

Выявление различных видов риккетсий у иксодовых клещей, в крови людей и мелких млекопитающих на юге Западной Сибири и на Урале

Иголкина Я.П.¹, Фоменко Н.В.¹, Ливанова Н.Н.², Астанин В.Б.³, Гостеева Л.А.⁴, Черноусова Н.Я.⁵, Рар В.А.¹

Detection of different rickettsia species from ixodid ticks, human blood and blood of small mammals in the South-Western Siberia and Ural

Igolkina Ya.P., Fomenko N.V., Livanova N.N., Astanin V.B., Gosteeva L.A., Chernousova N.Ya., Rar V.A.

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

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

³ Территориальное управление Роспотребнадзора по Новосибирской области, г. Новосибирск

⁴ Центральная клиническая больница СО РАН, г. Новосибирск

⁵ Муниципальная инфекционная клиническая больница № 1, г. Новосибирск

© Иголкина Я.П., Фоменко Н.В., Ливанова Н.Н. и др.

Методом двухраундовой ПЦР исследованы клещи, образцы крови людей и образцы крови и тканей мелких млекопитающих. Выявлена высокая частота встречаемости *Rickettsia tarasevichiae* в *Ixodes persulcatus* и *Rickettsia* sp. RpA4 в *Dermacentor reticulatus*. ДНК патогенных *Rickettsia helvetica* и *Rickettsia slovaca* выявлена в клещах *I. persulcatus* и *Dermacentor marginatus*. В крови человека, а также в крови и печени мелких млекопитающих обнаружена ДНК *Rickettsia sibirica*.

Ключевые слова: риккетсии, иксодовые клещи, группа клещевой пятнистой лихорадки, мелкие млекопитающие, ПЦР.

We investigated ticks, human blood samples, specimens of tissue and blood from small mammals using nested PCR. We detected high prevalence *Rickettsia tarasevichiae* and *Rickettsia* sp. RpA4 in samples of ticks *Ixodes persulcatus* and *Dermacentor reticulatus*, correspondingly. We observed DNA of pathogenic *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia slovaca* in *I. persulcatus* and *Dermacentor marginatus* and DNA of *Rickettsia sibirica* in human blood and in blood and liver samples of small mammals.

Key words: rickettsia, ixodid ticks, spotted fever group, small mammals, PCR.

УДК 616.981.71/.988.25 (571)

Риккетсиозы — трансмиссивные инфекционные заболевания, вызываемые облигатными внутриклеточными бактериями, принадлежащими к роду *Rickettsia* семейства *Rickettsiaceae* порядка *Rickettsiales*.

Представители порядка *Rickettsiales* — грамотрицательные бактерии, имеющие кокковидную или палочковидную форму, чаще всего представляют собой короткие палочки 0,3—0,6 мкм в ширину и 0,8—2,0 мкм в длину. Экологической микронисшей для риккетсий служит цитоплазма, а для ряда из них — ядро эукариотической клетки. Размер генома риккетсий составляет от 1 100 до 1 600 тыс. п.н. Многие виды риккетсий выявляются исключительно в насекомых или клещах,

однако некоторые риккетсии являются возбудителями трансмиссивных инфекций человека и теплокровных животных [1].

Род *Rickettsia* включает три группы: группу сыпного тифа, группу клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и группу неклассифицированных риккетсий [3, 14]. К группе сыпного тифа относятся два вида риккетсий: *R. typhi* — возбудитель крысиного сыпного тифа — передается человеку через блох. *R. prowazekii* вызывает эпидемический сыпной тиф, переносимый платяными вшами. В группу неклассифицированных риккетсий входят ряд риккетсий, переносимых клещами (*R. bellii*, *R. canadensis* и *R. tarasevichiae* и др.),

а также риккетсии эндосимбионты и паразиты грибов, амфизойных амёб, плодовых мушек, жуков и др. [3, 14].

В настоящее время большинство риккетсий, ассоциированных с клещами, относят к группе КПЛ. Иксодовые клещи вследствие исключительной способности к трансфазовой и трансвариальной передаче риккетсий служат для последних не только переносчиками, но и природным резервуаром возбудителя [1]. Риккетсии инфицируют почти все органы клещей, включая слюнные железы, и передаются позвоночным при присасывании [13].

