

ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ

УДК: 616.9:595.421Ixodidae-07

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ ПАЦИЕНТОВ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ

Т.В. Мжельская¹, Е.И. Бондаренко², Л.И. Иванов³, Е.В. Мокрецова⁴,
О.Е. Троценко¹, А.Г. Драгомерецкая¹, С.А. Морозова⁵, А.Г. Ковальский³,
С.А. Бахметьева³

¹ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск

²АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск

³ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора, г. Хабаровск

⁴ГБОУ ВПО ДВГМУ Минздрава России, г. Хабаровск

⁵«Вектор-Бест-Амур», г. Хабаровск

В образцах плазмы и лейкоцитарной фракции крови от 20 больных, госпитализированных в 2015 году в г. Хабаровске с подозрением на клещевые инфекции, с помощью ПЦР-РВ обнаружена ДНК *Borrelia miyamotoi* и ДНК *Rickettsia species* в 10% и 30% случаев соответственно. Последующим секвенированием геномных участков установлена принадлежность риккетсиозной ДНК к патогенной для людей *Rickettsia heilongjiangensis* и специфичность боррелиозной ДНК к *B. miyamotoi*. Показана возможность ПЦР-диагностики клещевой возвратной лихорадки, вызываемой *B. miyamotoi*, и Дальневосточной клещевой лихорадки, вызываемой *R. heilongjiangensis*, у больных на ранних стадиях болезни. Скрининг иксодовых клещей, собранных на территории Хабаровского края, свидетельствует о циркуляции *R. heilongjiangensis* и *B. miyamotoi* в этом регионе Дальнего Востока.

Ключевые слова: «клещевые» инфекции, *Borrelia miyamotoi*, риккетсии, ПЦР-РВ, секвенирование.

THE RESULTS OF THE MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF THE CLINICAL MATERIAL FROM PATIENTS WITH SUSPECTED INFECTIONS TRANSMITTED BY IXODIC TICK

T.V. Mzhelskaya¹, E.I. Bondarenko², L.I. Ivanov³, E.V. Mokretsova⁴, O.E. Trotsenko¹, A.G. Dragomeretskaya¹, S.A. Morozova⁵, S.A. Bakhmetyeva³

¹Federal State Institution of Science State Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of Federal service for surveillance on customer rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Khabarovsk, Russia;

²«Vektor-Best», Novosibirsk, Russia

³Khabarovsk Antiplateau Research Institute of Federal service for surveillance on customer rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Khabarovsk, Russia;

⁴State-Financed Educational Institution of the Higher Professional Education «Far Eastern State Medical University», Khabarovsk, Russia;

⁵«Vektor-Best-Amur», Khabarovsk, Russia

The RT-PCR samples of blood plasma and leucocytes taken from 20 in-door patients in 2015 in the city of Khabarovsk with suspected tick-borne infections contained *Borrelia miyamotoi* DNA and *Rickettsia* species DNA up to 10% and 30% respectively. The subsequent sequencing of the genome sites identified the affiliation of *Rickettsia* DNA to the pathogenic to people *Rickettsia heilongjiangensis* and specificity of *Borrelia* DNA to *B.miyamotoi*. The fact of PCR- based diagnostics of tick-borne recurrent fever caused *B.miyamotoi* and Far Eastern tick fever caused by *R.heilongjiangensis* was shown among the patients with early stage of the disease. The screening of the Lyme's ticks collected within Khabarovsk Krai area shows the circulation of *R. heilongjiangensis* and *B. miyamotoi* in the part of the Russian Far East.

Key words: tick-borne infections, *Borrelia miyamotoi*, *Rickettsia*, RT-PCR, sequencing.

Природноочаговые инфекции, переносчиками которых являются иксодовые клещи, широко распространены в регионах России, значительную часть территории которых занимают леса. Число ранее неизвестных возбудителей трансмиссивных заболеваний постоянно увеличивается. Так, в 1995 году в Японии в клещах *Ixodes persulcatus*, собранных на о. Хоккайдо, был изолирован новый вид боррелий, названный *Borrelia miyamotoi* [12].

