

5. Natural foci, epidemiology and prevention of tularemia. Olsufiev N.G., Dunayev T.N. Moscow: Medicine. 1970: 272 (in Russian).
6. Slonova R.A., Kushnareva T.V., Kompanets G.G. Current view on natural nidality of Hantavirus infection. Buletten' Sibirmkogo otdelenija Rossijskoj akademii medicinskih nauk [Bull. Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]. 2011; 31 (4): 13 – 19 (in Russian).
7. Slonova R.A., Kushnareva T.V., Maksema I.G., Kompanets G.G., Lunichina O.V. Contingency of the epidemic process of Hantavirus infection with activity of epizootic process in populations of mice of the genus Apodemus. J. Epidemiologija i infekcionnye bolezni. [Epidemiology and Infectious Diseases]. 2012; 3: 18 – 22 (in Russian).

Выявление генотипов *Rickettsia raoultii* в южном Казахстане

И.Е. Самойленко¹ (samoilenko.irinasamoilenko@yandex.ru), Л.В. Кумпан^{1,2},
Н.А. Околелова¹, Я.П. Иголкина³, А. Ю. Тикунов³, В.А. Рар³, Р.А. Егембердиева⁴, А.Н.
Коломеец¹, Т.А. Решетникова¹, Н.В. Рудаков^{1,2}

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, г. Омск

²ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет»

³«Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН,
г. Новосибирск

⁴Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова,
г. Алма-Ата, Казахстан

Резюме

Клещи *D. niveus* из Южного Казахстана были исследованы в культуре клеток с применением техники shell vial. Были получены изоляты *Rickettsia raoultii*, близкородственные к генотипам RpA4 и DnS14. Обсуждается возможность выявленных генотипов риккетсий вызывать заболеваемость клещевыми риккетсиозами населения Казахстана.

Key words: *Rickettsia*, клещи *Dermacentor niveus*, Республика Казахстан

Detection of *Rickettsia Raoultii* Genotypes in Southern Kazakhstan

I.E. Samoilenko¹ (samoilenko.irinasamoilenko@yandex.ru), L.V. Kumpan^{1, 2}, N.A. Okolelova¹, Y.P. Igolkina³, A.Yu. Tikunov³, V.A. Rar³, R.A. Egemberdieva⁴, A.N. Kolomeetz¹, T.A. Reshetnikova¹, N.V. Rudakov^{1,2}

¹Federal State Budgetary Institution of Science «Omsk Research Institute of Natural Focal Infections», Omsk, Russia

²State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Omsk State Medical University», Russia

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

⁴Kazakhstan National Medical University named after S.D. Asfendiyarov, Alma-Ata, Kazakhstan

Abstract

Previously it was established that different species of genus *Rickettsia* were detected in Kazakhstan. Nevertheless, rickettsial species spectrum of some regions of Kazakhstan has not been studied. *Dermacentor niveus* ticks from Southern Kazakhstan were investigated using cell cultures by shell vial technique. The first isolates close related to genotypes *Rickettsia raoultii* RpA4 and DnS14 were obtained. The role of these agents in tick-borne rickettsioses morbidity in Southern Kazakhstan is discussed.

Key words: *Rickettsia*, *Dermacentor niveus* ticks, Republic Kazakhstan

Введение

Заболеваемость клещевыми риккетсиозами (КР), или клещевым сыпным тифом регистрируют в ряде северных, восточных и южных регионов Республики Казахстан. Наиболее высокий уровень заболеваемости отмечается в Кызыл-Ординской, Северо-Казахстанской, Павлодарской и Восточно-Казахстанской областях, однако этиологический агент к настоящему времени не выделен и не идентифицирован [1, 2].

Патогенная *Rickettsia aeschlimanii* обнаружена в клещах *Haemaphysalis punctate* в Алма-Атинской области (юг Казахстана), где ранее регистрировалась

заболеваемость клещевыми риккетсиозами [3]. В Карагандинской области (Центральный Казахстан) в клещах *Dermacentor niveus* была генотипирована *Rickettsia raoultii* (генотипы RpA4 и DnS14), в клещах *Dermacentor marginatus* – *R. raoultii* генотипа RpA4 [4]. В Восточно-Казахстанской области в клещах *D. marginatus* также была выявлена *R. raoultii* генотипа RpA4 [5].

