

Новые методические подходы к изучению *Rickettsiales*

Н. В. Рудаков^{1,2}, С. Н. Шлынов^{1,2}, И. Е. Самойленко¹, Л. В. Кумпан²,
Т. А. Решетникова¹, А. П. Красиков³

¹ Омский НИИ природно-очаговых инфекций.

² Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии Омской государственной медицинской академии.

³ Кафедра эпизоотологии и инфекционных болезней института ветеринарной медицины Омского государственного аграрного университета

В последние десятилетия произошел глобальный рост заболеваемости природно-очаговыми инфекциями, передаваемыми клещами. Отсутствие эффективного мониторинга за очагами не позволяет оценить причины этого явления и разработать долгосрочные прогнозы. Новые подходы к лабораторной диагностике и изучению экологии возбудителей связаны с применением молекулярно-генетических методов и использованием живых систем (культур клеток, линий переносчиков).

Порядок *Rickettsiales* принадлежит к классу *Proteobacteria* и объединяет альфа 1 протеобактерии семейств *Rickettsiaceae* (рода *Rickettsia* и *Orientia*) и *Anaplasmataceae* (рода *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *NeoRickettsia*, *Wolbachia*) [4]. Их значение определяется результатами генетических исследований, свидетельствующих об эволюционном родстве риккетсий и митохондриальных зукариотов [1].

В составе рода *Rickettsia* выделяли две группы — клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ) с четырьмя подгруппами (*R.rickettsii*, *R.akari*, *R.massiliae*, *R.helvetica*) и сыпного тифа (СТ). Генетические исследования последних лет [5, 10] позволили выделить группу риккетсий — предшественников разделения на группы КПЛ и СТ (*ancestral group Rickettsiae*). Прогресс в генетическом изучении риккетсий проявляется в резком расширении числа видов рода *Rickettsia*, прежде всего представителей группы КПЛ и группы предшественников [7]. В соответствии с разработанными на основе определения нуклеотидных последовательностей генов критериями идентификации новых риккетсий [5] подтверждена видовая принадлежность 22 представителей рода *Rickettsia*, более двадцати риккетсий по этим критериям не изучено. В России к настоящему времени известно распространение 7 видов (*R.prowazekii*, *R.sibirica*, *R.conorii*, *R.slovaca*, *R.heilongjiangensis*, *R..tarasevichiae*, *R.helvetica*) и ряда неклассифицированных риккетсий.

В соответствии с классическими подходами к изучению микроорганизмов порядка

Rickettsiales предусмотрено их изучение при культивировании на лабораторных животных (морских свинках, хомячках) и куриных эмбрионах. Использование только данных подходов не позволяет изучить весь спектр микроорганизмов порядка *Rickettsiales*, поскольку ряд из них не культивируется на этих моделях. Другая крайность — «виртуальное» описание новых риккетсий на основе определения последовательностей отдельных (нередко коротких) фрагментов генов по единичным образцам ДНК без использования классических риккетсиологических методов и выделения штаммов. Мы считаем обязательным сочетание современных молекулярно — биологических, риккетсиологических и дополнительных методов изоляции с использованием живых систем для изучения реального спектра микроорганизмов порядка *Rickettsiales*.

Цель исследования — оптимизация методологических подходов к выявлению спектра и распространения клещевых альфа 1-протеобактерий.

Материалы и методы исследования

Эколого-эпидемиологические, полевые, лабораторные и экспериментальные методы были использованы нами для мониторинга природных очагов клещевых риккетсиозов и эрлихиозов в России и Казахстане. Осуществлен анализ заболеваемости КР в РФ за весь период регистрации этой инфекции (с 1936 г.). Выделение штаммов осуществлено с использованием классических (биопробы на морских свинках и куриных эмбрионах) и современных методов с использованием живых систем (культуры клеток *Vero*, лабораторные линии переносчиков). Основные результаты идентификации риккетсий и эрлихий были получены с использованием молекулярно — генетических методов на базе *Universite de la Mediterranee (Marseille, France)*.

ПЦР и секвенирование проводили, применяя специфичные для *Rickettsia* праймеры:

Rr190.70p и Rr190.701n, амплифицирующие фрагмент 629–632 п.о. отpA гена, и RpCS.877p RpCS.1273r, которые амплифицируют 396 п.о. фрагмент гена цитрат-синтетазы (gltA) и другие [2, 3, 5]. С помощью иммунологических (МФА с МКА, РНГА и ИФА) и генетических (ПЦР, секвенирование) методов проведено широкое обследование иксодовых клещей в очагах КР и на территориях с отсутствием заболеваний этой инфекцией в России и Казахстане. Осуществлена молекулярно-биологическая идентификация штаммов риккетсий из коллекции Омского НИИ природно-очаговых инфекций.