Позднее *B.miyamotoi* была выявлена в иксодовых клещах в Германии, Швеции и США [3]. Несмотря на то, что переносчиками возбудителя являются иксодовые клещи, генетически он принадлежит к группе боррелий – возбудителей клещевых возвратных лихорадок (КВЛ). В 2003 году сотрудниками ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора ДНК *B.miyamotoi* была выявлена в крови больных беззверителной формой болезни Лайма в г. Ижевске. После чего в России было начато изучение распространенности нового возбудителя и уточнение его роли в инфекционной патологии населения, что является предметом дискуссий среди исследователей и работников здравоохранения. В 2014 году был зарегистрирован набор реагентов для выявления ДНК *B.miyamotoi* методом ПЦР в режиме реального времени с целью выявления генетического маркера возбудителя в клещах и клиническом материале (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) [1, 2].

В настоящее время показано, что частота выявления ДНК *B.miyamotoi* среди голодных иксодовых клещей на территории разных регионов России варьирует от 1,8% до 4,5% [10], а инфицированность клещей, снятых с людей в Приморском крае, достигает 11,6% [5].

Заболевание, вызываемое *B.miyamotoi*, характеризуется отсутствием патогномичного признака ИКБ – эритемы на месте присасывания клеща. У пациентов, инфицированных *B.miyamotoi*, в клинике доминируют выраженная интоксикация, общемозговая симптоматика, нередко в сочетании с судорожным и менингеальным синдромом на фоне высокой лихорадки и характерных изменений в гемограмме в виде лейкопении со сдвигом формулы влево и тромбоцитопении [8]. Возможны рецидивирующее течение, поражение печени, почек, сердца и легких. В период заболевания возможны нарушения функции внешнего дыхания, диастолическая дисфункция левого желудочка, нарушения фильтрации и осмотического концентрирования мочи, микроциркуляторные нарушения и изменения в системе гемостаза [9].

Ежегодно в РФ регистрируется более 2500 случаев риккетсиозов. Из 16 видов риккетсий, относящихся к группе клещевых пятнистых лихорадок, на территории РФ выявлено 7 видов. На территории Сибири и Дальнего Востока РФ выявляются случаи клещевых риккетсиозов, вызываемых *Rickettsia heilongjiangensis*, первый описанный штамм которого был выделен в 1982 году из клещей *Dermacentor silvarum*, собранных в провинции Heilongjiang на северо-востоке Китая [7]. В Хабаровском крае клещевой риккетсиоз (КР) занимает лидирующее место среди трансмиссивных природноочаговых инфекций по числу заболевших. Так, в 2015 году в крае зарегистрировано 156 случаев КР у жителей восьми районов края. Для сравнения, в крае в 2015 году было зарегистрировано 58 случаев иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) и 9 заболевших клещевым энцефалитом (КЭ).

По данным О.Ю. Медяникова (2004), основными переносчиками *R.heilongjiangensis* в биотопах Хабаровского края являются клещи *Haemaphysalis concinna*, инфицированность которых составляет 28%. Клещи *H.japonica* также могут являться переносчиками возбудителя дальневосточного клещевого риккетсиоза, но инфицированность этого вида значительно ниже и составляет 4,5% [6]. Важно отметить, что в Хабаровском крае инфицированность возбудителем *R.heilongjiangensis* на уровне 7% была установлена у клещей *I.persulcatus* [4], отличающихся доминированием в лесных биотопах и высокой агрессивностью по отношению к человеку. Важно отметить, что в Иркутской области инфицированность *R.heilongjiangensis* клещей *H.concinna* значительно ниже и составляет 6,5% [11].

Цель исследования: применить для исследования клинического материала от больных с подозрением на «клещевые» инфекции молекулярно-генетические методы исследования (ПЦР, секвенирование) и оценить их эффективность.

Материалы и методы

Обследовали 20 пациентов, поступивших на лечение в стационар в инфекционное отделение Городской больницы № 10 весной 2015 года. Критерием отбора больных для обследования являлся факт присасывания к ним клеща и развитие лихорадочного состояния у больных.

