

В.А. Рар<sup>1</sup>, Н.М. Пуховская<sup>2</sup>, Н.П. Высокочина<sup>2</sup>, З.У. Зайнулина<sup>2</sup>, Л.Ф. Гуляко<sup>2</sup>, Л.И. Иванов<sup>2</sup>

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЭРЛИХИЙ И АНАПЛАЗМ В ТАЕЖНЫХ КЛЕЩАХ И МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ХАБАРОВСКОГО КРАЯ

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

<sup>2</sup>Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора (Хабаровск)

134 имаго таежных клещей *Ixodes persulcatus*, собранных в мае 2007 г. и 461 мелких млекопитающих, отловленных с февраля по ноябрь 2007 г. в Хабаровском крае, были исследованы на наличие эрлихий и анаплазм с помощью двухраундовой ПЦР с использованием праймеров из области гена 16S рРНК и последующего секвенирования. Было показано, что 3,7 % клещей инфицировано *Anaplasma phagocytophilum* и 5,9 % – *Ehrlichia muris* (включая случаи смешанной инфекции). ДНК *A. phagocytophilum* была обнаружена в 1 (0,9 %) из 114 образцов селезенки/печени мелких млекопитающих, отловленных на свободном от таежных клещей луговом участке. Напротив, 78 (22,5 %) из 347 мелких млекопитающих, отловленных на таежном участке, были инфицированы эрлихиями и/или анаплазмами: 22 (6,3 %) – *A. phagocytophilum*, 29 (8,4 %) – *E. muris*, 1 (0,3 %) – *Candidatus* «*Neoehrlichia mukurensis*», и 38 (11,0 %) – новым генетическим вариантом эрлихий, филогенетически схожих с *Ehrlichia sp. EHf669*. Инфицированные эрлихиями и анаплазмами мелкие млекопитающие преимущественно были отловлены в период активности клещей – с мая по сентябрь. В образцах от млекопитающих, отловленных в ноябре и феврале, была обнаружена ДНК только нового генетического варианта эрлихий.

**Ключевые слова:** анаплазмы, эрлихии, таежные клещи

## EXTENSION AND GENETIC DIVERSITY OF *EHRlichia* AND *ANAPLASMA* SPECIES IN *IXODES PERSULCATUS* TICKS AND SMALL MAMMALS AT KHABAROVSK REGION TERRITORY

V.A. Rar<sup>1</sup>, N.M. Pukhovskaya<sup>2</sup>, N.P. Vysochina<sup>2</sup>, Z.U. Zaynulina<sup>2</sup>, L.F. Gulyako<sup>2</sup>, L.I. Ivanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk

<sup>2</sup>Khabarovsk Antiplague Station, Khabarovsk

A total 134 adult *Ixodes persulcatus* ticks collected in May 2007 and 461 small mammals captured from February till November at Khabarovsk Region territory were examined to a presence of *Ehrlichia sp.* and *Anaplasma sp.* by nested PCR based on 16S rRNA gene with subsequent sequencing. It was shown that 3,7 % of *I. persulcatus* were infected by *Anaplasma phagocytophilum* and 5,9 % – by *Ehrlichia muris* (including dual infections). One (0,9 %) of 114 spleen/liver samples from small mammals captured in free from *I. persulcatus* meadow area contained *A. phagocytophilum* DNA. In contrast, 78 (22,5 %) from 347 small mammals captured in wooded area with high *I. persulcatus* prevalence were infected by *Ehrlichia/Anaplasma*: 22 (6,3 %) – by *A. phagocytophilum*, 29 (8,4 %) – by *E. muris*, 1 (0,3 %) – by *Candidatus* «*Neoehrlichia mukurensis*», and 38 (11,0 %) – by a novel *Ehrlichia* species close related to *Ehrlichia sp. EHf669*. Infected small mammals have been revealed presumably in the period of tick activity – from May to September. Small mammals captured in February and November were infected by a novel *Ehrlichia sp.* only.

