



© Ю. Ю. Илинский<sup>1,2</sup>,  
М. А. Юдина<sup>2</sup>, Е. А. Калмыкова<sup>2</sup>,  
Р. А. Быков<sup>1</sup>, Н. П. Высочина<sup>3</sup>,  
Н. П. Винарская<sup>4</sup>,  
И. К. Захаров<sup>1,2</sup>

УДК 579.262, 591.557

## ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ЭНДОСИМБИОТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИЕЙ *WOLBACHIA* ВИДОВ БЛОХ (SIPHONAPTERA: INSECTA) СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ И ХАБАРОВСКОГО КРАЯ

### ВВЕДЕНИЕ

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск;

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет;

<sup>3</sup> ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора;

<sup>4</sup> ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

✳ **Матерински наследуемая симбиотическая бактерия *Wolbachia* широко распространена среди членистоногих и некоторых нематод. Она обнаружена во всех главных отрядах насекомых, но некоторые таксономические группы остаются мало исследованными.**

**Мы провели скрининг коллекции одной из таких групп, а именно 15 видов блох (Siphonaptera), 252 образца, собранных на территории Свердловской области и Хабаровского края. Для шести видов впервые установлен факт инфицированности *Wolbachia*. На основании анализа литературных и наших данных мы оцениваем, что как минимум 500 видов из 2 тыс. описанных к настоящему времени могут оказаться инфицированными *Wolbachia*.**

✳ **Ключевые слова:** *Wolbachia*; Siphonaptera; биоразнообразие; симбиоз; популяция.

Поступила в редакцию 30.08.2012  
Принята к публикации 22.11.2012

Виды отряда блох (Siphonaptera) — это высокоспециализированные эктопаразиты млекопитающих и птиц. Строгая специфичность по отношению к хозяину существует только у блох летучих мышей, остальным представителям отряда присущ широкий спектр хозяев. Классификация блох неоднократно претерпевала изменения и не может считаться окончательной (Wagner, 1939; Jordan, 1948; Smit, 1982). В нашей работе мы используем классификацию, предложенную С. Г. Медведевым, согласно которой выделяются четыре инфраотряда: Pulicomorpha, Pygiopsyllomorpha, Hystrichopsyllomorpha и Ceratophylloporpha, включающие более 2 тыс. видов (Медведев, 1990, 1994, 1998, 2009). При этом описанная фауна Палеарктики значительно превосходит по объему любые другие области (Медведев, 2009).

Блохи могут выступать как самостоятельные болезнетворные агенты, в частности, вызывать кожные заболевания, такие как пуликоз (*Pulex irritans*) и саркопиллез (*Tunga penetrans*). Кроме того, они являются переносчиками более двух десятков инфекционных агентов (Whiting et al., 2008; Росс и др., 1987). Следует отметить, что в исследованиях блох отдается предпочтение отдельным видам, таким как *Pulex irritans*, *Ctenocephalides felis*, *C. canis*, *Spilopsyllus cuniculi*, *Xenopsylla cheopis* — блохи человека, кошек, собак, кроликов и крыс соответственно.

Альфа-протеобактерия *Wolbachia* — матерински наследуемый внутриклеточный симбионт членистоногих и некоторых паразитических нематод. Среди насекомых, по разным оценкам, *Wolbachia* может быть обнаружена у 15–66 % видов насекомых (Werren, 1997; Jeyaprasath, Hoy, 2000; Hilgenboecker et al., 2008; Zag, Hammerstein, 2012). К началу проведения нашего исследования присутствие *Wolbachia* было отмечено только для 25 видов блох, которые относятся к трем наиболее многочисленным инфраотрядам отряда Siphonaptera: Pulicomorpha, Hystrichopsyllomorpha и Ceratophylloporpha. В основном в работах исследовались образцы видов, собранные на территории Северной и Южной Америки (Gorham et al., 2003; Dittmar, Whiting, 2004; Luchetti et al., 2005), за исключением работы по кошачьей блохе (*Ctenocephalides felis*) из Франции (Rolain et al., 2003).

