

Кумпан Л.В.^{1,2}, Самойленко И.Е.², Решетникова Т.А.², Шпынов С.Н.^{1,2}, Рудаков Н.В.^{1,2}

Особенности культивирования нового генотипа *Candidatus Rickettsia tarasevichae* на биологических моделях (культуры клеток, морские свинки)

1-ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Омск;
2-ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций». Роспотребнадзора, г. Омск

Kumpan L. V., Samoylenko I. E., Reshetnikova T. A., Shpynov S. N., Rudakov N. V.

Features of the cultivation of a new genotype of *Candidatus Rickettsia tarasevichae* in biological models (cell culture, guinea pigs)

Резюме

В работе представлены результаты изучения некоторых фенотипических свойств (культивирование на биологических моделях) нового генотипа *Candidatus Rickettsia tarasevichae*. Эксперимент был проведен на эукариотической культуре клеток Vero и морских свинках. Используя культуру клеток, впервые в мире удалось изолировать штаммы *Candidatus Rickettsia tarasevichae*. На морских свинках была воспроизведена доброкачественная экспериментальная инфекция с преимущественным поражением сосудов головного мозга.

Ключевые слова: *Candidatus Rickettsia tarasevichae*, экспериментальная инфекция, культура клеток Vero, морские свинки

Summary

This paper presents the results of a study of some phenotypic properties (cultivation in biological models) of a new genotype *Candidatus Rickettsia tarasevichae*. The experiment was carried out in the eukaryotic cell culture Vero and guinea pigs. For the first time strains of *Candidatus Rickettsia tarasevichae* were isolated using cell culture. The benign experimental infection (with a primary lesion of cerebral vessels) was reproduced in guinea pigs.

Key words: *Candidatus Rickettsia tarasevichae*, experimental infection, cell culture Vero, guinea pigs

Введение

В последние годы отмечается увеличение числа новых генотипов риккетсий, что связано с совершенствованием методов их идентификации. В 2003 году описан новый генотип риккетсий - *Candidatus Rickettsia tarasevichae*, названный в честь академика Ирины Владимировны Тарасевич (1). Определена высокая инфицированность клещей *I. persulcatus* этим микроорганизмом на ряде территорий России. По действующим критериям таксономии риккетсий (2), данный генотип принадлежит к предковой группе и не может быть отнесен ни к одному из известных видов рода *Rickettsia*. Фенотипические свойства *Candidatus Rickettsia tarasevichae* в настоящее время полностью не изучены.

Для прохождения процедуры описания нового вида риккетсий необходимо изолировать оригинальный микроорганизм, изучить его фенотипические признаки и генотипические характеристики, и в завершение, описание нового вида должно быть опубликовано предпочтительно в *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* или в *Int J Syst Bacteriol* (3). Риккетсии с неизученными фенотипическими и генотипическими характеристиками классифицируются как *Candidatus «Rickettsia sp.»*.

Цель исследования – описание некоторых фенотипических свойств нового генотипа *Candidatus Rickettsia tarasevichae* (особенности культивирования на биологических моделях: культуры клеток, морские свинки).

Материалы и методы

В работе использован комплекс риккетсиологических, серологических, генетических методов.

Сбор иксодовых клещей проводили на стандартную волокушу. Сбор клещей проводился в зоне лесостепи в Омской, Новосибирской областях и горно-таежной зоне Красноярского края. Всего было проведено изучение 79 индивидуальных экземпляров клещей, полученных из трех регионов России:

1. Омская область, с. Подгородка – 58 экземпляров.
2. Новосибирская область, с. Усть – Тарка – 10 экземпляров.
3. Красноярский край, заповедник «Столбы» – 11 экземпляров.

В 2003 году в окрестности села Подгородка Омской области было собрано 58 клещей рода *I. persulcatus*. На первом этапе проведения эксперимента все 58 экзем-

плярных иксодовых клещей были предварительно исследованы с использованием стандартного гемоцитового теста (взятие гемолимфы из ампутированной конечности (4) и исследование полученных мазков в РНИФ).

В это же время в 2003 году из Красноярска были получены 11 иксодовых клещей, все эти экземпляры были взяты для исследования в культуре клеток Vero, минуя гемоцитовый тест.

В конце эпидемического сезона 2003 года из Новосибирской области (с. Усть-Тарка) поступили 40 иксодовых клещей, которые были исследованы с использованием стандартного гемоцитового теста, 18 экземпляров были отобраны для культивирования на культурах клеток Vero.

