Риккетсийг 23S рибосомын РНХ-ийн нуклеотидын дарааллаар илрүүлсэн дүн

Ц.Цэрэнчунт[1], Г.Дашдаваа[2], Ө.Баярсайхан[3], З.Амарбаясгалан[1], Ж.Батцэцэг[4], М.Наранхажид[1]

[1]АШУҮИС, БиоАнагаахын сургууль, Биологи тэнхим
[2]Завхан аймгийн Зоонозын өвчин судлалын үндэсний төв
[3]МУИС, ШУС, БУС-ын Биологийн тэнхим
[4]Зоонозын өвчин судлалын үндэсний төв
Цахим хаяг: narankhajid@mnums.edu.mn, Утас: 99132428

Түлхүүр үг:

Ricketsia
Удам төрлийн мод
Хачигт халдвар

Товч утга: Судалгаанд Сэлэнгэ аймгаас *I. persulcatus, D. nuttalli,* Дорноговь аймгаас *H. asiaticum,* Архангай аймгаас *H. asiaticum, D. niveus, D. nuttalli*, Баянхонгор аймгаас *H. asiaticum, D. niveus, D. nuttalli*, Хөвсгөл аймгаас *D. niveus, D. nuttalli, D. silvarum* зэрэг нийт таван зүйлийн 205 хачигны популяцид хачигт риккетсиозын үүсгэгчийг илрүүлэхээр судалгаанд хамруулсан. Төвийн болон Хангайн бүсийн зарим аймгуудаас цуглуулсан нийт 205 хачигнаас 72.6% (149/205)-д 23S rRNA генийн 412х.н урттай бүтээгдэхүүнийг ПГУ-ын аргаар илрүүлжээ. Судалгаанд хамрагдсан аймгуудын хачигны популяцид илэрсэн *Ricketsia*-ийн 23S rRNA генийн нуклеотидын дарааллыг үндэслэн байгуулсан удам төрлийн модонд Монголд ялгасан Ricketsia spp биеэ даасан бүлэг болон зурагдсан.

Үндэслэл: Хачигт халдвар нь хүнд хачгаар дамжин халдварладаг байгалийн голомтот халдварт өвчин. 1990 онд ДЭМБ-ийн 43 дугаар чуулганаар баталсан Өвчний Олон Улсын Х ангилалд хачгаар дамжин халдварладаг 28 төрлийн өвчин тэмдэглэгдснээс 11 төрөл нь хүнд өвчин үүсгэдэг.

Хачгийн тархалт бүхий бүс нутагт амьдардаг хүн амын дунд хачигт халдварын эрсдэл өндөр байдаг нь судалгаагаар тогтоогдсон. Манай орны газарзүйн өвөрмөц онцлогтой холбоотойгоор хачгийн тархалт нэмэгдэж байгаатай уялдан хүн амын дунд хачигт халдварын эрсдэл үүсэх магадлалтай.

Хачигт риккетсиоз (ХР) нь зөөвөрлөгчөөр дамжин халдварладаг зооноз өвчин юм. Одоогоор риккетсийн 30 гаруй хэвшинж бүртгэгдэж, зарим хэвшинж нь хүнд өвчин үүсгэдэг бөгөөд хачиг, бөөс зэрэг цус сорогч үе хөлтнөөр зөөвөрлөгддөг байна (CDC, 2004). *R. rikettsii* хойт, өмнөд болон төв Америкт уулын толбот халуурал өвчний үүсгэгч болдог байхад, *R. sibirica* Европ болон Азид уг халдварын үүсгэгч болдог. *R. australis* Авсрали улсад, *R. japonica* Япон улсад тус тус ХР-ын үүсгэгч болдог. Ихэнх тохиолдолд европ, ази тивд ХР-ын үүсгэгч нь *R. slovaca, R. sibirica, R. rikettsi, R. mongolotimonae* хүн амд өвчлөл үүсгэдэг. Сүүлийн жилүүдэд хачигт риккетсийн өвчлөл ихсэх хандлагатай байна. Иймд төвийн болон хангайн бүсийн зарим аймгуудад тархсан хачигт риккетсиозын үүсгэгчийг мэдрэг болон өвөрмөц чанар 98% -аас дээш молекул генетикийн аргаар илрүүлэн судлах шаардлагатай гэж үзэн энэхүү судалгааг хийж гүйцэтгэлээ.