Уровень инфицированности может сильно различаться между видами: от 7 % у *Ctenocephalides canis* до 94 % у *Pulex simulans* (Gorham et al., 2003). Отмечается и высокая вариабельность уровня инфекции среди популяций разных частей ареала. Так, в различных сборах популяций песчаной блохи *Tunga penetrans* показано как отсутствие *Wolbachia* (Luchetti et al., 2004), так и тотальная зараженность (Fischer et al., 2002; Heukelbach et al., 2004; Luchetti et al., 2005). Кроме того, для этого вида выявлен факт суперинфицированности, т. е. присутствие в одной особи филетически удаленных штаммов *Wolbachia* (Luchetti, 2005).

Исследования инфицированности *Wolbachia* видового разнообразия блох на обширной территории Северной Евразии и, в частности России, отсутствуют.

Нами был проведен поиск фактов инфицированности эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* среди видов блох, обитающих на территории Свердловской

области и Хабаровского края, образцы которых были собраны в 2009 и 2011 гг. соответственно. В данной работе мы впервые показали инфицированность *Wolbachia* для шести видов блох: *Doratopsylla birulai*, *Hystrichopsylla talpae*, *Neopsylla acanthina*, *Frontopsylla elata botis*, *Megabothris advenarius*, *M. calcarifer*. Учитывая результаты более ранних работ (Fischer et al., 2002; Gorham et al., 2003; Dittmar, Whiting, 2004; Heukelbach et al., 2004; Luchetti et al., 2005; Sekeyova et al., 2012), мы констатируем 31 симбиотическую ассоциацию Siphonaptera-*Wolbachia*. По нашим оценкам, как минимум 500 из описанных к настоящему моменту 2 тыс. видов блох могут оказаться инфицированными *Wolbachia*.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Коллекция блох.** Коллекция блох создана на основе сбора насекомых с диких животных на территории Свердловской области (2009 г.) и Хабаровского края (2011 г.) и включает 252 образца (табл. 1). Видовое разнообразие представлено 15 видами, которые относятся к двум инфраотрядам: (1) Hystrichopsyllomorpha — сем. Hystrichopsyllidae 9 видов; (2) Ceratophyllomorpha — сем. Ceratophyllidae, 4 вида, и сем. Leptopsyllidae, 2 вида. Вид *Palaeopsylla sorecis* был представлен как в сборах Свердловской области, так и Хабаровского края. До выделения ДНК коллекция блох хранилась в 96%-м спирте при температуре -20 °C.

**Выделение ДНК и установление статуса инфицированности.** Экстракцию ДНК проводили общепринятыми методом (Magnum, 1961) с модификациями. Блох индивидуально гомогенизировали в 100 µl экстрагирующего буфера (10 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 25 mM ЭДТА, 0,5 % SDS, 0,1 M NaCl) и инкубировали при +56 °C в течение 5 часов. После преципитации ДНК растворяли в 100 µl бидистиллированной воды.

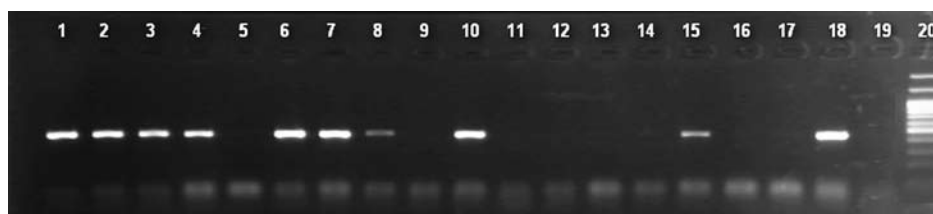
Все образцы ДНК проверялись на качество посредством амплификации с универсальными для насекомых праймерами 28sF3633 (5'-TACCGTGAGGGAAAGTTGAAA-3') и 28sR4076 (5'-AGACTCCTTGGTCCGTGTTT-3') (Choudhury, Werren, не опубликовано). Статус инфицированности устанавливали на основе амплификации ДНК со специфичными праймерами к 16SrRNA гену *Wolbachia* (рис. 1) W-Spec1 5'-CATACSTATTCGAAGGGATAG-3' и W-Spec2 5'-AGCTTCGAGTGAACCAATTC-3' (Werren, Windsor, 2000). Дополнительно к этому *Wolbachia*-позитивные об-

