

Выявление ДНК возбудителей клещевого риккетсиоза в клещах на территории Иркутской области

Н.В. Яковчиц¹ (nyakovchits@gmail.com), Е.И. Бондаренко² (ebondarenko@ngs.ru), Р.В. Адельшин¹, О.В. Мельникова¹, Е.А. Вершинин¹, И.М. Морозов¹, С.А. Борисов¹, Е.И. Андаев¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

²ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск

Резюме

С помощью тест-систем ПЦР-РВ исследовано индивидуально 470 экз. клещей *Dermacentor nuttalli* и 46 *Haemaphysalis concinna*, собранных на территории Иркутской области. Зараженность риккетсиями *D. nuttalli* составила 82,3%, в том числе у 1,3% выявлена ДНК *Rickettsia sibirica*. Зараженность клещей *H. concinna* риккетсиями составила 8,7%, в 6,5% случаев обнаруженная ДНК принадлежала *R. heilongjiangensis*. Результаты ПЦР были подтверждены филогенетическим анализом нуклеотидных последовательности фрагментов трех генов: цитратсинтазы (*gltA*) и поверхностных белков *ompA* и *ompB*.

Таким образом, установлена циркуляция на обследованной территории двух видов риккетсий, патогенных для человека.

Ключевые слова: клещи; риккетсии; риккетсиозы; ПЦР.

Detection of Rickettsial DNA in Ticks in Irkutsk Region

N.Yakovchits¹ (ebondarenko@ngs.ru), E. Bondarenko² (ebondarenko@ngs.ru), R. Adelshin¹, O. Melnikova¹, E. Vershinin¹, I. Morozov¹, S. Borisov¹, E. Andaev¹

¹Anti-Plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

²Company «Vektor-Best», Novosibirsk

Abstract

Individually 470 *Dermacentor nuttalli* and 46 *Haemaphysalis concinna* ticks collected in Irkutsk Region were analyzed using RT-PCR test systems. *Rickettsia* contamination of *D. nuttalli* was 82,3% including 1,3% of the ticks with *R. sibirica* DNA. *H. concinna* ticks were infected by rickettsia to 8,7% and the detected DNA in 6,5% of cases belonged to *R. heilongjiangensis*. PCR results were confirmed by phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of three gene fragments: citrate synthase (*gltA*) and *ompA* and *ompB* surface proteins.

Thus, circulation of two *Rickettsia* species pathogenic to humans was determined at the examined area.

Key words: a tick, *Rickettsia*, rickettsiosis, PCR

Введение

В Российской Федерации официально регистрируется заболеваемость риккетсиозами, обусловленная циркуляцией патогенных представителей рода *Rickettsia*: клещевой риккетсиоз (КР), или сибирский клещевой тиф (СКТ), вызываемый *Rickettsia sibirica*, основной переносчик которой – клещи рода *Dermacentor*, и астраханская пятнистая лихорадка с этиологическим агентом *R. conorii*; главный природный резервуар и переносчик – клещ *Rhipicephalus pumilio* [1]. Кроме того, есть данные о находках патогенных *R. helvetica*, *R. slovaca*, *R. aeschlimannii* [2].

На ряде территорий Алтайского, Красноярского, Хабаровского и Приморского краев в клещах *Haemaphysalis concinna* и *Dermacentor nuttalli* выявлена *R. heilongjiangensis*, вызывающая у людей заболевания, сходные по симптоматике с СКТ

[3 – 5]. Ранее считалось, что *R. heilongjiangensis* распространена на территории Хабаровского и Приморского краев [6], однако те же авторы со ссылкой на неопубликованные данные показывают, что ДНК этой риккетсии обнаружена ими в клещах *H. concinna*, собранных в Сибири. Первый клинический случай КР, вызванного этим возбудителем, подтвержден в 2014 году у пациента в Алтайском крае [7].

На территории Иркутской области в клещах *Ixodes persulcatus* обнаружена *R. tarasevichiae*, в клещах *D. nuttalli* и *D. silvarum* – *R. raoultii* и *R. sibirica* [8]. В последнее время появились сведения о находке в *H. concinna* патогенной *R. heilongjiangensis* [9].

Цель исследования – оценка зараженности клещей на территории Иркутской области патогенными риккетсиями и исследование генетического разнообразия этих возбудителей.

