

И.В. Козлова, В.И. Злобин<sup>1</sup>, М.М. Верхозина, В.А. Рар<sup>2</sup>, О.В. Лисак, Е.К. Дорощенко,  
С.С. Шулунов, О.Л. Богомазова<sup>3</sup>, А.М. Антонова<sup>3</sup>

## РЕЗУЛЬТАТЫ РЕКОГНОСЦИРОВОЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ОЦЕНКЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО МОНОЦИТАРНОМУ ЭРЛИХИОЗУ И ГРАНУЛОЦИТАРНОМУ АНАПЛАЗМОЗУ ЧЕЛОВЕКА В ПРИБАЙКАЛЬЕ

Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

<sup>1</sup>ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва)

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

<sup>3</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» (Иркутск)

В работе приводятся результаты первых рекогносцировочных исследований по обнаружению очагов МЭЧ и ГАЧ на территории Прибайкалья. Обнаружена высокая степень зараженности клещей *I. persulcatus* анаплазмами и эрлихиями и возможность микст-инфицирования клещей этими возбудителями. Доказана циркуляция на территории Иркутской области *E. muris*, *A. phagocytophilum* и *Candidatus «Neoehrlichia mikurensis»*. Осуществлена серологическая верификация первых случаев МЭЧ и ГАЧ на территории области. Ретроспективное исследование сывороток на наличие антител к возбудителям МЭЧ и ГАЧ позволило провести этиологическую расшифровку  $3,4 \pm 0,7$  % случаев лихорадок неясной этиологии. В ходе исследования впервые на территории Прибайкалья были верифицированы случаи микстинфекций, вызванные одновременно возбудителями ГАЧ, МЭЧ и ИКБ, ГАЧ и КЭ.

**Ключевые слова:** гранулоцитарный анаплазмоз человека, моноцитарный эрлихиоз человека, микстинфекция

## THE RESULTS OF THE FIRST RESEARCH EVALUATING THE EPIDEMIC SITUATION WITH HGA AND HME IN PRIBAIKALYE REGION

I.V. Kozlova, V.I. Zlobin<sup>1</sup>, M.M. Verkhovina, V.A. Rar<sup>2</sup>, O.V. Lisak, E.K. Doroschenko,  
S.S. Shulunov, O.L. Bogomazova<sup>3</sup>, A.M. Antonova<sup>3</sup>

Institute of Epidemiology and Microbiology SC ME, ESSC SB RAMS, Irkutsk

<sup>1</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow

<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk

<sup>3</sup>Federal Center of Sanitary and Epidemiological Surveillance in Irkutsk Region, Irkutsk

The paper gives the results of the first researches of revealing the sources of HGA and HME in Pribaikalye. Ticks *I. persulcatus* are found to be highly infected with the anaplasmas and ehrlichias and the possibility of mixed-infection of ticks is found. The circulation of the *E. muris*, *A. phagocytophilum* u *Candidatus «Neoehrlichia mikurensis»* in the Irkutsk region is proved. Serological verification of the first cases of HGA and HME on this territory is done. The retrospective research of serum for antibodies for agents HGA and HME allowed the etiological decoding of  $3,4 \pm 0,7$  % of fevers of undefined etiology. The cases of mixed infections by HGA, HME and ITBB, HGA and TBE were verified for the first time.

**Key words:** human granulocytic anaplasmosis (HGA), human monocytic ehrlichiosis (HME), mixed infection

Исследования по изучению моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) в России начались с 1999 г. после верификации случаев этого заболевания у больных в Пермской области [18]. К настоящему времени установлено широкое распространение *Ehrlichia muris*, являющейся, как предполагают многие исследователи, этиологическим агентом МЭЧ, на ряде территорий Азиатской части России [6, 10 – 12]. Возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) (*Anaplasma phagocytophilum*) был впервые выявлен в Балтийском регионе России [1, 2] и граничащих с Российским Дальним Востоком северо-восточных районах Китая [15]. В дальнейшем анаплазмы и эрлихии обнаружены в Приморском, Хабаровском и Алтайском краях, на территории Новосибирской, Тюменской, Омской и Челябинской областей [6, 7, 12, 19].