Забор крови у больных производили в лихорадочном периоде заболевания на 4-6-й день после присасывания клеща.

Образцы крови для анализа ПЦР-РВ у пациентов забирали натощак в пробирки S-Monovette (SARSTEDT, Германия), содержащие ЭДТА. Для получения образцов плазмы 2 мл полученной цельной крови от больного центрифугировали 10 мин при 800 об/мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) и отбирали для анализа верхний слой плазмы. Для получения лейкоцитарной фракции крови (ЛФК) плазму переносили в другую пробирку и центрифугировали 10 мин при 13 000 об/мин. Основную часть супернатанта удаляли, нижнюю часть жидкости объемом в 200-250 мкл вместе с осадком лейкоцитов и бактериальной массы ресуспендировали. Выделение суммарных НК из 100 мкл полученной суспензии ЛФК и из 1000 мкл плазмы проводили с использованием наборов реагентов «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест экстракция 1000» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) соответственно согласно инструкциям производителя.

Выявление ДНК *B. miyamotoi*, а также ДНК возбудителей ИКБ, *Anaplasma phagocytophilum*, вызывающей гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), *Ehrlichia muris/Ehrlichia chaffeensis* – возбудителя моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) и РНК ВКЭ в образцах суммарной НК, выделенной из плазмы и ЛФК больных, проводили методом ПЦР-РВ с помощью соответствующих коммерческих наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест». Для определения ДНК риккетсий в клинических образцах с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени (ПЦР-РВ) использовали лабораторную версию набора реагентов «РеалБест ДНК *Rickettsia species*». При постановке этого теста амплифицируется консервативный фрагмент гена цитратсинтазы (*gltA*), имеющийся у различных представителей рода *Rickettsia*. Выявление генетического материала патогенных для человека видов риккетсий в клещах *I. persulcatus*, *H. concinna* и *H. japonica* проводили с помощью лабораторной версии набора реагентов «РеалБест ДНК *Rickettsia sibirica/Rickettsia heilongjiangensis*», при использовании которой при постановке реакции специфические праймеры и зонды гибридизуются на участках генов *ompA R. sibirica* и *ompB R. heilongjiangensis*, обеспечивая их эффективную амплификацию для детекции в ПЦР-РВ.

Постановку ПЦР проводили на термоциклере с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «iQ5 iCycler» и «CFX96» («Bio-Rad», США). Видовую принадлежность *B. miyamotoi* (по участку гена *glpQ*) и риккетсий (по участку гена *gltA*) подтверждали секвенированием по Сэнгеру на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3100 DNA Analyser» («Applied Biosystems», США) в Межинститутском центре секвенирования ДНК СО РАН (г. Новосибирск). Для филогенетического анализа полученных нуклеотидных последовательностей применяли программу MEGA 4.0 [14], а для их сравнения с данными GenBank – поисковую систему «BLAST».

Сыворотки крови всех обследуемых с отрицательным результатом ПЦР были исследованы методом ИФА с целью выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу клещевого энцефалита (КЭ), классов М и G к возбудителям иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ).

Для выявления специфических IgM и IgG к *B. miyamotoi* в качестве антигена, сорбируемого на поверхность лунок планшет, использовали рекомбинантный белок *glpQ*, синтезированный по описанной ранее методике [13].

Результаты и обсуждение

В предварительном исследовании нами была изучена зараженность возбудителями клещевого риккетсиоза и *B. miyamotoi* клещей, собранных на флаг в лесных биотопах Хабаровского края в 2015 году. По результатам исследований ДНК *R. heilongjiangensis* была обнаружена у 19,8% клещей *H. concinna* и 4,0% клещей *H. japonica*. ДНК *B. miyamotoi* была выявлена у всех исследованных видов клещей (*I. persulcatus*, *H. concinna*, *H. japonica*, *D. silvarum*) и составила 1,8%, 1,2%, 2,0% и 3,0% соответственно. При исследовании клещей, удаленных после присасывания с жителей Хабаровского края в 2014 и 2015 гг. ДНК *B. miyamotoi* была обнаружена в 4,9±1,9% и 3,35±1,8% проб соответственно.