В природных очагах риккетсии могут существовать не только в трехчленной паразитарной системе позвоночные — риккетсии — членистоногие, но и длительное время сохраняться в клещах исключительно за счет трансвариальной передачи [1]. Роль позвоночных как природных резервуаров риккетсий мало изучена [7, 10]. Известно, что у животных инфекция может вызывать кратковременную риккетсиомию [12]. По-видимому, значение млекопитающих, в первую очередь грызунов, ограничено ролью временного резервуара инфекции. Однако млекопитающие имеют большое значение для поддержания циркуляции риккетсий в природе, так как обеспечивают прокормление иксодовых клещей — основных резервуаров и переносчиков инфекции. Последнее обстоятельство представляется особенно существенным, если учесть, что частота трансвариальной передачи возбудителя у клещей подвержена довольно резким колебаниям [1].

По степени патогенности риккетсии представлены широким спектром микроорганизмов — от классических и новых патогенов до симбионтов клеток эукариот [3, 14]. Патогенность для человека значительной части или даже большинства риккетсий пока не доказана. Непатогенные формы нередко встречаются на той же территории, где и возбудители заболеваний [3].

Человеку риккетсии группы КПЛ передаются при укусах инфицированными клещами. Риккетсии через лимфатическую систему проникают в кровь и затем в эндотелий сосудов органов и тканей. Основной мишенью для инфекции являются эндотелиальные клетки, хотя макрофаги, гепатоциты и клетки гладкой мускулатуры также могут быть инфицированы [9, 19]. Повреждение эндотелия служит причиной повреждения

сосудов, приводящего к повышению их проницаемости. Клинические симптомы риккетсиозов включают лихорадку, первичный аффект на месте укуса, региональный лимфаденит, полиморфную сыпь, головную и мышечную боль.

Риккетсиозы диагностируются на основе клинических, эпидемиологических и лабораторных данных [5]. Для детекции и идентификации риккетсий применяются серологические (РСК, РНИФ, иммуноблоттинг) и молекулярно-генетические (ПЦР, рестрикционный анализ и определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР) методы. Развитие ПЦР сделало возможным открытие новых видов, а также признание уже известных видов как патогенов человека [9].

На территории Урала и юга Западной Сибири распространены риккетсии, патогенность которых не установлена: *Rickettsia* sp. RpA4, *Rickettsia* sp. DnS14, *Rickettsia* sp. DnS28 и *R. tarasevichiae*, а также патогенные риккетсии группы КПЛ: *R. slovaca* и *R. sibirica* [5, 6, 15—18].

В данной работе приведены результаты выявления ДНК риккетсий в образцах от имаго клещей рода *Dermacentor* и таежных клещей *Ixodes persulcatus*, собранных на юге Западной Сибири (Новосибирская и Омская области), на Южном (Челябинская область) и Северном Урале (Свердловская область, территория заповедника «Денежкин камень»). Помимо этого, исследованы образцы крови и печени мелких млекопитающих, отловленных в Свердловской и Новосибирской областях и на Алтае. Результаты были получены с помощью метода двухраундовой ПЦР с использованием праймеров, соответствующих фрагментам генов цитратсинтазы (*gltA*) [4] и поверхностного белка *gOmpA*, а также метода определения нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР.

По данным С.Н. Шпынова [18], примерно в 50% образцов *D. reticulatus* и 43% *D. marginatus* в Новосибирской области выявлена ДНК *Rickettsia* sp. RpA4. По результатам настоящего исследования, ДНК *Rickettsia* sp. RpA4 выявлена в 42—52% образцов *D. reticulatus* в Омской и Новосибирской областях и в 3% *D. marginatus* — в Челябинской области (таблица).

R. tarasevichiae — недавно открытый вид риккетсий, который наиболее близок к патогенной *R. canadensis*. Ранее ДНК *R. tarasevichiae* была выявлена в

9,0—20,5% имаго *I. persulcatus*, собранных на территории Южного Урала и Сибири [17]. В данном исследовании методом двухраундовой ПЦР с использованием специфичных для *R. tarasevichiae* праймеров была выявлена ДНК *R. tarasevichiae* в 46—90% клещей

I. persulcatus, собранных в Свердловской, Челябинской и Новосибирской областях, а также по одному образцу от клещей *D. marginatus* и *D. reticulatus* из Челябинской и Новосибирской областей.