Зорилго: Хачигт риккетсиозын үүсгэгчийг молекул генетикийн аргаар төвийн болон хангайн бүсийн зарим аймгуудад илрүүлж, филогенетикийн онцлогийг судлах

Зорилт:

1. Хачигт риккетсиозын үүсгэгчийн нуклеотидын дарааллыг тогтоох
2. Риккетсийг 23S рибосомын РНХ-ийн нуклеотидын дарааллаар үндэслэн филогенетикийн шинжилгээ хийх
3. Төвийн болон хангайн бүсийн зарим аймгуудад тархсан риккетсиозийн халдварын тохиолдлын тархалтыг тогтоох

Арга зүй: Бид энэхүү судалгааг дескриптив судалгааны загварыг ашиглан гүйцэтгэсэн. Судалгааны хүрээ ба хэрэглэгдэхүүн: 2018-2019 онуудад Төвийн болон хангайн бүсийн зарим аймгуудаас цуглуулсан 205 хачигны дээжийг авч судалгаанд хамруулаа.

Полимеразын Гинжин Урвал: Хачигнаас ДНХ–ийг ялгахдаа эдээс ДНХ ялгах цомог (DNeasy tissue kit; - Qiagen, Germany) -ийг ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу ДНХ–г ялган цэвэршүүлэв.

Риккетсийн 23S рРНХ генийн олшруулалт хийхдээ Vitorino (2003) –ийн боловсруулсан дараах праймеруудыг тус тус ашиглав. Үүнд хөтлөгч гинжний ITS/F (5'-GAT AGG TCG GGT GTG GAA G-3'), хоцрогч гинжний ITS/R (5'-TCG GGA TGG GAT CGT GTG-3') праймеруудыг ашиглан ПГУ- ын мастер холимогийн 1 дээжинд нийт хэмжээ 25 мкл байхаар бэлтгэсэн. ПГУ-аар ДНХ-ийн олшруулахдаа Biometra® TGradient Thermal Cycler (PE Applied Biometra, German) машинд олшруулаа. Үр дүнг хэмжээ тогтоогуур (тодорхой тооны хос нуклеотид бүхий дүйцүүр), эерэг, сөрөг хяналттай харьцуулан дүгнэв.

ДНХ-ийн нуклеотидын дараалал тодорхойлох арга: ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг шууд ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Amerssham Biosciences Piscataway, NJ, USA) ашиглан, ABI Prism 310 Genetic Analyzer программ ашиглан ДНХ-ийн нуклеотидын дарааллыг тогтоох автомат төхөөрөмжид "Sanger" -ийн аргаар тодорхойлов.

Филогенетикийн шинжилгээ: Риккетсийн нуклейн хүчлийн бай дарааллыг риккетсийн нуклейн хүчлийн бүрэн дарааллаас ялган авахад BLASTN программ ашигласан [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Риккетсийн зүйлүүдэд филогенетикийн анализ хийхэд Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) программын Do Blast search хайлтын систем ашиглан ГенБанкэнд байршуулсан (ncbi) монголд ялгасан зүйлтэй хамгийн төстэй бусад оронд илрүүлсэн риккетсийн зүйлүүд болон лавлагаа зүйл, хэв шинжийг сонгов.

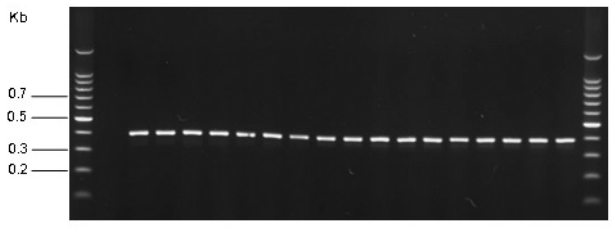
Үр дүн: Судалгаанд Сэлэнгэ аймгаас *I. persulcatus, D. nuttalli*, Дорноговь аймгаас *H. asiaticum,* Архангай аймгаас *H. asiaticum, D. niveus, D. nuttalli,* Баянхонгор аймгаас *H. asiaticum, D. niveus, D. nuttalli,* Хөвсгөл аймгаас *D. niveus, D. nuttalli, D. silvarum* зэрэг нийт таван зүйлийн 205 хачигны популяцид хачигт риккетсиозын үүсгэгчийг илрүүлэхээр судалгаанд хамруулсан (Хүснэгт 1).