Полученные результаты ПЦР-анализа клинического материала свидетельствуют о наличии в плазме и в образцах ЛФК двух из 20 (10%) больных ДНК *Borrelia miyamotoi*. Выявление генетического маркера *B. miyamotoi* с помощью ПЦР-теста было подтверждено секвенированием по гену *glpQ*, присутствующему у боррелий группы клещевых возвратных лихорадок (КВЛ), но отсутствующему у боррелий, возбудителей ИКБ, относящихся к группе *Borrelia burgdorferi s.l.* Именно наличие гена *glpQ* у *B. miyamotoi* позволяет дифференцировать ее от возбудителей ИКБ с помощью ПЦР-анализа при анализе как клещей, так и клинических образцов. Проведение секвенирования по участку гена *glpQ* двух выделенных положительных образцов ДНК *B. miyamotoi*, подтвердило данные ПЦР-анализа о наличии в крови больных этого патогена. Филогенетический анализ изолятов *B. miyamotoi* показал, что

они идентичны возбудителям, выделенным в 2012 году из материала от больных в Новосибирской области, в 2014 году в Иркутской области и в 2015 во Владивостоке (KU169374).

Нуклеотидные последовательности участка гена *glpQ*, (678 п.н.), полученные от двух хабаровских больных, были размещены в международной электронной базе данных GenBank под номерами KU974151 и KU974152.

Концентрация *B.miyamotoi* в крови больного может достигать от несколько сотен до сотен тысяч боррелий в 1 мл [1, 12, 13]. По-видимому, наличие продуктов жизнедеятельности и продуктов распада от такого количества боррелий в крови может вызывать пирогенный эффект у больных с лихорадками, возникшими после инфицирования *B.miyamotoi* в результате присасывания клеща.

Проведенный ПЦР-анализ на выявление маркеров других инфекций, передающихся клещами (ИПК), обеспечил выявление ДНК *Rickettsia spp.* в ЛФК 6 из 20 (30%) обследованных пациентов. Выявление генетических маркеров возбудителя подтверждено с помощью секвенирования по гену *gltA*. Полученные данные свидетельствовали, что ДНК риккетсий принадлежала к патогенному виду *R.heilongjiangensis*. Значения Ct при выявлении ДНК *B.miyamotoi* в плазме крови с помощью ПЦР-РВ составили 34-39, в ЛФК – 27-31. Значения Ct при определении ДНК риккетсий достигали 37- 40 цикла при ПЦР-анализе плазмы крови и 31-38 при анализе ЛФК.

Использование рекомбинантного белка *glpQ* в ИФА обеспечило выявление в сыворотках специфических антител класса G к *B.miyamotoi* у 2 из 20 (10%) больных, причем у этих же пациентов выявлены IgG к антигенам боррелий, возбудителей ИКБ (*B.burgdorferi s.l.*). Всего с помощью серологического теста «ЛаймБест-IgG» обнаружены антитела у 5 из 20 (25%) пациентов с подозрением на ИПК. Таким образом, комплексный подход с применением ПЦР-анализа совместно с ИФА обеспечил выявление у 13 из 20 (65%) больных маркеров возбудителей ИПК. В результате применения двух методов исследования (ПЦР и ИФА) было установлено, что у 7 из 20 (35%) обследованных пациентов лихорадка имела боррелиозную этиологию, причем в 2 случаях доказана причастность к заболеванию именно *B.miyamotoi*.

