

УДК 616.988.25-002.954.2

И.В. Козлова¹, Е.К. Дорощенко¹, О.В. Лисак¹, Ю.П. Джиоев¹, М.М. Верхозина², Т.В. Демина³,
В.А. Рар⁴, С.Е. Ткачев⁴, Н.В. Фоменко⁴, О.В. Сунцова¹, О.О. Черноиванова¹, А.И. Парамонов¹,
А.О. Ревизор³, В.И. Злобин³

ВИДОВОЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

¹ ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

² ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» (Иркутск)

³ ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития (Иркутск)

⁴ ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН (Новосибирск)

В статье подведены итоги многолетних исследований по изучению видового и генетического разнообразия возбудителей клещевых инфекций, циркулирующих в сочетанных природных очагах Восточной Сибири. Результаты исследования свидетельствуют о высокой генетической неоднородности региональной популяции вируса клещевого энцефалита, которая представлена штаммами дальневосточного, западного, урало-сибирского генотипов, штаммами группы 886 и 178-79. Установлено инфицирование иксодовых клещей следующими патогенами: *B. garinii*, *B. afzelii*, *R. sibirica*, *R. raoultii* (генотипы *R. sp. DnS14*, *R. sp. DnS28*), *E. muris*, *A. phagocytophilum* и *Candidatus «Neoehrlichia mikurensis»*.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, вирус клещевого энцефалита, боррелии, риккетсии, эрлихии, анаплазмы, сочетанные очаги

SPECIES AND GENETIC VARIETY OF TICK INFECTIONS PATHOGENS ON THE TERRITORY OF THE EASTERN SIBERIA

I.V. Kozlova¹, E.K. Doroshenko¹, O.V. Lisak¹, Yu.P. Dzhioyev¹, M.M. Verkhovina²,
T.V. Dyomina³, V.A. Rar⁴, S.E. Tkachev⁴, N.V. Fomenko⁴, O.V. Suntsova¹,
O.O. Chernovanova¹, A.I. Paramonov¹, A.O. Revizor³, V.I. Zlobin³

¹ Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction SB RAMS, Irkutsk

² Center of Hygiene and Epidemiology in Irkutsk Region, Irkutsk

³ Irkutsk State Medical University, Irkutsk

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

The article sums up long-term researches of studying of species and genetic variety of tick infections pathogens in combined natural focuses of the Eastern Siberia. The results of the research testify to the high genetic variety of regional population of tick-borne encephalitis virus that is represented by the strains of Far-Eastern, West, Ural-Siberian genotypes, the strains of the group 886 and 178-79. Infection of Ixodidae by the next pathogens: *B. garinii*, *B. afzelii*, *R. sibirica*, *R. raoultii* (renomuny *R. sp. DnS14*, *R. sp. DnS28*), *E. muris*, *A. phagocytophilum* u *Candidatus «Neoehrlichia mikurensis»* are determined.

Key words: genetic variety, tick-borne encephalitis virus, *Borrelia*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasmas*, combined focuses

Природно-очаговые трансмиссивные клещевые инфекции имеют широкое распространение в мире и отличаются большим этиологическим разнообразием — вирусы, риккетсии, бактерии, простейшие. Проблема заболеваний, переносчиками которых являются иксодовые клещи, в последнее десятилетие приобретает все большее значение для многих регионов России, в том числе и для Восточной Сибири, где отмечается беспрецедентный рост заболеваемости населения клещевым энцефалитом (КЭ), иксодовыми клещевыми боррелиозами (ИКБ), клещевым риккетсиозом (КР).

Современная неблагоприятная эпидемиологическая ситуация в отношении клещевых инфекций в России характеризуется не только ростом известных клещевых инфекций, но и выявлением новых нозологических форм и патогенов, роль которых в региональной инфекционной патологии еще не установлена.

Чрезвычайно важным новым аспектом является то, что очаги разных клещевых инфекций

накладываются друг на друга, т.е. речь идет о сочетанных природных очагах вирусных, бактериальных и риккетсиозных инфекций. Для понимания современной обстановки, осуществления регионально ориентированной диагностики и дифференцированной профилактики клещевых инфекций в Восточной Сибири необходима достоверная информация о спектре циркулирующих на территории региона клещевых патогенов и их генетической вариабельности.

Цель исследования — охарактеризовать видовое и генетическое разнообразие возбудителей клещевых инфекций на территории Восточной Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано 172 штамма ВКЭ из коллекции Института эпидемиологии и микробиологии ФБУЗ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, выделенных из различных биологических источников в период

с 1963 по 2006 гг., собранных в природных очагах Забайкалья и Прибайкалья и 9 изолятов РНК из крови больных людей.

Изучение генетической variability вируса КЭ проводили с использованием различных молекулярно-генетических подходов: реакции мГНК с панелью из 40 дезоксиолигонуклеотидных зондов [3], секвенирования фрагментов и полного генома вируса, ОТ-ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флюоресцентной детекцией с генотипспецифическими зондами [4]. ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводилось на базе ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ (г. Москва). Секвенирование штаммов вируса КЭ осуществлялось в ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ (г. Москва) и в Центре секвенирования ДНК СО РАН (г. Новосибирск).

