

О. В. Морозова^{1,2}, А. Е. Гришечкин², Л. С. Карань³, Е. И. Исаева², Л. Д. Щучинова⁴, Н. В. Логинова²,
В. И. Злобин^{2,5}

Детекция вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах, собранных в природном очаге Горного Алтая

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²ФГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Иванковского Минздрава России, Москва; ³ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва; ⁴Управление Роспотребнадзора по Республике Алтай, Горно-Алтайск; ⁵Иркутский государственный медицинский университет Росздрава

Детекция вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в образцах иксодовых клещей, собранных в мае 2007 г. в окрестностях поселка Манжерок Майминского района Республики Алтай, посредством иммуноферментного анализа показала наличие антигена ВКЭ в $16,9 \pm 1,9\%$ таежных клещей. На основании ОТ-ПЦР в реальном времени с генотипспецифичными флюоресцентными зондами и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей продуктов ОТ-ПЦР, соответствующих 5'-концевому фрагменту гена E ВКЭ, все изоляты вируса, выделенные от клещей, собранных в Горном Алтае, отнесены к сибирскому генетическому типу, доминирующему в клещах-переносчиках в большинстве эндемичных областей России и ближнего зарубежья. Количественные оценки вирусной нагрузки посредством ОТ-ПЦР с зондами в реальном времени показали пороговые циклы $Ct = 25,34—28,98$, которые с учетом эффективности выделения РНК и обратной транскрипции соответствовали приблизительно $10^4—10^5$ копиям вирусной РНК в клеще.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, клетки почки эмбриона свиньи, цитопатический эффект, реакция гемагглютинации, иммуноферментный анализ на антиген E, ОТ-ПЦР, ПЦР в реальном времени

Detection of tick-borne encephalitis virus in Ixodes ticks collected in a natural focus of Gornyi Altai

O. V. Morozova^{1,2}, A. E. Grishechkin², L. S. Karan³, E. I. Isayeva², L. D. Shchuchinova⁴,
N. V. Logina², V. I. Zlobin^{2,5}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk; ²D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow; ³Central Research Institute of Epidemiology, Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare, Moscow; ⁴Board of the Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare in the Republic of Altai, Gorno-Altai; ⁵Irkutsk State Medical University, Russian Agency for Health Care

Enzyme immunoassay of tick-borne encephalitis virus (TBE) in the samples of Ixodes ticks collected in the outskirts of the settlement of Manzherok, Maiminsk District, Republic of Altai, revealed TBE antigen in $16.9 \pm 1.9\%$ of the taiga ticks. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with specific fluorescent probes and phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of RT-PCR products corresponding to 5'-terminal fragment of the E gene of TBE, all the virus strains isolated from the ticks collected in Gornyi Altai were referred to as the Siberian genetic type that was dominant in virus-carrying ticks in the majority of endemic areas of Russia and near abroad. Viral load assays using the real-time RT-PCR with the probes indicated the threshold cycles $Ct = 25.34-28.98$, which, with regard to the efficiency of RNA identification and reverse transcription, was equal to about 10^4-10^5 viral RNA copies per tick.

Key words: tick-borne encephalitis virus, pig embryo kidney cells, cytopathic effect, hemagglutination reaction, enzyme immunoassay for E antigen, reverse transcription-polymerase chain reaction, real-time transcription-polymerase chain reaction

В природных популяциях на территории России среди РНК-содержащих флавивирусов, переносимых клещами, доминирует вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), а также обнаружены вирус омской геморрагической лихорадки, вирус Западного Нила и вирус Повассан. Попадая в организм человека при укусах клещей, эти вирусы способны вызывать тяжелые заболевания, нередко с инвалидизирующими или смертельными последствиями. В России на основании клинико-эпидемиологических данных обследования и результатов иммуноферментного анализа (ИФА) с лицензированными тест-системами на антитела классов IgM и IgG (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск) заболеваемость клещевым энцефалитом за 2005—2009 гг. изменялась от 4551 до 3138 случаев в год и в среднем составляла

2,6 случая на 100 тыс. населения. Регистрация этого заболевания в Республике Алтай ведется с 1950 г. и за последние 5 лет оставалась высокой (от 23,76 до 30,46 случая на 100 тыс. населения). Средний показатель заболеваемости клещевым энцефалитом за эти годы в Республике Алтай составлял 26,0 на 100 тыс. населения и превышал среднероссийский в 10 раз. Возможно, высокие уровни заболеваемости клещевым энцефалитом обусловлены обилием клещей-переносчиков и позвоночных резервуарных хозяев ВКЭ в Горном Алтае. В Республике Алтай выявлено 10 видов иксодовых клещей, 90 видов млекопитающих и 300 видов птиц, являющихся переносчиками и резервуарными хозяевами ВКЭ [9]. Видовой состав клещей Республики Алтай представлен 10 видами иксодид: *Ixodes persulcatus*