Детекция и идентификация риккетсий в клещах, в крови людей и мелких млекопитающих

Источник выделения	Место сбора (область)	Общее число проб	Число положительных проб				
			<i>R. tarasevichiae</i>	<i>R. helvetica</i>	<i>Rickettsia</i> sp.RpA4	<i>R. slovaca</i>	<i>R. sibirica</i>
<i>I. persulcatus</i>	Новосибирская	40	36	—	—	—	—
	Свердловская	35	16	—	—	—	—
	Челябинская	36	23	1	—	—	—
<i>D. marginatus</i>	Челябинская	30	1	—	1	1	—
<i>D. reticulatus</i>	Новосибирская	31	1	—	16	—	—
	Омская	24	—	—	10	—	—
Кровь мелких млекопитающих	Новосибирская	64	—	—	—	—	—
	Свердловская	104	3	—	—	—	1
	Алтай	28	1	—	—	—	—
Печень мелких млекопитающих	Свердловская	36	1	—	—	—	1
Кровь людей	Новосибирская	8	—	—	—	—	—
	Алтай	3	—	—	—	—	1

Кроме того, ДНК *R. tarasevichiae* выявлена в 3% образцов крови красных полевок *Clethrionomys rutilus*, отловленных в Свердловской области [4] и на Алтае, а также в 3% образцов печени *Cl. rutilus* из Свердловской области (таблица). Таким образом, авторами настоящей статьи впервые описаны случаи обнаружения ДНК *R. tarasevichiae* в клещах рода *Dermacentor* и образцах тканей мелких млекопитающих.

В образце от имаго *I. persulcatus* из Челябинской области была обнаружена ДНК *R. helvetica*. Этот возбудитель был выделен из тканей сердца двух молодых людей, которые умерли от внезапной сердечной недостаточности [2]. В настоящее время лишь предполагают, что *R. helvetica* связана с заболеваниями человека. *R. helvetica* была выявлена в клещах *Ixodes ricinus* во многих европейских странах [11]. Однако стало известно, что ее распространение не ограничивается территорией Европы. Так, риккетсии, идентичные и близкие к *R. helvetica*, были изолированы из клещей *I. ovatus*, *I. persulcatus* и *I. monospinosis* в Японии [8]. При сравнении полученной в настоящей работе нуклеотидной последовательности фрагмента гена *gltA* *R. helvetica* (DQ131912) с ранее известными оказалось, что найденная последовательность отличалась одной

нуклеотидной заменой от последовательности гена *gltA* (U59723) штамма C9P9, изолированного от *I. ricinus* (рисунок).

R. slovaca, недавно признанная патогенной для человека, вызывает заболевание TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy). Переносчиками данного возбудителя являются клещи *D. marginatus* и *D. reticulatus*. *R. slovaca* обнаружена в образцах от *D. marginatus* в европейской части России (Воронежская область, Ставропольский край) [6, 16]. Кроме того, описан случай изоляции риккетсий вида *R. slovaca* от клещей *D. marginatus* на Урале (Курганская область) [6]. ДНК этого патогена была обнаружена в ходе нашего исследования в 3% *D. marginatus*, собранных в Челябинской области (см. таблицу).

R. sibirica — этиологический агент клещевого риккетсиоза. Данное заболевание распространено преимущественно в азиатской части России. Высокие показатели заболеваемости клещевым риккетсиозом, (более 30 случаев на 100 тыс. населения) отмечены в Алтайском крае, республиках Алтай, Хакасия и Еврейской АО. Основным резервуаром и эпидемически значимыми переносчиками *R. sibirica* являются клещи родов *Dermacentor* (*D. nutallii*, *D. marginatus*, *D. silva-*

rum и *D. reticulatus*) и *Haemaphysalis* (*H. concinna*) [5]. Имеются данные об инфицированности *R. sibirica* клещей рода *Ixodes*, в частности *I. persulcatus*, в Новосибирской области и в Алтайском крае [5, 6]. На территории Сибири описаны очаги клещевого риккетсиоза

с высоким уровнем инфицированности клещей-переносчиков *R. sibirica*. Так, в 12% клещей *D. nutalli* на Алтае выявлена ДНК *R. sibirica* [15], а в Красноярском крае уровень зараженности этих же клещей возбудителем клещевого риккетсиоза составляет 5—17%. В настоящем исследовании не выявлена ДНК *R. sibirica* ни в одном из 196 проанализированных клещей, собранных в Новосибирской, Омской, Свердловской и Челябинской областях. Однако ДНК *R. sibirica* была обнаружена в одном образце крови *Cl. rutilus* и в одном образце печени обыкновенной бурозубки *Sorex araneus*, отловленных в Свердловской области на северной границе ареала распространения *I. persulcatus*.