Нами изучена возможность использования культуры клеток в качестве модели для изучения риккетсии новых генотипов. Для этой цели были использованы перевиваемые культуры клеток Vero. Культуры клеток Vero подвергались версенизации по стандартной методике. Культуры клеток Vero выращивали в культуральных флаконах в концентрации 150 тысяч на 1 мл. В качестве питательной среды использовали средку Игла МЕМ с двойным набором аминокислот, к общему объему добавляли до 10% эмбриональной сыворотки телят (5,6). Подготовленные матрасы заражали суспензией, полученной из клещей. В зараженные матрасы добавляли среду поддержания (Игла МЕМ без добавления эмбриональной сыворотки). Культуральные флаконы с зараженными клетками культивировали в углекислотном термостате при температуре 35,6 °C в течение 8-16 суток. После завершения инкубации все культуральные флаконы подвергались замораживанию в низкотемпературном холодильнике на -20°C, а потом оттаиванию, для разрушения клеток и максимального выхода из них микроорганизмов. После оттаивания, материал центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, супернатант в объеме 0,5 мл брали на следующий пассаж, а из 0,2 мл делали мазки, остатки супернатанта хранили в криобирках в низкотемпературном холодильнике.

Полученные образцы исследовали методом флуоресцирующих антител по стандартной методике, используя иммуноглобулины диагностические для выявления риккетсий группы КПЛ, антитела люминесцирующие сухие (НПО «Биомед»). Изучение морфологических и тинкториальных свойств риккетсий, проводили в соответствии с рекомендациями П.Ф. Здровского (7).

Идентификация выделенных штаммов проведена на базе Средиземноморского университета (г. Марсель, Франция). Однораундовую ПЦР проводили с применением родоспецифических праймеров с последующим секвенированием положительных образцов ДНК (1).

Воспроизведение экспериментальной инфекции проводили в биопробах на морских свинках-самцах весом 300-350 гр. путем внутрибрюшинного введения 2,0 мл 10-20% суспензии лиофилизированных штаммов, полученных на культурах клеток. В работе использованы штаммы «Усть-Тарка – 10/2003», «Усть-Тарка – 34/2003», «Подгородка-22/2003», «Подгородка-27/2003». Каждым

штаммом было заражено по три морских свинки.

Результаты и обсуждение

На первом этапе проведения эксперимента, из 58 экземпляров клещей, собранных в окрестности села Подгородка Омской области, в 37 экземплярах клещей, исследованных с использованием стандартного гемоцитового теста в РНИФ были обнаружены риккетсиоподобные микроорганизмы. Для изучения возможности культивирования микроорганизмов в культуре клеток Vero нами были взяты все 58 экземпляров иксодовых клещей.

11 иксодовых клещей из окрестностей Красноярска, минуя гемоцитовый тест, были взяты для исследования в культуре клеток Vero. Заражение подготовленного монослоя клеток Vero проводили суспензиями из индивидуальных экземпляров клещей. Культивирование риккетсий проводили по общепринятой методике, указанной ранее (5).

Полученные 40 экземпляров клещей из Новосибирской области были исследованы с использованием стандартного гемоцитового теста, в РНИФ в 18 экземплярах были обнаружены риккетсиоподобные микроорганизмы. 10 экземпляров клещей были взяты для культивирования в культуру клеток.

Весь материал культивировали в культуре клеток Vero на протяжении 4 пассажей. После каждого пассажа материал исследовали в РНИФ на наличие риккетсий, а также проводили изучение морфологических и тинкториальных свойств по Здровскому (7). В мазках риккетсиоподобные микроорганизмы окрашивались в яркорозовый или рубиново-красный цвет, цитоплазма клеток – в голубой, ядра – в синий. В культуре клеток Vero наблюдалось умеренное накопление риккетсий до 5-7 экземпляров в каждом поле зрения, преимущественно в цитоплазме клеток. Частота выявления риккетсий в культуре клеток по данным РНИФ приведена в таблице 1.

Полученные штаммы подвергали лиофильному высушиванию.

При исследовании молекулярно-генетическими методами 13 изолятов из окрестности с. Подгородка, во всех была обнаружена ДНК риккетсий, 6 изолятов идентифицированы, как относящиеся к новому генотипу риккетсий *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. Из 9 изолятов, полученных из Усть-Таркского района Новосибирской области, 7 были идентифицированы как *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. При исследовании 6 проб, полученных из заповедника «Столбы» Красноярского края, в 4 пробах выявлена *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, в двух пробах ДНК риккетсий не обнаружено. При идентификации в Genbank полученная последовательность фрагмента гена цитратсинтазы имела 100% гомологию с *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*.

8 штаммов *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* были депонированы во Всероссийский музей риккетсиозных культур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамален.