Детекцию и идентификацию эрлихий/анаплазм и риккетсий проводили в два этапа [9, 30]. На первом этапе использовали родоспецифичные праймеры из области генов *gltA* (для риккетсий) и 16S рРНК (для эрлихий). На втором этапе видовую принадлежность и генетические варианты выявленных риккетсий определяли с помощью праймеров, специфичных участкам гена *gOmpA* *R. sibirica* и *R. slovaca*. Идентификацию эрлихий и анаплазм осуществляли с помощью праймеров, специфичных к *A. phagocytophilum* и *E. muris*. Детекция ДНК боррелий группы КВЛ в образцах таежных клещей проведена методом двухраундовой ПЦР с праймерами направленными к гену *rbb* специфичными для боррелий группы КВЛ [12]. Определение нуклеотидных последовательностей положительных образцов проводили в Центре

секвенирования ДНК Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск). Кроме того, часть исследований по детекции РНК и ДНК клещевых патогенов осуществлялась на базе ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ (г. Москва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы в Институте эпидемиологии и микробиологии ФБУЗ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН значительно продвинулись исследования в области нового, быстро развивающегося во всем мире научного направления, получившего название молекулярной эпидемиологии, задачей которого является осуществление эпидемиологического анализа на основе определения степени гомологии вариантов возбудителей инфекций на молекулярном уровне.

Начиная с 1990-х годов, был проведен цикл работ по изучению природной изменчивости вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Использование различных молекулярно-биологических технологий позволило установить, что на территории Восточной Сибири циркулируют три генотипа ВКЭ (дальневосточный (генотип 1), европейский (генотип 2), урало-сибирский, (генотип 3) при общем доминировании и более широком распространении урало-сибирского генотипа (78,7 % выборки) (рис. 1).

Наибольшая генетическая variability обнаружена в природной популяции ВКЭ, циркулирующего на территории Иркутской области, где кроме трех основных генотипов обнаружены штаммы 886-84 и 178-79 со своеобразной генетической структурой, уникальность которой была доказана с помощью полногеномного секвенирования.

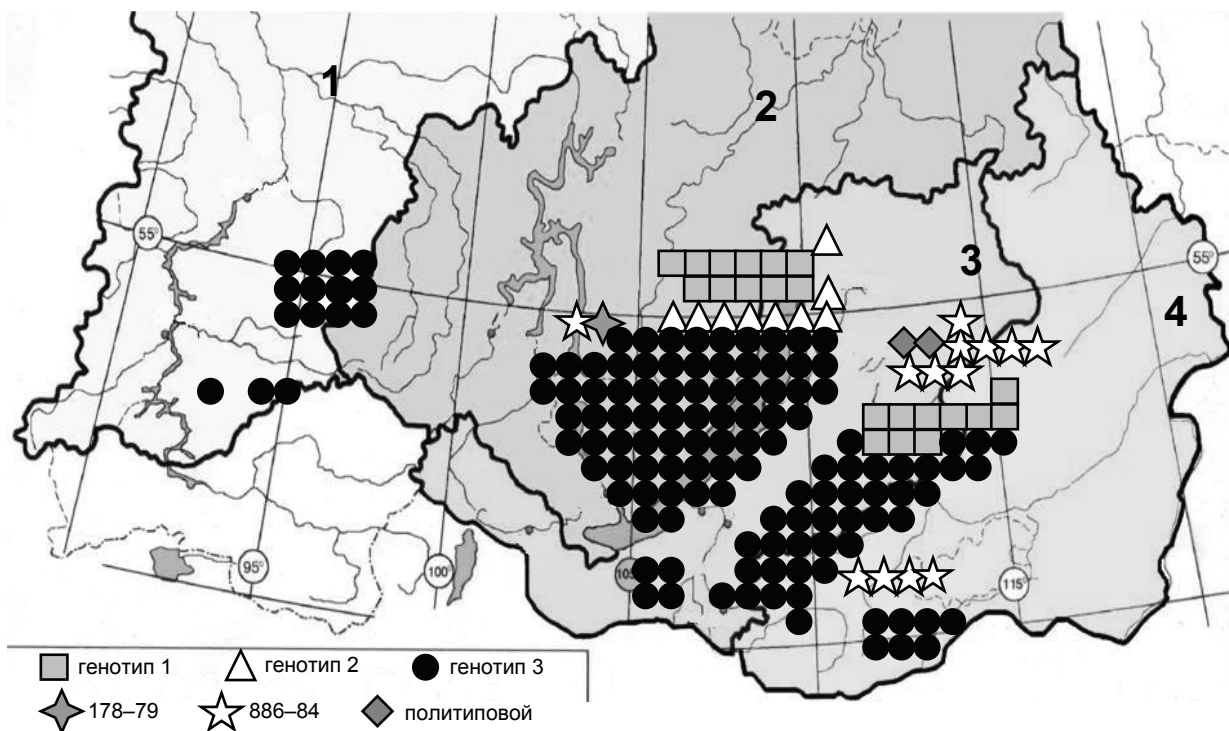


Рис. 1. Географическое распространение генотипов ВКЭ на территории Восточной Сибири: 1 – Красноярский край и Республика Хакасия; 2 – Иркутская область; 3 – Республика Бурятия; 4 – Читинская область.