Таблица 1

**Инфицированность эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* коллекции блох, собранных на территории Свердловской области (Св) и Хабаровского края (Хб)**

| Вид  | Территория сбора | Число образцов (инфицированных образцов); % |
|--|------------------|---|
| Инфраотряд Hystrichopsyllomorpha, семейство Hystrichopsyllidae |                  |   |
| <i>Catalagia striata</i>                                       | Хб               | 1 (0); 0                                    |
| <i>Ctenophthalmus congeneroides</i>                            | Хб               | 62 (0); 0                                   |
| <i>Ct. pisticus pacificus</i>                                  | Хб               | 9 (0); 0                                    |
| <i>Doratopsylla birulai</i>                                    | Хб               | 5 (1); 20                                   |
| <i>Hystrichopsylla microti</i>                                 | Хб               | 7 (0); 0                                    |
| <i>H. talpae</i>   | Св               | 10 (8); 80                                  |
| <i>Neopsylla acanthina</i>                                     | Хб               | 11 (1); 9,1                                 |
| <i>Palaeopsylla sorecis</i>                                    | Хб               | 1 (0); 0                                    |
|  | Св               | 3 (0); 0                                    |
| <i>Stenoponia sidimi</i>                                       | Хб               | 2 (0); 0                                    |
| Инфраотряд Ceratophyllomorpha, семейство Ceratophyllidae       |                  |   |
| <i>Frontopsylla elata botis</i>                                | Хб               | 20 (13); 65                                 |
| <i>Megabothris advenarius</i>                                  | Хб               | 13 (5); 38,5                                |
| <i>M. calcarifer</i>   | Хб               | 23 (1); 4,3                                 |
| <i>Monopsyllus indages</i>                                     | Хб               | 1 (0); 0                                    |
| Инфраотряд Ceratophyllomorpha, семейство Leptopsyllidae        |                  |   |
| <i>Leptopsylla bidentata</i>                                   | Св               | 2 (0); 0                                    |
| <i>L. pectiniceps</i>  | Хб               | 82 (0); 0                                   |

разцы в дальнейшем также проверяли с праймерами к генам *gatB* (5'-GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT-3', *gatBR1*: 5'-TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA-3' (Baldo et al., 2006) и *wsp* (81F 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3', 691R 5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3' (Zhou et al., 1998). Реакционная смесь общим объемом 20 µl содержала 2 µl ПЦР-буфера (Медиген, Новосибирск), 2 µl dNTP (0,8 mM), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (3,0 mM), по 4 µl каждого праймера (0,3 mM), 0,5 U Taq-полимеразы. Условия ПЦР: 30 циклов, первичная денатурация +94 °C 2', затем +94 °C 30'' в каждом цикле, отжиг праймеров: +54 °C — 50'' для 28sF3633/R4076 и +55 °C — 45'' для W-Spec; элонгация для 28SrRNA — 1' и для W-Spec — 1'30'', финальная элонгация в течение 9'. Ампликоны визуализировали в 1,5 % агарозном геле.



**Рис. 1.** Электрофорерограмма ампликонов гена 16SrRNA *Wolbachia*. Дорожки: 1–13 — *Frontopsylla elata botis*, 14–17 — *Doratopsylla birulai*, 18 — положительный контроль (линия w153 *Drosophila melanogaster*, генотип *Wolbachia* wMelCS), 19 — отрицательный контроль, 20 — маркер молекулярных масс 100 bp + 1,5 Kb + 2,0 Kb

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все выделенные образцы ДНК оказались надлежащего качества, после скрининга эндосимбиотическая бактерия была обнаружена у видов-представителей обоих инфраотрядов: *Hystriochopsyllomorpha* и *Ceratophyllomorpha*. В нашем исследовании все случаи присутствия инфекции выявлены впервые. В целом *Wolbachia*-позитивными оказались 40 % видового разнообразия коллекции и 11 % общего числа образцов (табл. 1).