На территории Западно-Казахстанской области Республики Казахстан, расположенной на границе с Астраханской областью РФ и эндемичной по Астраханской пятнистой лихорадке, был выявлен этиологический агент этого риккетсиоза

Rickettsia conorii subsp. *caspiensis*, идентификация которого была проведена с помощью ПЦР и последующего секвенирования [6]. Антитела к *R. conorii* в реакции непрямой иммунофлюоресценции выявлены нами в Западном Казахстане у больных после присасывания иксодовых клещей [7].

Таким образом, к настоящему времени в южной части Казахстана (Алма-Атинская область) обнаружена патогенная *R. aeschlimanii*, в западной части Казахстана доказано присутствие *R. conorii*, в Центральном и Восточном Казахстане – генотипов *R. raoultii*. Не изучен спектр риккетсий на ряде эндемичных по КР территорий севера, востока и юга Казахстана.

Цель исследования – изоляция и идентификация штаммов риккетсий из клещей *D. niveus*, собранных в Южном Казахстане.

Материалы и методы

Имаго клещей были собраны с растительности на стандартную волокушу (флаг) по общепринятой методике в Кызыл – Ордынской области Казахстана, на территории которой отмечается высокий уровень заболеваемости КР. 25 экземпляров клещей *D. niveus* были исследованы на наличие риккетсий на культурах клеток Vero и Her-2 (технология shell vial).

Культуры клеток выращивали в пластиковых пробирках в концентрации 150 тыс. на 1 мл. В качестве питательной среды использовали Игла MEM с двойным набором аминокислот, к общему объему добавляли до 5% эмбриональной сыворотки телят. В подготовленные пробирки вносили суспензию, полученную из индивидуальных экземпляров клещей, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 минут. Пробирки с зараженными клетками культивировали в углекислотном термостате при температуре 37 °С в течение 8 суток. После завершения инкубации все пробирки подвергали замораживанию до –20 °С в низкотемпературном холодильнике, а потом оттаиванию для разрушения клеток и максимального выхода из них микроорганизмов. Наличие риккетсий в зараженных культурах клеток выявляли в реакции непрямой иммунофлюоресценции. Фрагменты гена цитратсинтазы (*gltA*) риккетсий выявляли с использованием ПЦР.

Идентификация полученных изолятов молекулярно-биологическими методами проводилась в однораундовой и двухраундовой ПЦР с последующим секвенированием полученных ампликонов.

Однораундовая ПЦР

Выделение ДНК выполняли с использованием «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Москва) согласно инструкции производителя; ПЦР осуществляли с использованием набора реагентов «АмплиСенс®PCR» (ЦНИИЭ, Москва) с праймерами, амплифицирующими фрагмент гена цитратсинтазы (*gltA*) RpCS.877p и RpSC.1258n [8]. Детекцию ПЦР-

продукта производили с помощью электрофореза. ПЦР-продукт очищали на колонках. Пять образцов изолятов риккетсий были подвергнуты дополнительной амплификации в двухраундовой ПЦР.

Двухраундовая ПЦР

Двухраундовую ПЦР выполняли с использованием следующих праймеров. Для амплификации гена *gltA* в первом раунде использовали праймеры *glt1* и *glt2*, во втором раунде – *glt3* и *glt4*. Для амплификации гена 16S rRNA в первом раунде использовали праймеры 16S1 и 16S2, во втором – 16S3 и 16S4. Фрагмент риккетсиального гена *ompB* был амплифицирован с использованием праймеров B1 и B2 для первого раунда, и B3 и B4 для второго раунда ПЦР. Фрагмент риккетсиального гена *sca4* был амплифицирован с использованием праймеров sc4-1 и Rj 2837r для первого раунда, и sc4-3 и sc4-4 для второго раунда ПЦР. Фрагмент гена *ompA* был амплифицирован при помощи semi nested ПЦР с использованием праймеров A1 и A2 для первого раунда, и A2 и A3 для второго раунда ПЦР [9].

