Изучение генетического разнообразия анаплазм и эрлихий в паразитарных системах юга Западной Сибири и Урала

Рар В.А.¹, Ливанова Н.Н.², Панов В.В.², Астанин В.Б.³, Ливанов С.Г.², Морозова О.В.¹

The study of anaplasma and ehrlichia genetic variability in parasitic systems in the South-Western Siberia and Ural

Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., Astanin V.B., Livanov S.G., Morozova O.V.

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

© Рар В.А., Ливанова Н.Н., Панов В.В. и др.

ДНК *Ehrlichia muris* и *Anaplasma phagocytophilum* была обнаружена методом nested ПЦР в клещах *Ixodes persulcatus*, собранных в Новосибирской, Свердловской и Челябинской областях, и в образцах крови мелких млекопитающих, отловленных в Новосибирской и Свердловской областях. На территории Новосибирской области в образцах крови и клещах было выявлено два генетических варианта *A. phagocytophilum*.

Ключевые слова: *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophilum*, ПЦР, *Ixodes persulcatus*, мелкие млекопитающие, генетические варианты.

Ehrlichia muris and *Anaplasma phagocytophilum* DNA were detected using nested PCR among *Ixodes persulcatus* collected in Novosibirsk, Sverdlovsk and Chelyabinsk regions and in blood samples of small mammals from Novosibirsk and Sverdlovsk regions. Two genetic variants of *A. phagocytophilum* were revealed in blood samples and ticks from Novosibirsk region.

Key words: *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophilum*, PCR, *Ixodes persulcatus*, small mammals, genetic variants.

УДК 576.89

Эрлихиозы и анаплазмозы являются трансмиссивными природно-очаговыми инфекциями. Представители родов *Ehrlichia* и *Anaplasma*, относящиеся к семейству *Anaplasmataceae*, представляют собой маленькие грамотрицательные кокки, локализованные чаще всего внутри фагосом лейкоцитов. Внутрифагосомальные эрлихии делятся, образуя кластеры клеток, или так называемые морулы, выявляемые микроскопически после окрашивания по Гимзе. [23].

Эрлихиозные и анаплазмозные инфекции у домашних животных были описаны еще в середине XX в., однако широкий интерес к изучению эрлихий и анаплазм возник после обнаружения в семействе *Anaplasmataceae* патогенных для человека видов в 1987—1994 гг.

В настоящее время известно три инфекционных аген-

та, вызывающих эрлихиозы и анаплазмозы у людей. *Ehrlichia chaffeensis* поражает мононуклеарные лейкоциты, вызывая моноцитарный эрлихиоз человека [16], а *Ehrlichia ewingii* и *Anaplasma phagocytophilum* — гранулоцитарные лейкоциты, вызывая гранулоцитарный эрлихиоз и анаплазмоз человека [12, 15]. *A. phagocytophilum* — новое название вида, присвоенное после проведенного филогенетического анализа представителей семейства *Anaplasmataceae*, объединившего в себе микроорганизмы, ранее известные как *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* и HGE-агент [17].

Клинические проявления заболеваний неспецифичны и являются гриппоподобными. У больных наблюдаются острая лихорадка, сильная головная боль, боли в мышцах, тошнота. При лабораторном исследовании выявляются уменьшение числа лейко-

цитов и тромбоцитов, а также повышение активности аминотрансферазы [9]. В США было зарегистрировано 338 подтвержденных случаев моноцитарного эрлихиоза человека (в 1997—2001 гг.) и 654 случая гранулоцитарного анаплазмоза человека (в 1994—2001 гг.), при этом смертность составляла около 1%. В Европе выявлено около 20 случаев гранулоцитарного анаплазмоза у людей [23].