Результаты исследования и их обсуждение

В России регистрируют заболевания двумя риккетсиозами группы КПЛ:

- клещевым риккетсиозом (КР) или клещевым сыпным тифом (КСТ), вызываемым *R.sibirica sensu stricto*, основные переносчики — клещи рода *Dermacentor* и *Haemaphysalis concinna*, эпидемически активные очаги распространены преимущественно в Азиатской части России и в Казахстане [7, 8];

- астраханской пятнистой лихорадкой (АПЛ), вызываемой возбудителем, относящимся к *R.conorii* комплексу, переносчик — клещи *Rhipicephalis pumilio*, очаги распространены в Астраханской области и смежных территориях [11].

Случаи «клещевого риккетсиоза», вызванные *R.heilongjiangensis* и клинически схожие с КСТ, выявлены ретроспективно в Хабаровском крае [6].

Более 20 штаммов риккетсий, выделенных с использованием классических риккетсиологических методов в различных частях нозоареала КР, в разные периоды (40-е — 90-е годы), из различных источников (кровь больных, клещи *D.nuttalli*, *D.marginatus*, *D.silvarum*, *H.concinna*, *D.reticulatus*, *Ixodes persulcatus*) идентифицированы как *R.sibirica subsp. sibirica*.

Наряду с этим, распространенным в пределах всего нозоареала КР возбудителем, при исследовании коллекции штаммов риккетсий из коллекции Омского НИИПИ выявлены и другие риккетсии — *R.sibirica subsp. BJ-90*, *R.slovaca*, *R.heilongjiangensis*.

Не только три патогенных для человека вида риккетсий, вызывающих распознаваемые риккетсиозы в России и Казахстане (*R.sibirica sensu stricto*, возбудитель АПЛ, *R.heilongjiangensis*), были генотипированы в клещах. Другие патогенные риккетсии были выявлены в очагах КР — *R.slovaca (D.marginatus)*, *R.sibirica subsp. BJ-90 (R.sibirica subsp. BJ-90)*, *R.helvetica (Ixodes persulcatus)*, *R.aeschlimannii (Haemaphysalis punctata)*. Риккетсия, генети-

чески тесно связанная с *R.helvetica*, выявлена в клещах *Ixodes persulcatus* в Омской области.

Для выделения штаммов риккетсий новых генотипов, не выделяемых с помощью классических риккетсиологических методов, нами использованы две модели — моделирование цикла метаморфоза переносчиков (лабораторные линии иксодовых клещей) и культивирование на клеточных линиях *Vero*.

Экспериментальные клещевые модели позволяют изучать трансфазовую (от стадии к стадии: личинки→нимфы→имаго) и трансвариальную (через яйцо) передачу и другие вопросы взаимоотношений микроорганизмов с переносчиками. Экспериментальные линии эукариотических клеток — более чувствительная биологическая модель, позволяет изучать взаимоотношения с эукариотическими клетками, оценивать потенциальную патогенность риккетсий.

В целом по результатам исследований с использованием живых систем в переносчиках выявлен целый ряд новых генотипов риккетсий. Изолировано на культуре клеток *Vero 17* штаммов *R.tarasевичае*, восемь из них депонированы во Всероссийском музее риккетсиальных культур НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН.

Три новых риккетсии, тесно генетически связанные с *R.massiliae (R.sp.RpA4, R.sp.DnS14, R.sp.DnS28)* впервые описанные в Астраханской области (*R.sp.RpA4*) и в республике Алтай (*R.sp.DnS14, R.sp.DnS28*) *Rydkina et al.* [9], были в дальнейшем выявлены преимущественно в клещах рода *Dermacentor* в очагах КР и на свободных от этой инфекции территориях России и Казахстана [2, 3]. Патогенность этих генотипов риккетсий для человека окончательно не установлена, однако в последние годы выяснено не только широкое распространение этих риккетсий в Европе, но и их вероятная роль в возникновении синдрома TIBOLA. Штаммы этих новых генотипов были выделены и изучены с использованием моделирования естественного цикла метаморфоз переносчиков и культивирования на клеточных линиях *Vero*. Шесть штаммов риккетсий депонировано во Всероссийском музее риккетсиальных культур.

Новый риккетсиальный генотип, имеющий 86% гомологии по отpA гену с *R.sp.AT-1*, выявлен в клещах *I.persulcatus* в Алтайском и Красноярском краях.

Нами установлено распространение *E.titris* на ряде территорий Азиатской части России в зоне распространения таежного клеща *I.persulcatus* — основного переносчика вируса клещевого энцефалита, боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* и этого вида мо-

ноцитарных эрлийи. Можно считать достаточно вероятным распространение *E. muris* в пределах всего ареала *I. persulcatus*.