**Key words:** *anaplasma*, *ehrlichia*, *ixodes persulcatus* ticks

### ВВЕДЕНИЕ

Эрлихиозы и анаплазмозы – трансмиссивные природно-очаговые инфекции, вызываемые внутриклеточными грамотрицательными бактериями семейства *Anaplasmataceae*. Жизненный цикл эрлихий и анаплазм включает стадии размножения как в служащих специфичными переносчиками иксодовых клещах, так и в являющихся резервуарными хозяевами позвоночных животных. В настоящее время известно 5 видов эрлихий и 5 видов анаплазм [12], 3 из них (*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* и *Ehrlichia ewingii*) являются патогенными для людей [7, 11]. В последние годы с помощью молекулярно-генетических методов новые генетические варианты эрлихий, филогенетически схожих с *Ehrlichia chaffeensis*, были выявлены в иксодовых клещах на территории Африки, Тибета, Та-

иланда и Японии [5, 13]. В Японии в грызунах и клещах *Ixodes ovatus* были также обнаружены бактерии «*Candidatus Neoehrlichia mukurensis*», образующие отдельный филогенетический кластер в семействе *Anaplasmataceae* [9].

Специфичными переносчиками *A. phagocytophilum*, возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), являются клещи рода *Ixodes*. Подавляющее число заболеваний ГАЧ регистрируется в США, где до 2004 г. было отмечено 2 871 случаев заболевания [4], в Европе зарегистрировано около 70 случаев инфекции. В России первый случай ГАЧ был выявлен в 2000 г. на Дальнем Востоке [3], серологически подтвержденные случаи заболевания отмечались также на Алтае, в Новосибирской и Пермской областях [2, 6].

Таежный клещ *Ixodes persulcatus* широко распространен в лесной и лесостепной зоне России — от Балтики до Дальнего Востока. Два вида эрлихий и анаплазм — возбудитель ГАЧ *A. phagocytophilum* и *Ehrlichia muris*, моноцитарные эрлихии с неизвестной патогенностью, выявлены с помощью молекулярно-генетических методов в таежных клещах в различных местах их ареала. При этом уровень инфицирования клещей *A. phagocytophilum* не превышает 4 %, а степень инфицирования клещей *E. muris* — варьирует от 3 до 13 % [1, 2, 8, 10]. Резервуарными хозяевами являются различные виды крупных и мелких млекопитающих. Трансовариальная передача *A. phagocytophilum* в клещах не установлена, поэтому наличие резервуара инфекции играет важную роль в поддержании паразитарной системы [11].

**Целью** настоящей работы являлось изучение распространения и видового разнообразия эрлихий и анаплазм в таежных клещах и мелких млекопитающих в Хабаровском крае.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор таежных клещей и образцов тканей мелких млекопитающих проводили в 2006 г. в ходе ежемесячных наблюдений на территории 2-х участков. Первый (таежный) участок расположен в 25 км к югу от Хабаровска в хвойно-широколиственном лесу на территории Большехехцирского лесного заповедника, являющегося геоботаническим эталоном южной части Приамурья. В структуре мелких млекопитающих доминировали красно-серая полевка (*Clethrionomys rufocanus*) — 70 % и восточно-азиатская лесная мышь (*Apodemus peninsulae*) — 15 %. Иксодовые клещи были представлены четырьмя видами: *Dermacentor silvarum*, *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis japonica* и *I. persulcatus* с существенным доминированием последнего — 83 %. Для анализа использовали 134 клеща *I. persulcatus*, собранных на флаг с растительности в период их пиковой численности (май), а также органы (селезенка, печень) 347 мелких млекопитающих, отловленных с февраля по ноябрь. Второй (луговой) участок находится в 15 км к северо-востоку от Хабаровска в типичном для агроценозов Хабаровского Приамурья сельскохозяйственном ландшафте, характеризующемся чередованием мелиорированных полей, лесокустарниковых колок, суходольных лугов и старых залежей. Из грызунов доминировали полевая мышь (*Apodemus agrarius*) — 50 % и большая полевка (*Microtus fortis*) — 33 %. Иксодовые клещи, преимущественно *H. concinna*, на луговом участке встречались очень редко. Для исследования были использованы органы (селезенка, печень) 114 мелких млекопитающих, отловленных на территории участка с мая по сентябрь.