Переносчиками *A. phagocytophilum* в США являются клещи *Ixodes scapularis* и *Ixodes pacificus* [9, 18, 28], а в Европе — лесной клещ *Ixodes ricinus* [20, 22]. На севере США от 7,6 до 53,0% взрослых клещей *I. scapularis* и от 1,5 до 20,6% нимф инфицированы *A. phagocytophilum* [20, 28]. В Швеции, Швейцарии, Великобритании, Словении, Болгарии и на северо-западе России уровень зараженности *I. ricinus* гранулоцитарными анаплазмами варьирует от 1 до 5%, тогда как в Италии этот показатель достигает 24,4% [8, 20, 22]. К настоящему времени у клещей показана трансфазовая передача *A. phagocytophilum* [18, 28]. Трансовариальная передача в клещах не установлена [22], поэтому наличие резервуара инфекции играет важную роль в распространении данного патогена. Основными резервуарными хозяевами анаплазм в США являются белоногие мыши (*Peromyscus leucopus*) и белохвостые олени (*Odocoiles virginianus*) [27, 28], а в Европе — лесные мыши (*Apodemus sylvaticum*), рыжие полевки (*Clethrionomys glareolus*), а также косули (*Capreolus capreolus*), олени (*Cervus elaphus*), овцы [11, 20—22]. Помимо *I. ricinus*, в поддержании паразитарной системы *A. phagocytophilum* в лесных районах Англии участвуют норные клещи *Ixodes trianguliceps*, прокармливающиеся на мелких млекопитающих [11].

Таежный клещ *I. persulcatus* Shulze широко распространен в таежных, лесных и лесостепных зонах России от Прибалтики до Тихого океана [1], а также в Китае [13] и Корее [19]. В настоящее время в таежных клещах обнаружено два вида эрлихий и анаплазм: *Ehrlichia muris* и *A. phagocytophilum*. Моноцитарные эрлихии *E. muris*, первоначально изолированные из мышевидных грызунов в Японии [29], филогенетически близки к возбудителю моноцитарного эрлихиоза человека *E. chaffeensis*. *E. muris* были обнаружены в таежных клещах на северо-западе России [8], а также в Пермской [26], Тюменской, Омской, Новосибирской областях и в Алтайском крае [6]. Уровень инфицирования таежных клещей эрлихиями варьирует от 3 до

13%. Патогенность *E. muris* для человека не установлена, хотя в районе распространения данного вида в Пермской области наблюдалось четыре серологически подтвержденных случая моноцитарного эрлихиоза человека после укусов клещами [26]. *A. phagocytophilum* была выявлена в таежных клещах на северо-западе России [3], в Алтайском и Приморском краях [6], в Китае [13] и Корее [19]. Уровень инфицирования *I. persulcatus* анаплазмами не превышал 4%.

В данной работе изучалось видовое разнообразие эрлихий и анаплазм в паразитарных системах, расположенных в местах, близких к оптимуму обитания таежного клеща на юге Западной Сибири (в Новосибирской и Томской областях) и на Южном Урале (Челябинская область), а также на северной границе ареала таежного клеща на Северном Урале (Свердловская область, заповедник «Денежкин камень»). ДНК эрлихий и анаплазм выявляли методом *nested* ПЦР в образцах от голодных имаго клещей с использованием родоспецифичных праймеров из области гена *16S* рРНК. Видовую принадлежность и генетические варианты выявленных анаплазм и эрлихий определяли как при проведении ПЦР с использованием праймеров, специфичных для *A. phagocytophilum* и *E. muris*, так и посредством определения нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР [25]. Как и в предшествующих работах, было выявлено два вида эрлихий и анаплазм. ДНК *E. muris* была обнаружена у 8,6% клещей из Новосибирской и Томской областей, у 6,3% таежных клещей из Челябинской области и у 2,2% клещей из Свердловской области. *A. phagocytophilum* была выявлена у 2,4% клещей из Новосибирской и Томской областей [25], у 1,3% клещей из Челябинской и 0,7% клещей из Свердловской области. Следует отметить, что доля клещей, в которых была детектирована ДНК эрлихий и анаплазм, на Северном Урале существенно меньше, чем на Южном Урале и в Западной Сибири. Ни в одном из 87 исследованных луговых клещей *Dermacentor reticulatus*, собранных в Новосибирской и Омской областях, и 18 *Dermacentor marginatus*, собранных в Челябинской области, ДНК эрлихий и анаплазм не была обнаружена [25].

