# Современные подходы к изучению клещевых трансмиссивных инфекций в Кузбассе на основе молекулярных методов<sup>1</sup>

H.B. Рудаков<sup>1, 2</sup> (rickettsia@mail.ru), С.А. Рудакова<sup>1</sup>, А.Р. Ефимова<sup>3, 4</sup>, О.М. Дроздова<sup>4</sup>, А.Ф. Любенко<sup>1</sup>, Ю.А. Петрова<sup>1</sup>, В.В. Якименко<sup>1</sup>, В.Г. Дедков<sup>5</sup>

- <sup>1</sup> ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, г. Омск
- <sup>2</sup> Омский государственный медицинский университет, г. Омск
- <sup>3</sup> ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Кемеровской области», г. Кемерово
- <sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово
- <sup>5</sup> ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

#### Резюме

В данной работе представлены новые эколого-эпидемиологические данные о распространении и эпидемическом проявлении природных очагов клещевых трансмиссивных инфекций в Кемеровской области с учетом изучения их сочетанности с использованием современных молекулярно-биологических методов.

Ключевые слова: природный очаг, иксодовые клещи, эпидемиология, экология возбудителей

#### Modern Approches in the Study of Tick-Borne Infections Foci Based on Molecular Methods

N.V. Rudakov<sup>1,2</sup> (rickettsia@mail.ru), S.A. Rudakova<sup>1</sup>, A.P. Efimova<sup>3,4</sup>, O.M. Drozdova<sup>4</sup>, A.F. Lubenko<sup>1</sup>, Yu.A. Petrova<sup>1</sup>, V.A. Dedkov<sup>5</sup>

- <sup>1</sup> Omsk Research Institute of Natural Focal Infections
- <sup>2</sup> Omsk State Medical University
- <sup>3</sup> Center of hygiene and epidemiology in Kemerovo region
- <sup>4</sup>Kemerovo State Medical University
- <sup>5</sup> Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

#### Abstract

This paper presents a new ecological and epidemiological data on the distribution and the epidemic manifestation of natural foci of tick-borne infections in the Kemerovo region, taking into account the study of their combination with the use of modern molecular biology methods.

Key words: natural focus, ticks, epidemiology and ecology of pathogens

# Введение

В экспресс-исследованиях (в ИФА и ОТ-ПЦР) присосавшихся (снятых с людей) иксодовых клещей на вирус клещевого энцефалита и другие клещевые патогены, как правило, не идентифицируют вид, в лучшем случае определяют род переносчиков, среди которых в очагах клещевых трансмиссивных инфекций чаще встречаются представители родов Ixodes, Dermacentor, Rhipicephalus, Haemaphysalis[1].. Вместе с тем, в условиях сочетанных природных очагов определение вида и рода переносчика имеет существенное эпидемиологическое значение в определении тактики превентивных мероприятий [2, 3].

Применительно к видам рода *lxodes* дополнительный интерес представляют данные о симпатрии распространения *lxodes* persulcatus – основного

переносчика вируса клещевого энцефалита (КЭ), патогенных боррелий, возбудителей гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) и моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), некоторых видов риккетсий (Candidatus Rickettsia tarasevichiae, R. helvetica) и Ixodes pavlovskyi, эколого-эпидемиологическая значимость и степень распространения которого в различных регионах Сибири плохо изучены.

Необходимо отметить, что в последние годы отмечается рост распространения и доли *Ixodes pavlovskyi* в антропогенных (урбанизированных) ландшафтах Томской и Новосибирской областей, других территорий Западной Сибири [4 – 6], в частности в Кемеровской области [7]. Имеются отдельные упоминания о более низкой «агрессивности» *Ixodes pavlovskyi* по отношению к человеку по срав-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Доложено на научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природноочаговых инфекций» Роспотребнадзора: Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека. Омск, 15 – 16 ноября 2016 г.

нению с *lxodes persulcatus* [8, 9], что требует дополнительного изучения и подтверждения с позиций доказательной медицины.

**Цели данной работы** – определение доли *lxodes pavlovskyi* в сборах клещей в природных стациях в отдельных районах Кемеровской области и в структуре снятых с людей переносчиков, а также оценка инфицированности возбудителями клещевых трансмиссивных инфекций.

