

С.Н.Шпынов^{1,2}, Е.М.Полещук¹, Н.В.Рудаков^{1,2}, И.Е.Самойленко¹, Т.А.Решетникова¹, Л.В.Кумпан^{1,2},
А.Н.Коломеец¹, Г.Н.Сидоров¹, С.Е.Ткачѳв³, С.В.Грибенча⁴

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ТИПИРОВАНИЯ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ШТАММОВ РИККЕТСИЙ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ ЛИХОРАДКИ И ВИРУСА БЕШЕНСТВА

¹ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций»,

²ГОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», Омск;

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

⁴ГУ «Научно-исследовательский Институт вирусологии имени Д.И.Ивановского» РАМН, Москва

Проведена идентификация и типирование 50 штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и 36 штаммов лиссавирусов из рабочих коллекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» с использованием молекулярно-биологических, эпидемиологических и биоинформационных подходов. Определено таксономическое положение исследованных культур риккетсий группы КПЛ. Проведено районирование территории Российской Федерации по распространению патогенных риккетсий группы КПЛ в хозяевах – иксодовых клещах. Рассмотрены вопросы распространения лиссавирусов на территории Сибири.

Ключевые слова: Российская Федерация, эндемичные риккетсиозы, бешенство, эпидемиология, молекулярно-биологические исследования.

S.N.Shpynov^{1,2}, E.M.Poleshchuk¹, N.V.Rudakov^{1,2}, I.E.Samoilenko¹, T.A.Reshetnikova¹, L.V.Kumpan^{1,2},
A.N.Kolomeets¹, G.N.Sidorov¹, S.E.Tkachev³, S.V.Gribenchа⁴

Application of Molecular Typing Methods for Analysis of Strains of Rickettsiae of the Spotted Fever Group and Rabies Virus

¹Omsk Research Institute of Natural Focus Infections, ²Omsk State Medical Academy, Omsk; ³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk; ⁴D.I.Ivanovsky Research Institute of Virology, Moscow

50 strains of spotted fever group (SFG) rickettsiae and 36 lyssaviruses strains from the collection of Omsk Research Institute of Natural Focus Infections were identified and typed using the approaches of molecular biology, epidemiology and bioinformatics. The taxonomic status of the studied cultures of SFG rickettsiae was identified. Zonation of the Russian Federation territories according to the spread of SFG pathogenic rickettsiae in their hosts – ixodic ticks was carried out. Lyssaviruses distribution in the territory of Siberia was considered.

Key words: Russian Federation, endemic rickettsioses, rabies, epidemiology, molecular biological studies.

Создание эффективно действующей единой национальной системы индикации и идентификации возбудителей опасных инфекций требует проведения стандартизации средств и методов, используемых для лабораторной диагностики.

Применение комплекса молекулярно-биологических методов, основанных на ПЦР (ПЦР-ПДРФ, ПЦР-секвенирование, ПЦР со случайными праймерами, ПЦР с праймерами на повторяющиеся элементы и др.), позволило получить данные по молекулярным портретам штаммов возбудителей инфекционных болезней, циркулирующих на территории Российской Федерации. Одним из важных разделов этой работы является «ретроспективное» молекулярное типирование штаммов микроорганизмов, хранящихся в рабочих коллекциях учреждений Роспотребнадзора.

В рабочих коллекциях ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора содержится 97 штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и 251 штамм лиссавирусов, полученных от человека, животных и других биологических объектов (иксодовых клещей).

Применение молекулярных методов типирования в комплексе с другими лабораторными методами

в системе эпидемиологического надзора за возбудителями природно-очаговых заболеваний способствует более эффективному мониторингу очагов этих инфекций и совершенствованию профилактических мероприятий.

Создана уникальная коллекция штаммов риккетсий, не имеющая аналогов в мире. Коллекции микроорганизмов в институте, кроме авторских штаммов, включают большое количество музейных штаммов из различных регионов мира. Коллекция лиссавирусов института не имеет аналогов в России. Она представлена видом Rabies virus (классический вирус бешенства, соответствует генотипу 1), а также оригинальными видами: European bat lyssavirus 1 (лиссавирус европейских летучих мышей 1-го типа, 5-й генотип), Aravan (8-й генотип), Khujand (9-й генотип), Irkut (10 генотип), West Caucasian bat virus лиссавирус (11-й генотип).

Материалы и методы

Осуществлено молекулярно-генетическое исследование 50 штаммов риккетсий из рабочей коллекции ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых

инфекций» Роспотребнадзора, выделенных в очагах клещевого риккетсиоза (КР) от больных и иксодовых клещей шести видов, а также с не эндемичных по этой инфекции территорий азиатской части РФ в период с 1954 по 2005 год.