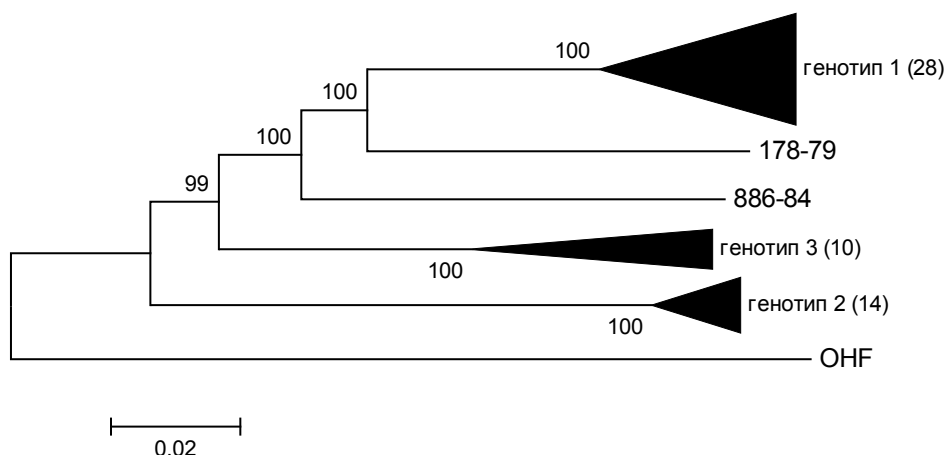


Рис. 2. Филогенетическое дерево, демонстрирующее уровень генетического родства 54 штаммов ВКЭ, полученное на основании расшифровки кодирующей области полипротеина (10242 н.п.): генотип 1 – X07755, AB022703, AB001026, DQ989336, AY182009, AY217093, JF316707, JF316708, FJ997899, EU816450–EU816455, AY169390, FJ906622, GQ228395, FJ402885, FJ402886, DQ862460, GU121642, HQ201303, HQ901367, HQ901366, HM859894, HM859895, JN003205, Sofjin [28]; генотип 2 – TEU27495, TEU27491, TEU39292, AF091010, EU106868, DQ401140, GV266392, HM535610, HM535611, HM120875, GU183379–GU183381, GU183383; генотип 3 – L40361, AF527415, DQ486861, FJ968751, JN003206–JN003209, GU183382, GU183384.

Сопоставление полного генома штаммов 886-84 (EF469662) и 178-79 (EF469661) с последовательностями ВКЭ, имеющимися в GenBank, показало, что на филогенетических деревьях они образуют самостоятельные ветви, не входя в состав кластеров трех основных генотипов (рис. 2). По уровню нуклеотидных и аминокислотных замен они «приближаются к границе разделения генотипов» (табл. 1) [7].

Таблица 1
Уровень нуклеотидных и аминокислотных замен между генотипами ВКЭ и штаммом 886-84 (%) (кодирующая область полипротеина, длина 10242 н.п.)

	генотип 1	генотип 2	генотип 3
Уровень нуклеотидных замен (%) (кодирующая область полипротеина, длина 10242 н.п.)			
генотип 1	4,3		
генотип 2	16,4	2,3	
генотип 3	14,4	15,2	5,4
178–79	11,0	16,0	14,1
886–84	12,5	15,6	13,7
Уровень аминокислотных замен (%) (полная аминокислотная последовательность полипротеина, длина 3414 а.о.)			
генотип 1	1,3		
генотип 2	6,9	0,9	
генотип 3	5,3	6,2	1,9
178–79	3,1	6,1	5,2
886–84	3,9	6,0	4,2

Примечание: серым цветом выделен уровень нуклеотидных и аминокислотных замен внутри каждого генотипа.

Анализ полной аминокислотной последовательности генома штамма 886-84 подтвердил, что его генетическая структура уникальна, она представля-

ет собой «переплетение» из последовательностей, характерных для генотипов 1, 2 и 3.

На настоящий момент с помощью мГНК и секвенирования нами выявлена группа из 13 изолятов, имеющих генетическую структуру, аналогичную штамму 886-84 (группа 886). Для восьми штаммов из этой группы были получены фрагменты геномов длиной 1650 н.о., кодирующие белки С, М и часть белка Е (810 н.о.) (GenBank, №№ доступа: EF469662, EU878281 – EU878283, JN936341, JN936347, JN936349 – JN936350, JN936353 – JN936355) (рис. 3).