### Материалы и методы

Для определения видовой принадлежности клещей из природных стаций использовали фенотипические признаки [10] и молекулярный метод.

Определение видовой принадлежности клещей в суспензиях осуществляли по специально разработанной методике на основе метода мультипрайм-ПЦР в реальном времени, позволяющей проводить дифференциальное генотипирование клещей видов I. ricinus, I. persulcatus и I. pavlovskyi. В качестве мишени использовали фрагмент гена цитохромоксидазы (COI). ДНК выделяли из 100 мкл осветленной 10% клещевой суспензии с помощью набора Рибо-преп (ФБУН «ЦНИИЭ») согласно рекомендациям производителя. Реакцию проводили в объеме 25 мкл: 10 мкл пробы, 2,5 мкл ДНТФ (1,76 мМ, ФБУН «ЦНИИЭ»), 5 мкл буфера С (ФБУН «ЦНИИЭ»), 0,5 мкл полимеразы TagF (ФБУН «ЦНИИЭ»), по 5 пмоль каждого специфического праймера, по 3 пмоль каждого специфического флуоресцентного зонда и деионизированной воды milliQ (ФБУН «ЦНИИЭ») в количестве, необходимом для достижения требуемого объема реакции.

Амплификацию выполняли на приборе для ПЦР в реальном времени Rotor GeneQ (Qiagen, Germany) в следующем режиме:  $95\,^{\circ}\text{C}-15$  мин, далее 35 циклов  $95\,^{\circ}\text{C}-10$  с,  $55\,^{\circ}\text{C}-20$  с,  $72\,^{\circ}\text{C}-10$  с. Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась при  $55\,^{\circ}\text{C}$ . При этом регистрация специфического сигнала для клещей вида *I. ricinus,I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* осуществлялась по отдельным каналам.

Всего в эпидемиологический сезон 2015 года исследовано 200 экземпляров клещей рода *Ixodes* (*I. persulcatus* — 123, *I. pavlovskyi* — 76), собранных с растительности в природных стациях в Мариинском, Кемеровском, Крапивинском, Гурьевском и Юргинском районах Кемеровской области. Исследовано также 186 суспензий иксодовых клещей, снятых с людей в городах Кемерово и Новокузнецке (из них *I. persulcatus* — 116, *I. pavlovskyi* — 70).

Исследование суспензий клещей методом ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторах: «СFX96» (Віо-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и «Rotor-Gene 6000» (Giagen, Германия). При выделении ДНК, РНК использовались наборы Рибо-преп (ФБУН «ЦНИИЭ»). Для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами использовали наборы мультипрайм: «АмплиСенс ТВЕV, В. burgdorferi sl, A. phagocytophilum,

E. chaffeensis/E. muris-FL», применяя предварительно для проведения обратной транскрипции комплект «Реверта-L» (ФБУН «ЦНИИЭ»).

Результаты исследований на риккетсии будут представлены в отдельной публикации.

### Результаты и обсуждение

Из 186 снятых клещей по результатам генотипирования 62,4% отнесены к *I. persulcatus*, 37,6% – к *I. pavlovskyi*. В г. Кемерово (генотипировано 72 снятых переносчиков) преобладали клещи *I. persulcatus* (84,7%), соответственно на долю *I. pavlovskyi* пришлось только 15,3% иксодид. В г. Новокузнецке при исследовании 114 клещей структура снятых переносчиков отличалась – оба вида встречались примерно в равных соотношениях (*I. persulcatus* – 48,2%, *I. pavlovskyi* – 51,8%).

При исследовании клещей на ИКБ положительные результаты составили 30,1% (*I. persulcatus* – 31,9%, *I. pavlovskyi* – 27,1%), на ГАЧ – 3,8% (4,3 и 2,9% соответственно), МЭЧ – 2,7% (1,7 и 4,3% соответственно), на КЭ – отсутствовали. Одновременно ДНК ИКБ и ГАЧ выявлены в 2,2% проб (*I. persulcatus* – 2,6%, *I. pavlovskyi* – 1,4%), ИКБ и МЭЧ – также в 2,2% (1,7 и 2,9% соответственно).