На территории Прибайкалья сложились все биоценотические предпосылки для существования очагов МЭЧ и ГАЧ. Это наличие соответствующих пе-

реносчиков (клещей *I. persulcatus*) и резервуарных хозяев, общего механизма передачи с уже известными в Восточной Сибири патогенами, передаваемыми через укус. В пользу этого же предположения можно отнести и тот факт, что 14,6 % случаев сезонных лихорадок у больных, находящихся на лечении в городской инфекционной больнице после укуса клещей, остаются нерасшифрованными. Все это свидетельствует о необходимости проведения поисковых исследований на наличие очагов МЭЧ и ГАЧ на данной территории.

**Цель исследования** — оценить эпидемиологическую ситуацию по МЭЧ и ГАЧ на территории Прибайкалья.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении поисковых исследований на наличие очагов МЭЧ и ГАЧ на территории Иркутской области на присутствие антител к данным

возбудителям проанализировано 644 сыворотки крови больных с острыми лихорадочными заболеваниями неясной этиологии, возникшими в различные сроки после присасывания клещей. На наличие ДНК эрлихий и анаплазм исследовано 139 клещей *I. persulcatus*.

Для обнаружения ДНК эрлихий и анаплазм использовали праймеры: Ehr12 for - 5'-AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C -3'; Ehr14 rev - 5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A -3', амплифицирующие фрагмент ДНК длиной 450 – 500 п.о. Также ДНК в образцах клещей выявляли с помощью двухраундовой ПЦР с использованием родоспецифичных праймеров из области гена 16S рРНК. Видовую принадлежность и генетические варианты выявленных возбудителей определяли как при проведении ПЦР с использованием праймеров, специфичных для *A. phagocytophilum* и *E. muris*, так и посредством определения нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР [19].

Полученные ампликоны очищали с помощью GFX колонок («Amersham Biosciences», USA). Определение нуклеотидных последовательностей проводили с помощью набора DNA Sequencing Kit Big Dye v.3.1. (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ продуктов реакции проведен с использованием автоматического анализатора ДНК модели ABI 310 (Applied Biosystems, США) в Центре секвенирования ДНК СО РАМН, г. Новосибирск). Анализ последовательностей проводили с помощью программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) и CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>). Филогенетический анализ осуществляли с помощью программы MEGA 3.1 [17]. Кроме того, ДНК эрлихий и анаплазм выявляли методом ПЦР с использованием коммерческой тест-системы «GenePak» («Биокот», Россия) (*Ehr*, Эрлихия общ. *Ehrlichia spp.*).

Для обнаружения иммуноглобулинов класса М и G к возбудителям МЭЧ и ГАЧ использовали ИФА с диагностическими тест-системами производства

НПО «Омникс» (Санкт-Петербург). Для экспресс-индикации антигена вируса КЭ в клещах и крови людей использовали ИФА. Исследование проводили согласно инструкции производителя тест-системы (ФГУП НПО «Микроген», Томск). Результаты ИФА учитывали на спектрофотометре EL × 800 (БИО-ТЕК Instruments, USA) при длине волны 450 нм. Наличие антител к возбудителю ИКБ осуществляли с помощью НРИФ или ИФА. Для постановки НРИФ использовали диагностикумы НИИ-ЭМ им. Гамалеи РАМН (Москва) и НПО «Вирион» (Томск) с учетом результатов с помощью люминисцентной микроскопии (Крючечников В.Н., 1985). Определение IgM и IgG-антител в ИФА осуществляли с помощью тест-систем «ЛаймБест» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область) и «Боррелиоз-ИФА-комби», «Боррелиоз-ИФА-скрининг» (ООО «Омникс», Санкт-Петербург) по инструкции производителя.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы в литературе появились сообщения о тестировании крови больных с отрицательными результатами на КЭ и ИКБ с целью выявления возбудителей других инфекций. Описаны случаи микстинфекции КЭ и ИКБ, стали появляться сведения о микстинфекции ИКБ и эрлихозов [3 – 5, 8, 9].

С целью выяснения возможной роли в инфекционной патологии Восточной Сибири возбудителей МЭЧ и ГАЧ нами проведено ретроспективное изучение материалов от больных с лихорадкой неясной этиологии или укусом клеща в анамнезе. Суммарные данные по тестированию сывороток крови за период 2003 – 2006 гг. приведены в таблице 1.

Из 644 исследованных сывороток антитела к возбудителю МЭЧ обнаружены в 7 пробах (1,1 ± 0,4 %). В 2-х пробах одновременно выявлены IgM-антитела к возбудителям МЭЧ и ИКБ (0,3 ± 0,2 %). При исследовании 460 сывороток крови людей, пострадавших от укуса клещей, антитела к возбудителю ГАЧ в виде моноинфекции обнаружены в 8 (1,7 ± 0,6 %) случаях.

