могут существовать природные очаги туляремии. Это отмечается и на территории Воронежской области. Но в таких очагах видовой состав клещей-переносчиков и видовой состав резервуарных хозяев возбудителя в значительной степени отличаются от видовых составов переносчиков и хозяев в типичных очагах степного типа (Олсуфьев, Дунаева, 1970) и сходны с видовыми составами в пойменно-долинных очагах примыкающей лесостепной зоны.

Клещ *D. marginatus* является более ксерофильным по сравнению с *D. reticulatus*. Ареал этого вида охватывает всю степную зону (Филиппова, 1997). Интразональные пойменно-долинные биотопы, по которым он проникает в лесостепь, в значительной мере ограничивают северные рубежи его ареала. Экспериментально установлено, что клещ *D. marginatus*, как и *D. reticulatus*, способен при кровососании воспринимать *F. tularensis* от резервуарных хозяев и с утратой некоторого количества бактерий передавать этот микроб от личинок до взрослых особей в процессе метаморфоза. При переходе зараженных нимф в половозрелую фазу количество бактерий сокращается в клеще от 10 до 1000 раз (Петров, Дунаева, 1955; Олсуфьев, Петров, 1967; 1968). Наши данные позволяют предполагать, что в европейской части лесостепной зоны *D. marginatus* может быть важным сочленом туляремийной паразитарной системы очагов пойменно-долинного типа, но этот вид принимает несколько меньшее участие в эпизоотическом процессе, чем *D. reticulatus*. Это предположение, видимо, можно распространить и на очаги туляремии иных типов, паразитарные системы которых включают иксодовых клещей обоих видов. В природных очагах Центральной Европы среди клещей *D. marginatus*, исследованных молекулярно-биологическим или иными методами, было меньше положительных, чем среди *D. reticulatus* (Hubálek et al., 1996; Wicki et al., 2000; Sréter-Lancz et al., 2009 и др.).

Положительные результаты ПЦР-РВ с родоспецифичными праймерами при отсутствии в тех же образцах ДНК *F. tularensis* позволяют предположительно объяснять их

наличием FLE. Они были констатированы только в пробах клещей *D. reticulatus* из лесного и двух пойменно-долинных природных очагов, один из которых находился в лесостепной, а второй – в степной зоне. Соотношение между числом клещей с FLE и ДНК *F. tularensis*, по нашим результатам, в целом составляло примерно 1:10 и было близко к полученному при исследовании клещей этого вида в Венгрии (Kreizinger et al., 2013). При этом оно существенно отличалось от данных, полученных при выявлении 16s rRNA фрагмента генома FLE другими исследователями: 50.4 % в Польше (Wójcik-Fatla et al., 2015) и 79 % во Франции (Michelet et al., 2013). Взрослые клещи *D. reticulatus*, собранные в различных районах Португалии и Испании, содержали или ДНК *F. tularensis*, или ДНК FLE в большем количественном соотношении (de Carvalho et al., 2011, 2016). По предположению авторов, эти различия обусловлены различиями популяций клещей из разных географических областей. Нам не удалось обнаружить FLE у взрослых клещей *I. ricinus*, хотя известно, что очень немногие из них могут содержать этих эндосимбионтов (Wójcik-Fatla et al., 2015). Как справедливо отмечают авторы данной публикации, все эти «несстыковки» могут объясняться различиями в применяемых методиках ПЦР, а также разницей в количестве тестируемых клещей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение иксодовых клещей на наличие ДНК *F. tularensis* может быть информативным направлением мониторинга за состоянием природных очагов туляремии. Выявленные нами у *D. reticulatus* образцы с ДНК бактерий рода *Francisella* при отсутствии в тех же образцах ДНК *F. tularensis* позволяют предположить, что у клещей присутствуют эндосимбионты группы FLE. Их детальная идентификация и дальнейшие исследования важны для понимания филогении туляремийного микроба и совершенствования методов лабораторной диагностики. Для изучения FLE прежде всего необходима разработка новых молекулярно-биологических методов с высокой чувствительностью, позволяющих обнаруживать специфическую ДНК этих микроорганизмов при ее небольшом количестве в клеще.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баркалова Л.Д., Ромашова Н.Б., Транквилевский Д.В., Бахметьева Ю.О., Чубирко М.И. 2012. К вопросу распространения очагов иксодовых клещевых боррелиозов на территории Воронежской области. Здоровье населения и среда обитания 234 (9): 30–34.
- Ковалевский Ю.В., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Нефедова В.В. 2013. Экология клеща *Ixodes trianguliceps* и его роль в природных очагах иксодовых клещевых боррелиозов Среднего Урала. Зоологический журнал 92 (5): 505–516.