При идентификации 200 иксодид из природных стаций на долю *I. persulcatus* пришлось 123 (61,5%), *I. pavlovskyi* — 77 (38,5%). При их исследовании РНК вируса КЭ выявлена в одной пробе *I. persulcatus*, наиболее часто выявляли ДНК возбудителя ИКБ — в 28,0% (в *I. persulcatus* — 29,3%, в *I. pavlovskyi* — 26,0%). ДНК возбудителя МЭЧ обнаружена в 7,0% проб, преимущественно в пробах *I. persulcatus* (*Ehrlichia muris*—в 5,7%, *E. chaffensis* — в 4,9%). ДНК возбудителя ГАЧ выявлена в 3,5% проб (*I. persulcatus* — в 2,4%, *I. pavlovskyi* — в 5,2%).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена видовая структура снятых с людей (жители г. Кемерово и г. Новокузнецка) переносчиков и их инфицированность основными клещевыми патогенами человека. Среди снятых переносчиков в целом преобладает *I. persulcatus*, однако до 37,6% приходится на *I. pavlovskyi*. На юге Кузбасса (г. Новокузнецк) оба вида находятся в примерно равных соотношениях. В структуре клещей, собранных в природных стациях в пяти районах Кемеровской области, на долю *I. pavlovskyi* приходится 38,5%, то есть такое же соотношение, как среди снятых переносчиков с жителей г. Кемерово и г. Новокузнецка.

Показана возможность молекулярной дифференциации *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в снятых переносчиках, что позволило дифференцированно по видам определить инфицированность основными клещевыми патогенами суспензий снятых иксодид.

# Выводы

 Впервые в Кемеровской области выявлена инфицированность возбудителями клещевых

- инфекций двух основных видов клещей рода Ixodes – I. persulcatus и I. pavlovskyi в природных стациях и снятых переносчиков.
- 2. Впервые установлена достаточно существенная доля клещей вида I. pavlovskyi в структуре клещей в природных стациях (особенно на юге Кузбасса) и структуре снятых переносчиков, что ставит под сомнение положение об их меньшей «агрессивности» при нападении на человека.
- 3. Установлена различная инфицированность клещей рода lxodes основными клещевыми патогенами, среди которых в порядке убывания выявлялась ДНК боррелий ИКБ, ГАЧ и МЭЧ, РНК вируса КЭ. При этом существенных отличий инфицированности основными клещевыми патогенами I. persulcatus и I. pavlovskyi, как из природных стаций, так и снятых с людей не отмечается.

4. По результатам ОТ-ПЦР, обращает на себя внимание более частое выявление в клещах I. persulcatus из природных стаций ДНК МЭЧ и крайне низкая инфицированность их вирусом КЭ.

Полученные данные, несомненно, могут быть использованы для совершенствования эпидемического надзора и контроля инфекций, передаваемых клещами, в Кемеровской области.

Необходимо сделать акцент на изучение видовой структуры и инфицированности основными клещевыми патогенами снятых с людей переносчиков с последующей превентивной терапией пациентов в зависимости от выявленного патогена и разработкой предупредительных мероприятий по всему комплексу инфекций, передаваемых иксодовыми клещами.