Количество экземпляров каждого вида в изучаемой коллекции варьирует от 1 до 82. Исходя из этого, мы разделили коллекцию на две группы: [1] виды, представленные малым (от 1 до 13) и [2] — значительным числом образцов (от 20 до 82). Среди первой группы у 4 из 11 видов была обнаружена *Wolbachia*, что может указывать на высокую долю инфицированных бактерией особей в популяции этих видов. При этом отсутствие *Wolbachia* во второй группе коллекции: *Leptopsylla pectiniceps* (82 особи) и *Ctenophthalmus congeneroides* (62) вовсе не означает, что эти виды свободны от *Wolbachia*. Действительно, Hilgenboecker et al. (2008) констатировали феномен распределения *Wolbachia* внутри отдельно взятого вида на очень высоком (>90 %) или низком уровне (<10 %).

Высокая концентрация инфицированных особей в популяциях может указывать как на то, что бактерии вызывают какие-либо репродуктивные аномалии, так и на то, что симбиоз носит мутуалистический характер. Общеизвестно, что у членистоногих бактерия вызывает различные репродуктивные аномалии: цитоплазматическую несовместимость, андродид, феминизацию и партеногенез (последние 3 приводят к сдвигу в соотношении полов). Однако для представителей блох нет никакой информации о возможной биологической роли *Wolbachia*. Так, регистрируемые случаи сдвига в соотношении полов в популяциях блох (Gogham et al., 2003) могут объясняться не влиянием *Wolbachia*, как отмечают сами авторы, а половым диморфизмом, когда самцы характеризуются более короткой продолжительностью жизни (Marshall, 1981).

В нашей работе впервые получены данные о статусе инфицированности *Wolbachia* 15 видов блох для ранее неисследованного биоразнообразия и ареала, что существенно дополняет наше представление о распространенности эндосимбиотической бактерии *Wolbachia* среди видов отряда Siphonaptera. Суммируя ранее опубликованные и наши результаты мы констатируем о 31 факте симбиотической ассоциации «*Wolbachia* — виды отряда Siphonaptera». Мы попытались оценить уровень распространения бактерии среди видов блох. Dittmar и Whiting (2004) выявили инфицированность *Wolbachia* у 20 из 79 видов блох (25 %), но при этом анализировалась только одна особь от каждого вида. Следовательно, данное значение можно рассматривать как нижнюю границу инфицированности среди блох, в частности, таких больших инфраотрядов как *Hystriochopsyllomorpha* и *Ceratophyllomorpha*. В нашем

исследовании общая зараженность *Wolbachia* составила 40 %, что, на наш взгляд, также можно рассматривать как заниженное значение, поскольку в большинстве своем выборки видов немногочисленны. Таким образом, принимая оценку нижней границы инфицированности блох на уровне 25 %, и экстраполируя на описанное видовое разнообразие, как минимум 500 видов отряда Siphonaptera инфицировано *Wolbachia*. В действительности это значение может оказаться значительно выше.