Хүснэгт 1. Хачигны зүйлийн бүрдэл

Бүс	Аймаг	Хачиг тоо	Хачигны зүйлийн бүрдэл				
			I. persulcatus	*H. asiaticum*	*D. niveus*	*D. nuttalli*	*D. silvarum*
Хангай							
	Сэлэнгэ	16	12	0	0	4	0
	Дорноговь	18	0	8	0	10	0
Төв							
	Архангай	58	0	14	8	36	0
	Баянхонгор	64	0	24	3	37	0
	Хөвсгөл	49	0	0	16	31	2
Нийт		205	12	46	27	118	2

Төвийн болон Хангайн бүсийн зарим аймгуудаас цуглуулсан нийт 205 хачигнаас ДНХ-ийг ялган цэвэршүүлж, цэвэршүүлсэн ДНХ-гээс риккетсийн бай генийн ДНХ-ийг ПГУ-аар олшруулахад 23S ITS генийн 412х.н урттай бүтээгдэхүүн үүссэн. ПГУ-аар судалгаанд хамрагдсан нийт сорьцын 72.6% (149/205)-д эерэг үр дүн үзүүлэв (Зураг 1).

Хачигны популяцид илрүүлсэн риккетсийн тохиолдлыг судалгаанд хамрагдсан аймгуудаар авч үзвэл хачигт риккесиозын хамгийн өндөр халдварлалтын хувь Хөвсгөл аймагт 85.7% (42/49), хамгийн бага халдварлалт Дорноговь аймагт 62.5% (5/18) тус тус илэрсэн (Хүснэгт 2).



Зураг 1. Риккетсийн 23S ITS генийн ДНХ-г ПГУ–аар олшруулсан дүн

Тайлбар: SM – хэмжээ тогтоогуур (100х.н-ийн нарийвчлалтай), NC – сөрөг хяналт, PC – эерэг хяналтаар Rickettsia sp-ийн 23S ITS генийн 412х.н урттай бай дарааллыг олшруулав. 1-16 дугаар сорьцод илэрсэн Rickettsia sp-ийн 23S ITS генийн 412х.н урттай бай дараалал.

Хүснэгт 2. Хачигны популяцид илрүүлсэн риккетсийн тохиолдол (аймгуудаар)

Аймаг	ДНХ ялгасан сорьцны тоо	ПГУ эерэг сорьцны тоо	Халдварлалтын хувь
Сэлэнгэ	16	8	72.7
Дорноговь	18	5	62.5
Архангай	58	41	70.6
Баянхонгор	64	53	84.1
Хөвсгөл	49	42	85.7
Нийт	205	149	72.6

Хачигт риккетсиозын тохиолдлыг эзэн амьтдаар авч үзвэл хамгийн их халдварлалтын хувь үхэрт ассан хачганд 78.5% (22/28), хонинд ассан хачганд 76,1% (16/21), малын бэлчээрээс цуглуулсан хачганд 73% (38/52) тус тус илэрсэн (Хүснэгт 3).