Таблица 1  
Суммарные результаты ретроспективного изучения сывороток крови больных за период с 2003 по 2006 гг.

Наличие антител к возбудителям МЭЧ, ГАЧ	Число обследованных сывороток	Число (%) положительных сывороток	
		Абс.	%(± m)
МЭЧ – IgM	644	2	0,3 ± 0,2
МЭЧ – IgG	644	5	0,8 ± 0,4
МЭЧ – IgM + ИКБ	644	2	0,3 ± 0,2
ГАЧ – IgM	460	5	1,1 ± 0,4
ГАЧ – IgG	460	3	0,7 ± 0,3
IgM – ГАЧ + ИКБ	460	2	0,4 ± 0,3
IgG – ГАЧ + ИКБ	460	1	0,2 ± 0,2
IgM + IgG ГАЧ + ИКБ	460	1	0,2 ± 0,2
IgG ГАЧ + антиген ВКЭ	460	1	0,2 ± 0,2

Особую группу составили сыворотки крови больных, у которых наличие антител к анаплазмам сочеталось с обнаружением антител к возбудителям ИКБ или антигена вируса КЭ.

Случаи микстинфекций возбудителей ГАЧ и ИКБ зафиксированы в 0,86 ± 0,43 % случаев. Так, две сыворотки давали положительный результат в НРИФ с боррелиозным антигеном и в ИФА с возбудителем ГАЧ. ИКБ в обоих случаях протекал без наличия кольцевой мигрирующей эритемы. Еще в одной пробе крови одновременно были обнаружены антитела к возбудителю ГАЧ, а также с помощью НРИФ и ИФА – антитела к возбудителю ИКБ. Затем данные о наличии у пациента боррелиозной инфекции были подтверждены с помощью ПЦР. Результаты генотипирования показали, что у данного больного в сыворотке крови присутствует *B. afzelii*. Пациент за профилактической помощью по поводу присасывания клеща не обращался. Спустя три недели на месте укуса возникла эритема.

Одновременно антитела к возбудителю ГАЧ и ИКБ обнаружены и в сыворотке крови больного, который обратился за диагностической помощью спустя месяц после укуса клеща, после появления в месте укуса эритемы. Выявлена 1 проба крови, в которой одновременно присутствовал антиген вируса КЭ и IgG-антитела к возбудителю ГАЧ. Учитывая, что с момента укуса клещом прошло всего 3 дня, вероятнее всего, что антитела к возбудителю ГАЧ у данного пациента сформировались в результате предыдущих укусов.

Путем сбора анамнеза у пациентов с положительными результатами анализа на наличие антител к возбудителям МЭЧ и ГАЧ были выявлены основные места нападения клещей, зараженных данными возбудителями. Так, у людей, снявших с себя клещей, содержащих моноцитарные эрлихий, зафиксированы укусы на территории Шелеховского, Усольского, Усть-Ордынского, Ольхонского и Осинского районов Иркутской области. Наличие антител к возбудителю ГАЧ выявлено у людей, пострадавших от укусов клещей на территории Иркутского, Шелеховского, Баяндаевского и Куйтунского районов. Эти данные могут свидетельствовать в пользу достаточно широкого распространения очагов возбудителей МЭЧ и ГАЧ на территории области. Ретроспективное исследование сывороток на наличие антител к данным возбудите-

лям позволило провести этиологическую расшифровку 3,4 ± 0,7 % случаев лихорадок неясной этиологии.

С целью доказательства существования природных очагов МЭЧ и ГАЧ на территории Прибайкалья в 2004 г. нами было проведено исследование 40 суспензий клещей *I. persulcatus* и 34 проб крови людей, пострадавших от укуса клещей. В однораундовой ПЦР были использованы праймеры к участкам гена 16S рНК, амплифицирующие фрагмент ДНК длиной 450 – 500 п.о. и ПЦР-диагностикумы «*Ehr. Ehrlichia spp.*» производства фирмы «Биолот» (Санкт-Петербург). Положительных проб в клещах и крови больных людей не выявлено.