При изучении штаммов риккетсий определены нуклеотидные последовательности фрагмента *ompA* гена размером 629/632 п.н., кодирующего синтез белка наружной мембраны, гена *gltA* размером 1234 п.н., отвечающего за синтез цитрат синтетазы. Для постановки ПЦР использовали праймеры, предложенные V.Roux *et al.* [12] и P.-E.Fournier *et al.* [5]. Секвенирование было выполнено на ABI 3100 PRISM (Applied Biosystems) автоматическом секвенаторе.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTAL в оболочке BISANCE [4]. Процент гомологии нуклеотидных последовательностей определяли, применяя DNADIST software package (Hitachi Software Engineering America, Brisbane, CA) by the method of Kimura [8]. Филогенетический анализ выполняли, применяя neighbour-joining метод и программу DNAPARS в версии PHYLIP с методом максимальной вероятности (maximum-likelihood). Построение филогенетических деревьев выполняли с применением программы ClustalW в версии 1.8 (доступной через DNA Data Bank of Japan, Vishima, Japan [http://www.ddbj.nig.ac.jp/htmls/E-mail/clustalw-e.html]). Визуализацию дендрограмм осуществляли с помощью программы TreeView, версия 1.61. Последовательности нуклеотидов в амплифицированных фрагментах ДНК всех положительных проб были идентифицированы с депонентами находящимися в GenBank в режиме прямого доступа.

Для определения молекулярно-генетического разнообразия рабдовирусов, циркулирующих на юге Сибири, использованы 36 изолятов, выделенных в биопробе в 2001, 2002 и 2008 гг. в Республике Тыва, Красноярском и Алтайском краях, Омской, Новосибирской, Белгородской, Воронежской и Тверской областях. РНК, выделенную из головного мозга белых мышей с помощью TRIZol (Invitrogen, USA), исследовали в ОТ-ПЦР с праймерами к гену нуклеопротеина (N) [6, 13]. Ампликоны секвенировали с набором Big-Dye™ Terminator Kit v.3.0 с последующим анализом на приборе ABI 3130xl в Центре Секвенирования ДНК СО РАН (Новосибирск). Полученные последовательности гена N анализировали и сравнивали с последовательностями лабораторных штаммов, полевых изолятов из Африки, Индии, Таиланда, Японии, США, Грузии, Монголии, Казахстана (n=17) и России (n=35), полученными из GenBank в программе BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Для филогенетического анализа использовали набор данных (n=100, включая 80 изолятов с территории России), представляющий собой последовательность гена N (1252 нуклеотида, позиции 170–1421 по отношению к геному штамма SAD B19; GenBank № M31046). При дальнейшем исследовании

проведено сравнение 152 последовательностей гена N (1302 нуклеотида, позиции 122–1423, по отношению к геному штамма ABL; GenBank № NC003243). Выравнивание и филогенетический анализ методами neighbor joining (NJ) и maximum likelihood (ML) проводили в программе MEGA 4 [9].

Результаты и обсуждение

Идентификация и типирование штаммов риккетсий группы КПЛ

В ходе осуществления молекулярно-генетической верификации 50 штаммов риккетсий установлено, что 25 штаммов было представлено видом *Rickettsia sibirica sensu stricto*, 2 штамма – *R. sibirica* BJ-90, 3 – *R. heilongjiangensis*, 1 – *R. slovaca*, 10 – *R. tarasevichae* и 9 – *R. raoultii* (RpA4-5, DnS28-3, DnS14-1) [13, 14]. Определена филогенетическая позиция идентифицированных штаммов риккетсий (рис. 1).

Наряду с классическим генотипом – *R. sibirica sensu stricto*, широко распространенном, по нашим данным, в нозоареале КР, на Дальнем Востоке РФ и в Северном Китае, в клещах *Dermacentor silvarum* выявляют генотип *R. sibirica* BJ-90. Штамм «Приморье-32/84» *R. sibirica* subsp. BJ-90 выделен из клещей *D. silvarum* в нашей лаборатории Т.А. Решетниковой за шесть лет до изоляции первых китайских штаммов этого вида риккетсий (1990 г.). *R. heilongjiangensis* формально описана как новый вид в 2003 г. [6]. Необходимо отметить, что штаммы *R. heilongjiangensis* были изолированы в ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора значительно раньше первых китайских штаммов, однако они идентифицированы лишь в последние годы [14]. Первый штамм нового вида риккетсий выделил В.К. Ястребов в 1966 г. из клещей *Haemaphysalis concinna*, собранных в Алтайском крае. Еще два штамма *R. heilongjiangensis*, выделенные из клещей *H. concinna*, собранных в

