

АНАЛИЗ ЗАРАЖЕННОСТИ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ТЕРРИТОРИИ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.А. Бессолицына¹, С.А. Волков¹, Ф.С. Столбова², И.В. Дармов¹

¹ФГБОУ ВПО Вятский государственный университет, г. Киров, Россия

²ФГОУ ВПО Вятская государственная сельскохозяйственная академия, г. Киров, Россия

Резюме. Объект исследования — иксодовые клещи родов *Dermacentor* и *Ixodes*, выделенные из природных экобиотопов в Кировской области. Цель представленной работы — определение с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции процента инфицированных вирусом клещевого энцефалита клещей в зависимости от времени, места и метода сбора на территории Кировской области, а также их видовой и половой принадлежности. В результате исследования установлено, из двух исследованных видов иксодовых клещей, только таежный клещ (*Ixodes persulcatus*), но не луговой (*Dermacentor reticulatus*), является переносчиком вируса клещевого энцефалита. Также установлено, что носителями вируса клещевого энцефалита могут быть как самки клеща, так и самцы. Показана целесообразность исследования на зараженность вирусом клещевого энцефалита не только клещей, снятых с человека, но собранных с животных, прежде всего собак, и с растительного покрова.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, иксодовые клещи, идентификация, обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция.

Введение

Клещевой энцефалит (tick borne encephalitis, ТБЕ) — природно-очаговая вирусная инфекция, характеризующаяся лихорадкой, интоксикацией и поражением серого вещества головного мозга и/или оболочек головного и спинного мозга. Заболевание может привести к стойким неврологическим, психиатрическим осложнениям и летальному исходу.

Вирус клещевого энцефалита (ТБЕВ) — нейротропный, РНК-содержащий. Относится к роду *Flavivirus*, входит в семейство *Flaviviridae* экологической группы арбовирусов [2]. В настоящее время известно три генетических типа (изоформы) вируса, существенно различающихся по симптомам и прогнозу вызываемого ими заболевания: дальневосточный, сибирский и западноевропейский [5].

Экологически возбудители клещевого энцефалита тесно связаны с иксодовыми клещами

и их прокормителями. Зараженность вирусом клещевого энцефалита установлена у 14 видов иксодовых клещей, однако реальное эпидемиологическое значение имеют только два вида клещей, являющихся основными переносчиками: *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus* [1].

Иксодовые клещи служат не только переносчиками ТБЕВ, но также выполняют функцию его резервуаров [1]. Организм клеща является благоприятной средой для размножения вируса. Наибольшее количество вируса накапливается в кишечнике, половом аппарате и слюнных железах, так как инфекция у них сохраняется всю жизнь и может передаваться трансвариальным путем потомству [1].

По данным центра Роспотребнадзора по Кировской области [6], зараженность клещей вирусом клещевого энцефалита составляет 5–7%. Анализ зараженности клещей осуществляется медицинскими учреждениями, поэтому анализируют только клещей, снятых с человека.

Авторы:

Бессолицына Е.А., к.б.н., доцент кафедры микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВПО ВятГУ, г. Киров, Россия;

Волков С.А., студент ФГБОУ ВПО ВятГУ, г. Киров, Россия;

Столбова Ф.С., к.б.н., доцент кафедры зоологии и пчеловодства биологического факультета ФГОУ ВПО ВятГСХА, г. Киров, Россия;

Дармов И.В., д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВПО ВятГУ, г. Киров, Россия.

Адрес для переписки:

Бессолицына Екатерина Андреевна
610006, Россия, г. Киров, ул. Мельникова, 26, кв. 71.
Тел.: 8 922 919-79-70.
E-mail: bess2000@mail.ru

поступила в редакцию 05.05.2014
принята к печати 23.06.2014

© Бессолицына Е.А. и соавт., 2014

Однако в прокормлении клещей и заносе их в места возможного контакта с человеком участвуют также домашние животные, прежде всего собаки, поэтому важен анализ клещей, снятых не только с человека, но и с домашних животных, а также изъятых из среды свободно живущих клещей.

Важным вопросом является также оценка зараженности клещей в зависимости от их пола. Считается, что инфекционные агенты передаются в организм человека при укусе самок. Но не исключено, что инфекция передается и при укусе самцов.

Основными переносчиками вируса клещевого энцефалита в Кировской области являются таежные клещи *Ixodes persulcatus*. Однако в связи с изменениями климата, отмечаемыми в последние годы, в некоторых районах Кировской области были выделены луговые клещи (*Dermacentor reticulatus*), и, следовательно, появилась задача мониторинга клещей и этого вида [4].