Материалы и методы

Имаго клещей собирали в апреле–мае 2014 года на флаг и идентифицировали по морфологическим признакам [10]. Всего собрано 516 экз. клещей двух видов: *D. nuttalli* (470), *H. concinna* (46). После отлова клещей хранили в замороженном состоянии при температуре минус 70 °С, затем исследовали индивидуально. При подготовке к анализу их последовательно отмывали в 70% этиловом спирте, физиологическом растворе pH 7,4 с добавлением пенициллина, затем в стерильном физиологическом растворе. Гомогенизацию осуществляли с помощью шаровой мельницы TissueLyser LT (Qiagen, США) при частоте 50 Гц с добавлением 500 мкл раствора для подготовки образцов (производства ЗАО «Вектор-Бест»). Для выделения ДНК из полученных суспензий использовали наборы «РеалБест экстракция 100» (производства ЗАО «Вектор-Бест» г. Новосибирск).

Для проведения ПЦР-анализа применяли лабораторные версии трех наборов для ПЦР-РВ (производства ЗАО «Вектор-Бест»). В тесте для обнаружения ДНК представителей рода *Rickettsia* используется детекция участка гена цитратсинтазы (*gltA*). В двух других наборах, предназначенных для дифференциации ДНК патогенных для человека риккетсий – *R. sibirica* и *R. heilongjiangensis*, в качестве мишени использовали участки гена *ompA*. Все указанные тест-системы успешно апробированы ранее [11]. Амплификацию участков ДНК при постановке ПЦР-РВ проводили на термоциклере с флуоресцентной детекцией CFX96 (BioRad, США).

На первом этапе проводили скрининговое исследование образцов на наличие в них ДНК *Rickettsia spp.* На втором этапе клещей *D. nuttalli*, в которых была обнаружена ДНК риккетсий, исследовали с помощью тест-системы для выявления ДНК *R. sibirica*, а клещей *H. concinna* – с помощью тест-системы для выявления ДНК *R. heilongjiangensis*.

Пробы, в которых была выявлена ДНК патогенных риккетсий, отбирали для секвенирования по участкам трех генов: *gltA* и поверхностных белков *ompA* и *ompB*.

Для амплификации участка гена, кодирующего цитратсинтазу, использовали праймеры CS535d GCAATGTCTTATAAATATTC и CS890r GCTTTAGCTACATATTTAGG [12], гена поверхностного белка *ompA* – Rr190.70p ATGGCGAATATTTCTCCAAAA и 190-701r GTTCCGTTAATGGCAGCATCT [13], гена поверхностного белка *ompB* – 120-2113 CGATGCTAACGTAGGTTCTT и 120-2988 CCGGCTATACCGCCTGTAGT [14].

Секвенирование проводили с теми же праймерами и набором BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 1.1. (Applied Biosystems) на генетическом анализаторе ABI Genetic Analyzer 3500 xL. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали

при помощи программ Vector NTI v. 9.0, BioEdit v. 7.1.5.0. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 5 [15].

Результаты и обсуждение

Для выбора районов обследования нами был проведен анализ заболеваемости КР по административным территориям. Согласно данным К.А. Аитова и соавт. [16], среднемноголетний показатель заболеваемости (1994 – 2008 гг.) в районах, входящих в состав Усть-Ордынского Бурятского округа (УОБО), на 100 тыс. населения составил 34,0, в то время как на остальных территориях Иркутской области – 3,2.

Мы проанализировали данные по заболеваемости КР в Иркутской области с 2009 по 2013 год. Установлено, что из 360 больных, зарегистрированных в 19 районах, 140 (38,9%) приходится на три района, входящих в состав УОБО: Боханский (25), Баяндаевский (31) и Эхирит-Булагатский (84), где проживает 2,4% населения области. Среднемноголетняя заболеваемость за пять лет в УОБО составила 21,9 на 100 тыс. населения, в то время как на остальной территории области – 1,8.

Исходя из этого, мы предположили, что наиболее вероятным местом обнаружения патогенных риккетсий является Эхирит-Булагатский район. Для сравнения уровней зараженности переносчиков были выбраны граничащий с ним Ольхонский район и удаленные Заларинский и Слюдянский районы.

Всего исследовано 470 экз. клещей *D. nuttalli*, собранных в лесостепных ландшафтных зонах четырех районов Иркутской области, и 46 – *H. concinna*, отловленных на территории Эхирит-Булагатского района. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Общая зараженность клещей *D. nuttalli* варьируется от 63,2 до 91,6%, что сопоставимо с данными литературы [8].