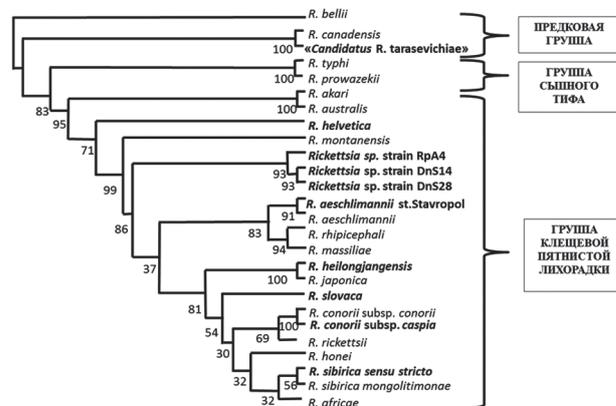


Рис. 1. Филогенетические позиции риккетсий группы КПЛ, выявленных в России. Филогенетическое дерево построено при сравнении нуклеотидных последовательностей гена цитрат синтазы (*gltA*) применением neighbour-joining метода и программы DNAPARS в версии PHYLIP с методом максимальной вероятности (maximum-likelihood)

Приморском крае в 1981 г. (т.е. тоже до первых китайских штаммов), хранятся в нашей коллекции.

Штамм «Карпунино 19/69» показал 100 % гомологии с *R. slovaca*. Этот вид риккетсий из группы КПЛ был впервые изолирован J.Rehacek в 1968 г. из клещей *D. marginatus* в Чехословакии. Штамм «Карпунино 19/69» был изолирован М.С.Шайманом в 1969 г. из клещей *D. marginatus* в Курганской области и спустя 34 г. идентифицирован, как *R. slovaca* [14].

Эти результаты показывают, что на территории Российской Федерации, кроме *R. sibirica* и возбудителя астраханской пятнистой лихорадки, распространены и другие патогенные для человека риккетсии группы КПЛ – *R. heilongjiangensis* и *R. slovaca*, а также впервые показывают наличие в Приморском крае геноварианта *R. sibirica* – *Rickettsia* sp. ВJ-90, что необходимо учитывать при эпидемиологическом надзоре и диагностике заболеваний.

Типологическая характеристика распространения патогенных для человека риккетсий группы КПЛ в России

На основании полученных данных удалось осуществить районирование территории Российской Федерации по распространению патогенных риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки в хозяевах – иксодовых клещах [2]. Выделено 2 основных географических региона:

- Восточно-Европейский с циркуляцией возбудителя астраханской пятнистой лихорадки и *R. slovaca* (дермаценторно-рипицефалисный);

- Азиатский с циркуляцией *R. slovaca*, *R. sibirica* и «*R. heilongjiangensis*» (дермаценторно-гемафизалисный), в котором можно выделить четыре области: дермаценторную (маргинатусно-ретикулятусную) с циркуляцией *R. sibirica* и *R. slovaca*; дермаценторно-гемафизалисную сибирскую (сибирское пятно ареала *H. concinna*) с циркуляцией *R. sibirica* и «*R. heilongjiangensis*»; дермаценторную (нутталлиево-сильварумную) с циркуляцией *R. sibirica* и возможно «*R. heilongjiangensis*»; дермаценторно-гемафизалисную дальневосточную (пятно ареала *H. concinna* на Дальнем Востоке) с циркуляцией *R. sibirica* и «*R. heilongjiangensis*».

Типирование штаммов лиссавирусов, выделенных на территории Российской Федерации

В результате молекулярно-генетического анализа лиссавирусов установлено, что выделенные нами в 2008 г. вирусы группировались в пределах пяти филогенетических групп (арктической, прибалтийской, восточно-европейской лесной, степной, сибирско-дальневосточной) классического бешенства (вид Rabies virus), циркуляция которых была установлена в стране к 2003 г. [10]. Вирусы, выделенные в 2008 г. на юге Красноярского края и в Тыве, совместно с нашими и ранее секвенированными изолятами из юго-восточной Европы, Урала, Западной Сибири и Казахстана сформировали отдельный монофилетический кластер (bootstrap 99 %). Это общая группа вирусов степного типа [10].

