Детекция ДНК бартонелл в иксодовых клещах, комарах и в крови больных в Новосибирской области

Морозова О.В.¹, Петрожицкая Л.В.², Черноусова Н.Я.³, Мирзаева А.Г.², Добротворский А.К.², Морозов И.В.¹

Detection of bartonella DNA in ixodid ticks, mosquitoes and in patients blood in Novosibirsk region

Morozova O.V., Petrozhitskaya L.V., Chernousova N.Ya., Mirzayeva A.G., Dobrotvorsky A.K., Morozov I.V.

© Морозова О.В., Петрожицкая Л.В., Черноусова Н.Я. и др.

Методом двухраундовой ПЦР выявлено наличие ДНК бартонелл в клещах *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus*, в комарах *Aedes cantans*, но не в комарах других видов и мошках. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР показал инфекцию переносчиков и больных в Hовосибирской области двумя видами: *Bartonella hensela* и *Bartonella quintana*, а также смешанные формы инфекции.

Ключевые слова: бартонеллы, двухраундовая ПЦР, иксодовые клещи, комары, больные.

Bartonella DNA was detected using nested PCR in ticks Ixodes persulcatus and Dermacentor reticulatus, in mosquitoes Aedes cantans, but not in other mosquito or gnat species. Phylogenic analysis of the PCR product nucleotide sequences proved the infection of arthropod vectors and human blood with Bartonella henselae, Bartonella quintana or their mixed infection in Novosibirsk region.

Key words: Bartonella henselae, Bartonella quintana, nested PCR, ixodid ticks, mosquitoes, patients.

УДК 576.895.42

Введение

История открытия бартонелл. Заболевания, вызываемые бартонеллами, были известны задолго до открытия и идентификации их этиологических агентов. Имеются свидетельства врачей в Южной Америке (Перу), датированные 1571 г., описывающие инфекционное заболевание, при котором на теле больного появляются бородавки размером с яйцо, разрывающиеся с выделением крови и гноя [7]. В 1871 г. произошли вспышки бартонеллезов в Перу, при которых заболели и погибли до 7 тыс. человек. Известны также две значительные эпидемии окопной лихорадки в результате инфекции бартонеллами среди солдат во время Первой и Второй мировых войн. Вновь сообщения о регистрации бартонеллезов появились в начале 1990-х гг., когда возбудитель был выявлен у ВИЧ-

инфицированных лиц в качестве оппортунистической инфекции.

Серологические и молекулярно-генетические исследования в разных странах, в том числе и в России, выявили скрытую циркуляцию возбудителя среди людей и его наличие в популяции вшей [12]. У 1,48—2,48% населения Украины специфические антитела выявлены во всех возрастных группах, во Франции — у 0,6% обследованных, а эндокардиты, обусловленные бартонеллами, подтверждены у 76,4% больных.

Характеристика бартонелл. С 1984 г. бартонеллы классифицированы в α-2 подгруппе *Proteobacteria* порядка *Rhizobiales* семейства *Bartonellaceae* рода *Bartonella* [3, 7]. В номенклатуре бартонелл отражены имена микробиологов А.Н. Бартона, Д. Хенсел, Д. Карриона, открывших соответствующие виды. Так, Диана Хенсел

 $^{^{1}}$ Институт химической биологии и фундаментальной медицины CO РАН, г. Новосибирск

² Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск

 $^{^3}$ Муниципальная инфекционная клиническая больница № 1, г. Новосибирск

выделила штамм бартонелл из крови лихорадящего больного СПИДом, позднее названный *Bartonella henselae*.