Секвенирование ПЦР продуктов

ПЦР продукты очищали с использованием колонок GFX Columns (Amersham Biosciences, United States), их нуклеотидные последовательности определяли с использованием генетического анализатора AB3500 xL (Life Technologies, США) и ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, United States), затем анализировали при помощи BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) и CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) программ. Уровень гомологии последовательностей определяли с использованием GenBank в соответствии с рекомендуемыми критериями оценки [10].

Результаты и обсуждение

При исследовании клещей с использованием двух линий культур клеток, наличие риккетсиоподобных микроорганизмов было выявлено в РНИФ в изолятах из 19 клещей *D. niveus*. Среднее накопление риккетсий составило до 10 микробных тел в поле зрения. Риккетсиоподобные микроорганизмы были обнаружены в культуре клеток Her-2 в 12 образцах, в культуре клеток Vero – в 17 образцах, в двух культурах клеток одновременно – в 10 образцах.

ДНК риккетсий в ПЦР с праймерами, амплифицирующими фрагменты гена *gltA* выявлена в изолятах из 18 клещей *D. niveus*. Для идентификации полученные фрагменты гена *gltA* (604 bp) *Rickettsia* spp. были секвенированы. Все секвенсы гена *gltA* были идентичны секвенсам гена *gltA* *R. raoultii*. Три риккетсиальных изолята (№№ 7, 11 и 14) были идентичны *R. raoultii* генотип RpA4 (номер доступа в GenBank – KM288494) и два (№ 13, 24) – были идентичны *R. raoultii* генотип DnS14 (GenBank – DQ365804).

Дополнительно фрагменты генов 16S rRNA, *ompA*, *ompB* и *sca4* (655, 485, 755 и 714 п.о. со-

ответственно) были секвенированы для двух изолятов (№ 11 и 24). Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S rRNA, *ompA*, *ompB* и *sca4* были гомологичны (99,8 – 100%) соответствующим последовательностям *R. raoultii* (GenBank: KJ 410261, KM 288513, JX 683120 и DQ 365807).

Выводы

1. Несмотря на многочисленные данные о широком распространении *R. raoultii* в Евразии, штаммы риккетсий этого вида из клещей *D. niveus* в Южном Казахстане изолированы и идентифицированы впервые. Изолированные в этом регионе Республики Казахстан штаммы *R. raoultii* наиболее близки к ранее описанным

генотипам *R. raoultii* RpA4 и DnS14, имея некоторые отличия по фрагментам генов 16S rRNA, *ompA*, *ompB* и *sca4*.

2. Учитывая, что данный вид риккетсий считается ответственным за часть случаев синдрома TIBOLA преимущественно в Европе и не вызывает классическую клинику СКТ [11], а штаммы других видов риккетсий не изолированы, требуется дальнейшее изучение этиологии заболеваний клещевыми риккетсиозами в Северном, Восточном и Южном Казахстане.

Работа частично поддержана Минобрнауки, проект VI.55.1.1 (Анализ риккетсий в изолятах, полученных на культурах клеток).

Литература

1. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Оберт А.С. Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в России. Омск. Омский научный вестник. 2011; 232.
2. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Егембердыева Р.А., Самойленко И.Е., Кумпан Л.В. Молекулярная эпидемиология риккетсий и риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России и Казахстане. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2014; 25: 28 – 30.
3. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Танкибаев М.А., Fournier P.-E., Raoult D. Новые данные о распространении риккетсий RpA4 и *R. aeschlimannii* в Северной Азии. Бюллетень ВЧНЦ СО РАМН; 2002; 2 (4): 136 – 138.
4. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tankibaev M., Tarasevich I., Raoult D. 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; 42 (5): 2221 – 2223.
5. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Fournier P.-E., Raoult D. Молекулярное типирование риккетсий, анаплазм и эрлихий в иксодовых клещах в Российской Федерации и Республике Казахстан. Здоровье населения и среда обитания. 2012; 1: 33 – 35.
6. Смирнова С.Е., Карань Л.С., Платонов А.Е., Танитовский В.А., Белоножкина Л.Б., Бидашко Ф.Г. и др. Циркуляция вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в районах северной границы ареала этой инфекции на территории Республики Казахстан. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009; 5: 42 – 47.
7. Самойленко И.Е., Рудаков Н.В., Решетникова Т.А., Егембердыева Р.А., Шаламова Е.В., Штрек С.В. и др. Результаты выявления антител к риккетсиям в сыворотках крови пациентов в Омской области и Западно-Казахстанской области Республики Казахстан. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2015; 1: 36 – 38.
8. Wood D.O., Williamson L.R., Winkler H.H., Krause D.C. Nucleotide sequence of the *Rickettsia prowazekii* citrate synthase gene. J. Bacteriol. 1987; 169: 3564 – 3572.
9. Igolkina Y.P., Rar V.A., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Tikunov A.Yu. et al. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia: identification of a new *Candidatus Rickettsia* species. Infect. Genet. Evol. 2015; 34: 88 – 93.
10. Fournier P.-E., Dumler J.S., Greub G., Zhang J., Wu Y., Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 5456 – 5465.
11. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Рудакова С.А., Кумпан Л.В., Белан Ю.Б., Решетникова Т.А. и др. О роли *Rickettsia raoultii* в эпидемиологии клещевых риккетсиозов в России. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2015; 3: 17 – 21.