При внутрибрюшинном заражении морских свинок-самцов лиофильно высушенными штаммами *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* была воспроизведена доброкачественная экспериментальная инфекция, клинически

Таблица. Частота выявления риккетсий в зараженных клетках Vero с помощью РНИФ

Территория сбора клещей	Количество экземпляров клещей, использованных для заражения культуры клеток	Обнаружены риккетсиоподобные микроорганизмы	
		абс.	%
Омская область (с.Подгородка)	58	43	74,1
Красноярский край (г. «Столбы»)	11	9	81,8
Новосибирская область(с.Усть-Тарка)	10	10	100

проявляющаяся незначительным повышением температуры (до 39,6°C) на 4-7 день после заражения, и патолого-анатомически характеризующаяся незначительным увеличением и гиперемией селезенки, печени и тестикул, а также выраженной гиперемией мозга и мозговых оболочек. При микроскопии мазков-отпечатков из лимфоузлов, влажных оболочек яичек и легких зараженных животных, окрашенных по методу Здродовского, наблюдали незначительное накопление риккетсиоподобных микроорганизмов, в мазках из селезенки отмечалось до 10-15 экземпляров в поле зрения; наибольшее количество риккетсиоподобных микроорганизмов (более 50 экземпляров в поле зрения) отмечалось в мазках из мозга. Возбудитель выявлялся преимущественно в цитоплазме клеток исследованных органов.

Мозг морских свинок, инфицированных *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, взят для культивирования на клеточной культуре Vero.

Культивирование риккетсий в культуре клеток проводили на протяжении 3 пассажей. Поскольку наибольшее накопление биомассы риккетсий наблюдается в условиях пониженного метаболизма клеток хозяев, нами были подобраны оптимальные условия культивирования. Для этого мы увеличили время инкубации зараженных клеток с 7 суток до 14 суток. При бактериоскопии мазков, окрашенных по методу Здродовского, было выявлено, что количество риккетсиоподобных микроорганизмов при инкубации 7 суток составляло от 5 до 7 экземпляров в поле зрения. После увеличения времени инкубации, число риккетсиоподобных микроорганизмов увеличилось до 25-30 экземпляров в каждом поле зрения, с преимущественной локализацией микроорганизма в цитоплазме клеток.

Выводы

Таким образом, с использованием культуры клеток Vero впервые удалось изолировать штаммы риккетсий нового генотипа *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* и изучить особенности их культивирования. В опытах на морских свинках-самцах показано, что лиофилизированные культуры *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* вызывают доброкачественную экспериментальную инфекцию, с преимущественным поражением сосудов головного мозга. Для присвоения данной риккетсии статуса нового вида необходимо описание фенотипических свойств этого микроорганизма.■

Кумпан Л.В. - к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии с курсом иммунологии ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия»; старший научный сотрудник ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций», г. Омск; *Самойленко И.Е.* - к.м.н., ведущий научный сотрудник ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций», г. Омск; *Решетникова Т.А.* - к.м.н., старший научный сотрудник ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций», г. Омск; *Шпынов С.Н.* - д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии с курсом иммунологии «Омская государственная медицинская академия»; ученый секретарь ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций», г. Омск; *Рудаков Н.В.* - д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии с курсом иммунологии ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия»; директор ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций», г. Омск; Автор, ответственный за переписку - *Кумпан Л.В.*, 644008 г. Омск, ул. Физкультурная д.5 кв.108., тел: 8-9236853293, e-mail: Ludmilavirus@mail.ru

Литература:

- Shpynov S., Fournier P.-E., Rudakov N. and Raoult D. "Candidatus Rickettsia tarasevichiae" in Ixodes persulcatus ticks collected in Russia // Ann. NY Acad. Sci., 2003, vol.990, June 2003. Rickettsiology: present and future directions - p.162-172.
- Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New Rickettsia Isolates and Description of Rickettsia heilongjiangensis sp.nov. / P.-E. Fournier [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2003. 41, N12. P. 5456-5465.
- Naming of Rickettsiae and rickettsial diseases / D. Raoult [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2005. - V. 1063. - P. 1-12.
- Burgdorfer W. Haemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks // Amer. J. Trop. Med. Hyg. - 1970/- Vol.19. - ч.6. - P.1010-1014
- Eremeeva M.E. Differentiation among the spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA / M.E. Eremeeva, X.J. Yu, D. Raoult // J. Clin. Microbiol. - 1994. - Vol. 32. - P. 803-810.
- Кумпан, Л.В. Изучение биологических свойств риккетсий в культуре клеток / Л.В. Кумпан, Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, С.Н. Шпынов // Актуальные проблемы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения. - Материалы У111 межрегион. научно-практ. конф. с междунар. участием. Омск, 20 ноября 2008 года. - Омск, 2008. - Том II. - С. 184 - 190.
- Здродовский П.Ф., Учение о риккетсиях и риккетсиозах / П.Ф. Здродовский, Е.М. Галиевич //3-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 1972 - 496 с.