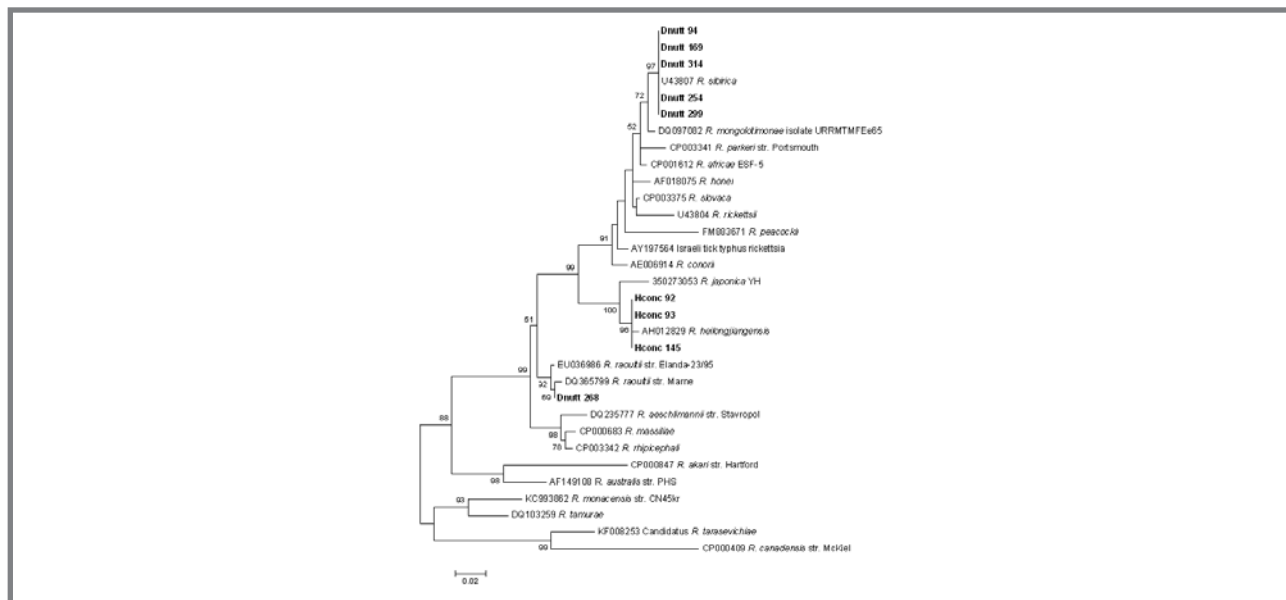
Уровень зараженности клещей *H. concinna* отличается от результатов исследования Я.Е. Григорьевой с соавт. [9], которые выявили в 2009 году среди 49 клещей этого вида, собранных на территории Иркутской области, 22% содержащих ДНК *R. heilongjiangensis*. Возможно, это связано с отловом клещей в разных районах и в разное время. При сравнении с уровнем зараженности клещей *H. concinna* в Амурской области, составившим в 2011 году 25% [11], выявленная нами зараженность *R. heilongjiangensis* на территории Иркутской области также невелика.

При верификации результатов ПЦР с помощью филогенетического анализа результаты конструирования древа по фрагменту гена цитратсинтазы оказались недостаточными для определения видовой принадлежности, так как малая варибельность этого участка привела к объединению в один кластер нуклеотидных последовательностей, принадлежащих разным видам риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки.

Таблица 1.
Результаты ПЦР-анализа клещей на наличие ДНК риккетсий

Район	Количество исследованных клещей	Количество клещей, содержащих ДНК <i>Rickettsia</i> spp. абс. (%±m)	Количество клещей, содержащих ДНК <i>R. sibirica</i> ; <i>R. heilongjiangensis</i> абс. (% ± m)
Заларинский	64 <i>D. nuttalli</i>	43 (67,2 ± 5,9%)	0
Слюдянский	36 <i>D. nuttalli</i>	33 (91,6 ± 4,6%)	0
Ольхонский	77 <i>D. nuttalli</i>	49 (63,6 ± 5,5%)	0
Эхирит-Булагатский	293 <i>D. nuttalli</i>	262 (89,4 ± 1,8%)	6 (2 ± 0,8%) <i>R. sibirica</i>
	46 <i>H. concinna</i>	4 (8,7 ± 4,2%)	3 (6,5 ± 3,6%) <i>R. heilongjiangensis</i>

Рисунок 1.
Филогенетическое древо, построенное по результатам секвенирования фрагмента гена *ompA* (415 п.н.). Жирным шрифтом выделены изученные последовательности. Показана бутстреп-поддержка > 50%



Более информативным оказалось определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена *ompA* (рис. 1).

По результатам филогенетического анализа установлено, что обнаруженная в клещах *H. concinna* ДНК риккетсий принадлежит *R. heilongjiangensis* и объединяется в один кластер с последовательностью AN012829 из базы данных GeneBank.