В 2006 г. было исследовано 48 клещей *I. persulcatus* из Слюдянского района Иркутской области и 50 клещей из Иркутского района. *E. muris* была обнаружена в 5 образцах (10,4 %), ДНК *A. phagocytophilum* – в одном образце клещей (2,1 %), одновременно два этих вида возбудителей детектированы в одной пробе (2,1 %). При исследовании 50 клещей из Иркутского района – ДНК *E. muris* обнаружена в 9 пробах (18,0 %), ДНК *A. phagocytophilum* – в 3 (6,0 %).

Кроме того, в 1 клеще из Иркутского района была определена нуклеотидная последовательность длиной 473 н.п., идентичная фрагменту гена 16S рНК *Candidatus* «*Neoehrlichia mikurensis*» (GenBank AB196305). ДНК *Candidatus* «*Neoehrlichia mikurensis*» была нами также обнаружена в образце крови и селезенки восточноевропейской полевки (*Microtus rossiaemeridionalis*) в Новосибирской области. Бактерии *Candidatus* «*Neoehrlichia mikurensis*», образующие отдельный филогенетический кластер в семействе *Anaplasmataceae*, были обнаружены в Японии в грызунах и в клещах *Ixodes ovatus* [16]. Относящиеся к тому же филогенетическому кластеру бактерии, называемые ранее *Ehrlichia-like* «*Scotti variant*», были также выявлены в клещах *I. ricinus* в Европе [13] и в *I. persulcatus* из Омской области [14]. Данные о патогенности «*Ehrlichia-like*» *sp. Schotti variant* для теплокровных отсутствуют.

Суммарные данные результатов исследования клещей *I. persulcatus*, собранных на территории Иркутской области, на наличие ДНК анаплазм и эрлихий приведены в таблице 2.

Основные места контакта населения с возбудителями МЭЧ и ГАЧ, выявленные на основании серологических и молекулярно-генетических исследований приведены на рисунке 1.

Таблица 2  
Результаты исследования клещей на наличие ДНК анаплазм и эрлихий (ПЦР, 2006 г.)

Количество исследованных клещей <i>I. persulcatus</i>	Количество клещей, содержащих ДНК			
	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. muris</i>	<i>A. phagocytophilum</i> + <i>E. muris</i>	<i>Candidatus</i> « <i>Neoehrlichia mikurensis</i> »
98	4 / 4,1	14 / 14,3	1 / 1,0	1 / 1,0

Примечание: числитель – абсолютные цифры; знаменатель – %.



Рис. 3. Карта-схема основных мест контакта населения Иркутской области с возбудителями МЭЧ и ГАЧ, установленные на основании серологических и молекулярно-генетических исследований.

### ВЫВОДЫ

1. В ходе исследований впервые установлено существование на территории Прибайкалья природных очагов МЭЧ и ГАЧ. Обнаружена высокая степень зараженности клещей *I. persulcatus* анаплазмами и эрлихиями и возможность микст-инфицирования клещей этими возбудителями. С помощью двухраундовой ПЦР, позволяющей генотипировать возбудителей, доказана циркуляция на территории Иркутской области *E. muris*, *A. phagocytophilum* и *Candidatus «Neoehrlichia mikurensis»*.

2. Осуществлена серологическая верификация первых случаев МЭЧ и ГАЧ на территории области. Тестирование крови на наличие антител к МЭЧ и ГАЧ свидетельствует о контакте населения с возбудителями этих инфекций и возможном участии анаплазм и эрлихий в формировании региональной инфекционной патологии.

3. Ретроспективное исследование сывороток на наличие антител к возбудителям МЭЧ и ГАЧ позволило провести этиологическую расшифровку  $3,4 \pm 0,7$  % случаев лихорадок неясной этиологии. Кроме того, в ходе исследования впервые на территории Прибайкалья были верифицированы случаи микстинфекций, вызванные одновременно возбудителями ГАЧ, МЭЧ и ИКБ, ГАЧ и КЭ. На основании полученных результатов уточнена этиологическая структура заболеваемости клещевыми инфекциями на изучаемой территории.

