

ДИАГНОСТИКА КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-АНАЛИЗА С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Е.И. Бондаренко, Д.И. Тимофеев, М.К. Иванов*

ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск,

*Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Территория России – один из самых больших в мире ареалов распространения иксодовых клещей. Ежегодно в стране официально регистрируется порядка полумиллиона пострадавших от их укусов. При этом имеющаяся статистика считается неполной, так как далеко не каждый пострадавший обращается за помощью в лечебно-профилактические учреждения. Иксодовые клещи являются активными переносчиками возбудителей таких опасных для человека заболеваний, как вирусный клещевой энцефалит (ВКЭ), иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ) и др. Диагностика этих заболеваний, объединяемых термином «клещевые инфекции» (КИ), как правило, проводится с учетом эпидемиологического анамнеза (присасывание клеща, пребывание в эндемичном районе, посещение леса, лесопарковой зоны, в т. ч. в пределах городской территории) на основании лабораторного анализа и клинических признаков заболевания. Однако последние далеко не всегда позволяют проводить дифференцированную диагностику КИ (к примеру, общеземозовые симптомы или неврологические нарушения характерны как для ВКЭ, так и для ИКБ, ГАЧ и МЭЧ). Следует отметить, что в 40 % случаев и более этиология острых лихорадочных проявлений, возникающих после присасывания клещей на территории РФ, остается невыясненной. Подобные случаи могут быть связаны с ГАЧ и МЭЧ.

Возбудители ГАЧ и МЭЧ (бактерии *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis*) открыты относительно недавно. Эрлихиозы и анаплазмозы как нозологические формы являются для России новыми заболеваниями и до сих пор в ней официально не зарегистрированы. Вследствие этого в большинстве районов, эндемичных по этим заболеваниям, их диагностика вообще не осуществляется и многие врачи о них не информированы. В то же время во всех регионах, в которых встречаются иксодовые клещи и осуществляется комплексная диагностика ГАЧ и МЭЧ, это заболевание выявлено и не является редким. Так, в Перми, где среди больных с КИ доказанная доля ГАЧ и МЭЧ составляет 25 %, в весенне-летние периоды 2003–2006 гг. с помощью клинических, эпидемиологических и серологических методов было выявлено 122 случая ГАЧ. Антитела к возбудителям ГАЧ и МЭЧ выявлены у жителей Липецкой, Пермской, Новосибирской, Тюменской, Иркутской областей, а также жителей Алтайского края и Дальнего Востока. Смертность от ГАЧ и МЭЧ в развитых странах варьирует в пределах от 0,5 до 3,5 % (данные CDC, США). Поэтому, на наш взгляд, диагностика ГАЧ и МЭЧ в России безусловно актуальна.

Сочетанность природных очагов и общий основной путь передачи КИ (укус клеща рода *Ixodes*) обу-

славливают высокую вероятность микст-инфицирования человека при укусе. Наличие в анамнезе пациента факта нападения клеща, зараженного одним или несколькими возбудителями, может способствовать постановке правильного диагноза заболевания и его лечению в случае обращения пострадавшего за помощью даже спустя длительное время. Поэтому для назначения адекватной терапии при укусе необходим лабораторный анализ клеща с целью одновременного выявления в нем различных возбудителей КИ. Для решения этой задачи наиболее перспективно выявление нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) возбудителей КИ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью, скоростью исполнения и хорошо зарекомендовал себя как метод лабораторной диагностики КИ в развитых странах.

Задача работы – оценка зараженности клещей рода *Ixodes*, собранных в двух участках Новосибирской области, патогенными бактериями *B.burgdorferi* s.l. (возбудитель ИКБ), *A.phagocytophilum*, *E.muris*/*E.chaffeensis* и вирусом клещевого энцефалита с помощью метода ПЦР с детекцией в режиме реального времени с применением ПЦР-наборов, разработанных в ЗАО «Вектор-Бест» для комплексной диагностики КИ.

Материалы и методы. Для исследования были использованы две выборки клещей рода *Ixodes*, содержащие 306 (выборка № 1) и 443 особи (выборка № 2), собранные «на флаг» в разных местах Тогучинского района Новосибирской области в мае 2009 и 2011 гг. Выделение нуклеиновых кислот из суспензий клещей после их индивидуальной гомогенизации проводили с помощью набора «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Детекцию возбудителей КИ проводили на термоциклерах CFX («Bio-Rad», США) с использованием наборов реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l.», «РеалБест ДНК *A.phagocytophilum*, *E.muris*/*E.chaffeensis*» и «РеалБест РНК ВКЭ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Принадлежность выявленных бактерий к тому или иному виду или геновиду подтверждали при помощи секвенирования полиморфных участков генома на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3100 DNA Analyser» («Applied Biosystems», США) с последующим филогенетическим анализом последовательностей ДНК с помощью программы «Vector NTI v 8.0».