Суммарные нуклеиновые кислоты были экстрагированы из клещей с помощью набора «Проба НК» (ДНК-технология, Москва), а из образцов печени и селезенки — с помощью набора для выделения РНК/ДНК НПО «Литех» (г. Москва).

ДНК эрлихий и анаплазм выявляли с использованием двухраундовой полимеразной цепной реак-

ции (ПЦР) в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена 16S рРНК, как описано ранее [14]. Первый раунд ПЦР проводили в присутствии праймеров Ehr1 (5'-gaacgaacgctggcggaagc-3') и Ehr2 (5'-agta(t/c)cg(a/g)accagatagccgc-3') (температура отжига 57 °С), а 2 раунд — в присутствии праймеров Ehr3 (5'-tgcataggaatctacctagtag-3') и Ehr4 (5'-ctaggaattccgctatcctct-3') (температура отжига 59 °С). Длина ПЦР-продукта составляла 524 н.п. Видовую принадлежность определяли посредством проведения 2-го раунда ПЦР в присутствии видоспецифичных праймеров: HGE1 (5'-cggattattctttatagcttgc-3') и HGE2 (5'-cttaccgaaccgcctacatg-3') для детекции *A. phagocytophilum*, Em1 (5'-cgaacggatagctaccatagc-3') и Em2 (5'-cgctccaaagttaagctttgg-3') для детекции *E. muris*, а также Ekh1 (5'-cagatgctctagctattatagc-3') и Ekh2 (5'-agctccaaagttaagctctgg-3') для выявления эрлихий нового генетического варианта *Ehrlichia sp. Khabarovsk 437* (температура отжига 55 °С). Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР, очищенных с использованием GFX колонок (Amersham Biosciences, США), были определены в Центре секвенирования ДНК СО РАН, г. Новосибирск. Сравнение нуклеотидных последовательностей с ранее опубликованными проведено с использованием программы BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), анализ полученных последовательностей проведен методом CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК *Ehrlichia sp. Khabarovsk 437*, выявленная в образцах печени и селезенки красно-серой полевки, зарегистрирована в базе данных GenBank под номером EF445398.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы ДНК от таежных клещей и от образцов печени и селезенки мелких млекопитающих были исследованы на наличие эрлихий и анаплазм методом двухраундовой ПЦР в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена 16S рРНК. Положительные образцы были проанализированы на наличие ДНК *A. phagocytophilum* и *E. muris* при проведении 2-го раунда ПЦР с праймерами, специфичными к данным возбудителям. Было показано, что 12 из 134 клещей инфицированы эрлихиями/анаплазмами: 4 клеща — *A. phagocytophilum*, 7 — *E. muris*, а 1 — двумя патогенами одновременно (табл. 1).

Среди отловленных на свободном от таежных клещей луговом участке 114 мелких млекопитающих только одна красно-серая полевка была инфицирована *A. phagocytophilum*, в то время как 78 из 347 мелких млекопитающих, отловленных на таежном участке, были инфицированы эрлихиями и/или анаплазмами. В 16 образцах была обнаружена ДНК *A. phagocytophilum*, в 33 — ДНК *E. muris*, в 6 — ДНК обоих возбудителей, а в 33 образцах не удалось выявить ДНК ни *A. phagocytophilum*, ни *E. muris*. Для 14 из 33 образцов были определены нуклеотидные последовательности длиной 473 н.п.; все они оказались идентичны друг другу, но отличались от имеющихся в базе данных GenBank последовательностей. Оп-

Таблица 1  
Выявление эрлихий и анаплазм в природных образцах методом двухраундовой ПЦР