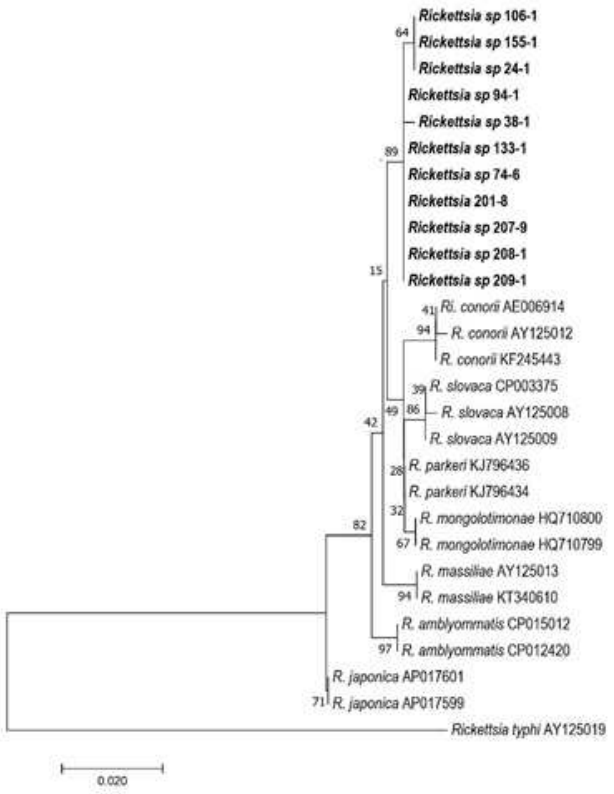
Монгол орны хачигны популяцид илэрсэн *Ricketsia*-ийн 23S rRNA генийн нуклеотидын дарааллыг үндэслэн филогенетикийн модыг Bootstrap replication 1000 байхаар тооцоолж, Tamura-Nei загвар ашиглан Maximum Likelihood аргаар Genbank-нд бүртгэлтэй АНУ-д ялгасан Rickettsia typhi (AY125019)-ийг аутгрупп болгон байгуулсан. Удам төрлийн модонд филогенетикийн дүн шинжилгээ хийхэд *Rickettsia*

conorii (AE006914, AY125012, KF245443)-ийн гурван жишиг дараалал биеэ даасан бүлэг (clade), *Rickettsia slovaca* (CP003375, AY125008, AY125009) гурван жишиг дараалал биеэ даасан бүлэг (clade), *R. parkeri* (KJ796436, KJ796434) болон *R. mongolotimonae* (HQ710800, HQ710799)-ийн дөрвөн жишиг дараалал биеэ даасан бүлэг, *R. massiliae* (AY125013, KT340610)-ийн дарааллууд нэг бүлэг, *R. amblyommatis* (CP015012, CP012420)-ийн дарааллууд биеэ даасан нэг бүлэг, *R. japonica* (AP017601, AP017599)-ийн дарааллууд биеэ даасан нэг бүлэг, Монголд ялгасан *Rickettsia sp* (106-1, 155-1, 24-1, 94-1, 38-1, 133-1, 74-1, 201-8, 207-9, 208-1, 209-1)-ийн дарааллууд биеэ даасан нэг бүлэг (clade) болон зурагдсан (Зураг 2).

Хүснэгт 3. Хачигт риккетсиозын тохиолдол (эзэн амьтдаар)

Эзэн (эх үүсвэр)	Хачиг	Хачгаар халдварласан эзэн амьтны тоо	Риккетсийг ПГУ-аар илрүүлсэн дүн	Риккетсийн халдварлалтын хувь (%)
Тэмээ	*H. asiaticum*	16	8	50
	D. nutallii	20	17	85
	D. nivues	6	2	33.3
	Бүгд	42	27	64.2
Морь	*D. nivues*	5	2	40
	D. nutallii	18	14	77.7
	Бүгд	23	16	69.5
Хонь	*D. nutallii*	18	14	77.7
	D. nivues	3	1	33.3
	Бүгд	21	16	76.1
Ямаа	*H. asiaticum*	14	11	78.5
	D. nutalli	20	18	90
	D. nivues	3	1	33.3
	Бүгд	37	19	51.3
Үхэр	*H. asiaticum*	5	3	60
	D. nivues	3	1	33.3
	D. nutallii	20	18	90
	Бүгд	28	22	78.5
Хүн	*D. nutallii*	2	1	50
	Бүгд	2	1	50
Бэлчээр	*D. nutalli*	20	17	85
	D. nivues	3	1	33.3
	D. silvarum	2	1	50
	H. asiaticum	21	17	80.9
	I. persulcatus	6	2	33.3
	Бүгд	52	38	73
Нийт		205	149	72.6

Удам төрлийн модонд *Rickettsia* төрөлд хамрагдах есөн зүйлийн нийт хорин найман 23S ITS генийн дарааллуудаас *Rickettsia*-ийн төрөлд багтах хорин таван дарааллууд нь нэг мөчрөөс салж Rickettsia conorii -ийн дарааллууд нэг бүлэг, *R. parkeri* болон *R. mongolotimonae*-ийн дарааллууд нэг бүлэг болон зурагдсан буюу тус тусдаа салангид мөчирт хуваагдан зурагдсан байна. Харин *Rickettsia typhi* нь аутгрупп болж салсан бөгөөд босго (cut off) утгыг 70% авсан болно (Зураг 2).