Роль резервуарных хозяев в поддержании природных очагов *A. phagocytophilum* в ареале распространения таежного клеща изучена очень мало. На Западном Урале (Пермская область) в образцах крови примерно у 12% рыжих полевок была выявлена ДНК

A. phagocytophilum [5]. В проведенном исследовании была детектирована ДНК эрлихий и анаплазм методом nested ПЦР в крови мелких млекопитающих, отловленных в окрестностях г. Новосибирска и в заповеднике «Денежкин камень» на Северном Урале. В образцах крови зверьков, отловленных вблизи г. Новосибирска, ДНК *E. muris* была обнаружена в 1,1% случаев, *A. phagocytophilum* — в 4,2%, а ДНК двух видов — в 2,1% (табл. 1). На исследуемой территории Северного Урала доля мелких млекопитающих, в крови которых детектирована ДНК эрлихий и анаплазм, была существенно выше. ДНК *E. muris* была выявлена в 5,8% образцов, *A. phagocytophilum* — в 13,2%, а ДНК двух видов — в 1,1% образцов крови. На территории Новосибирской области эрлихии и анаплазмы были обнаружены только в образцах от лесных полевок (*Clethrionomys rutilus*, *Clethrionomys rufocanus*), а на Северном Урале — как в образцах от лесных полевок (*Cl. rutilus*, *Cl. glareolus*, *Cl. rufocanus*), так и от бурозубок (*Sorex araneus* L.) [2]. ДНК *E. muris* также была обнаружена в одном из трех исследованных образцов от пашенной полевки *Microtus agrestis*. Вероятнее всего, резервуарными хозяевами могут служить мелкие млекопитающие различных видов.

Известно, что *A. phagocytophilum* циркулирует в крови мелких грызунов в течение достаточно короткого времени и выявляется только в период активности иксодовых клещей [11]. Следовательно, сохранение патогена в паразитарной системе в течение зимы поддерживается клещами, а не мелкими млекопитающими. В то же время на территории заповедника «Денежкин камень» уровень инфицирования анаплазмами мелких млекопитающих значительно выше, чем таежных клещей (табл. 1). Возможно, на данной территории *A. phagocytophilum* циркулирует с участием других видов переносчиков.

Выявление инфекционного агента гранулоцитарного анаплазмоза человека как в клещах, так и в резервуарных хозяевах в различных регионах России свидетельствует о существовании потенциальной опасности заражения людей этим патогеном. В настоящее время имеются единичные сообщения о подтвержденных серологически случаях заболевания гранулоцитарным анаплазмозом человека на Алтае, в Новосибирской области [6], а также на Дальнем Востоке [4]. В ходе данного исследования было проанализировано 263 образца крови больных, госпитализированных в инфекционные больницы г. Новосибирска с признаками инфекционных заболеваний после укусов клещами. Ни в одном из исследованных образцов не удалось выявить ДНК эрлихий или анаплазм [7], что может быть связано как с низким уровнем инфицированности таежных клещей, так и с коротким временем бактериемии *A. phagocytophilum*.

Вид *A. phagocytophilum* объединяет в себе микроорганизмы, ответственные за развитие анаплазмоза не только у людей, но и у овец, лошадей, крупного рогатого скота, собак. Изучение внутривидового разнообразия проводится сравнением нуклеотидных последовательностей как вариабельных генов [10, 14], так и консервативных: *groESL* оперона [10, 24] и гена *16S* рРНК [10, 13, 24]. В настоящее время нет однозначных данных о корреляции между определенными генетическими вариантами анаплазм и их биологическими свойствами. Ген *16S* рРНК считается золотым стандартом для классификации бактерий. Анализ имеющихся в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей рибосомального гена *A. phagocytophilum* позволяет выделить, по крайней мере, семь генетических вариантов анаплазм, различающихся по расположенному вблизи

5' конца гена вариабельному участку [13] (табл. 2).

Таблица 1

Выявление эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах и в образцах крови мелких млекопитающих

Источник выделения ДНК	Место сбора	Общее число проб	Число образцов, содержащих ДНК		
			<i>E. muris</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. muris</i> + <i>A. phagocytophilum</i>
<i>I. persulcatus</i>	Западная Сибирь	127	11	3	0
	Южный Урал	79	5	1	0
	Северный Урал	102	3	1	0
<i>D. reticulatus</i>	Западная Сибирь	0	0	0	0

<i>D. marginatus</i>	Южный Урал	0	0	0	0
Кровь мелких млекопитающих	Западная Сибирь	95	1	4	2
	Северный Урал	190	11	25	2

Таблица 2

Сравнение переменных участков гена 16S рРНК генетических вариантов *A. phagocytophilum* (позиции 75—86 п.н. по последовательности *A. phagocytophilum* GenBank U02521)