Время отлова	Всего образцов	Положительные образцы*	Число (%) особей, инфицированных			
			<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. muris</i>	<i>A. novel Ehrlichia sp. Khabarovsk</i>	<i>Candidatus «Neoehrlichia mikurensis»</i>
<i>I. persulcatus</i> , таежный участок						
май	134	12 (9,0 %)	5 (3,7 %)	8 (5,9 %)		
Мелкие млекопитающие, таежный участок						
14 февраля	18	1 (5,6 %)			1	
21 марта	3	0				
27 апреля	29	2 (6,9 %)	1		1	
25 мая	34	12 (35,3 %)	4	9	1	
29 июня	38	12 (31,6 %)	10	3	2	
13 июля	47	8 (17,0 %)		3	5	
18 августа	40	11 (27,5 %)	1	7	4	
7 сентября	63	26 (41,2 %)	6	6	20	
18 октября	50	4 (8,0 %)		1	2	1
21 ноября	25	2 (8,0 %)			2	
<b>всего</b>	<b>347</b>	<b>78 (22,5 %)</b>	<b>22 (6,3 %)</b>	<b>29 (8,4 %)</b>	<b>38 (11,0 %)</b>	<b>1 (0,3 %)</b>
Мелкие млекопитающие, луговой участок						
Май-сентябрь	114	1 (0,9 %)	1 (0,9 %)			

**Примечание:** \* – включая случаи смешанной инфекции.

ределенные для 2 образцов более длинные последовательности длиной 653 н.п. также были идентичны друг другу и наиболее схожи с фрагментом рибосомального гена *Ehrlichia sp.* EHf669 (96,9 % гомологии), обнаруженного в Японии в клещах *Haemaphysalis sp.* Следует отметить, что определенные нуклеотидные последовательности отличаются от известных последовательностей эрлихий и анаплазм инсерцией одного нуклеотида (Т) в консервативной области гена. С помощью филогенетического анализа было показано, что новый генетический вариант эрлихий относится к кластеру, объединяющему большинство видов и генетических вариантов эрлихий. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК нового генетического варианта эрлихий, названного *Ehrlichia sp. Khabarovsk 437*, доступна в базе данных GenBank под номером EF445398. Проведение ПЦР в присутствии праймеров, специфичных к *Ehrlichia sp. Khabarovsk 437*, показало, что 38 из 347 мелких млекопитающих инфицированы новым генетическим вариантом эрлихий, включая 6 случаев смешанной инфекции (табл. 1). При этом наблюдались все возможные варианты смешанной инфекции, включая один случай одновременного инфицирования красно-серой полевки двумя видами эрлихий и одним видом анаплазм.

Кроме того, в 1 образце от красно-серой полевки была определена нуклеотидная последовательность длиной 473 н.п., идентичная фрагменту гена 16S рРНК *Candidatus «Neoehrlichia mikurensis»* (GenBank AB196305). Ранее ДНК *Candidatus*

*«Neoehrlichia mikurensis»* была нами обнаружена в таежном клеще в Иркутской области и в образце крови и селезенки восточноевропейской полевки (*Microtus rossiaemeridionalis*) в Новосибирской области. Относящиеся к тому же филогенетическому кластеру бактерии, называемые ранее *Ehrlichia-like «Scotti variant»*, были также обнаружены в *I. persulcatus* в Омской области [2].

Преобладающим видом грызунов в исследуемом лесном биотопе являются красно-серые полевки, они наиболее часто инфицированы эрлихиями и анаплазмами (24,5 % инфицированных особей) и, вероятно, играют основную роль в качестве природного резервуара инфекции. Численности других видов мелких млекопитающих существенно ниже. Три из 36 исследованных особей восточно-азиатской лесной мыши были инфицированы *E. muris*, 1 из 11 обыкновенных бурозубок (*Sorex araneus*) была инфицирована *Ehrlichia sp. Khabarovsk 437*, и 1 из 2 бурндуков (*Tamias sibiricus*) был инфицирован ДНК *A. phagocytophilum*.