Пять образцов ДНК из клещей *D. nuttalli*, по результатам ПЦР отнесенных к *R. sibirica*, также образуют единый кластер с последовательностью U43807 из GeneBank, а образец Dnutt268 оказался в одной группе с нуклеотидными последовательностями гена *ompA* *R. raoultii*.

Определение нуклеотидной последовательности и филогенетический анализ фрагмента гена поверхностного белка *ompB* дали аналогичный результат (рис. 2).

Все образцы, за исключением Dnutt268, отнесенные по результатам ПЦР к *R. sibirica*, объединились в одну группу с *R. sibirica* и близкородственным с ней видом *R. mongolotimoniae*, который ра-

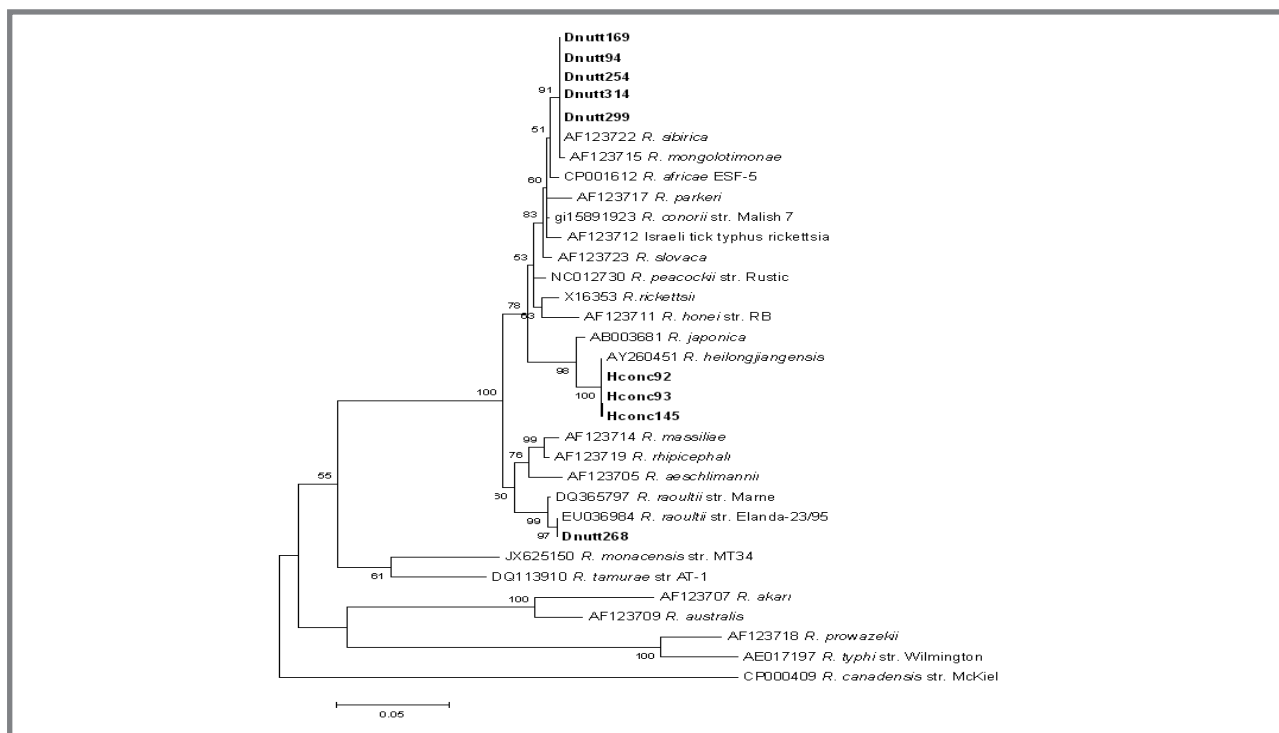
нее считался подвидом *R. sibirica*. ДНК риккетсий, обнаруженная в клещах *H. concinna*, отнесена к *R. heilongjiangensis*.

По результатам секвенирования образец Dnutt268 был отнесен к *R. raoultii*, в то время как с помощью ПЦР-РВ в нем была обнаружена ДНК *R. sibirica*. В ходе исследования с помощью тест-системы для выявления ДНК представителей рода *Rickettsia* указанный образец не отличался по значению порогового цикла (Ct) от остальных. При проведении ПЦР с тест-системой для выявления ДНК *R. sibirica*, Ct у этого образца составил 33, тогда как у остальных пяти образцов, содержащих ДНК *R. sibirica*, его значение лежит в пределах 21 – 24. Значение порогового цикла внутреннего контроля обеих тест-систем составляет 31 – 34, что говорит о нормальном протекании реакции.