Генетический вариант	Нуклеотидная последовательность	Источник изоляции	Номер в GenBank	Ссылка
1	TAAAGAATAGTT	Кровь человека, США	U02521	[15]
		Кровь человека, Италия	DQ029028	
		<i>I. ricinus</i> , Швейцария	AF084907	
		Белонная мышь, США	AF189153	
2	TAAAGAATAATT	<i>I. persulcatus</i> , Китай	AF227954	[13]
		Кровь человека, США	AF093789	
		<i>I. persulcatus</i> , Корея	AF470701	[19]
		Рыжая полевка, Западный Урал	AY094353	[5]
		<i>I. persulcatus</i> , Северный Урал		
		<i>I. persulcatus</i> , Южный Урал		Данная работа
3	TGAAGAATAATT	Красная полевка, Северный Урал		
		Красная полевка, Южный Урал		
4	TGAAGAATAGTT	<i>I. ricinus</i> , Швеция	AJ242784	
		<i>I. scapularis</i> , Канада	AF311343	
		Косуля, Швейцария	AF384213	[21]
5	TAAAGATTAGTT	<i>I. ricinus</i> , Швеция	AJ242783	
		<i>I. ricinus</i> , Германия	AF136714	
6	TGGAGGATAATT	<i>I. persulcatus</i> , Китай	AY079425	[13]
7	TAGAGAATAGTT	<i>I. persulcatus</i> , Новосибирская область	AF205140	[13]
		<i>I. persulcatus</i> , Новосибирская область	AY587607	Данная работа
		Благородный олень, Словения	AF481852	[24]
		<i>I. ricinus</i> , Германия	AY281807	

Примечание. Вариационные нуклеотидные остатки в последовательности затенены.

Наиболее широко распространенные первые два генетических варианта были выявлены в иксодовых клещах и в млекопитающих различных видов как в Европе, так и в США. В крови больных анаплазмозом людей обнаружены ДНК *A. phagocytophilum* также только первых двух геновариантов. Напротив, генетические варианты 5 и 6 до последнего времени были выявлены только в таежных клещах в Китае [13], а варианты 4 и 7 — только в Европе. В настоящих исследованиях показано, что нуклеотидные последовательности фрагмента рибосомального гена *A. phagocytophilum* от таежных клещей, собранных на Северном и Южном Урале, а также из образцов крови мелких млекопитающих из Новосибирской и Свердловской областей соответствовали широко распространенному генетическому варианту 2 [2]. Этот же генетический вариант был выявлен ранее в Пермской области [5]. В то же время последовательности фрагмента рибосомального гена анаплазм, обнаруженные в трех образцах от та-

ежных клещей из Новосибирской области (GenBank AY587607), соответствовали редкому генетическому варианту 6, обнаруживаемому ранее только в Китае (см. табл. 2) [25]. Случай обнаружения двух различающихся генетических вариантов *A. phagocytophilum* в Новосибирской области, один из которых выявляется только в лесных полевках, а другой в таежных клещах, представляет особый интерес и требует дальнейшего изучения. Все определенные нуклеотидные последовательности *E. muris* были идентичны друг другу (GenBank AY587608) и отличались от последовательности *E. muris*, изолированной из крови *Eothenomys kageus* в Японии (GenBank U15527) по одной нуклеотидной замене.

Таким образом, в исследуемых паразитарных системах на юге Западной Сибири и на Урале были обнаружены моноцитарные эрлихии *E. muris* и возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека *A. phagocytophilum* как в имаго *I. persulcatus*, так и в крови мелких

млекопитающих. Анализ последовательностей гена 16S рРНК *A. phagocytophilum* выявил два генетических варианта анаплазм, один из которых был обнаружен только в таежных клещах в Новосибирской области и соответствовал генетическому варианту, детектированному ранее в Китае в *I. persulcatus*.

Исследование поддержано РФФИ (проект № 05-04-48962а).