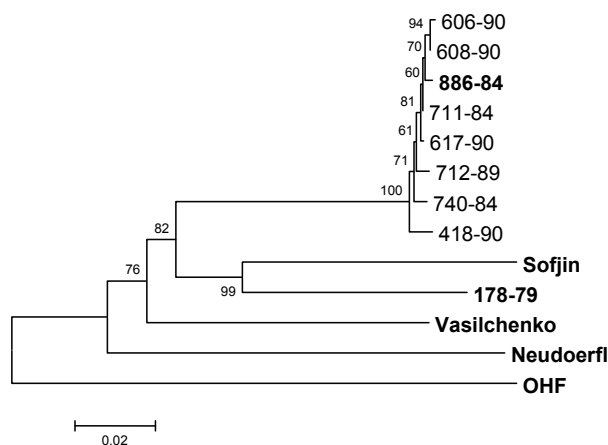


Рис. 3. Филогенетическое дерево (NJ, Kimura 2), построенное на основе анализа фрагмента генома ВКЭ, соответствующего генам С, М и части Е (1650 н.о.).

Гомология со штаммом 886-84 составила 98,2 – 99,8 %, а уровень различий между штаммами группы 886 и представителями трех основных генотипов варьировал от 13,1 % со штаммом Софжин до 16,6 % со штаммом Найдорф.

Проведенные нами исследования позволили установить, что ВКЭ «группы 886» имеет собственный ареал. Штаммы группы 886 обнаружены на

территории трех крупных регионов Восточной Сибири: Республика Бурятия, Иркутская и Читинская области. Недавно в литературе описан случай менингоэнцефалита с летальным исходом в Булганском аймаке Монголии, который был вызван изолятом, имеющим генетическую структуру, аналогичную штамму 886-84 [15]. Установлена экологическая связь штаммов из этой группы со всеми звеньями трансмиссивной цепи, изучены их биологические свойства.

Нами было отмечено, что генетическое разнообразие вируса наблюдается в тех районах, где более выражено разнообразие ландшафтов, а следовательно, переносчиков ВКЭ и их прокормителей. Например, в Иркутской области это Эхирит-Булагатский район, где обнаруживаются штаммы всех трех генотипов, включая европейский, а также штаммы 886-84 и 178-79.

Показано, что роль теплокровных и иксодовых клещей в селекции штаммов разных генотипов может быть неодинаковой. Наибольшее генетическое разнообразие отмечено среди штаммов ВКЭ, изолированных от млекопитающих. Так, млекопитающие участвуют в селекции штаммов генотипов 1, 2, 3, 886-84 и так называемых микст-штаммов. Выделение штаммов генотипов 1, 3, 178-79 и 886-84 от клещей также свидетельствует об их существенной роли в формировании гетерогенной популяции ВКЭ в Восточно-Сибирском регионе.

Путем изоляции штаммов от больных людей установлено, что в региональной инфекционной патологии принимают участие все три генотипа ВКЭ, а также «микст-штаммы» (табл. 2).

Штаммы урало-сибирского генотипа (Айна/1448, 215-79, 210-79 и 413-04) вызывали инап-

паратную, менингеальную, менингоэнцефалитическую и прогредиентную формы заболевания. Штамм 1Г-98, выделенный из сгустка крови больного лихорадочной формой КЭ, был отнесен к западному генотипу. Штамм 2517-05, изолированный из сгустка крови больной прогредиентной формой КЭ, принадлежал к дальневосточному генотипу.

С помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени был выявлен один «микст-штамм» (№ 3869-03), который содержал одновременно ВКЭ урало-сибирского и западного генотипов. Штамм выделен из сыворотки крови человека с инаппарантной формой КЭ. До генотипирования, выявившего наличие геномов двух подтипов, штамм прошел пять пассажей в культуре клеток и на белых беспородных мышах, что указывает на стабильность двойной инфекции.

Генотипирование девяти изолятов РНК, выделенных из проб крови больных людей, находящихся в 2009 г. на лечении в стационаре по поводу инфекционного заболевания, возникшего после укуса клеща, показало, что в 7 случаях этиологическим агентом инфекции послужил ВКЭ дальневосточного генотипа, в 2 других — урало-сибирского.

По данным ряда авторов, особенности клинического течения ИКБ и эффективность диагностики зависят от генетической структуры возбудителей [5, 14, 16, 24]. Исследователи отмечают, что использование в качестве диагностикомов региональных изолятов боррелий приводит к повышению эффективности выявления больных ИКБ на данной территории [22, 25, 27]. В связи с этим актуальным является изучение региональных особенностей видового состава боррелий, циркулирующих на территории Восточной Сибири и принимающих участие в инфекционной патологии.