- Козорезов А.В., Попова Т.И., Гайдукова Е.П., Степкин Ю.И., Квасов Д.А. 2017. Обзор эпизоотической и эпидемиологической ситуации по природно-очаговым инфекциям в Воронежской области в 2016 г. Современные проблемы общей и прикладной паразитологии и эпизоотологии. Воронеж. 126–133.
- Кормилицына М.И., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., Мещерякова И.С. 2016. Первая молекулярно-генетическая идентификация возбудителя туляремии у клещей *Ixodes trianguliceps* Bir. в России. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 34 (2): 67–70.
- Кормилицына М.И., Коренберг Э.И., Михайлова Т.В., Ковалевский Ю.В., Транквилевский Д.В. 2019. Возможное участие таежного клеща *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930 в циркуляции возбудителя туляремии в природных очагах лесного типа. Паразитология 53 (3): 209–219.
- Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Мазепа А.В., Окунев Л.П., Холин А.В., Куликалова Е.С., Храмов М.В., Дятлов И.А., Транквилевский Д.В. 2017. Эпидемиологический и эпизоотологический анализ ситуации по туляремии в Российской Федерации в 2016 г., прогноз на 2017 г. Проблемы особо опасных инфекций 2: 13–18.
- Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Пакскина Н.Д., Холин А.В., Мазепа А.В., Куликалова Е.С., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. 2018. Туляремия: актуальные вопросы и прогноз эпидемической ситуации на территории Российской Федерации в 2018 г. Проблемы особо опасных инфекций 1: 22–29.
- Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Пакскина Н.Д., Холин А.В., Мазепа А.В., Куликалова Е.С., Косилко С.А., Бирковская Ю.А., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. 2019. Эпидемическая активность природных очагов туляремии на территории Российской Федерации в 2018 г. и прогноз ситуации на 2019 г. Проблемы особо опасных инфекций 1: 32–41.
- Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Холин А.В., Мазепа А.В., Куликалова Е.С., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. 2020. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по туляремии на территории Российской Федерации в 2019 г. и прогноз на 2020 г. Проблемы особо опасных инфекций 1: 21–32.
- Мещерякова И.С., Транквилевский Д.В., Квасов Д.А., Михайлова Т.В., Кормилицына М.И., Демидова Т.Н., Степкин Ю.И., Жуков В.И. 2015. Оценка современной эпизоотической активности природных очагов туляремии в Воронежской области с помощью иммуно-серологического и молекулярно-генетического исследования основных носителей возбудителя. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1: 11–17.
- Михайлова Т.В., Мещерякова И.С., Транквилевский Д.В., Кормилицына М.И., Демидова Т.Н. 2014. Характеристика природных очагов туляремии на Северо-Востоке Воронежской области. Дальневосточный журнал инфекционной патологии 25: 58–60.
- Михайлова Т.В., Мещерякова И.С., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И., Квасов Д.А., Степкин Ю.И., Транквилевский Д.В. 2015. Особенности биотопического распределения различных видов мелких млекопитающих и их роль в поддержании природных очагов туляремии в Северо-Восточной части Воронежской области. Журнал эпидемиология и вакцинопрофилактика 3: 57–61.
- Михайлова Т.В., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И., Квасов Д.А., Козорезов А.В., Транквилевский Д.В. 2017. Эпизоотическая активность и эпидемическое проявление природных очагов туляремии в Воронежской области. Журнал эпидемиология и вакцинопрофилактика 92 (1): 16–21.
- Негров О.П. (отв. ред.) 2005. Кадастр беспозвоночных животных Воронежской области. Воронеж, ВГУ. 825 с.
- Олсуфьев Н.Г. 1947. О ландшафтных типах туляремийных очагов средней полосы РСФСР. Зоологический журнал 26 (3): 255–261.