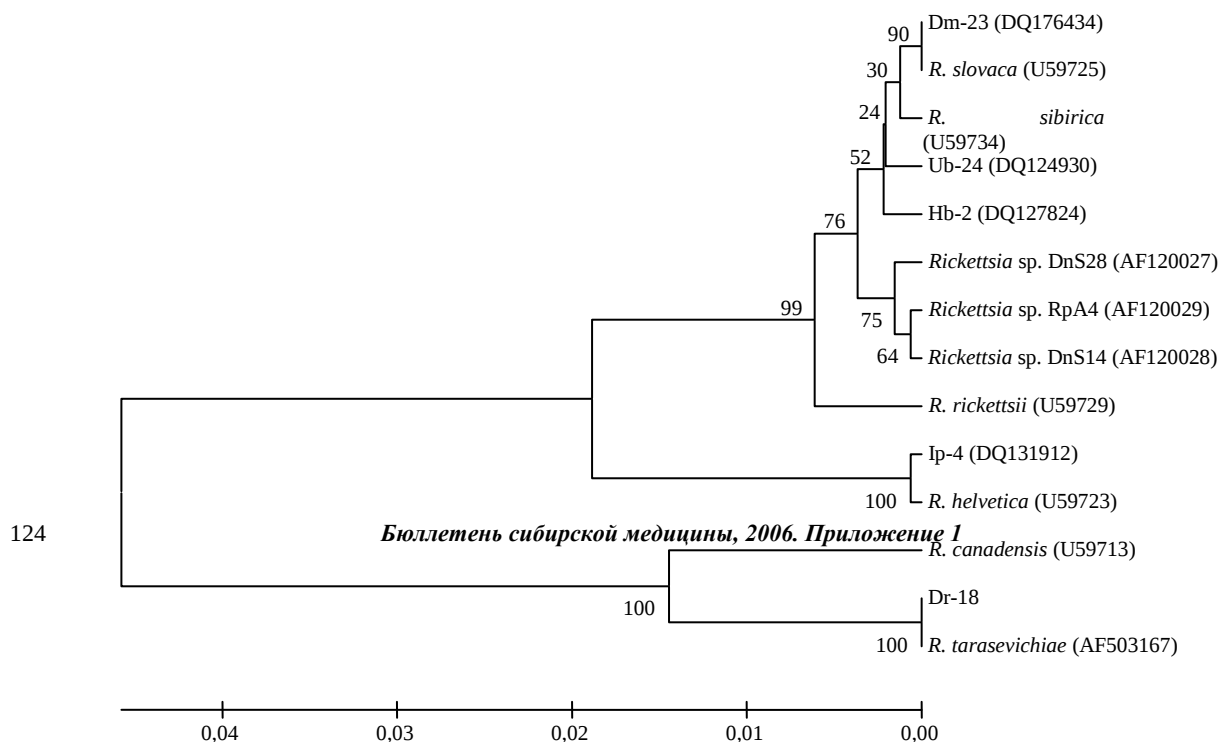
ДНК *R. sibirica* была обнаружена также в 1 из 11 исследованных образцов крови больных с характерной для клещевого риккетсиоза полиморфной сыпью, госпитализированных в ЦКБ СО РАН и МИКБ № 1 г. Новосибирска после укусов клещами. Троице из 11 пациентов (в том числе и больному, в крови которого детектирована ДНК *R. sibirica*) поставлен диагноз клещевого риккетсиоза, однако при проведении РСК с *R. sibirica* в качестве антигена были получены отрицательные результаты.

Следует отметить, что нуклеотидные последовательности фрагмента гена *gltA* (830 п.н.) *R. sibirica* из

крови человека (DQ127824) и *Cl. rutilus* (DQ124930) отличались между собой четырьмя нуклеотидными заменами, а от единственной определенной ранее последовательности (U59734) — двумя нуклеотидными заменами (см. рисунок). Причем одна замена в нуклеотидной последовательности *R. sibirica* фрагмента гена *gltA* из образца крови человека приводила к аминокислотной замене со сменой класса аминокислоты (Glu → Gly). Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *ompA* (530 п.н.) *R. sibirica* из крови человека полностью соответствовала определенной ранее последовательности (U83455).

Таким образом, в изучаемых районах Урала и юга Западной Сибири была выявлена высокая частота встречаемости риккетсий с неизвестной патогенностью *R. tarasevichiae* и *Rickettsia* sp. RpA4 в клещах *I. persulcatus* и *D. reticulatus*. ДНК патогенных риккетсий

R. helvetica и *R. slovaca* была выявлена в клещах *I. persulcatus* и *D. marginatus* соответственно. В крови людей, а также в крови и тканях мелких млекопитающих была обнаружена ДНК *R. sibirica*.



Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gltA* (817 п.н.) риккетсий, с использованием метода UPMGA. Для построения филогенетического дерева использовались нуклеотидные последовательности фрагмента гена *gltA* ДНК риккетсий, выделенных из клещей *Dermacentor marginatus* (Dm-23), *Dermacentor reticulatus* (Dr-18) и *Ixodes persulcatus* (Ip-4), а также из образцов

крови человека (Hb-2) и красной полевки *Clethrionomys rutilus* (Ub-24)

Несмотря на высокую частоту встречаемости *R. tarasevichiae* в клещах *I. persulcatus*, ДНК этого вида риккетсий была выявлена лишь в 3 из 168 образцов крови мелких млекопитающих из ареала распространения *I. persulcatus*, что может быть обусловлено низким уровнем риккетсиемии либо коротким временем циркуляции риккетсий в крови. Представляет особый интерес случай выявления в крови и печени мелких млекопитающих ДНК *R. sibirica*, так как основные переносчики этого патогенна — клещи рода *Dermacentor* — на Северном Урале не обитают.

Литература

1. Балашов Ю.С., Дайтер А.Б. Кровососущие членистоногие и риккетсии. Л.: Наука, 1973. 251 с.
2. Гратц Н.Г. Возникающие и возобновляющиеся трансмиссивные заболевания в Европе // Успехи соврем. биологии. 2005. Т. 125. № 1. С. 3—13.
3. Коренберг Э.И. Преадаптивное происхождение возбудителей природно-очаговых зоонозов // Успехи соврем. биологии. 2005. Т. 125. № 2. С. 131—139.
4. Ливанова Н.Н., Пар В.А., Ливанов С.Г., Иголкина Я.П. Разнообразие паразитарных систем с участием мелких млекопитающих и *Ixodes persulcatus* Shulze на Северном Урале // Сиб. экол. журн. 2005 Т. 10. № 5. С. 1079—1084.
5. Рудаков Н.В., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз. Омск: ОмГМА, 2001. 120 с.
6. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Самойленко И.Е. и др. Генетическая идентификация риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, изолированных в очагах клещевого риккетсиоза // Журн. микробиологии. 2004. № 5. С. 43—48.
7. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe // Clin. Microbiol. Infect. V. 10. № 12. P. 1108—1132.
8. Fournier P.E., Fujita H., Takada N., Raoult D. Genetic identification of *rickettsiae* isolated from ticks in Japan // J. Clin. Microbiol. 2002. V. 40. № 6. P. 2176—2181.
9. Katz B., Waites K. Emerging intracellular bacterial infections // Clin. Lab. Med. 2004. V. 24. № 3. P. 627—649.
10. Parola P., Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat // Clinical Infectious Diseases. 2001. V. 32. № 5. P. 897—928.
11. Parola P., Paddock C.D. and Raoult D. Tick-borne rickettsiosis around the world: emerging diseases challenging old concepts // Clin. Microbiol. Rev. 2005. V. 18. № 4. P. 719—756.
12. Parola P., Davoust B., Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses // Vet. Res. 2005. V. 36. № 3. P. 469—492.
13. Raoult D., Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases // Clin. Microbiol. Rev. 1997. V. 10. № 4. P. 694—719.
14. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoilenko I.E., Tankibaev M.A. Ecology and epidemiology of spotted fever group *Rickettsia* and new data from their study in Russia and Kazakhstan // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2003. V. 990. P. 12—24.
15. Rydkina E., Roux V., Fetisova N., Rudakov N. New *Rickettsiae* in ticks collected in territories of the Former Soviet Union // Emerging Infectious Diseases. 1999. V. 5. № 6. P. 811—814.
16. Shpynov S., Parola P., Rudakov N. et al. Detection and identification of spotted fever group *Rickettsiae* in *Dermacentor* ticks from Russia and Central Kazakhstan // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2001. V. 20. P. 903—905.
17. Shpynov S., Fournier P., Rudakov N., Raoult D. «Candidatus *Rickettsia tarasevichiae*» in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Russia // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2003. V. 990. P. 162—172.
18. Shpynov S., Fournier P., Rudakov N. et al. Detection of a *Rickettsia* closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, «*Rickettsia heilongjiangensis*», *Rickettsia* sp. strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. № 5. P. 2221—2223.
19. Walker D.H., Valbuena G.A., Olano J.P. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2003. V. 990. P. 1—11.

Поступила в редакцию 06.01.2006 г.