Бартонеллы — грамотрицательные аэробные плейоморфные бактерии, паразитирующие в эритроцитах и эндотелиальных клетках сосудистой системы и эндокарда позвоночных по всему миру. Присутствие бартонелл в клетках крови формально противоречит существующим со времен Коха (1878) представлениям о стерильности крови у здоровых организмов. При культивировании in vitro бартонеллы нуждаются в факторах роста, таких как гемин и другие продукты расщепления эритроцитов [1]. Для В. quintana возможно культивирование в платяных вшах, для B. henselae — в кошачьих блохах, а также на твердых и полужидких питательных средах, обогащенных 5— 10% крови человека или животных. Срок культивирования составляет 15-45 дней [1]. В срезах из инфицированных тканей бартонеллы могут быть изогнутыми, плейоморфными размером от 0,3-0,5 до 1,0-3,0 мкм или сгруппированы в компактные скопления (кластеры) [3]. Окрашиваются по Романовскому— Гимзе; в биоптатах из тканей — красителем акридиновым оранжевым и с применением серебра по Warthing Starry. Для В. bacilliformis характерны 1—4 жгутика, расположенные на одном из полюсов клетки, и поэтому клетки подвижны [15]; для В. henselae наблюдали один жгутик либо только пили [3]. Бартонеллы имеют трехслойную оболочку, состоящую, как у всех грамотрицательных бактерий, из наружной мембраны, клеточной стенки и внутренней мембраны, которая содержит 12 известных белков с молекулярной массой от 28 до 174 кДа.

Размер генома бартонелл варьирует от 1,5 до 2 млн н.п.; нуклеотидные последовательности полноразмерных геномов двух видов бартонелл представлены в базе данных GenBank: *Bartonella quintana* штамм «Toulouse» (NC_005955, 1 581 384 н.п.); *Bartonella henselae* штамм «Houston-1» (NC_005956, 1 931 047 н.п.). Размножение бартонелл происходит простым поперечным делением.

Циркуляция бартонелл в природных популяци- ях. Бартонеллы широко распространены повсеместно, где встречается человек и домашние животные. У теплокровных резервуарных хозяев бартонелл развивается хроническая бактериемия без симптомов или с небольшими физиологическими нарушениями [7]. До 50% популяций диких и домашних кошек инфициро-

ваны бартонеллами [3]. Высокая (до 68,1%) бактериемия среди кошек, связанная с B. henselae, наблюдается в некоторых штатах США, а также в Германии, особенно среди животных (до 89%) из тех семей, в которых дети или взрослые перенесли болезнь от кошачьих царапин. В природных популяциях бартонеллы циркулируют среди мышевидных грызунов, представителей семейства кошачьих (кошки, пумы) и собак, вызывая у них персистентную инфекцию. В США и Великобритании 42—62% грызунов инфицированы барнонеллами [3]. Среди оленей во Франции и Калифорнии эта инфекция еще более распространена [3]. Помимо этого, домашние животные, прежде всего кошки и собаки, являются резервуарами бартонелл и переносчиками инфекции людям. Природный резервуар В. quintana до настоящего времени не установлен, единственным хозяином инфекции считается человек. У людей, помимо остро протекающего лихорадочного заболевания, возможно длительное (до 2-5 лет) скрытое бессимптомное носительство или же в сочетании с хронически протекающими лимфаденопатией и эндокардитом. Необходимо отметить селекцию видов бартонелл в определенных видах теплокровных резервуарных хозяев [7].

Трансмиссия бартонелл в природных популяциях происходит при укусах кровососущих членистоногих (кошачьих блох, платяных вшей, комаров, москитов, мошек, клещей и других) или повреждениях кожных покровов. Недавно наличие Bartonella spp. было показано в иксодовых клещах Ixodes scapularis, Ixodes ricinus и Ixodes pacificus [4—6, 13, 14]. Методом ПЦР показано наличие ДНК бартонелл у 70% клещей Ixodes ricinus [14]. Различные виды бартонелл, включая В. henselae, были обнаружены в 19,2% клещей Ixodes pacificus в Калифорнии [4]. В северо-западной Италии ДНК В. henselae была обнаружена в 1,5% клещей *I. ricinus*, снятых с людей [13]. Известно, что трансовариальная передача бартонелл отсутствует, однако жизнеспособные клетки сохраняются в течение определенной фазы развития членистоногих, в частности, у вшей — до 45 сут.

Эндемичным видом бартонелл является только *В. bacilliformis* — возбудитель болезни Карриона, распространенный исключительно на северо-западе Южной Америки в горных районах Анд [3].