Прокармливающиеся на мелких млекопитающих личинки и нимфы иксодовых клещей активны в период с апреля по сентябрь. Резкое увеличение числа инфицированных особей наблюдалось в период наибольшей активности клещей в мае; доля инфицированных мелких млекопитающих оставалась высока (17 – 41 %) в течение всего периода клещевой активности (табл. 1). Следует отметить, что в образцах от млекопитающих, отловленных вне периода активности иксодовых

клещей (ноябрь, февраль) была обнаружена ДНК только нового генетического варианта эрлихий.

Таким образом, на территории Хабаровского края и в таежных клещах, и в мелких млекопитающих были обнаружены ДНК *A. phagocytophilum* и *E. muris*. Кроме того, значительная часть грызунов инфицирована новым генетическим вариантом эрлихий *Ehrlichia sp.* Khabarovsk 437, а 1 полевка — *Candidatus* «Neoehrlichia mikurensis». Специфичный переносчик для *Ehrlichia sp.* Khabarovsk 437 не установлен.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Изучение генетического разнообразия анаплазм и эрлихий в паразитарных системах юга Западной Сибири и Урала / В.А. Рар, Н.Н. Ливанова, В.В. Панов, В.Б. Астанин и др. // Бюл. сиб. мед. — 2006. — Приложение № 1. — С. 116–120.
2. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане / С.Н. Шпынов, Н.В. Рудаков, В.К. Ястребов, Г.Н. Леонова и др. // Мед. паразитол. — 2004. — № 2. — С. 10–14.
3. Первый случай гранулоцитарного эрлихиоза на Дальнем Востоке Российской Федерации / Ю.Н. Сидельников, О.Ю. Медяников, Л.И. Иванов, Н.И. Здановская // Клин. мед. — 2003. — № 81. — С. 67–68.
4. Bakken J.S. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis / J.S. Bakken, J.S. Dumler // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2006. — N 1078. — P. 236–247.
5. Detection of ehrlichial DNA in *Haemaphysalis* ticks recovered from dogs in Japan that is closely related to a novel *Ehrlichia sp.* found in cattle ticks from Tibet, Thailand and Africa / H. Inokuma, T. Beppu, M. Okuda, Y. Shimada et al. // J. Clin. Microbiol. — 2004. — N 42. — P. 1353–1355.
6. Human granulocytic anaplasmosis: risk in the Cisural region, Russia / M.V. Afanasieva, N.N. Vorobyeva, E.I. Korenberg, V.I. Frizen // Int. J. Med. Microbiol. — 2006. — N 296, Suppl. 1. — P. 167–168.
7. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease / S.M. Chen, J.S. Dumler, J.S. Bakken, D.H. Walker // J. Clin. Microbiol. — 1994. — № 32. — P. 589–595.
8. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia / A.N. Alekseev, H.V. Dubinina, I. Van De Pol, L.M. Schouls // J. Clin. Microbiol. — 2001. — N 39. — P. 2237–2342.
9. Kawahara M. Ultrastructure and phylogenetic analysis of '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks / M. Kawahara, Y. Rikihisa, E. Isogai, M. Takahashi et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2004. — № 54. — P. 1837–1843.
10. Monocytic *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* ticks from Perm, Russia / M.D. Ravyn, E.I. Korenberg, J.A. Oeding, Y.V. Kovalevskii et al. // Lancet. — 1999. — N 27. — P. 722–723.
11. Parola P. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses / P. Parola, B. Davoust, D. Raoult // Vet. Res. — 2005. — N 36. — P. 469–492.
12. Reorganization of genera in the 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* / J.S. Dumler, A.F. Barbet, C.P. Bekker, G.A. Dasch et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2001. — N 51. — P. 2145–2165.
13. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet / B. Wen, R. Jian, Y. Zhang, R. Chen // J. Clin. Microbiol. — 2002. — N 40. — P. 3286–3290.
14. Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Russia / V.A. Rar, N.V. Fomenko, A.K. Dobrotvorskyy, N.N. Livanova et al. // Emerg. Infect. Dis. — 2005. — N 11. — P. 1708–1715.