Целью исследования являлось определение с помощью обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) процента инфицированных вирусом клещевого энцефалита клещей, в зависимости от времени, места и метода сбора на территории Кировской области, а также их видовой и половой принадлежности.

Материалы и методы

Сбор клещей, определение вида и половой принадлежности. Сбор клещей проводили с растительного покрова на движущегося учетчика и флаг или волокушу из вафельной ткани размером 60 x 100 см [1], а также с людей и домашних животных (собак, кошек).

Идентификацию клещей, выделенных из природных источников, проводили по определительным таблицам Н.А. Филипповой [7].

Выделение и амплификация ДНК. Суммарную ДНК экстрагировали с помощью гуанидин-тиоизоцианатного метода [10] из клещей, фиксированных в 70% этиловом спирте.

Исследование нуклеиновых кислот, выделенных из клещей, проводили с использованием обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Для проведения реакции был использован праймер: TBEV-R 5'-ctc-atg-ttc-agg-ccc-aac-ca-3' [8]

Для амплификации использовали следующие праймеры:

- TBEV-E(F) 5'-aca-ccg-gag-act-atg-ttg-ccg-ca-3';
- TBEV-E(R) 5'-ccg-ttg-gaa-ggt-gtt-ca-ct-3 [8].

Состав реакционной смеси для ПЦР: 0,5 мкл пробы (50 нг), однократный буфер для ПЦР без магния («Sybenzyme»), 3 мМ MgCl₂, 200 мкмоль смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов («Sybenzyme»), прямой и обратный праймеры по 10 пмоль каждого («Syntol»), 1,25 ед. а. Taq-

полимеразы («Sybenzyme»), вода до конечного объема 10 мкл.

Условия ПЦР: 1 цикл денатурации — 94°C, 5 мин; 40 циклов — 94°C, 30 с; 57°C, 30 с и 72°C, 30 с; 1 цикл достройки — 72°C, 5 мин.

Продукты амплификации разделяли в 6% нативном полиакриламидном геле, гель окрашивали бромистым этидием [10].

Достоверность различий оценивали с использованием двустороннего критерия Фишера [9] с уровнем значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

Анализ видовой и половой принадлежности клещей. В период с 2007 по 2013 гг. было исследовано 375 клещей из 23 районов Кировской области. С растительного покрова было собрано 97 клещей, с людей — 76, с собак — 187, с кошек — 11, с коров — 4, с ежа — 1. Клещи были проанализированы по половому составу: самок обнаружено — 304, самцов — 71. Анализируемые клещи относились двум видам: *Ixodes persulcatus* (316 штук) и *Dermacentor reticulatus* (59 особей).

ОТ-ПЦР анализ зараженности клещей вирусом TBEV. Зараженность вирусом определяли при исследовании суммарных нуклеиновых кислот, выделенных из каждого клеща, с последующей постановкой реакции ОТ-ПЦР. За 2007 г. исследован 21 клещ, из них 2 зараженных; за 2008 г. — 30 клещей, 9 зараженных; за 2009 г. — 82 клеща, 8 зараженных; за 2010 г. — 67 клещей, 5 зараженных; за 2011 г. — 81 клещ, 7 зараженных; за 2012 г. — 87 клещей, 10 зараженных, за 2013 г. — 7 клещей (зараженных нет). Таким образом, процент зараженности составил: за 2007 г. — 9,5%, за 2008 г. — 30,0%, за 2009 г. — 9,7%, за 2010 г. — 7,5%, за 2011 г. — 8,6%, за 2012 г. — 11,5%.

По данным Роспотребнадзора [6], в 2009 г. в Кировской области было отмечено 18,47 случаев заболевания клещевым энцефалитом на 100 тыс. человек, в 2010 г. — 7,71, в 2011 г. — 8,42, в 2012 г. — 8,8 случаев на 100 тыс. человек. Как видно из результатов нашего исследования, наблюдаются незначительные колебания по годам процента зараженных вирусом клещей, что сходится с данными Роспотребнадзора. Исключением являются результаты за 2008 г., когда наблюдался значительно больший процент зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита — 30%. Это может быть связано либо с малым объемом выборки, либо с тем фактом, что возрастание действительно было, но в данных Роспотребнадзора не проявилось из-за того, что анализу подвергались только клещи, снятые с человека.