Патогенез. Для человека патогенными являются пять видов бартонелл (*B. henselae*, *B. quintana*, *B. ba-*

cilliformis, B. clarridgeiae, B. elizabethae). Входными воротами для большинства видов бартонелл является кожа и связанные с ней кровеносные сосуды. Распространение бартонелл происходит гематогенным и лимфогенным путями. В организме человека бактерии проявляют тропизм к эритроцитам, эндотелиальным клеткам, кроветворной ткани костного мозга, также могут быть обнаружены в селезенке, лимфатических узлах, эндокарде, клапанах сердца, печени и коже. Проникновение бартонелл в эукариотические клетки происходит с участием жгутиков [1]. При этом в местах прикрепления бартонелл к чувствительным клеткам формируются скопления микроорганизмов и возникает воспалительная реакция с разрастанием клеток эндотелия и прилегающих тканей. Особенностью бартонелл является способность стимулировать пролиферацию клеток эндотелия и капилляров, что приводит к ангиоматозу. При инфицировании людей патогенными видами бартонелл наблюдаются хроническая бактериемия, лихорадка, кожные нарывы, эндокардиты, развивается доброкачественная лимфоаденопатия. Реже проявляются нарушения в центральной нервной системе, печени, глазной и костной тканях. По характеру течения можно выделить острые (окопная лихорадка, болезнь Карриона, лихорадка Оройя), подострые (болезнь от кошачьих царапин) и хронические (бациллярный ангиоматоз, перуанская бородавка, пурпурный гепатит, эндокарди-

заболевания. Клинически заболевания, вызываемые бартонеллами, крайне разнообразны — от легких местных симптомов до остро протекающих или длительно текущих болезненных состояний, способных приводить к смертельному исходу. Ослабление иммунитета вследствие заражения эндотелиальных клеток, нарушения в кровообращении и гипоксия органов и тканей обуславливают появление и нарастание общетоксических симптомов (лихорадка, озноб, гипотензия, тошнота, рвота, ослабление сердечной деятельности). У больных лихорадкой Оройя наблюдается анемия, что обусловлено интенсивным повреждением при инфекционном процессе эритроцитов, достигающим 40—50 и даже 90% циркулирующей популяции клеток с последующим разрушением.

Постепенное появление в крови больных специфических антител останавливает инфекционный процесс, больные постепенно выздоравливают с формированием специфического иммунитета в зависимости от вида бартонелл. При хронических формах бартонеллезов, развивающихся чаще всего у лиц с иммунной недостаточностью, устанавливается длительная бактериемия вопреки интенсивной многомесячной терапии антибиотиками. Последнее объясняется внутриклеточной локализацией части популяции возбудителя. Наиболее злокачественно протекает острая форма болезни Карриона, известная как лихорадка Оройя, при которой смертность раньше достигала 40%, а при отдельных вспышках — до 90%. Смертельные исходы при других формах бартонеллезов редки [10].

Поскольку обязательной регистрации бартонеллезов не существует, то истинное число заболеваний остается неизвестным. Имеются сведения, что в США в начале 1990-х гг. бартонеллы были обнаружены у 22 тыс. пациентов, из которых 2 тыс. были госпитализированы.

Цель данной работы состояла в детекции и идентификации бартонелл в членистоногих переносчиках и в крови больных в Новосибирской области.

Материал и методы

Детекция ДНК бартонелл. Имаго иксодовых клещей Ixodes persulcatus и Dermacentor reticulates собирали с растительности на флаг в пригородах г. Новосибирска в эпидемиологические сезоны 2001—2005 гг. Комары и мошки, находящиеся в поиске доноров крови, были отловлены в смешанном лесу в пойме р. Оби летом 2004 и 2005 гг. Видовую принадлежность клещей, комаров и мошек определяли по морфологическим признакам.

Нуклеиновые кислоты были выделены из индивидуальных клещей, пулов комаров и мошек по 10 особей в каждом, а также из 200 мкл клеток крови пациентов, госпитализированных летом 2003 и 2004 гг. в муниципальную инфекционную клиническую больницу № 1 г. Новосибирска с признаками инфекционных заболеваний [2]. Для детекции ДНК бартонелл проводили двухраундовую ПЦР с праймерами, соответствующими гену groEL, как описано ранее [2, 16].

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР. Определялись нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР [2] и регистрировались в базе данных GenBank (номера доступа АУ453166-АУ453170, АУ597524, АУ612093, АУ612094, АУ885134-АУ885146). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы MEGA [9].