Заключение

Присутствие возбудителей дальневосточного риккетсиоза и малоизученной КВЛ, вызываемой *B.miyamotoi*, в напивавшихся и голодных клещах в совокупности с выделением из клинического материала от заболевших после присасывания клеща свидетельствует об их активной циркуляции на территории Хабаровского края. Функционирование на значительной территории Хабаровского края природных очагов инфекций, передающихся иксодовыми клещами, выявленное сочетанное инфицирование клещей вирусными и бактериальными патогенами предполагают развитие у лиц, пострадавших от присасывания клеща, микст-инфекций, требующих своевременной точной диагностики для назначения адекватной терапии. Методы молекулярно-генетического анализа являются высокоэффективными, позволяют подтвердить клинический диагноз уже в первые дни заболевания, а также изучить генетическое разнообразие и выявить эпидемиологические связи между возбудителями.

Литература

1. Бондаренко Е.И., Позднякова Л.Л., Сибирцева С.Г. и др. Набор реагентов для выявления *Borrelia miyamotoi* – возбудителя клещевой возвратной лихорадки методом ПЦР в режиме реального времени // Новости Вектор-Бест. – 2013. - № 1 (67) – С. 2-9.
2. Бондаренко Е.И., Трушина Ю.Н., Якович Н.В. и др. Использование комплексного подхода к выявлению возбудителей инфекций, передаваемых клещами в Иркутской области // Инфекционные болезни. - 2015. - Т. 13. Приложение № 1. - С. 52–53.
3. Войцеховская И.В., Козлова И.В., Сунцова О.В. и др. Циркуляция *Borrelia miyamotoi* в природных очагах Прибайкалья // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2014. - Т.8. - С. 56-65.
4. Иголкина Я.П., Пар В.А., Т.Е. Епихин и др. Молекулярно-генетический анализ риккетсий, переносимых иксодовыми клещами на территории Дальнего Востока. // Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе: Материалы научно-практической конференции. – Новосибирск, 2016. – С. 109-111.
5. Леонова Г.Н., Бондаренко Е.И., Хворостенко А.А., Курловская А.В. Изучение распространенности на юге Дальнего Востока возбудителей инфекций, передаваемых иксодовыми клещами // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. - № 1 (80). – С. 31-35.
6. Медяников О.Ю. Клинико-эпидемиологическая характеристика клещевого риккетсиоза, вызываемого *Rickettsia heilongjiangensis* на Дальнем Востоке России: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М.; 2004. –137 с.
7. Рудаков Н.В. Риккетсии и риккетсиозы: Руководство для врачей. – Омск. – 2016. – 400 с.
8. Сарксян Д.С. Иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный *Borrelia miyamotoi* – клинико-эпидемиологическая характеристика, диагностика, лечение: Автореф. дисс. ... д-ра. мед. наук. - М.; 2016. – 45 с.

9. Скрипченко Н.В., Балинова А.А. Клинико-лабораторные особенности иксодового клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, у детей // Журнал инфектологии. - 2010. - Том 2. - № 2. - С. 35-39.
10. Фоменко Н.В., Ливанова И.Н., Баргоянов В.Ю., и др. Выявление *Borrelia miyamotoi* в клещах *Ixodes persulcatus* на территории России // Паразитология. – 2010. - № 3 (Том 44). – С. 201-210.
11. Яковчиц Н.В., Бондаренко Е.И., Адельшин Р.В. и др. Выявление ДНК возбудителей клещевого риккетсиоза в клещах на территории Иркутской области // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2015. - №6 (85). - С. 43 – 47.
12. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y. et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan // Int. J.Syst. Bacteriol. — 1995. — 45. — P. 804-810.
13. Krause P.J., Narasimhan S., Wormser G.P. et al. *Borrelia miyamotoi sensu lato* seroreactivity and seroprevalence in the northeastern United States // Emerg. Infect. Dis. - 2014. - V. 20. - P. 1183–1190.
14. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. et al. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia // Emerg. Infect. Dis. — 2011. — 17 (10). — P. 1816-1822.

Сведения об авторах:

Мжельская Тамара Владимировна – руководитель лабораторией клещевого энцефалита и других природно-очаговых инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора. 680610, г. Хабаровск, ул. Шевченко, д.2. тел. 8 (4212) 46-18-59 E-mail: adm@hniiem.ru