Вирусы из Красноярского края, Тывы и Монголии в пределах этого кластера (bootstrap 83 %) сформировали отдельную подгруппу, образующую две ветви: первая – представители юга Красноярского края и один изолят из Тывы, вторая – изоляты из Монголии и Тывы. Так как изоляты с территории Тывы входят в обе ветви, то, возможно, что бешенство проникло в Красноярский край и Хакасию в результате выноса инфекции с территории Тывы и Монголии (по долине Енисея) [11]. Это подтверждается тем, что точка регистрации первого случая в Красноярском крае наиболее близка к границам Тывы. Известно также, что бешенство активизировалось в западных районах Монголии в 1999–2000 гг. [1].

При включении в анализ большего числа последовательностей от изолятов с территории Монголии, собранных в 2006–2008 гг. [3], вирусы из Красноярского края (2008 г.), Тывы (2008 г.) и Монголии в пределах кластера степных вирусов формируют группу с еще большей поддержкой – 93 bootstrap (рис. 2). Данный факт также свидетельствует о возможном выносе возбудителя из Монголии на территорию России.

В Тыве бешенство регистрировали четырежды через 12, 17 и 10 лет. На 4-й раз, вероятно, произошел вынос инфекции на юг Красноярского края, где очаг

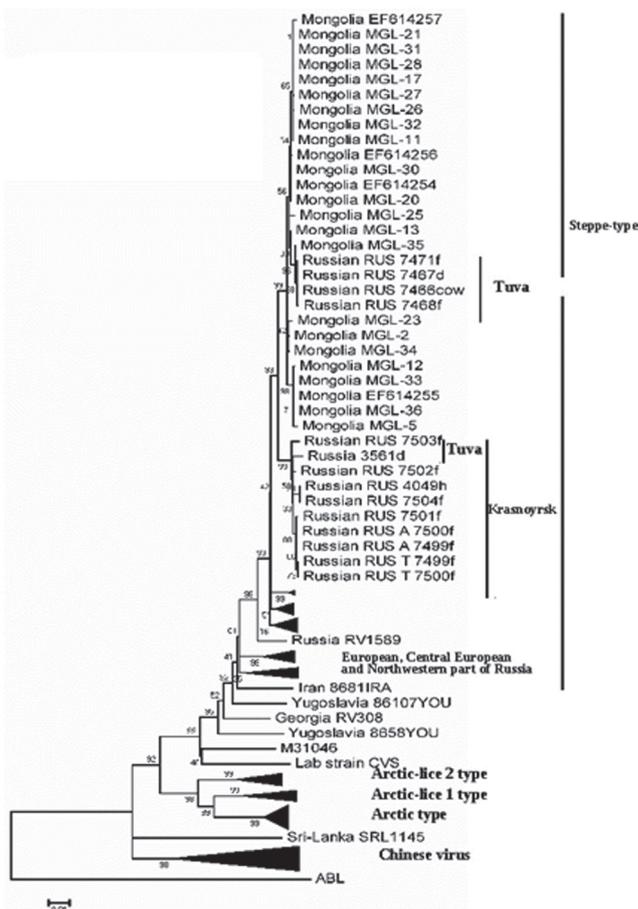


Рис. 2. Филогенетическое дерево, полученное NJ методом для 152 изолятов вируса бешенства секвенированием полного гена N (1302 нуклеотида)

укоренился и стал функционировать относительно автономно. Изоляты с Тывы, выделенные в прошлые годы, группируются с Монгольскими и современными Тувинскими. Возможно, заносы бешенства на юг Восточной Сибири являются результатом периодической активизации природных очагов в южной Азии. Однако проанализированные изоляты из Китая представляют собой совершенно самостоятельную группу, и пока это предположение не подтверждается.

В остальных подгруппах в группе степных вирусов совместно группируются представители с различных территории Урала, Западной Сибири и Казахстана, а также вирусы, циркулирующие в юго-восточной Европе и Нижнем Поволжье.

Вероятно, бешенство в Западную Сибирь и на Урал попадает с юга Казахстана. Возможно, имеют место обратные миграции бешеных хищников в Казахстан с территории России.

Таким образом, особенностью ситуации по бешенству в южной части Восточной Сибири в последнее десятилетие является резкое увеличение доли лиц в структуре заболеваемости и распространение инфекции на ранее благополучные территории. По данным молекулярно-генетического и картографического анализа, бешенство на юг Восточной Сибири, возможно, проникло в результате выноса инфекции с территории Монголии через Тыву. Вирусы с юга Западной Сибири группируются совместно с изолятами с территории Казахстана, Урала, Нижнего Поволжья и юго-восточной Европы. Молекулярно-генетические исследования оказывают существенную помощь в установлении путей распространения инфекции, что определяет их актуальность и практическую значимость.