Таблица 2
Генотипирование штаммов и изолятов РНК ВКЭ, выделенных от больных людей в Иркутской области

Штамм, изолят РНК	Источник выделения	Форма заболевания	Генотип
Айна/1448	Ликвор	Хронический КЭ, прогредиентная форма	3
215-79	Секц. материал	Острый КЭ, менинго-энцефалитическая форма	3
210-79	Сыворотка крови	КЭ, форма неизвестна	3
1Г-98	Сгусток крови	КЭ, лихорадочная форма	2
3869-03	Сыворотка крови	КЭ, инаппарантная форма	3, 2
413-04	Сыворотка крови	КЭ, менингеальная форма, двухволновое течение	3
2517-05	Сгусток крови	Хронический КЭ, прогредиентная форма	1
А-09	РНК из крови	Хронический КЭ, прогредиентная форма	1
Ј-09	РНК из крови	КЭ, лихорадочная форма	3
Г-09	РНК из крови	КЭ, лихорадочная форма; гепатит А	1
Н-09	РНК из крови	КЭ, лихорадочная форма, средней тяжести	1
Ки-09	РНК из крови	КЭ, лихорадочная форма, средней тяжести	1
Л-09	РНК из крови	КЭ; клещевой риккетсиоз	1
S-09	РНК из крови	КЭ, менингеальная форма, тяжелое течение	1
Ко-09	РНК из крови	КЭ; ИКБ, безэритемная форма	1
В-09	РНК из крови	КЭ, лихорадочная форма, средней тяжести	3

Проведенное нами в 2009 г. генотипирование 55 образцов клещей, собранных на территории Усть-Илимского, Братского, Киренского и Бодайбинского районов Иркутской области, показало присутствие в них ДНК *V. garinii*.

С целью определения геновидов боррелий, принимающих участие в развитии ИКБ у людей, было проведено типирование 59 образцов крови, взятых в разные сроки с момента укуса клеща (табл. 3). Было установлено, что в 11 пробах содержится ДНК *V. garinii*, в 2 образцах генотипирована *V. afzelii*, в 7 пробах одновременно обнаружена ДНК *V. garinii* и *V. afzelii*.

Результаты этих исследований подтверждают полученные ранее данные о циркуляции на территории Прибайкалья двух геновидов боррелий — *V. garinii* и *V. afzelii* — и доказывают участие этих геновидов в развитии ИКБ у больных в Прибайкалье. Учитывая широкое распространение *V. garinii* и *V. afzelii* на территории Восточной Сибири, при проведении лабораторной диагностики ИКБ целесообразным было бы использование диагностиком на основе комбинации этих двух геновидов.

Совсем недавно в иксодовых клещах, собранных на территории России, а также в крови людей с безэритемной формой ИКБ был обнаружен новый вид боррелий — *B. miyamotoi*, принадлежащих к группе возбудителей клещевых возвратных лихорадок. Впервые *B. miyamotoi* была обнаружена в клещах *I. persulcatus* в Японии в 1995 г. [21], впоследствии ее находили в *I. ricinus* во Франции, Германии, Швеции [20, 29], в *I. scapularis* и *I. pacificus* — в Северной Америке [13, 18], в клещах *I. persulcatus* — в России [8, 12, 23]. В 2008 г. *B. miyamotoi* была впервые генотипирована в клещах *I. persulcatus*, отловленных на территории Иркутской области. При исследовании 519 клещей ДНК *B. miyamotoi* обнаружена в 3,9 % случаев. В 0,6% проб выявлено микстинфицирование переносчиков *B. miyamotoi* и *B. burgdorferi* s.l. (табл. 4)

Открытие «новой» клещевой инфекции, этиологическим агентом которой является *B. miyamotoi*, требует создания и внедрения серологических и ПЦР-методик для дифференциальной диагностики данного заболевания и выяснения степени его

распространенности в Восточной Сибири, а также детального исследования клинической картины и разработки способов лечения и профилактики.

Возбудителем КР в Иркутской области является *R. sibirica*, однако появление в последнее время сведений о новых видах риккетсий на территории юга Сибири, Северного Казахстана и Дальнего Востока [1, 2, 10, 11] свидетельствует о необходимости уточнения вопроса об этиологии этой инфекции в Прибайкалье. Проведенные нами исследования показали, что наряду с *R. sibirica* на территории региона циркулируют риккетсии *R. raoultii* (генотипы *R. sp.* DnS14, *R. sp.* DnS28, *R. sp.* RpA4), патогенность которых для человека пока не изучена.

С целью установления роли различных генотипов риккетсий в развитии КР нами проведено исследование 73 проб крови больных людей, в 14 (19,2 %) из них обнаружена ДНК риккетсий. Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *rOmpA* длиной 337 п.н. у двух ампликонов показало, что оба они генетически близки *R. raoultii* генотипа *R. sp.* DnS14, что указывает на возможную роль данного генотипа риккетсий в региональной инфекционной патологии.

В последние годы в клещах тех же видов, с которыми связана передача вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и боррелий, обнаружены возбудители *Ehrlichia muris* и *Anaplasma phagocytophilum* и описаны новые для России заболевания — моноцитарный эрлихиоз (МЭЧ) и гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ).

На наличие ДНК эрлихий и анаплазм нами было проанализировано 1387 экземпляров иксодовых клещей из 10 районов Иркутской области (табл. 5).