Результаты и обсуждение. Согласно результатам ПЦР-анализа, общая инфицированность клещей разными видами возбудителей КИ, вызывающих заболевания у человека, в выборке № 1 и № 2 составила 62,1 % (190 из 306 клещей) и 45,6 % (202 из 443) соответственно. При этом на долю микст-инфицированных клещей приходится 13,4 % (выборка № 1,

Таблица 1

Выявляемость в клещах различных возбудителей КИ. Выборка №1 (306 особей)

Один возбудитель 48,7 % (149)				Микст-инфицированность 13,4 % (41)						
ВКЭ	Б	А	Э	ВКЭ/Б	ВКЭ/Э	Б/А	Б/Э	ВКЭ/Б/А	ВКЭ/Б/Э	Б/А/Э
3,6 % (11)	42,8 % (131)	0,7 % (2)	1,6 % (5)	2,6 % (8)	0 % (0)	2,3 % (7)	7,5 % (23)	0 % (0)	0,3 % (1)	0,7 % (2)

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; Б – *B. burgdorferi s.l.*; А – *Anaplasma phagocytophilum*; Э – *Ehrlichia muris*.

Таблица 2

Выявляемость в клещах различных возбудителей КИ. Выборка №2 (443 особи)

Один возбудитель 40,4 % (179)				Микст-инфицированность 5,2 % (23)						
ВКЭ	Б	А	Э	ВКЭ/Б	ВКЭ/Э	Б/А	Б/Э	ВКЭ/Б/А	ВКЭ/Б/Э	Б/А/Э
1,4 % (6)	36,8 % (163)	1,1 % (5)	1,1 % (5)	1,4 % (6)	0,2 % (1)	0,5 % (2)	2,3 % (10)	0,2 % (1)	0,5 % (2)	0,2 % (1)

табл. 1) и 5,2 % (выборка № 2, табл. 2). Половина анализированных клещей была инфицирована боррелиями комплекса *B. burgdorferi s.l.* Для произвольно отобранных 57 образцов, в которых идентифицирована ДНК боррелий, было проведено секвенирование участка линейной хромосомы гена *RecA*. 31,6 % боррелий (18 из 57) относились к виду *V. afzelii*, 68,4 % (39 из 57) – к *V. garinii*.

Общая выявляемость ДНК *A. phagocytophilum* в двух выборках клещей составила 3,3 % (10 из 306 клещей) и 2 % (9 из 443) соответственно. С помощью ПЦР-анализа ДНК эрлихий была выявлена в 9,8 % (30 из 306) и 4,1 % (18 из 443) анализируемых клещей. Все образцы эрлихий, обнаруженных в клещах, на основании данных секвенирования были отнесены к *Ehrlichia muris*. Данные скрининга клещей свидетельствуют, что наличие в них ВКЭ или *B. burgdorferi s.l.* не исключает его инфицирования возбудителями ГАЧ и МЭЧ: более половины случаев выявления последних соответствуют микст-инфицированным клещам. При этом в большинстве случаев количество анаплазм и эрлихий

в клещах (в том числе с микст-формами инфицирования) достаточно велико и заметно превышает содержание боррелий.

Полученные данные свидетельствуют о высокой зараженности иксодовых клещей возбудителями КИ, что указывает на значительный риск инфицирования в случае укуса клеща, а также на вероятность микст-инфицирования человека. Примененные в работе наборы на основе метода ПЦР в реальном времени характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью, достаточной для выявления возбудителей КИ в клещах и в случае низких нагрузок. Эти особенности, а также возможность одновременного выявления нескольких возбудителей КИ в составе одного клеща делают данный метод безусловно актуальным для массовой лабораторной диагностики, направленной на выявление возбудителей в клещах, поступающих в диагностические лаборатории от пострадавшего населения, и проведения дальнейшего превентивного этиотропного лечения с целью предотвращения развития заболеваний.

ПРОБЛЕМА «СМЕНЫ» ГЕНОТИПА ВКЭ НА УРАЛЕ ЗА ПОСЛЕДНИЕ 60 ЛЕТ

С.Ю. Ковалев, Т.А. Мухачева

Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург

Проблема распространения и эволюции вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) во многом еще остается terra incognita, и любое исследование в этой области представляет значительный научный интерес. В журнале «Вопросы вирусологии» в год 70-летнего юбилея открытия ВКЭ вышла статья «Эволюция клещевого эн-

цефалита и проблема эволюции возбудителя» (Погодина и др., 2007). В данной публикации авторы, основываясь на сравнении так называемых хронологических рядов штаммов ВКЭ, описали любопытный феномен изменения генотипического состава штаммов ВКЭ, выделенных в разные годы за почти 70-летний период на