Результаты анализов нуклеотидного разнообразия среди изолятов *Wolbachia* из различных видов блох демонстрируют несколько филетических линий (Ros et al., 2009), которые относятся к паразитам (артропод-инфицирующим) и мутуалистам (нематод-инфицирующим). Поэтому дальнейшее направление исследований требует проведения филогенетического анализа выявленных изолятов *Wolbachia* на основе современного протокола описания штаммов (Baldo et al., 2006), а также расширения скрининга видового разнообразия и ареала исследования.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность к. б. н. В. А. Пар (ИХБФМ СО РАН) за помощь в осуществлении исследования. Работа частично поддержана Российским Фондом Фундаментальных исследований № 12-04-31784-мол\_а, № 12-04-01319-а и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: Современное состояние и проблемы развития», проект № 30.33.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Медведев С. Г., 1990. Классификация блох и проблемы ее обоснования // Успехи медицинской энтомологии и акарологии в СССР. С. 20—22.
2. Медведев С. Г., 1998. Классификация отряда блох (Siphonaptera) и ее теоретические предпосылки // Энтомологическое обозрение. Т. 77. С. 916—934.
3. Медведев С. Г., 1994. Морфологические основы классификации отряда блох (Siphonaptera): Автореф. дис... докт. биол. наук. СПб, 50 с.
4. Медведев С. Г., 2009. Систематика и географическое распространение и пути эволюции блох // Труды зоологического института РАН. Т. 313. С. 273—282.
5. Росс Г., Росс Ч., Росс Д., 1985. Энтомология. М.: Мир. 576 с.
6. Baldo L., Dunning Hotopp J. C., Jolley K. A., et al., 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis* // Applied Environmental Microbiology. Vol. 72. P. 7098—7110.
7. Dittmar K., Whiting M. F., 2004. New *Wolbachia* endosymbionts from nearctic and neotropical fleas (Siphonaptera) // J. Parasitol. Vol. 90. P. 953—957.
8. Fischer P., Schmetz C., Bandi C. et al., 2002. *Tunga penetrans*: molecular identification of *Wolbachia* endobacteria and their recognition by antibodies against

- proteins of endobacteria from filarial parasites // *Experimental Parasitology*. Vol. 102. P. 201–211.
9. Gorham C.H., Fang Q.Q., Durden L.A., 2003. *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera) // *J. Parasitol.* Vol. 89. P. 283–289.
  10. Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P. et al., 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? — A statistical analysis of current data // *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 281. P. 215–220.
  11. Jeyaprakash A., Hoy M.A., 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76 % of sixty-three arthropod species // *Insect Molecular Biology*. Vol. 9, N 4. P. 393–405.
  12. Luchetti A., Mantovani B., Fioravanti M.L., Trentini M., 2004. *Wolbachia* infection in the newly described Ecuadorian sand flea, *Tunga trimamillata* // *Exp. Parasitol.* Vol. 108. P. 18–23.
  13. Luchetti A., Mantovani B., Trentini M., 2005. *Wolbachia* superinfection in an Ecuadorian sample of the sand-flea *Tunga penetrans* (Preliminary note) // *Bull. Ins.* Vol. 58. P. 93–94.
  14. Pampiglione S., Fioravanti M.L., Gustinelli A. et al., 2009. Sand flea (*Tunga* spp.) infections in humans and domestic animals: state of the art // *Medical and Veterinary Entomology*. Vol. 23. P. 172–186.
  15. Rolain J.-M., Franc M., Davoust B., Raoult D., 2003. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis* and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France // *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9. P. 338–342.
  16. Ros V.I. D., Fleming V.M., 2009. How diverse is the Genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mite (Acari: Tetranychidae) // *Applied and Environment Microbiology*. Vol. 7. P. 1036–43.
  17. Werren J.H., 1997. Biology of *Wolbachia* // *Annual Review of Entomology*. Vol. 42. P. 587–609.
  18. Whiting M.F., Whiting A.S., Hastriter M.W. et al., 2008. A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera) and host association // *Cladistics*. Vol. 24. P. 677–707.
  19. Zag P., Hammerstein P., 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected // *PloS ONE*. Vol. 7. I. 6. e38544.

**WOLBACHIA INFECTION AMONG FLEAS (SIPHONAPTERA: INSECTA) OF SVERDLOVSK REGION AND Khabarovsk Territory**

*Ilinsky Yu. Yu., Yudina M. A., Kalmykova E. A., Bykov R. A., Vysochina N. P., Vinarskaya N. P., Zakharov I. K.*

✪ **SUMMARY:** *Wolbachia* are maternally inherited symbiotic bacteria that are widespread among arthropods and filarial nematode parasites. It has been found in all main insect orders although some of them are still insufficiently studied. We performed PCR-screening for 15 species, 252 samples of fleas (Siphonaptera), that had been collected in the Sverdlovsk region and Khabarovsk territory. Six new symbiotic associations of *Wolbachia*-Siphonaptera were found for the first time. On the basis of earlier published data and the results of the current study we estimate that a minimum of 500 out of 2000 species in the Siphonaptera order are infected with *Wolbachia*.