ДНК *E. muris* обнаружена в клещах, собранных на территории всех обследованных районов. Инфицированность клещей *E. muris* варьировала в широких пределах от 5,7 % в Усть-Илимском районе до 33,8 % в Качугском районе. ДНК *A. phagocytophilum* выявлена в таежных клещах, отловленных на территории Иркутского, Слюдянского, Эхирит-Булагатского, Казачинско-Ленского и Качугского районов Иркутской области. Случаи микст-инфицирования клещей двумя видами возбудителей зафиксированы на территории Иркут-

Таблица 3

Результаты исследования в ПЦР сывороток крови людей

Число исследованных сывороток	Положительный результат абс. % ± m	в том числе			Отрицательный результат абс. % ± m
		только <i>V. garinii</i> абс. % ± m	только <i>V. afzelii</i> абс. % ± m	<i>V. garinii</i> + <i>V. afzelii</i> абс. % ± m	
59	20 33,9 ± 6,2	11 18,6 ± 5,1	2 3,4 ± 2,4	7 11,9 ± 4,2	39 66,1 ± 6,1

Таблица 4

Выявление ДНК *B. miyamotoi* и *B. burgdorferi* s.l. в клещах *I. persulcatus* на территории Иркутской области

Число исследованных / положительных образцов	Число положительных образцов (%)		
	<i>B. miyamotoi</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>B. miyamotoi</i> + <i>B. burgdorferi</i> s.l.
519 / 162	20 (3,9 %)	139 (26,8 %)	3 (0,6 %)

Результаты исследования клещей на наличие ДНК *E. muris* и *A. phagocytophilum*

Район	Всего исследовано	<i>E. muris</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. muris</i> + <i>A. phagocytophilum</i>
Киренский	189	43 (22,8 %)	–	–
Усть-Илимский	122	7 (5,7 %)	–	–
Братский	52	4 (7,7 %)	–	–
Бодайбинский	56	4 (7,1 %)	–	–
Иркутский	390	34 (8,7 %)	22 (5,6 %)	7 (1,8 %)
Эхирит-Булагатский	339	21 (6,2 %)	9 (3,4 %)	7 (2,7 %)
Слюдянский	48	5 (10,4 %)	1 (2,1 %)	1 (2,1 %)
Казачинско-Ленский	68	4 (5,9 %)	1 (1,5 %)	–
Качугский	71	24(33,8 %)	1 (1,4 %)	2 (2,8 %)
Ольхонский	52	–	–	1 (1,9 %)
Всего	1387	146 (10,5 %)	34 (2,5 %)	18 (1,3 %)

ского, Эхирит-Булагатского, Слюдянского, Качугского и Ольхонского районов. Инфицированность клещей *I. persulcatus E. muris* составила 10,5 %, а *A. phagocytophilum* – 2,5 %. Два вида возбудителей одновременно обнаружены в 1,3 % случаев. При исследовании клещей *H. concinna* выявлена только ДНК *E. muris* (2,9 %). В клещах рода *Dermacentor*, собранных на территории Ольхонского района, ДНК возбудителей МЭЧ и ГАЧ не обнаружена.

У образцов ДНК *E. muris* были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена 16S рРНК длиной 653 н.п., они оказались наиболее схожими с соответствующим участком образца, впервые обнаруженного в клещах *Haemaphysalis* в Японии. В одном из клещей, отловленных на территории Иркутского района, генотипирована *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. Секвенирование фрагмента гена 16S рРНК длиной 1299 н.п. и сравнение первичной структуры амплифицированного фрагмента с нуклеотидными структурами микроорганизмов семейства *Anaplasmataceae*, имеющимися в GenBank, показало его схожесть с соответствующим участком образца *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, впервые обнаруженного в Японии в клещах *Ixodes ovatus* и грызунах [26], и нуклеотидными последовательностями образца ранее описанного, как «Ehrlichia-like» sp. Schotti variant и обнаруженного при исследовании клещей *I. ricinus*, собранных в Голландии, и в клещах *I. persulcatus* из Омской области [6, 17, 19].

Нуклеотидные последовательности фрагмента гена groESL оперона *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* длиной 1245 н.п. оказались идентичными нуклеотидным структурам образца *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (EU810406), которая была генотипирована недавно в образце крови пациента из Германии, что может служить свидетельством в пользу возможного участия этого вида возбудителя в инфекционной патологии человека.

В микст-инфицированных клещах нами обнаружены следующие сочетания патогенов: *E. muris* в комбинации с *A. phagocytophilum*, или

B. burgdorferi s.l., или вирусом КЭ, или *B. miyamotoi*; *A. phagocytophilum* в сочетании с вирусом КЭ. Также обнаружено микст-инфицирование клещей сразу тремя патогенами: *E. muris*, *B. burgdorferi* s.l и вирус КЭ; *E. muris*, *A. phagocytophilum* и *B. miyamotoi*.