Schulze, Ixodes pavlovskiy Pom., Ixodes trianguliceps Bir., Ixodes crenulatus Koch, Ixodes apronophorus P. Sch., Dermacentor reticulatus Fabr., Dermacentor marginatus Schulz, Dermacentor silvarum Ol., Dermacentor nuttalli Ol. u Haemophysalis concinna Koch [6].

В Республике Алтай иммунизируют население против клещевого энцефалита преимущественно вакциной "Энцевир" производства НПО "Микроген". В последние годы уровень иммунизации составлял $40,0 \pm 0,2\%$ населения. При этом реальная иммунная прослойка взрослого населения была $36,1 \pm 2,5\%$. Так, в 2007 г. среди 1405 обследованных доноров методом ИФА у 508 (36,2%) обнаружены антитела к белку Е ВКЭ. Анализ заболеваемости показывает, что вакцинация не всегда предотвращает заболевание: по многолетним данным среди больных клещевым энцефалитом $22,7 \pm 3,3\%$ привитых людей (из них лишь у $5,0 \pm 1,8\%$ нарушена схема иммунизации). Однако для иммунизированных лиц заболеваемость в 2 раза ниже и характерны более легкие лихорадочные формы клещевого энцефалита.

Помимо этого, в 2007 г. 49 $\pm 2\%$ лиц, пострадавших от присасывания клещей, получили иммуноглобулин против клещевого энцефалита (821 из 1675 человек).

Развитие международного туризма в Горном Алтае повышает риск инфекции ВКЭ.

Цель данной работы состояла в детекции и идентификации изолятов ВКЭ в иксодовых клещах, собранных в Горном Алтае.

Материалы и методы

Сбор клещей. Голодных имаго таежного клеща собирали в мае 2007 г. с растительности в природном очаге клещевого энцефалита в окрестностях поселка Манжерок Майминского района ($85^{\circ}74'$ с. ш. и $51^{\circ}84'$ в. д.) Республики Алтай. Видовую принадлежность клещей определяли по морфологическим признакам [6]. Всего исследовали 404 иксодовых клеща.

ИФА клещевых суспензий выполняли с применением тест-системы "ВектоВКЭ-антиген-стрип" и "ВектоВКЭ-антиген" (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск; серия № D1154) в соответствии с инструкцией производителя. Оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре "Униплан" ("Пикон", Россия) при длине волны 450 нм. ИФА проведен для 404 проб.

Положительные в ИФА 11 проб с оптической плотностью более 0,4 опт. ед. исследовали дополнительно посредством заражения культуры клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и ОТ-ПЦР с электрофоретической или гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакций в реальном времени.

Заражение клеточных культур. СПЭВ в среде MEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) выращивали до полного монослоя и проводили заражение клещевыми суспензиями, положительными в ИФА с оптической плотностью более 0,4 опт. ед. в минимальном объеме среды MEM без сыворотки 1 ч при 37°C . Затем монослой клеток отмывали и добавляли среду поддержания — MEM с 1% ЭТС. Наблюдали за развитием цитопатического эффекта в течение последующих 3—5 дней. Выявленные по цитопатическому эффекту изоляты ВКЭ

идентифицировали в реакции геммагглютинации (РГА) и ИФА.

РГА проводили в соответствии с [10], используя 0,4% суспензию формализированных эритроцитов гуся.

ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией осуществляли в соответствии с [1, 7], используя амплификатор "Терцик" ("ДНК-технология", Москва). Также для обнаружения РНК ВКЭ в клещевых суспензиях проводили ПЦР в реальном времени с применением тест-системы "Амплиценс-TBEV-FRT" (ЦНИИ эпидемиологии, Москва) и Rotor-Gene 6000 ("Corbett Research", Австралия).

Для определения генетических типов ВКЭ также использовали метод ПЦР в реальном времени, разработанный и описанный ранее [5], с модификациями: праймеры для детекции европейского генетического типа были заменены на TBE-E1 CAT-GCCGTAGCTGGCACCGCGAGAAA и TBE-E2 CAACAGAGTAATGACCAGCAACCAGCT, зонды — на TBE-E4 FAM-CAGAGGGACTGAGTTCCAGAACG-BQH1 и TBE-E6 FAM-TCCGTCGCTGACCTCCTTTT-BQH1.