## Литература

- 1. СП 3.1.3310-15. Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами.
- Рудакова С.А., Коломеец А.Н., Самойленко И.Е., Кузьминов А.М., Рудаков Н.В. Экспресс-индикация трансмиссивных патогенов как основа
- дифференцированного подхода к профилактике инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Бюллетень CO PAMH. 2007; 4: 116 119. Рудаков Н.В., Матущенко А.А., Шпынов С.Н., Рудакова С.А. Новые и возвращающиеся природно-очаговые инфекции: теоретические и прикладные аспекты проблемы. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2002; Т. 2 (4): 16 - 19.
- 4. Романенко В.Н. Многолетняя динамика численности и видового состава иксодовых клещей (Ixodidae) на антропогенно нарушенных и естественных территориях. Паразитология. 2011; 45 (5): 384 - 91.
- 5. Ливанова Н.Н., Ливанов С.Г., Панов В.В. Особенности распределения клещей lxodes persulcatus и lxodes pavlovskyi на границе лесной и лесостепной зон Приобья. Паразитология.2011; 45 (2): 94 – 102.
- 6. Малькова М.Г., Якименко В.В., Танцев А.К. Изменение границ ареалов пастбищных иксодовых клещей рода Ixodes Latr., 1795 (Parasitiformes, Ixodidae) на территории Западной Сибири. Паразитология. 2012; 46 (5): 369 - 383.
- 7. Калягин Ю.С., Зубко К.С., Ефремова Г.В. Иксодовые клещи г. Кемерово и пути их проникновения в городскую черту: опыт теоретического исследования. Вестник КемГУ. 2010: 2 (42): 5 - 10.
- 8. Романенко В.Н., Кондратьева Л.М. Зараженность иксодовых клещей, снятых с людей вирусом клещевого энцефалита на территории города Томска и его окрестностей. Паразитология. 2011; 45 (1): 3 – 10.
- 9. Алленов А.В., Зверева Т.В., Никитин А.Я., Татрова Е.В., Мамедалиева И.В., Солодкая Н.С. Сравнительный анализ численности и частоты контактов с человеком иксодовых клещей юга Приморского края. Тихоокеанский медицинский журнал. 2014; 4: 32 – 34.
- 10. Якименко В.В., Малькова М.Г., Шпынов С.Н. Иксодовые клещи Западной Сибири: фауна, экология, основные методы исследования. Омск: Омский научный вестник. 2013: 1 - 240.

#### References

- 1. Sanitary rules 3.1.3310-15. Prevention of infections transmitted ticks.
- Rudakova S.A., Kolomeyets A.N., Samoylenko I.E., Kuzminov A.M., Rudakov N.V. Express indication of vector-borne pathogens as the basis of a differentiated approach to the prevention of infections transmitted by ticks. Byulleten SO RAMN. [Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciencesl 2007: 4: 116 - 119 (in Russian).
- 3. Rudakov N.V., Matushchenko A.A., Shpynov S.N., Rudakova S.A. New and re-emerging natural-focal infections: theoretical and applied aspects of the problem. Byulleten Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk. [Bulletin of the East-Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]. 2002; 2 (4): 16 - 19 (in Russian).
- 4. Romanenko V.N. Long-term dynamics of abundance and species composition of ixodid ticks (Ixodidae) in anthropogenically disturbed and natural areas. Parazitologiya. [Parasitology].. 2011; 45 (5): 384 – 391 (in Russian).
- 5. Livanova N.N., Livanov S.G., Panov V.V. Features of the distribution of ticks Ixodespersulcatus and Ixodespavlovskyi on the border of forest and forest-steppe zones of the Ob region. Parazitologiya. [Parasitology]. 2011; 45 (2): 94-102 (in Russian). 6. Malkova M.G., Yakimenko V.V., Tantsev A.K. Changing the boundaries of the areas of pasture ticks of the genus Ixodes Latr., 1795 (Parasitiformes, Ixodidae)
- in the territory of Western Siberia. Parazitologiya. [Parasitology]. 2012; 46 (5): 369 383 (in Russian).
- 7. Kalyagin Yu.S., Zubko K.S., Efremova G.V. Ticks of Kemerovo city and ways of their penetration into the city limits: the experience of theoretical research. Vestnik KemGU. [Bulletin of Kemerovo State University]. 2010; 2 (42): 5 10 (in Russian). 8. Romanenko V.N., Kondratyeva L.M. Infestation with Ixodes ticks removed from humans, the virus of tick-borne encephalitis on the territory of city of Tomsk
- and its environs. Parazitologiya. [Parasitology]. 2011; 45 (1): 3 10 (in Russian). Allenov A.V., Zvereva T.V., Nikitin A.Ya., Tatrova E.V., Mamedalieva I.V., Solodkaya N.S. Comparative analysis of the number and frequency of contacts with the person ticks South of Primorsky Krai. Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal. [Pacific Medical Journal]. 2014; 4: 32 – 34 (in Russian).
- 10. Yakimenko V.V., Malkova M.G., Shpynov S.N. Ixodid ticks in West Siberia: fauna, ecology, basic research methods. Omskiy nauchny vestnik. [Omsk Scientific Bulletin]. 2013: 1 - 240 (in Russian).