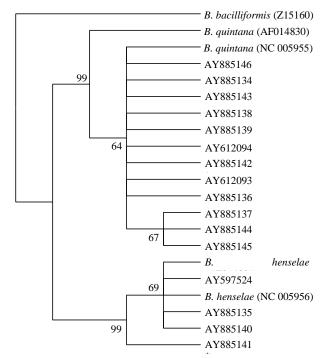
Результаты

ДНК бартонелл обнаружена в пробах от иксодовых клещей: *Ixodes persulcatus* — $(44,0 \pm 7,0)\%$ (2002), $(38.0 \pm 6.9)\%$ (2003), $(37.1 \pm 5.8)\%$ (2004); Dermacentor reticulatus — $(19,1 \pm 4,8)\%$ (2002—2003); $(21,4 \pm 4,5)\%$ (2004). Кроме этого, ДНК бартонелл была выявлена в 2004 г. в 2 из 6 исследованных пулов по 10 комаров рода Aedes, что соответствовало индивидуальной зараженности 4,0%; в 2005 г. — в 3 из 18 пулов (индивидуальная зараженность — 1,9%). Необходимо отметить, что все комары, содержащие ДНК бартонелл, относились к виду Aedes cantans. В пробах от комаров других видов (Aedes punctor, Aedes cinereus и Aedes communis), а также среди 17 пулов мошек Byssodon maculata в 2005 г. ДНК бартонелл не обнаружена. На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР фрагмента гена groEL длиной 231 н.п. и 13 известных видов бартонелл показано, что среди клещей и комаров преобладают Bartonella henselae, но также обнаружены Bartonella quintana и смешанные формы инфекции.

Пробы крови собраны летом 2003 и 2004 гг. у пациентов, госпитализированных в муниципальную инфекционную клиническую больницу № 1 г. Новосибирска с признаками инфекционных заболеваний, для большинства — после укусов клещами. В каждом пятом случае больные не отмечали укусов клещами, а лишь подтверждали пребывание в эпидемиологически опасных районах области в период активности иксодовых клещей. При анализе ДНК, выделенных из клеток крови 369 пациентов, продукты двухраундовой ПЦР были обнаружены для 73 образцов ($(19.8 \pm 2.1)\%$ от числа обследованных), нуклеотидные последовательности которых оказались гомологичны между собой, а также последовательностям гена groEL двух видов бартонелл — В. henselae и В. quintana. Смешанная инфекция различными видами бартонелл — B. henselae и B. quintana — была обнаружена у одного пациента.

Достоверность идентификации видовой принадлежности фрагментов ДНК иллюстрирует построенное по критерию максимального сходства филогенетическое дерево (рисунок), на котором последовательности AY885135, AY597524, AY885140 и

известные нуклеотидные последовательности этого локуса *В. henselae* образуют одну группу с индексом поддержки 0,99; а последовательности AY885137, AY885144, AY885145, AY612093, AY885136, AY612094, AY885138, AY885139, AY885134, AY885143, AY885146 и последовательности гена *В. quintana* — другую группу также с индексом поддержки 0,99.



Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей фрагмента гена groEL исследованных образцов ДНК Bartonella, построенное по критерию максимального сходства. Виды бартонелл указаны для эталонных штаммов [16], для нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР с ДНК из крови пациентов приведены номера доступа в базе данных GenBank. Смешанная инфекция, обнаруженная в крови одного пациента, представлена в виде двух последовательностей с номерами AY885141* и AY885142*. В узлах указаны индексы поддержки кладистических групп

Обсуждение

Распространение большинства известных видов бартонелл не является природно-очаговым, они обнаружены везде, где встречается человек и домашние животные, и территория Западной Сибири, очевидно, не является исключением. Изучение клещей как переносчиков возбудителей инфекционных заболеваний человека проводилось в Новосибирском научном центре с 1990-х гг. Однако ранее комплексные молеку-