Молекулярное типирование проводили в двух пробирках, при этом в первой дифференцируются дальневосточный (канал детекции — FAM/Green) и сибирский (канал детекции JOE/Yellow) генетические типы, а во второй на канале FAM/Green детектируется западноевропейский генетический тип ВКЭ.

Для подтверждения специфичности детекции ВКЭ определяли нуклеотидные последовательности продуктов ОТ-ПЦР с использованием праймеров RTBE1—4 5'-GTTGACYTKGCYAGACYGT-CAT-3' и TBE2as 5'-CATCAGCTCCCACTCCGATGTCAT-3', соответствующих фрагменту гена Е ВКЭ, и автоматического анализатора ДНК модели ABI 310 ("Applied Biosystems", США). Номера доступа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е изолятов ВКЭ от клещей в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): GQ422875, GQ422876, GQ422877, GQ422879.

Результаты и обсуждение

Среди иксодовых клещей, собранных в мае 2007 г. в Республике Алтай, доминировали таежные клещи *I. persulcatus Schulze*, кроме этого, обнаружены 2 особи *H. concinna Koch*.

Анализ вирусофорности иксодовых клещей проводили посредством ИФА на антиген Е ВКЭ. Из 402 исследованных проб *I. persulcatus* положительными в ИФА оказались 68, что соответствовало вирусофорности $16,9 \pm 1,9\%$. Полученные данные превышали аналогичные показатели в предшествующие годы [9]. В клещах *H. concinna* антиген ВКЭ не обнаружен.

В результате ОТ-ПЦР с различными парами праймеров, соответствующими генам С, Е и NS3, РНК ВКЭ выявлена для 10 клещевых суспензий, оптическая плотность которых по результатам ИФА превышала 0,4 о. е. На основании ОТ-ПЦР в реальном времени с флюоресцентными зондами, специфичными для 3 генетических типов ВКЭ, все изоляты ВКЭ принадлежали к сибирскому генетическому типу (рис. 1). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е длиной 773 н. п. для изолятов ВКЭ из клещевых суспензий (рис. 2) показал единую кладисти-

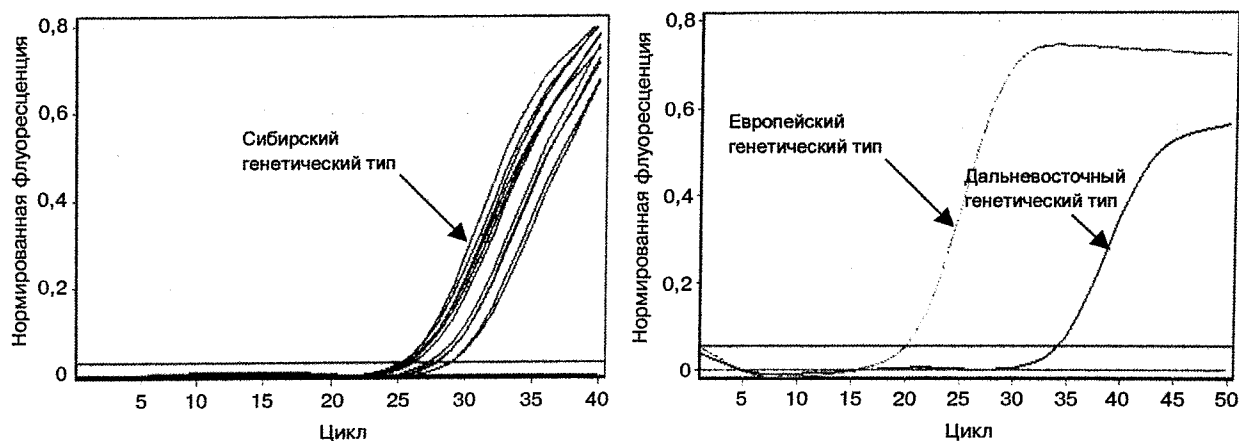


Рис. 1. Результаты молекулярного типирования изолятов ВКЭ с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени с генотипспецифичными флуоресцентными зондами.

ческую группу для описанных в данной работе изолятов ВКЭ из Республики Алтай с прототипным штаммом Заусаев сибирского генетического типа ВКЭ с высоким индексом поддержки — 100. Необходимо отметить совпадение топологии филогенетических деревьев, построенных при помощи 4 альтернативных алгоритмов программы Mega 4.0. Доминирование сибирского генетического типа ВКЭ было показано ранее для большинства эндемичных областей России и ближнего зарубежья [1–5].