ВЫВОДЫ

1. На территории Иркутской области существуют сочетанные очаги КЭ, ИКБ, КР, МЭЧ и ГАЧ.
2. Результаты исследования свидетельствуют о высокой генетической неоднородности региональной популяции ВКЭ на территории Восточной Сибири, которая представлена штаммами дальневосточного, западного, урало-сибирского генотипов, штаммами группы 886, 178-79. Основу популяции составляют штаммы урало-сибирского генотипа.
3. Показана уникальность генетической структуры штаммов ВКЭ группы 886 и 178-79, которые представляют собой разные варианты «переплетений» из аминокислотных последовательностей, характерных для генотипов 1, 2 и 3.
4. Получена информация о генетической вариативности возбудителей ИКБ в Иркутской области. Результаты исследований подтвердили данные о циркуляции на территории области *B. garinii* и *B. afzelii* и позволили получить доказательства участия этих геновидов боррелий в формировании заболеваемости.
5. Выявлена значительная генетическая вариативность риккетсий, циркулирующих на территории региона. Наряду с *R. sibirica* обнаружены риккетсии новых генотипов, в том числе, с неустановленной патогенностью для человека (*R. raoultii* (генотипы *R. sp.* DnS14, *R. sp.* DnS28)). Вклад риккетсий новых генотипов в региональную инфекционную патологию требует углубленного изучения.
6. На территории Иркутской области выявлено наличие природных очагов МЭЧ и ГАЧ с циркуляцией в них *E. muris*, *A. phagocytophilum* и *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. Обнаружена высокая

степень зараженности клещей *I. persulcatus* анаплазмами, эрлихиями и возможность микстинфицирования клещей этими возбудителями.

7. Наличие на территории Иркутской области сочетанных очагов клещевых инфекций с циркулирующей патогенов различной природы (вирусной, бактериальной, риккетсиозной) и их значительная генетическая вариабельность затрудняют диагностику и профилактику этих инфекций и требуют комплексного подхода и учета новых данных о спектре и генетическом разнообразии возбудителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выявление новых генотипов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки на юге Урала, в Сибири, на Дальнем Востоке и в Казахстане / С.Н. Шпынов, Н.В. Рудаков, В.К. Ястребов [и др.] // Эпидемиология и инфекц. болезни. — 2005. — № 1. — С. 23–27.

2. Выявление различных видов риккетсий у иксодовых клещей, в крови людей и мелких млекопитающих на юге Западной Сибири и на Урале / Я.П. Иголкина, Н.В. Фоменко, Н.Н. Ливанова [и др.] // Бюл. сибирской медицины (Приложение 1). — 2006. — Т. 5. — С. 121–125.

3. Генетическая вариабельность и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксиолигонуклеотидных зондов / Т.В. Демина, Ю.П. Джигоев, М.М. Верховина [и др.] // Вопр. вирусол. — 2009. — № 3. — С. 33–42.

4. Генотипирование вируса клещевого энцефалита молекулярно-биологическими методами / Л.С. Карань, Т.А. Булгакова, Т.В. Маленко [и др.] // Геномные технологии в медицине и медобразовании на рубеже веков: Матер. Междунар. науч.-практ. конф. — Алма-Ата, 2006. — С. 70–72.

5. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). — СПб.: Изд-во «Фолиант», 2000. — 155 с.

6. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане / С.Н. Шпынов, Н.В. Рудаков, В.К. Ястребов [и др.] // Мед. паразитол. — 2004. — № 2. — С. 10–14.

7. Применение молекулярно-генетических методов для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита / Л.С. Карань, Г.В. Маленко, Н.Г. Бочкова [и др.] // Бюл. СО РАМН. — 2007. — № 4. — С. 34–40.

8. ПЦР-диагностика клинических случаев боррелиозов и риккетсиозов / Л.С. Карань, Н.А. Рудникова, Т.А. Булгакова [и др.] // Генодиагностика инфекционных заболеваний. — М.: Медицина для всех, 2004. — Т. II. — С. 35–37.

9. Разнообразие паразитарных систем с участием мелких млекопитающих и *Ixodes persulcatus* Shculze на Северном Урале / Н.Н. Ливанова, В.А. Рар, С.Г. Ливанов, Я.П. Иголкина // Сиб. экол. журн. — 2005. — Т. 10, № 5. — С. 1079–1084.

10. Рудаков Н.В., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз. — Омск: ОмГМА, 2001. — 120 с.

11. Современные подходы к изучению *Rickettsiales* / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, И.Е. Са-

мойленко [и др.] // Бюл. сибирской медицины (Приложение 1). — Т. 5. — 2006. — С. 111–115.

12. Фоменко Н.В. Генетическая гетерогенность *Borrelia* spp. Западной Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. — Иркутск, 2008. — 24 с.

13. Assessment of polymicrobial infections in ticks in New York State / R. Tokarz, K. Jain, A. Bennett [et al.] // Vector Borne Zoonotic Dis. — 2009.

14. Balmelli T., Piffaretti J.C. Association between different clinical manifestation of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato // Res. Microbiol. — 1995. — N 146 (4). — P. 329–340.