Полученные результаты могут составить основу единой системы молекулярного типирования возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней и будут способствовать созданию на базе ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» референс-центров по лабораторной диагностике и мониторингу возбудителей природно-очаговых риккетсиозов и лабораторной диагностике и мониторингу бешенства.

Одним из важнейших разделов работы референс-центров станет применение молекулярных методов типирования при изучении штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки и вируса бешенства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ботвинкин А.Д., Отгонбаатар Д.* Бешенство на сопредельных территориях России и Монголии (исторический обзор). Сибирский мед. журн. 2006; 7:8–10.
2. *Шпынов С.Н., Рудаков Н.В.* Районирование территории Российской Федерации по распространению патогенных риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2008; 4:26–30.
3. *Boldbaatar B., Inoue S., Tuya N., Dulam P., Batchuluun*

D., Sugiura N. et al. Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005–2008. Jpn. J. Infect. Dis. 2010; 63(5):358–63.

4. *Dessen P., Fondrat C., Valencien C., Mugnier C.* BISANCE: a French service for access to biomolecular sequence databases. Comput. Appl. Biosci. 1990; 6(4):355–6.

5. *Fournier P.-E., Roux V., Raoult D.* Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. Int. J. Syst. Bacteriol. 1998; 48(3):839–49.

6. *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(12):5456–65.

7. *Johnson N., Black C., Smith J., Un H., McElhinney L.M., Aylan O., Fooks A.R.* Rabies emergence among foxes in Turkey. J. Wildl. Dis. 2003; 39(2):262–70.

8. *Kimura M.A.* simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. J. Mol. Evol. 1980; 16:111–20.

9. *Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics. 2001; 17:1244–5.

10. *Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M. et al.* Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. J. Wildl. Dis. 2004; 40(4):617–31.

11. *Poleshchuk E.M., Tkachev S.E., Gribencha S.V., Sidorov G.N.* Rabies virus in Russia: phylogenetic relationships based on N gene sequences. In: Japan-Russia International Workshop 2010. The 54th ISTC Japan Workshop. Current Life-Threatening Infections. Medical Countermeasures. Medical Exchange and Networks. Tokyo-Niigata; 2010. P. 28–9.

12. *Roux V., Rydkina E., Ereemeeva M., Raoult D.* Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997; 47:252–61.

13. *Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoilenko I.E., Fournier P.-E., Reshetnikova T.A., Kumpan L.V., Raoult D.* Characterisation of the Omsk collection of rickettsial strains. Clin. Microbiol. Infect. 2009; 15 Suppl 2:298–9.

14. *Shpynov S.N., Fournier P.-E., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A., Yastrebov V.K. et al.* Short report: Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 74(3):440–3.

15. *Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F.* Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986; 83:3914–8.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. *Botvinkin A.D., Otgonbaatar D.* [Rabies in contiguous areas of Russia and Mongolia: historical review]. Sibirsky Med. Zhurn. 2006; 7:8–10.
2. *Shpynov S.N., Rudakov N.V.* [Zonation of the Russian Federation's territory according to the spread of pathogenic Rickettsias of the tick-borne spotted fever group]. Med. Parazitol. Parazitar. Bol. 2008; 4:26–30.

Authors:

Shpynov S.N., Poleshchuk E.M., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A., Kumpan L.V., Kolomeets A.N., Sidorov G.N. Omsk Research Institute of Natural Focus Infections. Mira Avenue, 7, Omsk, 644080, Russia. E-mail: stan63@inbox.ru

Shpynov S.N., Rudakov N.V., Kumpan L.V. Omsk State Medical Academy. Omsk, Russia.

Tkachev S.E. Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS. Akademik Lavrentyev Avenue, 8, Novosibirsk, 630090, Russia.

Gribencha S.V. D.I.Ivanovsky Research Institute of Virology. Gamaleya St., 16, Moscow, 123098, Russia.

Об авторах:

Шпынов С.Н., Полещук Е.М., Рудаков Н.В., И.Е.Самойленко, Решетникова Т.А., Кумпан Л.В., Коломеец А.Н., Сидоров Г.Н. Омский НИИ природно-очаговых инфекций. 644080, Омск, проспект Мира, 7. E-mail: stan63@inbox.ru

Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Кумпан Л.В. Омская государственная медицинская академия. Омск.

Ткачев С.Е. Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 8.

Грибенча С.В. Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Иванова РАН. 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 16.

Поступила 22.08.11.