Случаи гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) у людей были выявлены нами ретроспективно в Алтайском крае в 1999 г., в Новосибирской области в 2002 г. На территории Алтайского края на фоне роста заболеваемости КР часть случаев серонегативного КР была верифицирована с использованием реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) как ГАЧ. Можно считать достаточно вероятным распространение возбудителя ГАЧ в России в пределах всего ареала клещей *I. persulcatus*. Несомненно необходимость дифференциации случаев ГАЧ от других распространенных клещевых инфекций — прежде всего с клещевым энцефалитом, клещевыми боррелиозами и риккетсиозами. В результате проведенных нами исследований показано распространение в клещах *I. persulcatus* на территориях Сибири и Дальнего Востока *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophila*, «Schotti variant», в *H. concinna* на Дальнем Востоке — *A. bovis*. Выделен в Омской области и изучен возбудитель анаплазмоза крупного рогатого скота — *Anaplasma sp. Omsk*, идентифицированный с помощью ПЦР-секвенирования на базе Новосибирского института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Нуклеотидная последовательность гена *16S rPHK* (AY649325) «*Anaplasma sp. Omsk*» была депонирована в *GenBank* (авторы: Rar V. A., Bejsembaev K. K., Rudakov N. V.,

Krasikov A. P., Morozova O. V.). Штамм *Anaplasma sp. Omsk* изолирован и изучен на культуре клеток *Vero*, получен антиген и иммунные сыворотки, изучена экспериментальная инфекция у различных видов животных, особенности клиники и клинико-лабораторные показатели у больных животных в очагах крупного рогатого скота, осуществлены лечебные мероприятия в очагах и оценена их экономическая эффективность, в экспериментах на двух видах клещей рода *Dermacentor* оценена трансвариальная и трансфазовая передача.

Выводы

Нозоареал КР в целом совпадает с распространением *R. sibirica subsp. sibirica* — от Курганской области на западе до Приморского и Хабаровского краев на востоке.

В целом выявлено распространение на территориях России и Казахстана не менее 15 клещевых альфа 1-протеобактерий. Анализ распространения риккетсий группы КПЛ показал их тесные экологические связи с определенными видами переносчиков. Впервые серологически верифицированы случаи гранулоцитарного эрлихиоза на различных территориях Сибири. Выделено с помощью культур клеток *Vero* и клещевых моделей и идентифицировано большое количество уникальных штаммов риккетсий новых генотипов, большинство из которых — впервые в мире. Спектр клинических проявлений вызываемых ими заболеваний и вклад в региональную патологию требует углубленного изучения.

Литература

1. Емельянов В. В. Эволюционное родство риккетсий и митохондрией эукариота // Вестник РАМН. 2000. №3. С.3-7.
2. Шпынов С. Н., Рудаков Н. В., Самойленко И. Е. и др. Генетическая идентификация риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, изолированных в очагах клещевого риккетсиоза // Журн. микробиол. 2004. №5. С.43-48.
3. Шпынов С. Н., Рудаков Н. В., Ястребов В. К. и др. Выявление новых генотипов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки на юге Урала, в Сибири, на Дальнем Востоке и в Казахстане // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2005. №1. С.23-27.
4. Dumler J. S., Barbet A. F., Bekker C. P. et al. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia, and Ehrlichia with NeoRickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. v.51. P.2145-2165.
5. Fournier P. E., Dumler S., Greub G et al. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New Rickettsia Isolates and Description of Rickettsia heilongjiangensis sp.nov. // J.Clin.Microbiology. 2003. v.41. №12. P.5456-5465.
6. Mediannikov O., Sidelnikov Y., Ivanov E. et al. Acute tick-borne rickettsiosis caused by Rickettsia heilongjiangensis in Russian Far East. Emerg Infect Dis. 2004 №10(5). P.810-7.
7. Rudakov N. V., Shpynov S. N., Samoilenko I. E. and Tankibaev M. A. Ecology and epidemiology of spotted fever group Rickettsiae and new data from their study in Russia and Kazakhstan // Ann. NY Acad. Sci.2003 v.990. Rickettsiology: present and future directions. P.12-24.
8. Rudakov N. V., Samoilenko I. V., Yakimenko V. V. et al. The re-emerging of Siberian tick typhus: field and experimental observations // In: Raoult D., Brouqui P., eds. Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millenium. Elsevier, Paris. 1999. P.269-273.
9. Rydkina E., V. Roux, N. Fetisova et al. New Rickettsiae in ticks collected in territories of the former Soviet Union. Emerg. Infect. Dis. 1999. №5. P.811-814.
10. Stothard D. R. and Fuerst P. A. Evolutionary analysis of spotted fever and typhus groups of Rickettsia using 16S rRNA gene sequences // Syst. Appl. Microbiol. 1998. №18. P.52-61.
11. Tarasevich I. V., Makarova V. A., Fetisova N. F. et al. Studies of a «new» rickettsiosis «Astraktan» spotted fever // Eur. J. Epidemiol. 1991. №7. P.294-298.