Зураг 2. Судалгаанд хамрагдсан аймгуудын хачигны популяцид илэрсэн *Ricketsia*-ийн 23S rRNA генийн нуклеотидын дарааллыг үндэслэн байгуулсан удам төрлийн мод

Тайлбар: *Ricketsia*-ийн 23S rRNA генийн удам төрлийн модыг бүүтстреп репликаци 1000 байхаар тооцоолж, Tamura-Nei загвар ашиглан Maximum Likelihood аргаар байгуулсан.

Хэлцэмж: *Ricketsia*-ийн төрлүүдийн зүйлийн олон янз байдал 23S rRNA генийн нуклеотидын дараалал дахь генетикийн хэлбэлзэл нь сайн судлагдсан байдаг[3,5,7]. Харин хүнд халдварладаг зарим зүйлийн *Ricketsia*-ийн доторх удам зүйн хувьсал, генетикийн олон янз байдлын ач холбогдол зэрэг нь бүрэн судлагдаагүй хэвээр байна[4]. Гэсэн хэдий ч *Ricketsia*-ийн генетикийн олон янз байдал, популяцийн бүтцийг сайн ойлгох нь эзэн амьтдын өвөрмөц байдал эсвэл газарзүйн онцлогтой холбоотой ойлголтыг өгдөг тул хяналт, урьдчилан сэргийлэх хөтөлбөрийг хэрэгжүүлэхэд чухал ач холбогдолтой учраас энэ чиглэлийн судалгаа сүлийн жилүүдэд эрчимтэй хийгдэж байна[3-9].

Rickettsia төрлийн 23S rRNA генийн нуклеотидын дараалалд 857-1258 дугаар байрлалаас 412 bp-ийн өгөгдөл Genbank-нд голчлон бүртгэгдсэн байна[4-7]. Ийм учраас бид энэхүү судалгаандаа тусгаарлагдмал болон олон төрлийн Rickettsia-ийн төрөл зүйл, омог хэв шинжийг харьцуулахын тулд энэхүү дарааллын өгөгдлийг (412 bp) филогенетик шинжилгээнд ашиглав. *Rickettsia* төрлийн 23S rRNA генийн нуклеотидын дарааллыг үндэслэн филогенетикийн модыг байгуулан филогенетикийн дүн шинжилгээ хийхэд *Rickettsia* conorii -ийн гурван жишиг дараалал биеэ даасан бүлэг (clade), *Rickettsia* slovaca-ийн гурван жишиг дараалал биеэ даасан бүлэг, *R. parkeri* болон *R. mongolotimonae*-ийн дөрвөн жишиг дараалал биеэ даасан бүлэг, *R. massiliae*-ийн дарааллууд нэг бүлэг, *R. amblyommatis*-ийн дарааллууд биеэ даасан нэг бүлэг, *R. japonica*-ийн дарааллууд биеэ даасан нэг бүлэг, Монголд ялгасан *Rickettsia sp*-ийн дарааллууд биеэ даасан нэг бүлэг (clade) болон зурагдсан нь R*icketsia*-ийн хувьд удамшлын хувьсамтгай байдал, омог, хэв шинжийн олон янз байдал нь эзэн амьтдын зүйлийн олон янз байдал, газарзүйн байрлал, байгалийн бүс бүслүүрээс шалтгаалдаг гэсэн судлаачдын үр дүнтэй дүйж байна.