4. Полученные в ходе работы материалы свидетельствуют о том, что для Восточной Сибири наряду с существовавшими проблемами профилактики и лечения таких клещевых инфекций как КЭ, КР и ИКБ, вероятно появились и новые проблемы, связанные с этиологией, эпидемиологией, диагностикой, лечением и профилактикой заболеваний эрлихиозной природы.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.Н. Возможные варианты заболеваний клещевыми инфекциями и прогностическая роль анамнеза в их диагностике (паразитологические аспекты проблемы) / А.Н. Алексеев, Н.В. Рудаков, Е.В. Дубинина // Мед. паразитология. — 2004. — № 4. — С. 31–35.
2. Алексеев А.Н. Смешанные инфекции в клещах-переносчиках рода *Ixodes* (*Acarina: Ixodidae*) — правило, а не исключение / А.Н. Алексеев, И.В. Дубинина, А.В. Семенов // Клинические перспективы в инфектологии: Материалы «Круглого стола» в рамках Всерос. науч. конф. — СПб., 2001. — С. 9–16.
3. Григорян Е.В. Микстинфекция: моноцитарный эрлихиоз человека с иксодовым клещевым боррелиозом и клещевым энцефалитом / Е.В. Григорян, Н.Н. Воробьева, Э.И. Коренберг // Клинические перспективы в инфектологии. — 2001. — С. 57–58.

4. Дроздов В.Н. Ошибки диагностики и дифференциальный диагноз клещевых нейроинфекций у детей в Западной Сибири / В.Н. Дроздов, А.С. Оберт, Н.В. Рудаков // Современная ситуация и перспективы борьбы с клещевыми инфекциями в XXI веке: Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции, 14–15 февраля 2006. – Томск, 2006. – С. 43–44.
5. Дубинина И.В. Динамика биоразнообразия возбудителей болезней, переносимых клещами рода *Ixodes*: анализ многолетних данных / И.В. Дубинина, А.Н. Алексеев // Мед. паразитология и паразитар. болезни. – 1999. – № 2. – С. 13–19.
6. Изучение генетического разнообразия анаплазм и эрлихий в паразитарных системах юга Западной Сибири и Урала / В.А. Рар, Н.Н. Ливанова, В.В. Панов, В.Б. Астанин и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т. 5, Приложение 1. – С. 116–120.
7. К вопросу об этиологии гранулоцитарного эрлихоза человека на Дальнем Востоке России / О.Ю. Медянный, Ю.Н. Сидельников, Л.И. Иванов, Н.И. Здановская // Тихоокеан. мед. журн. – 2001. – № 2 (7). – С. 126.
8. Клинико-лабораторная апробация новых отечественных рекомбинантных тест-систем для серологической верификации моноцитарного эрлихоза и гранулоцитарного анаплазмоза человека / М.В. Афанасьева, Э.И. Коренберг, В.И. Фризен и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2005. – № 1. – С. 45–48.
9. Коренберг Э.И. Взаимоотношения возбудителей трансмиссивных болезней в микст инфицированных иксодовых клещах / Э.И. Коренберг // Паразитология. – 1999. – Т. 32, Вып. 4. – С. 273–289.
10. 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. паразитология и паразитар. болезни. – 2004. – № 2. – С. 10–14.
11. Первые данные о клиническом течении моноцитарного эрлихоза в России / Е.В. Григорян, Э.И. Коренберг, Н.Н. Воробьева и др. // Эпидемиол. и инфек. бол. – 2000. – № 6. – С. 20–23.
12. Современные подходы к изучению *Rickettsiales* / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, И.Е. Самойленко, Л.В. Кумпан и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т. 5, Приложение 1. – С. 111–115.
13. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferisensu lato* and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks / L.M. Schouls, I. Vaan De Pol, S.G. Rijpkema, C.S. Schot // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P. 2215–2222.
14. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia / S. Shpynov, P.E. Fournier, N. Rudakov et al. // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 1078. – P. 378–383.
15. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from Southern China / W.C. Cao, Y.M. Gao, P.H. Zhang et al. // J. Clin. Microbiol. – 2000. – N 38. – P. 2778–2780.
16. Kawahara M. Ultrastructure and phylogenetic analysis of '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks / M. Kawahara, Y. Rikihisa, E. Isogai, M. Takahashi et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – N 54. – P. 1837–1843.
17. Kumar S. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment / S. Kumar, K. Tamura, M. Nei // Brief. Bioinform. – 2004. – Vol. 5. – P. 150–163.
18. *Monocytic Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* ticks from Perm, Russia / M.D. Ravyn, E.I. Korenberg, J.A. Oeding et al. // Lancet. – 1999. – Vol. 353, N 9154. – P. 722–723.
19. Tick-borne pathogen detection, Western Siberia, Russia / V.A. Rar, N.V. Fomenko, A.K. Dobrotvorskyy et al. // Emerg. Infect. Dis. – 2005. – № 11. – P. 1708–1715.