✪ **KEY WORDS:** *Wolbachia*; Siphonaptera; biodiversity; symbiosis; population.

✪ **Информация об авторах**

**Илинский Юрий Юрьевич** — н.с., к.б.н. Лаборатория генетики популяций. Институт цитологии и генетики СО РАН. Кафедра цитологии и генетики Новосибирского государственного университета. 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, д. 10. E-mail: paulee@bionet.nsc.ru.

**Юдина Мария Александровна** — студентка. Кафедра цитологии и генетики. Новосибирский государственный университет. 630090, Новосибирск, Пирогова ул., д. 2. E-mail: marijudina@gmail.com.

**Калмыкова Екатерина Алексеевна** — студентка. Кафедра цитологии и генетики. Новосибирский государственный университет. 630090, Новосибирск, Пирогова ул., д. 2. E-mail: ekkalm@yandex.ru.

**Быков Роман Андреевич** — аспирант. Лаборатория генетики популяций. Институт цитологии и генетики СО РАН. 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, д. 10. E-mail: bikovra@gmail.com.

**Височина Нэля Павловна** — зав. лаб. (без степени). Зоолого-паразитологическая лаборатория. Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора. 680031, Хабаровск, Санитарный пер. д. 7. E-mail: neljavis@mail.ru.

**Винарская Наталья Петровна** — к.б.н., с.н.с. Лаборатория арбовирусных инфекций. Омский НИИ природно-очаговых инфекций. 644080, Омск, пр-т Мира, д. 7. E-mail: vinarskayan@inbox.ru.

**Захаров Илья Кузьмич** — д.б.н., профессор, заведующий. Лаборатория генетики популяций. Институт цитологии и генетики СО РАН. Кафедра цитологии и генетики Новосибирского государственного университета. 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, д. 10. E-mail: zakharov@bionet.nsc.ru.

**Ilinsky Yuri Yuryevich** — Candidate of Biological Sciences. Institute of Cytology and Genetics. Laboratory of Populations Genetics. Novosibirsk State University, Department of Cytology and Genetics. 630090, Novosibirsk, Lavrentyeva pr., 10. Russia. E-mail: paulee@bionet.nsc.ru.

**Yudina Mariya Aleksandrovna** — Student. Novosibirsk State University. Department of Cytology and Genetics. 630090, Novosibirsk, Pirogova ul, 2. Russia. E-mail: marijudina@gmail.com.

**Kalmykova Ekaterina Alekseevna** — Student. Novosibirsk State University. Department of Cytology and Genetics. 630090, Novosibirsk, Pirogova ul, 2. Russia. E-mail: ekkalm@yandex.ru.

**Bykov Roman Andreyevich** — Postgraduate student. Institute of Cytology and Genetics. Laboratory of Populations Genetics. 630090, Novosibirsk, Lavrentyeva prospect, 10. Russia. E-mail: bikovra@gmail.com.

**Vysochina Nelya Pavlovna** — Head of the laboratory. Khabarovsk Antiplague Station. 680031, Khabarovsk, Sanitarnyy per., 7. E-mail: neljavis@mail.ru.

**Vinarskaya Natalya Petrovna** — Can. of Biological Sciences. Omsk State Research Institute of Natural Foci Infections. Lab. of Arthropod-Borne Viral Infections. 644080, Omsk, Mira pr., 7. Russia. E-mail: vinarskayan@inbox.ru.

**Zakharov Ilya Kuzmich** — Doctor of Biological Sciences, Professor Head of the laboratory. Institute of Cytology and Genetics. Laboratory of Populations Genetics. Novosibirsk State University, Department of Cytology and Genetics. 630090, Novosibirsk, Lavrentyeva pr., 10. Russia. E-mail: zakharov@bionet.nsc.ru.