Наибольшая зараженность клещей была выявлена нами в Кильмезском, Пижанском и Оричевском районах (50, 50 и 18,6% соответственно). В Арбажском, Кирово-Чепецком, Зуевском,

Слободском районах также наблюдается достаточно высокий процент зараженности клещей (от 15,5 до 12%), тогда как, по данным Роспотребнадзора [6], случаи заболевания выявлены только в Оричевском (3,2 на 100 тыс. человек), Кирово-Чепецком (11,7 на 100 тыс. человек), Слободском (9,3 на 100 тыс. человек) районах.

По данным Роспотребнадзора [6], наибольший процент заболеваемости наблюдается в северных районах области, но в данной работе показано, что высокий процент клещей, содержащих вирус, наблюдается также в центральных и южных районах области.

Самцы клеща редко подвергаются исследованию медицинскими учреждениями на предмет их зараженности ТБЕВ. Это связано с тем, что укус самца кратковременный и безболезненный, поэтому его не замечают. Мы исследовали не только самок, но и самцов клещей. Количество исследованных самцов составило 71, из них были заражены 3 (4,2%). Количество исследованных самок составило 304, среди них было 38 зараженных (12,5%). Статистический анализ с использованием двустороннего критерия Фишера (составляет 0,055, уровень значимости 0,05) и метода χ^2 (составляет 4,05, уровень значимости 0,05) показал достоверную разницу между процентом зараженности самцов и самок; вероятность зараженности самца была достоверно меньше, чем самки.

В Кировской области основными переносчиками клещевого энцефалита являются клещи вида *Ixodes persulcatus*. Осенью 2010 г. в Яранском районе в большом количестве были обнаружены клещи другого вида — *Dermacentor reticulatus*. Данный вид клещей нетипичен для Кировской области [3, 4]. Однако в 2010 г. погодные условия в южных районах области были сходны с отмеченными в Крыму во время осенней вспышки увеличения численности клещей этого вида [3, 4].

Процент зараженности по видам составил 12,9% (41 из 316) и 0% (0 из 59) для *Ixodes persulcatus*

и *Dermacentor reticulatus* соответственно. Таким образом, можно утверждать, что луговые клещи (*Dermacentor reticulatus*) не являются переносчиками вируса клещевого энцефалита.

В медицинских учреждениях на зараженность вирусом клещевого энцефалита исследуются только клещи, снятые с человека, хотя их природными прокормителями являются дикие животные. Поэтому для получения более полной картины зараженности, возникает необходимость исследования клещей, снятых с домашних и диких животных (собак, кошек, ежей, лосей и др.), а также извлеченных из растительного покрова (сбор на флаг). Такие исследования позволяют получить более полную эпизоотологическую картину распространения вируса клещевого энцефалита в Кировской области.

В связи с этим нами были исследованы клещи, снятые с разных объектов: человека, различных домашних и диких животных, с растительного покрова. Количество клещей, снятых с собак, составило 187 штук, из них 25 были заражены (13,4%); с кошек — 11, зараженных нет; с коров — 4, зараженных нет; с ежа — 1, не заражен. Число клещей, снятых с человека, составило 76, из них 9 были заражены (11,8%). Число клещей, снятых с растительного покрова, составило 97, из них 7 были заражены (7,2%). Статистический анализ показал, что значения процента зараженных клещей, снятых с собак, растительного покрова и человека, достоверно не различаются. Следовательно, собаки являются таким же источником зараженных клещей, что и растительный покров, но из-за более тесного контакта с человеком могут представлять большую опасность.

Полученные нами результаты позволяют отнести собак к прокормителям иксодовых клещей и резервуарным хозяевам вируса клещевого энцефалита, а также считать их индикаторами неблагополучия местности по клещевому энцефалиту.

THE ANALYSIS OF IXODES TICKS INFESTATION WITH TBEV IN KIROV REGION

Bessolitsyna E.A.^a, Volkov S.A.^a, Stolbova F.S.^b, Darmov I.V.^a

^a Vyatka State University, Kirov, Russian Federation

^b Vyatka State Agricultural academy, Kirov, Russian Federation

Abstract. The objects of this study are Ixodes ticks which were collected in different areas of Kirov province. The aim of the study is to determine the proportion of TBEV infected ticks using the reverse transcription and PCR, depending on time, place, and methods of collection in the Kirov province as well as of ticks specific and sexual identity. The study found that from the two tick species that were tested only taiga tick (*Ixodes persulcatus*) but not the meadow tick (*Derma-*

centor reticulatus) was the TBEV vector. Study also has shown that both males and females ticks can be the TBEV vectors. Moreover, it was proved the importance of ticks testing which were gathered not only from human but also from animals, primary from dogs, and from the plants.

Key words: TBEV, *Ixodes ticks*, identification, reverse transcription, PCR (polymerase chain reaction).