Литература

1. Буди́ко М.И. Климат и жизнь. Л.: Гидрометеиздат, 1971.
2. Ливанова Н.Н., Рар В.А., Ливанов С.Г., Иголкина Я.П. Разнообразие паразитарных систем с участием мелких млекопитающих и *Ixodes persulcatus* Shculze на Северном Урале // Сиб. эколог. журн. 2005. Т. 10. № 5. С. 1079—1084.
3. Семенов А.В., Алексеев А.Н., Дубинина Е.В. и др. Выявление генотипической неоднородности популяции *Ixodes persulcatus* Shculze (Acari: Ixodidae) северо-запада России и особенности распределения клещевых патогенов — возбудителей болезни Лайма и эрлихиозов в различных генотипах // Мед. паразитология. 2001. Т. 3. С. 11—15.
4. Сидельников Ю.Н., Медяников О.Ю., Иванов Л.И., Здановская Н.И. Первый случай гранулоцитарного эрлихиоза на Дальнем Востоке Российской Федерации // Клинич. медицина. 2003. Т. 81. С. 67—68.
5. Телфорд С.Р., Коренберг Э.И., Гойберт Х.К. и др. Выявление в России природных очагов бабезиоза и гранулоцитарного эрлихиоза // Журн. микробиологии. 2002. № 6. С. 21—25.
6. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К. и др. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане // Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2004. № 2. С. 10—14.
7. Фоменко Н.В., Рар В.А., Романова Е.В. и др. Молекулярно-генетический анализ инфекций, переносимых клещами, у больных Новосибирской области // Молекуляр. медицина. 2005. Т. 4. С. 48—52.
8. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Van De Pol I., Schouls L.M. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. P. 2237—2342.
9. Bakken J.S., Dumler J.S. Human granulocytic ehrlichiosis // Clin. Infect. Dis. 2000. V. 31. P. 554—560.
10. Bjoersdorff A., Bagert B., Massung R.F. et al. Isolation and characterization of two European strains of *Ehrlichia phagocytophila* of equine origin // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2002. V. 9. P. 341—343.
11. Bown K.J., Begon M., Bennett M. et al. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom // Emerg. Infect. Dis. 2003. V. 9. P. 63—70.
12. Buller R.S., Arens M., Hmiel S.P. et al. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis // N. Engl. J. Med. 1999. V. 341. P. 148—155.
13. Cao W.C., Zhao Q.M., Zhang P.H. et al. Prevalence of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* in

- Ixodes persulcatus* ticks from Northe Eastern China // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003. V. 68. P. 547—550.
14. Carter S.E., Ravyn M.D., Xu Y. et al. Molecular typing of the etiologic agent of human granulocytic ehrlichiosis // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. P. 3398—3401.
15. Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease // J. Clin. Microbiol. 1994. V. 32. P. 589—595.
16. Dawson J.E., Anderson B.E., Fishbein D.B. et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with Human ehrlichiosis // J. Clin. Microbiol. 1991. V. 29. P. 2741—2745.
17. 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 phagocytophilum* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 2145—2165.
18. Hodzic E., Fish D., Maretzki C.M. et al. Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks // J. Clin. Microbiol. 1998. V. 36. P. 3574—3578.
19. Kim C.M., Kim M.S., Park M.S. et al. Identification of *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *A. bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* ticks from Korea // Vector Borne Zoonotic Dis. 2003. V. 3. P. 17—26.
20. Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W. et al. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland // J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38. P. 1002—1007.
21. Liz J.S., Sumner J.W., Pfister K., Brossard M. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*) // J. Clin. Microbiol. 2002. V. 40. P. 892—897.
22. Ogden N.H., Bown K., Horrocks B.K. et al. Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. // Med. Vet. Entomol. 1998. V. 12. P. 423—429.
23. Parola P., Davoust B., Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses // Vet. Res. 2005. V. 36. № 3. P. 469—492.
24. Petrovec M., Bidovec A., Sumner J.W. et al. Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages // Wien Klin. Wochenschr. 2002. V. 31. P. 641—647.
25. Rar V.A., Fomenko N.V., Dobrotvorskij A.K. et al. Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Russia // Emerg. Infect. Dis. 2005. V. 11. P. 1708—1715.
26. Ravyn M.D., Korenberg E.I., Oeding J.A. et al. Monocytic *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* ticks from Perm, Russia // Lancet. 1999. V. 27. P. 722—723.
27. Tate C.M., Mead D.G., Luttrell M.P. et al. Experimental infection of white-tailed deer with *Anaplasma phagocytophilum*, etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 3595—3601.
28. Telford S.R., Dawson J.E., Katavolos P. et al. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer

tick-rodent cycle // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 11. P. 6209—6214.
29. Wen B., Rikihisa Y., Mott J. et al. *Ehrlichia muris* sp. nov.,

identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics // Int. J. Syst. Bacteriol. 1995. V. 45. P. 250—254.

Поступила в редакцию 06.01.2006 г.