В результате ОТ-ПЦР в реальном времени (см. рис. 1) пороговые циклы $C_t = 25,34–28,98$ соответствовали приблизительно $10^2–10^3$ геном-эквивалентам в реакционной смеси или с учетом эффективности выделения РНК и обратной транскрипции $10^4–10^5$ копиям вирусной РНК в клеще. Количественные оценки вирусной нагрузки в *I. persulcatus*, собранных в Горном Алтае, соответствовали предшествующим наблюдениям для иксодовых клещей из других природных очагов клещевого энцефалита методами ОТ-ПЦР ($10^4–10^7$) [7] и ИФА ($4,0–7,5 \lg$ БОЕ/мл) [8].

После заражения клеток СПЭВ 11 образцами клещевых суспензий, оптическая плотность которых по

результатам ИФА превышала 0,4 о. е., цитопатический эффект наблюдали для 7 образцов не ранее чем через 48 ч. Специфичность вирусной инфекции подтверждали посредством РГА с формализованными эритроцитами гуся, ИФА на антиген Е ВКЭ и ОТ-ПЦР. Титры РГА непосредственно для суспензий отдельных клещей не определяли, а для соответствующих культуральных жидкостей инфицированных клеток на первом пассаже они составляли 1:2–1:4, на втором и третьем пассажах возрастали и варьировали в диапазоне от 1:32 до 1:128. Титры ИФА суспензий составляли 1:8, в то время как титры ИФА культуральных жидкостей СПЭВ через 48 ч после заражения были от 1:2 до 1:64 для различных штаммов ВКЭ в зависимости от пассажей. В результате ОТ-ПЦР с праймерами, соответствующими гену NS3, для всех 7 проб РНК, выделенных из культуральных жидкостей СПЭВ, инфицированных клещевыми суспензиями и положительных в РГА и ИФА, наблюдали специфические продукты реакций.

Таким образом, от иксодовых клещей из природного очага клещевого энцефалита в Республике Алтай с использованием классических вирусологических и молекулярно-биологических методов вы-

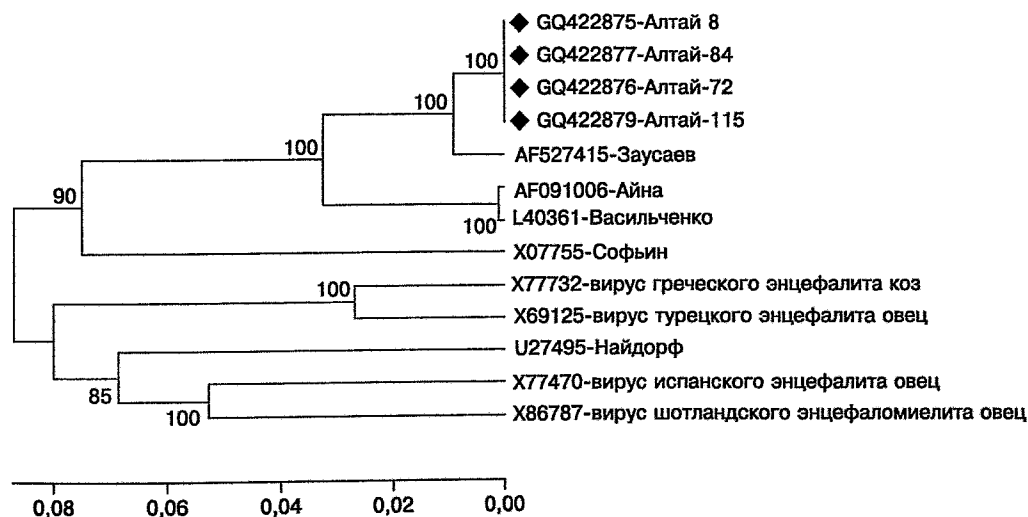


Рис. 2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е длиной 773 н. п. для изолятов ВКЭ из Республики Алтай (выделены ромбом) и различных генетических типов ВКЭ, депонированных в базе данных GenBank, посредством программы Mega 4.0, алгоритм UPGMA, 1000 репликаций.

делены изоляты ВКЭ, относящиеся к сибирскому генетическому типу и подобные штамму Заусаев по структуре гена E и по вирусной нагрузке.