References

1. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoylenko I.E., Obert A.S. Rickettsiae and rickettsioses of spotted fever group in Russia. Omskij nauchny vestnik. [Omsk Scientific Bulletin]. 2011; 232 (in Russian).
2. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Egemberdyeva R.A., Samoylenko I.E., Kumpan L.V. Molecular epidemiology of rickettsiae and rickettsial diseases of spotted fever group in Russia and Kazakhstan. Far East Journal of infectious diseases. 2014; 25: 28 – 30 (in Russian).
3. Shpynov S., Rudakov N., Tankibaev M., Fournier P.-E., Raoult D. A new data on the distribution of *Rickettsia* RpA 4 and *R. aeschlimann* in North Asia. Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra Sibirskogo otdelenija Rossijskoj akademii medicinskih nauk. [Bulletin' East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]. 2002; 2 (4): 136 – 138 (in Russian).
4. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tankibaev M., Tarasevich I., Raoult D. 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. 42 (5): 2221 – 2223.
5. Shpynov S., Rudakov N., Fournier P.-E., Raoult D. Molecular typing of *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* spp. in ticks in the Russian Federation and the Republic Kazakhstan. Zdorov'e naselenija i sreda obitanija. [Public Health and Environment]. 2012; 1: 33 – 35 (in Russian).
6. Smirnov S.E., Karan L.S., Platonov A.E., Tanitovskiy V.A., Belonozhkina L.B., Bidashko F.G. et al. Circulation of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in areas of the northern boundary of the area of the infection in the Republic of Kazakhstan. J. Epidemiology and Infectious Diseases]. 2009; 5: 42 – 47 (in Russian).
7. Samoylenko I.E., Rudakov N., Reshetnikova T.A., Egemberdyeva R.A., Shalamova E.V., Shtrek S.V., Kumpan L.V. Results of detection antibodies against Rickettsiae in the blood sera of patients at the Omsk region of Russia and West-Kazakhstan region of the Republic Kazakhstan. J. Epidemiology and Vaccinal Prevention] 2015; 1: 36 – 38 (in Russian).
8. Wood D.O., Williamson L.R., Winkler H.H., Krause D.C. Nucleotide sequence of the *Rickettsia prowazekii* citrate synthase gene. J. Bacteriol. 1987. 169: 3564 – 3572.
9. Igolkina Y.P., Rar V.A., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Tikunov A.Yu. et al. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia: identification of a new *Candidatus Rickettsia* species. Infect. Genet. Evol. 2015; 34: 88 – 93.
10. Fournier P.-E., Dumler J.S., Greub G., Zhang J., Wu Y., Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 5456 – 5465.
11. Rudakov N., Samoylenko I.E., Rudakova S., Kumpan L.V., Belan Yu.B., Reshetnikova T.A. et al. On the role of *Rickettsia raoultii* in the epidemiology of rickettsioses in Russia. Medicinskaja parazitologija i parazitarnye bolezni. [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]. 2015; 3: 17 – 21 (in Russian).