Дүгнэлт:

1. *Ricketsia*-ийн 23S rRNA генийн 412 хос нуклеотидын дарааллийг тогтоон нуклеотидын солигдолтыг үнэлэхэд C суурь T сууриар солигдох магадлал харьцангуй өндөр (50.14%) байгаа нь 23S rRNA генийн нуклеотид бусад генүүдтэй харьцуулахад 2.5 дахин их трансицид өртөгтэй холбоотой.
2. Монголд ялгасан *Rickettsia sp*-ийн дарааллууд харьцангуй биеэ даасан нэг бүлэг (clade) болон зурагдсан нь эзэн амьтдын өвөрмөц байдал, газарзүйн онцлогтой холбоотой.
3. Төвийн бүсэд хамрагдах Баянхонгор 84.1%, Хөвсгөл 85.7 аймгуудад риккетсиозийн халдварын тохиолдлын тархалт өндөр байгаа нь хачгийн популяцийн нягтралшилтай холбоотой.

Ном зүй:

1. *Bilings, A., Teltow, G., Weaver, S., and Waker, D. 1998. Molecular characterization of a novel rickettsia species from Ixodes scapularis in Texas. Emerg. Infect. Dis. Apr.-Jun. 4: 305—309.*
2. *Eremeeva, M., Beati, L., Makarova, V.A., Fetisova, N.F., Tarasevitch, I.V., Balayeva, N.M., and Raoult, D. 1994. Astrakhan fever rickettsiae: antigenic and genotypic analysis of isolates obtained from human and Rhipicephalus pumilio ticks. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51: 697—709.*
3. *Fournier P-E, El Karkouri K, Leroy Q, Robert C, Giumelli B, Renesto P, et al. Analysis of the Rickettsia africae genome reveals that virulence acquisition in Rickettsia species may be explained by genome reduction. BMC Genomics. 2009;10: 166. pmid:19379498*
4. *Fujita, H., Takada, N., Isogai, E., Watanabe, Y., and Ito, T. 2000. Isolation of spotted fever group rickettsiae from Ixodes persulcatus ticks in the central part Hokkaido, Japan. Med. Entomol. Zool. 51: 55—58.*
5. *Gillespie JJ, Driscoll TP, Verhoeve VI, Utsuki T, Husseneder C, Chouljenko VN, et al. Genomic Diversification in Strains of Rickettsia felis Isolated from Different Arthropods. Genome Biol Evol. 2014;7: 35–56. pmid:25477419*
6. *Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016; 1–11.*
7. *Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. Biol Rev. 2011;86: 379–405. pmid:20716256*
8. *Murray GGR, Weinert LA, Rhule EL, Welch JJ. The Phylogeny of Rickettsia Using Different Evolutionary Signatures: How Tree-Like is Bacterial Evolution? Syst Biol. 2016;65: 265–279.*
9. *Mutai BK, Wainaina JM, Magiri CG, Nganga JK, Ithondeka PM, Njagi ON, et al. Zoonotic Surveillance for Rickettsiae in Domestic Animals in Kenya. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2013;13: 360–366.*

Molecular evidence of tick borne rickettsiosis using 23S rRNA gene sequences

Ts.Tserenchunt[1], G.Dashdavaa[2], J.Battsetseg[3], U.Bayarsaikhan[4], Z.Amarbayasgalan[1], M.Narankhajid[1]

[1]Mongolian National University of Medical Sciences, Department of Biology
[2]National Center for Zoonotic Diseases, Zavkhan
[3]National Center for Zoonotic Diseases
[4]National University of Mongolia, School of Arts and Sciences, Department of Biology
Email:narankhajid@mnums.edu.mn, Tel: 99132428

In total, there are 205 populations of ticks of five species, including *I. persulcatus, D. nuttalli* from Selenga province, *H. asiaticum* from Dornogovi province, *H. asiaticum, D. niveus, D. nuttalli* from Arkhangai province, *H. asiaticum, D. niveus, D. nuttalli* from Bayankhongor province, *D. nuttalli, D. silvarum, D. niveus* from Khuvsgul province were included in the study to detect tick-borne rickettsiosis. Of the total number of 205 ticks collected in some provinces of the Central and Khangai regions, 72.6% (149/205) of rickettsia with the 23S ITS gene length of 412 bp were detected by PCR method. Ricketsia spp was isolated as an independent clade isolated in Mongolia from a phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of the Ricketsia 23S rRNA gene found in tick populations in the studied provinces.

Key word: Tick borne disease, sequence, phylogenetic tree