- Олсуфьев Н.Г. 1953. К экологии лугового клеща *Dermacentor pictus* Herm., о происхождении его очагов и путях их ликвидации в средней полосе Европейской части РСФСР. М. Вопросы краевой, общей и экспериментальной паразитологии и медицинской зоологии 8: 49–98.
- Олсуфьев Н.Г. 1987. Клещ *Dermacentor pictus* Herm. и антропогенное действие на его популяцию, а также связанный с ним лугополевой очаг туляремии. Медицинская паразитология и паразитарные болезни 3: 16–20.
- Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. 1970. Природная очаговость, эпидемиология и профилактика туляремии. М., Медицина, 272 с.
- Олсуфьев Н.Г., Петров В.Г. 1967. Кровососущие членистоногие и *Francisella tularensis*. В кн. Биологические взаимоотношения кровососущих членистоногих с возбудителями болезней человека. М., Медицина, 200–218.
- Петров В.Г. 1968. *Dermacentor marginatus* Sulz. и *Ixodes ricinus* L. как хранители и переносчики возбудителя туляремии. Паразитология 2 (5): 424–429.
- Петров В.Г., Дунаева Т.Н. 1955. Зависимость инфицирования иксодовых клещей от особенностей течения туляремии у животных-доноров. М. Вопросы краевой, общей и экспериментальной паразитологии и медицинской зоологии IX: 153–162.
- Сильченко В.С. 1961. Природноочаговые инфекции в Воронежской области. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии 5: 15–18.
- Транквилевский Д.В. 2016. Об инфицированности мелких млекопитающих возбудителями зоонозов в Российской Федерации. Здоровье населения и среда обитания 283 (10): 53–56.
- Транквилевский Д.В., Квасов Д.А., Мещерякова И.С., Михайлова Т.В., Кормилицына М.И., Демидова Т.Н., Ананьина Ю.В., Савельева О.В., Малкин Г.А., Мутных Е.С., Коротина Н.А., Дзагурова Т.К., Простаков Н.И., Сурков А.В., Куролап С.А., Клепиков О.В., Стёпкин Ю.И., Чубирко М.И., Жуков В.И. 2014. Вопросы организации мониторинга природных очагов инфекций опасных для человека. Планирование, проведение и анализ результатов полевых наблюдений. Здоровье населения и среда обитания 257 (8): 38–43.
- Транквилевский Д.В., Удовиков А.И., Попов В.П., Захаров К.С., Попов Н.В., Безсмертный В.Е. 2015. Состояние численности грызунов и эпидемиологическая обстановка по туляремии на территории Российской Федерации во втором полугодии 2014 и прогноз на 2015 г. Проблемы особо опасных инфекций 1: 30–35.
- Филиппова Н.А. 1997. Иксодовые клещи подсем. *Amblyomminae*. Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные. Т. IV, вып. 5. СПб., Наука, 436 с.
- Филиппова Н.А. 2011. Особенности биоразнообразия европейской фауны иксодовых клещей (Acari, Ixodidae) как переносчиков возбудителей природноочаговых инфекций. Паразитология 45 (3): 161–181.
- de Carvalho I., Santos N., Soares T., Zé-Zé L., Nuncio M.S. 2011. *Francisella*-like endosymbiont in *Dermacentor reticulatus* collected in Portugal. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 11: 185–188.
- de Carvalho I., Toledo A., Carvalho C.L., Barandika J.F., Respicio-Kingry L.B., Garcia-Amil C., García-Pérez A.L., Olmeda A.S., Zé-Zé L., Petersen J.M., Anda P., Nuncio M.S., Escudero R. 2016. *Francisella* species in ticks and animals, Iberian Peninsula. Ticks and Tick-borne Diseases 7 (1): 159–165.
- Gehring H., Schacht E., Maylaender N., Zeman E., Kaysser P., Oehme R., Pluta S., Spletstoesser W.D. 2013. Presence of an emerging subclone of *Francisella tularensis holarctica* in *Ixodes ricinus* ticks from south-western Germany. Ticks and tick-borne diseases 4 (1–2): 93–100.
- Genchi M., Prati P., Vicari N., Manfredini A., Sacchi L., Clementi E., Bandi C., Epis S., Fabbri M. 2015. *Francisella tularensis*: no evidence for transovarial transmission in the tularemia tick vectors *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus*. PLoS One 10 (8): e0133593. doi: 10.1371/journal.pone.0133593.