При сопоставлении полученных электрофоретических с нуклеотидными последовательностями генов *ompA* и *ompB*, взятыми из базы данных GeneBank, оказалось, что сиквенс образца Dnutt268 был гетерогенным. В переменных сайтах преобладал сигнал,

Рисунок 2.

Филогенетическое древо, построенное по результатам секвенирования фрагмента гена *ompB* (718 п.н.) (Жирным шрифтом выделены изученные последовательности. Показана бутстреп-поддержка > 50%.)



соответствующий нуклеотидам последовательности *R. raoultii*, однако в этих же сайтах значителен был сигнал, соответствующий нуклеотидам *R. sibirica*.

Можно предположить, что в данном образце в разных количествах содержится ДНК двух видов риккетсий. По этой причине величина *Ct*, полученная при использовании тест-системы для выявления ДНК представителей рода *Rickettsia*, идентична остальным, но так как содержание ДНК *R. raoultii* больше, чем ДНК *R. sibirica*, при проведении ПЦР с праймерами, фланкирующими участки генов *ompA* и *ompB*, преимущественно нарабатывался продукт, принадлежащий *R. raoultii*, в то время как тест-система по выявлению ДНК *R. sibirica*, в силу высокой чувствительности, позволяет обнаружить малое количество генетического материала этого патогена.

Выводы

1. Показано, что на территории Усть-Ордынского Бурятского округа Иркутской области, где регистрируется наибольшая заболеваемость клещевым риккетсиозом, циркулируют два вида патогенных для человека риккетсий – *R. sibirica* и *R. heilongjiangensis*, переносчиками которых являются иксодовые клещи *D. nuttalli* и *H. concinna*. Наши результаты подтверждают данные, полученные ранее [8, 9].
2. Тест-системы ПЦР-РВ для выявления *R. sibirica* и *R. heilongjiangensis* позволяют обнаруживать ДНК указанных риккетсий, что подтверждено секвенированием фрагментов генов *ompA* и *ompB*.

Литература

1. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Егембердыева Р.А., Самойленко И.Е., Купман Л.В. Молекулярная эпидемиология риккетсий и риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России и Казахстане. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2014; 25: 28 – 30.
2. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Купман Л.В., Решетникова Т.А., Абрамова Н.В. Микроорганизмы порядка *Rickettsiales* и вызываемые ими заболевания в России. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2010; 17: 155 – 159.
3. Shpyunov S., Fournier P.-E., Rudakov N., Tankibaev M., Tarasevich I., Raoult D. Detection of a *Rickettsia* closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia* spp. Strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan. J. Clin. Microbiol. 2004; 5: 2221 – 2223.
4. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Ястребов В.К., Самойленко И.И., Купман Л.В., Решетникова Т.А., и др. Современное состояние проблемы клещевых риккетсиозов в России и новые подходы к классификации болезней, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2012; 5 (87): 109 – 113.
5. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Fournier P.-E., Raoult D. Молекулярное типирование риккетсий, анаплазм и эрлийи в иксодовых клещах в Российской Федерации и Республике Казахстан. Здоровье населения и среда обитания. 2012; 1 (226): 33 – 35.
6. Mediannikov O., Sidelnikov Yu., Ivanov L., Mokretsova E., Fournier P.-E., Tarasevich I. et al. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. Emerg. Infect. Dis. 2004; 5: 810 – 817.
7. Гранитов В.М., Арсеньева И.В., Бесхлебцова О.В., Дедков В.Г., Карань Л.С., Васильева О.А. и др. Первый клинический случай клещевого риккетсиоза, вызванного *Rickettsia heilongjiangensis*, на территории Сибири. Инфекционные болезни. 2014; т. 25 (3): 91 – 94.
8. Шулунов С.С., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Козлова И.В., Адельшин Р.В., Беликов С.И. Разнообразие риккетсий в иксодовых клещах на территории Прибайкалья. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2007; 1 (53): 83 – 85.
9. Григорьева Я.Е., Карань Л.С., Рудакова С.А., Федорова М.В., Журенкова О.Б. Разработка набора реагентов для дифференциальной детекции патогенных риккетсий методом РВ-ПЦР. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014». Москва, 2014; т. 1; 518 – 519.
10. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. *Ixodinae*. В кн.: Фауна СССР. Паукообразные. Ленинград: Изд-во АН СССР, 1977; т. 4: 396.
11. Бондаренко Е.И., Мокрецова Е.В., Здановская Н.И., Высочина Н.П., Пуховская Н.М., Тимофеев Д.И. и др. Выявление возбудителей клещевого риккетсиоза в клещах и крови пациентов на Дальнем Востоке с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени. Поликлиника. 2014; 5: 44 – 48.