Работа проводилась частично при поддержке междисциплинарного интеграционного гранта № 83 СО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахвалова В. Н., Рар В. А., Ткачев С. Е. и др. Генетический анализ штаммов вируса клещевого энцефалита Западной Сибири // *Вопр. вирусол.* — 2002. — Т. 45, № 5. — С. 11—13.
2. Злобин В. И., Мамаев Л. В., Джиоев Ю. П. и др. Генетические типы вируса клещевого энцефалита // *Журн. инфекц. патол.* — 1996. — № 4. — С. 13—17.
3. Злобин В. И., Демина Т. В., Беликов С. И. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента гена белка оболочки // *Вопр. вирусол.* — 2001. — № 1. — С. 16—21.
4. Злобин В. И., Верхозина М. М., Демина Т. В. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита // *Вопр. вирусол.* — 2007. — № 6. — С. 4—13.
5. Карань Л. С., Маленко Г. В., Бочкова Н. Г. и др. Применение молекулярно-генетических методик для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита // *Бюл. СО РАМН.* — 2007. — № 4 (126). — С. 34—40.
6. Коклягина А. Т. Географическое распределение иксодовых клещей в Алтайском крае // *Материалы краевой конференции микробиологов, эпидемиологов и инфекционистов по природно-очаговым заболеваниям в Алтайском крае.* — Барнаул, 1967. — С. 31—37.
7. Морозова О. В., Бахвалова В. Н., Панов В. В. Сравнение методов детекции вируса клещевого энцефалита // *Фундаментальные науки — медицине.* Новосибирск, 2008. — С. 171—177.
8. Шупакин В. Н., Семашко И. В., Караванов А. С. и др. Оценка чувствительности иммуоферментного метода в определении инфекционного и неинфекционного антигенов вируса клещевого энцефалита // *Вопр. вирусол.* — 1989. — Т. 34, № 5. — С. 634—637.
9. Щучинова Л. Д. Эпидемиологический надзор и контроль инфекций, передающихся клещами, в Республике Алтай: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Омск, 2009.
10. Clarke D. H., Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* — 1958. — Vol. 7. — P. 561—573.

Поступила 25.02.10

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2011
УДК 618.16-006.52-022:578.827.12]-07

Г. И. Вергейчик¹, Ж. А. Стрибук¹, В. Ф. Еремин²

Распространенность вирусов папилломы человека высокого и низкого онкогенного риска у пациенток, страдающих патологией наружных половых органов

¹УО Гомельский государственный медицинский университет, ²Государственное учреждение Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Представлены результаты обследования 49 пациенток с генитальными папилломами, лейкоплакией, дисплазией и раком вульвы и влагалища. Основываясь на полученных данных, можно предположить важную роль вируса папилломы человека в развитии поражений вульвы и влагалища и пересмотреть значимость генотипов высокого и низкого онкогенного риска в развитии доброкачественных новообразований, предраковых состояний и злокачественных опухолей вульвы и влагалища.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, генитальные папилломы, рак вульвы и влагалища

Prevalence of high- and low-risk oncogenic human papillomaviruses in patients with external genital pathology

G. I. Vergeichik (Viarheichyk)¹, Zh. A. Stribuk (Strybuk)¹, V. F. Eremin²

¹Gomel State Medical University, ²Republican Research-and-Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

The paper presents the results of examining 49 patients with genital papillomas, vulvar and vaginal leukoplakia, dysplasia, and cancer. The findings may suggest that human papillomavirus plays an important role in the development of vulvar and vaginal lesions and reconsider the importance of high- and low-risk oncogenic genotypes in the development of benign neoplasms, precancerous conditions, and malignant tumors of the vulva and vagina.

Key words: human papillomavirus, genital papillomas, vulvar and vaginal cancer

Ежегодно в Европе диагностируется 250 000 новых случаев генитальных бородавок, вызываемых вирусом папилломы человека (ВПЧ). Основные типы ВПЧ, выявляемые при поражениях вульвы, влагалища, шейки матки и промежности, — это 6, 11, 16 и 18; более 90% случаев возникновения генитальных бородавок связаны с ВПЧ типов 6, 11 [7]. В возрасте 15—49 лет около 40% мужчин и женщин инфицированы папилломавирусами, в 65% случаев генитальные папилломы развиваются у лиц младше 25 лет [5].

Генитальные бородавки — это широко распространенные, высококонтагиозные поражения генитального тракта. Они представляют собой фиброэпителиальные образования с тонкой ножкой или на широком основании, располагающиеся на поверхности кожи и слизистых оболочек в виде единичных выростов или скоплений, напоминающих петушиные гребни или цветную капусту. Существуют различные морфологические формы генитальных бородавок, к которым относятся клас-

Контактная информация:

Вергейчик Галина Ивановна, канд. мед. наук, доц.; e-mail:giv2001@tut.by