- Gurycová D., Kocianová E., Výrosteková V., Reháček J. 1995. Prevalence of ticks infected with *Francisella tularensis* in natural foci of tularemia in western Slovakia. *European Journal of Epidemiology* 11 (4): 469–474.
- Hildebrandt A., Franke J., Schmoock G., Pauliks K., Krämer A., Straube E. 2011. Diversity and coexistence of tick-borne pathogens in central Germany. *Journal of Medical Entomology* 48 (3): 651–655.
- Hubálek Z., Tremf F., Halouzka J., Juricova Z., Hunady M., Janik V. 1996. Frequent isolation of *Francisella tularensis* from *Dermacentor reticulatus* ticks in an enzootic focus of tularaemia. *Medical and Veterinary Entomology* 10: 241–246.
- Hubálek Z., Halouzka J. 1997. Mosquitoes (Diptera: Culicidae), in contrast to ticks (Acari: Ixodidae), do not carry *Francisella tularensis* in a natural focus of tularemia in the Czech Republic. *Journal of Medical Entomology* 34: 660–663.
- Hubálek Z., Rudolf I. 2017. *Francisella tularensis* prevalence and load in *Dermacentor reticulatus* ticks in an endemic area in Central Europe. *Medical and Veterinary Entomology* 31 (2): 234–239.
- Korenberg E.I., Kovalevskii Yu.V., Gorelova N.B., Nefedova V.V. 2015. Comparative analysis of the roles of *Ixodes persulcatus* and *I. trianguliceps* ticks in natural foci of ixodid tick-borne borrelioses in the Middle Urals, Russia. *Ticks and Tick-borne Diseases* 6 (4): 316–321.
- Kreizinger Z., Hornok S., Dán A., Hresko S., Makrai L., Magyar T., Bhide M., Erdélyi K., Hofmann-Lehmann R., Gyuranecz M. 2013. Prevalence of *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in the tick population of Hungary and the genetic variability of *Francisella*-like agents. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 13 (3): 160–163.
- Michelet L., Bonnet S., Madani N., Moutailler S. 2013. Discriminating *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in *Dermacentor reticulatus* ticks: valuation of current molecular techniques. *Veterinary Microbiology* 163 (3–4): 399–403.
- National Center for Biotechnology Information. 2020. Taxonomy Browser. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> (01 июня 2020)
- Rubel F., Brugger K., Pfeffer M., Chitimia-Dobler L., Didyk Y.M., Leverenz S., Dautel H., Kahl O. 2016. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases* 7 (1): 224–233.
- Sréter-Lancz Z., Széll Z., Sréter T., Márialigeti K. 2009. Detection of a novel *Francisella* in *Dermacentor reticulatus*: a need for careful evaluation of PCR-based identification of *Francisella tularensis* in Eurasian ticks. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 9: 123–126.
- Whitten T., Demontigny C., Bjork J., Foss M., Peterson M., Scheffel J., Neitzel D., Sullivan M., Smith K. 2019. Prevalence of *Francisella tularensis* in *Dermacentor variabilis* ticks, Minnesota, 2017. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 19 (8): 596–603.
- Wicki R., Sauter P., Mettler C., Natsch A., Enzler T., Pusterla N., Kuhnert P., Egli G., Bernasconi M., Lienhard R., Lutz H., Leutenegger C.M. 2000. Swiss Army survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases* 19: 427–432.
- Wójcik-Fatla A., Zając V., Sawczyn A., Cisak E., Sroka J., Dutkiewicz J. 2015. Occurrence of *Francisella* spp. in *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland. *Ticks and Tick-borne Diseases* 6 (3): 253–257.
- Zelner B., Huntley J.F. 2019. Ticks and tularemia: do we know what we don't know? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9: 146. doi: 10.3389/fcimb.2019.00146

EVALUATION OF THE POSSIBLE ROLE OF IXODID TICKS
IN NATURAL TULAREMIA FOCI IN THE FOREST-STEPPE ZONE
OF THE EUROPEAN RUSSIA

M. I. Kormilitsyna, E. I. Korenberg, T. V. Mikhaylova,
Yu. V. Kovalevskii, A. V. Amirkhanyan, D. V. Trankvilevsky,
B. V. Romashov, D. A. Kvasov, A. M. Salomatina

Keywords: natural foci, the causative agent of tularemia, types of foci, ixodid ticks

SUMMARY

1756 adult individuals of ticks *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1894), *D. marginatus* (Sulzer, 1776) and *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) collected from vegetation in April–May 2018 and 2019 in natural foci of tularemia in forest and floodplain-valley types of the forest-steppe zone of the European Russia (Voronezh region) were investigated. Ticks (2 individuals in a pool) were studied by RT-PCR for the presence 16S rRNA gene fragment (amplicon size 218–226) in the *Francisella* genome. All positive samples were checked using species-specific primers and probes complementary to a fragment of the *lpnA* gene and the *ISFtu2*-element. *Francisella* DNA content in *I. ricinus* ticks from the forest biotope was found almost 20 times less than in *D. reticulatus*. The amount of *Francisella* DNA in *D. reticulatus* ticks collected in all studied floodplain-valley foci was more than 5 times greater than in *D. marginatus*. All positive tick pools of *D. marginatus* ticks were identified as *Francisella tularensis*, in contrast to *D. reticulatus*, which contained not only the DNA of *F. tularensis*, but also the unidentified DNA of *Francisella* genus bacteria. 15 % of them were found in *D. reticulatus* ticks from a forest-type focus and 5 % – in three floodplain-valley biotopes (in total). This may indicate the presence of endosymbionts of the FLE group in ticks of *D. reticulatus*. Thus, *D. marginatus* may be an important joint of the tularemia parasitic system of foci of the floodplain-valley type, however, these ticks take a slightly lesser part in the epizootic process than *D. reticulatus* in the European part of the forest-steppe zone. Adult forest ticks *I. ricinus* are occasional hosts of bacteria *F. tularensis*.