15. Characterization of tick borne encephalitis virus that caused the lethal meningoencephalitis human in Mongolia / M.A. Khasnatinov, G.A. Danchinova, U. Unursaikhan [et al.] // Inter. Conference Zoonotic infections disease and tourism. — Ulaanbaatar, 2009. — P. 88–93.

16. Cimmino M.A. Relative frequency of Lyme borreliosis of its clinical manifestations in Europe // Infection. — 1998. — N 26. — P. 298–300.

17. Detection and identification of Ehrlichia, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and Bartonella species in Duth Ixodes ricinus ticks / L.M. Schouls, I. Van De Pol, S.G. Rijpkema, C.S. Schot // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37. — P. 2215–2222.

18. Detection of a *Borrelia miyamotoi* sensu lato relapsing-fever group spirochete from *Ixodes pacificus* in California / J. Mun, R.J. Eisen, L. Eisen, R.S. Lane // J. Med. Entomol. — 2006. — Vol. 43. — P. 120–123.

19. Ehrlichia-like organism gene found in small mammals in the suburban district of Guangzhou of China / H. Pan, S. Liu, Y. Ma [et al.] // Ann. N.-Y. Acad. Sci. — 2003. — Vol. 990. — P. 107–111.

20. Fraenkel C., Garpmo U., Berglund J. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish Ixodes ricinus ticks // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40. — P. 3308–3312.

21. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan / M. Fukunaga, Y. Takahashi, Y. Tsuruta [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1995. — Vol. 45. — P. 804–810.

22. Genospecies and their influence on immunoblot results / B. Wilske, U. Hauser, G. Lehnert [et al.] // Wien. Klin. Wochenschr. — 1998. — Vol. 110. — P. 882–885.

23. Ixodes tick-borne borrelioses in Russia / L.S. Karan, N.A. Rudnikova, A.E. Platonov [et al.] // Abstract book of the 5th Int. Conference on Emerging Zoonoses. — Limassol, Cyprus, 2007. — P. 121.

24. Magnarelli L.A. Current status of laboratory diagnosis for Lyme disease // Am. J. Med. — 1995. — N 98. — P. 10S–12S.

25. Merljak Skocir L., Ruzic-Sabljić E., Maraspin-Carman V. Comparison of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains for detection of immune response in patients with erythema migrans // Int. J. Med. Microbiol. — 2007. — Vol. 5. — P. 101–119.

26. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel Ehrlichia sp. In wild deer and ticks

on two major island in Japan / M. Kawahara, Y. Rikihisa, Q. Lin [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — Vol. 72. — P. 1102—1109.

27. Nilsson I., von Rosen I. Serum antibodies against *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and the 41-kiloDalton flagellin in patients from a Lyme borreliosis endemic area: analysis by EIA and immunoblot // Apmis. — 1996. — Vol. 104. — P. 907—914.

28. Pletnev A.G., Yamshikov V.F., Blinov V.M. Nucleotide sequence of the genome and complete

amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus // Virology. — 1990. — Vol. 174. — P. 250—263.

29. Richter D., Schlee D.B., Matuschka F.R. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent // Emerg. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 9. — P. 697—701.

30. Tick-borne pathogen detection, Western Siberia, Russia / V.A. Rar, N.V. Fomenko, A.K. Dobrotvorsky [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2005. — N 11. — P. 1708—1715.

Сведения об авторах

Козлова Ирина Валерьевна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФБГУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; тел.: 8 (3952) 33-39-51; e-mail: diwerhoz@rambler.ru)

Дорощенко Елена Константиновна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФБГУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (e-mail: doroshchenko-virus@mail.ru)

Лисак Оксана Васильевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФБГУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (e-mail: lisak.lisa@rambler.ru)

Джиоев Юрий Павлович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФБГУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; e-mail: alanir07@mail.ru)

Верхозина Марина Михайловна – кандидат биологических наук, биолог микробиологической лаборатории вирусологического отделения ПЦР-лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 51; тел.: 8 (3952) 23-41-97, факс: 8 (3952) 23-13-71; e-mail: diwerhoz@rambler.ru)

Демина Татьяна Васильевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ЦЛД «Мечников» ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ (e-mail: demina2006@mail.ru)

Рар Вера Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН (630090, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8; тел.: 8 (383) 333-36-77)

Ткачев Сергей Евгеньевич – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН (630090, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8; тел.: 8 (383) 333-36-77; e-mail: sergey.e.tkachev@mail.ru)

Фоменко Наталия Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник ЗАО «Вектор-Бест» (e-mail: nataliyaf@ngs.ru)

Сунцова Ольга Владимировна – научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФБГУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (e-mail: Olga_syntsova@list.ru)

Черноиванова Ольга Олеговна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФБГУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (e-mail: na_sviazi@mail.ru)

Парамонов Алексей Игоревич – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФБГУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (e-mail: paramonov_a.i@mail.ru)

Ревизор Александр Олегович – аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ (e-mail: alexandrrev@rambler.ru)

Злобин Владимир Игоревич – академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел.: 8 (3952) 24-30-16; e-mail: vizlobin@mail.ru)