лярно-эпидемиологические исследования бартонелл среди членистоногих переносчиков и у больных, перенесших укусы клещей, не только на территории Новосибирской области, но и в России не проводились. В настоящем исследовании впервые показано наличие ДНК бартонелл в иксодовых клещах, комарах и в клетках крови больных на территории Западной Сибири. Полученные данные свидетельствуют о доминирующей роли таежных клещей в трансмиссии бартонелл, инфицирование которыми приводит к заболеванию населения Новосибирской области Необходимо отметить, что в каждом пятом случае больные не отмечали укусов клещами, а лишь подтверждали пребывание в эпидемиологически опасных районах области в период активности иксодовых клещей. Поэтому не исключена передача бартонелл при укусах комаров, несмотря на малые количества возбудителя и низкий уровень инфицированности комаров (от 1,9 до 4%). Роль других кровососущих членистоногих в трансмиссии бартонелл незначительна, однако для окончательной ее оценки требуются дополнительные исследования.

Литература

- 1. *Ильина Т.С., Ирхин А.И.* Бактерии рода *Bartonella* характеристика, факторы патогенности и метода молекулярно-генетического исследования // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 2004. № 2. С. 3—10.
- 2. Морозова О.В., Черноусова Н.Я., Морозов И.В. Детекция ДНК бартонелл методом двухраундовой ПЦР у пациентов после укусов клещами в Новосибирской области // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 2005. № 4. С. 14—17.
- 3. Breitschwerdt E.B., Kordick D.L. Bartonella infection in Animals: Carriership, Reservoir Potential, Pathogeniciti, and Zoonotic Potential for Human Infection // Clin. Microbiol. Reviews. 2000. Vol. 13. № 3. P. 428—438.
- 4. Chang C.C., Chomel B.B., Kasten R.W. et al. Molecular evidence of Bartonella spp. in questing adult Ixodes pacificus

- ticks in California $/\!/$ J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. P. 1121—1126.
- Chang C.C., Hayashidani H., Pusterla N. et al. Investigation of Bartonella infection in ixodid ticks from California // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2002. V. 25. P. 229—236.
- 6. Eskow E., Rao R.V., Mordechai E. Concurrent infection of the central nervous system by Borrelia burgdorferi and Bartonella henselae: evidence for a novel tick-borne disease complex // Arch. Neurol. 2001. V. 58. P. 1357—1363.
- 7. Jacomo V., Kelly P.J., Raoult D. Natural history of Bartonella infections (an exception to Koch's postulate) // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2002. Vol. 9. P. 8—18.
- 8. Korenberg E.I., Kovalevsky Y.V., Gorelova N.B. Ecology of Borrelia burgorferi sensu lato in Russia // Lyme Borreliosis Epidemiology and Control. Oxford: CAB International, 2002. P. 175—200.
- 9. *Kumar S, Tamura K, Nei M.* MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Brief Bioinform. 2004. V. 5. № 2. P. 150—163.
- 10. Le Page M. Death of the fittest // New Scientist. 2001. V. 171. P. 20.
- 11. Morozova O.V., Dobrotvorsky A.K., Livanova N.N. et al. PCR detection of Borrelia burgdorferi sensu lato, tick-borne encephalitis virus, and human granulocytic ehrlichiosis agent in Ixodes persulcatus ticks from Western Siberia, Russia // J. Clin. Microbiol. 2002. V. 40. № 11. P. 3802—3804.
- 12. Rudkina E.B., Roux V., Gagua E.M. et al. Bartonella quintana in body lice collected from homeless persons in Russia. // Emerg. Infect. Dis. 1999. V. 5. № 1. P. 176—178.
- Sanogo Y.O., Zeaiter Z., Caruso G. et al. Bartonella henselae in Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy // Emerg. Infect. Dis. 2003.
 V. 9. P. 329—332.
- 14. Schouls L.M., Van De Pol I., Rijpkema S.G., Schot C.S. Detection and identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Bartonella species in Dutch Ixodes ricinus ticks // J. Clin. Microbiol. 1999. Vol. 37. P. 2215—2222.
- 15. *Yanji Xu, Yan Chai. Bartonella* badlliformis: Molecular Mechanisms of Invasion // Einstein Quart. J. Biol. Med. 2002. № 19. P. 56—58.
- 16. Zeaiter Z., Fournier P.-E., Raoult D. Genomic variation of Bartonella henselae strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease // J. Clin. Microbiol. 2002. V. 40. P. 1023—1030.

Поступила в редакцию 06.01.2006 г.