Authors:

Bessolitsyna E.A. ✉, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Biological Faculty, Vyatka State University; 610006, Russian Federation, Kirov, Melnikova str., 26, fl. 71.

Phone: +7 922 919-79-70 (mobile). E-mail: bess2000@mail.ru

Volkov S.A., Student, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation;

Stolbova F.S., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Zoology and Beekeeping, Vyatka State Agricultural Academy, Biological Faculty, Kirov, Russian Federation;

Darmov I.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Microbiology, Biological Faculty, Vyatka State University, Kirov, Russian Federation.

Received 05.05.2014

Accepted 23.06.2014

Список литературы/References

1. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит. Руководство для врачей. Новосибирск, 2001. 359 с. [Jerusalimskiy A.P. *Kleshchevoy entsefalit. Rukovodstvo dlya vrachey* [Thick-borne encephalitis. Doctor's guide]. Novosibirsk, 2001, 359 p.]
2. Казанцев А.П., Матковский В.С. Справочник по инфекционным болезням. М.: Медицина, 1985. 184 с. [Kazantsev A.P., Matkovskiy V.S. *Spravochnik po infektsionnym boleznyam* [Infection diseases directory]. Moscow, Medicine, 1985, 184 p.]
3. Пышкин В.Б., Евстафьев И.Л., Евстафьев А.И. К экологии и биоразнообразию рода *Dermacentor* Koch., иксодидофауны Крыма (Acrania, Ixodidae) // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана. 2006, с. 30–35. [Pyshkin V.B., Evstaf'ev I.L., Evstaf'ev A.I. K ekologii i bioraznoobraziyu roda *Dermacentor* Koch., iksodiofauny Kryma (Acrania, Ixodidae)] [On ecology and biological variety *Dermacentor* Koch genus, ixodes species in Crimea (Acrania, Ixodidae)]. *Ekosistemy Kryma, ikh optimizatsiya i okhrana = Crimea's Ecosystems, Optimization and Protection*. 2006, pp. 30–35.]
4. Столбова Ф.С., Бердинских И.С. Осенняя активность клещей рода *Dermacentor* Koch. на юго-западе Кировской области // Проблемы биомониторинга и биоиндикации: сб. материалов VIII Всерос. науч.-практ. конф. Киров, 2010, ч. 2, с. 17–21. [Stolbova F.S., Berdinskikh I.S. *Osennaya aktivnost' kleshchey roda Dermacentor Koch. na yugo-zapade Kirovskoy oblasti* [Autumn activity of *Dermacentor* Koch thick in the south-west of Kirov region]. *Problemy biomonitoringa i bioindikatsii: sb. materialov VIII Vseros. nauch.-prakt. konf.* [Proceedings of VII All-Russian scientific and practical conference "Problems of biomonitoring and bioindication"]. Kirov, 2010, part 2, pp. 17–21.]
5. Токаревич К.Н. Важнейшие инфекционные болезни, общие для животных и человека. Л.: Медицина, 1979. 221 с. [Tokarevich K.N. *Vazhneyshie infektsionnye bolezni, obshchie dlya zivotnykh i cheloveka* [The most important infectious diseases common for animals and human]. Leningrad, Medicine, 1979, 221 p.]
6. Управление федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Кировской области [Официальный сайт] URL: <http://www.43.rospotrebnadzor.ru> (дата обращения: 15.03.14) [Upravlenie federal'noy sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka po Kirovskoy oblasti [Ofits. sayt] [Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Kirov region [official site]. URL: <http://www.43.rospotrebnadzor.ru> (date accessed: 03/15/14)].
7. Филиппова Н.А. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acraea, Ixodidae): морфология, систематика, экология, медицинское значение. Л.: Наука, 1985, Т. 1, 352 с. [Filippova N.A. *Taizhnyy kleshch Ixodes persulcatus Schulze (Acraea, Ixodidae): morfologiya, sistematika, ekologiya, meditsinskoe znachenie* [Taiga thick *Ixodes persulcatus* Schulze (Acraea, Ixodidae): morphology, taxonomy, ecology, medical value. Leningrad]. Leningrad, Science: 1985, vol. 1, 352 p.]
8. Ruzek D., St'astna H., Kopecky J., Golovljova I., Grubhoffer L. Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *J. Virol. Met.*, 2007, vol. 144, pp. 133–137.
9. Sahai H., Anwer Khurshid H. On analysis of epidemiological data involving A 2X2 contingency table: an overview of fisher's exact test and yates' correction for continuity. *J. Biopharm. Stat.* 1995, vol. 1, no. 1, pp. 43–70.
10. Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.