

Шыныбекова Г.О.
Мухами Н.Н.
Кожабергенов Н.С.
Абаева М.Р.
Жаксылык С.Б.
Султанкулова К.Т.

КР ССМ Биологиялык коопсуздук проблемалары илимий-изилдөө институту
Казакстан, Жамбыл облусу, ш.тп. Гвардейский

Чоров М.Ж.

И. Арабаев атындагы Кыргыз мамлекеттик университети
Бишкек ш.

sh.gaukhar@biosafety.kz

ИКСОД КЕНЕЛЕРИНДЕ КЕНЕ ЭНЦЕФАЛИТИНИН ВИРУСУН АНЫКТОО

Аннотация. Борбордук нерв системасынын инфекциясын пайда кылган тве вирусу дүйнө жүзү боюнча саламаттыкты сактоонун негизги көйгөйү болуп саналат. Кене энцефалит вирусу Казакстандын бардык жаратылыш аймактарында тарайт. Комплекстүү мониторинг региондордогу эпидемиологиялык кырдаалды аныктоого, ар кандай вирустардын жаңы жана потенциалдуу очокторун аныктоого, жаныбарлар жана адамдар үчүн коркунуч туудурган патогендердин жаңы же өзгөртүлгөн түрлөрүн бөлүп көрсөтүүгө мүмкүндүк берет. Ар кандай талаа, жарым чөл жана чөл жаратылыш комплекстери көптөгөн жаныбарлардын – потенциалдуу кенелердин азыктандыруучу жайлары болуп саналат. Иксод кенелери жаныбарлардын жана адамдардын ден соолугуна коркунуч туудурган вирустун негизги алып жүрүүчүлөрү болуп саналат. Өлкөнүн ландшафттык-климаттык шарттарынын жана жаныбарлар дүйнөсүнүн ар түрдүүлүгү ар кандай патогендердин очокторунун болушуна шарт түзөт, биринчи кезекте кенелер менен байланышкан. Акыркы бир нече он жылдыкта Казакстанда кенелердин саны да, кене аркылуу жугуучу оорулардын саны да көбөйдү. Кене энцефалитинин көпчүлүк учурлары жазында жана күзүндө болот, бул кенелердин активдүүлүгүнүн жогорулашы менен байланыштуу.

Бул иш айыл чарба жаныбарларынан: ири мүйүздүү малдан, майда мүйүздүү малдан, жылкылардан чогултулган кене энцефалит вирусун аныктоо максатында, алар жашаган жерлерде, жеке короолордо жана фермаларда, ошондой эле чөп жана бадал өсүмдүктөрүнөн табылган. Изилдөө жүргүзүү үчүн кенелер кене энцефалитинин эндемиги болгон Алматы облусунун аймагында кармалган. Кан соргуч курт-кумурскалардын жогорку активдүүлүк мезгилинде, 2021-2022-жылдары 477 иксод кенелеринин үлгүлөрү алынган. Идентификациялоо учурунда жыйналган кенелер *Ixodidae* үй-бүлөсүнүн 4 түрүнө таандык экени аныкталган: *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Hyalomma asiaticum*, *Hyalomma scupense*. Жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн натыйжасында кене энцефалитинин вирусунан карата 0,63% оң анализдер табылды. Ошондой эле электрондук микроскопиялык изилдөөлөр жүргүзүлүп, кене энцефалитинин вирусунун бар экендиги аныкталды, анткени *Flaviviridae* вирусунун вириондору аныкталды.

Негизги сөздөр: Иксод кенелери, кене энцефалити, *Flavivirus*, ПТР, микроскоп.

Шыныбекова Г.О.
Мухами Н.Н.
Кожабегенов Н.С.
Абаева М.Р.
Жаксылык С.Б.
Султанкулова К.Т.

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности МЗ РК
Казахстан, Жамбылская область, пгт. Гвардейский

Чоров М.Ж.

Кыргызский государственный университет имени И. Арабаева
г. Бишкек

sh.gaukhar@biosafety.kz

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ

Аннотация. Вирус клещевого энцефалита, вызывающий инфекции центральной нервной системы, является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Вирус клещевого энцефалита циркулирует во всех природных зонах Казахстана. Комплексный мониторинг позволит определить эпидемиологическую ситуацию в регионах, выявить новые и потенциальные очаги различных вирусов, выделить новые или измененные виды патогенов, представляющие опасность для животных и людей. Разнообразные степные, полупустынные и пустынные природные комплексы являются местом обитания многих животных – потенциальных кормушек для клещей. Иксодовые клещи являются основными переносчиками вируса, угрожающего здоровью животных и человека. Многообразие ландшафтно-климатических условий и животного мира страны создает предпосылки для существования очагов различных патогенов, в первую очередь связанных с клещами. За последние несколько десятилетий были зарегистрировано увеличение как численности клещей в Казахстане, так и числа случаев клещевых заболеваний. Большинство случаев по клещевому энцефалиту происходит весной и осенью, что коррелирует с повышенной активностью клещей.

Данная работа выполнена с целью выявления вируса клещевого энцефалита у иксодовых клещей, собранных с сельскохозяйственных животных: крупного рогатого скота (КРС), мелкого рогатого скота (МРС), лошадей, в местах их обитания, в частных дворах и фермах, также с травянистой и кустарниковой растительности. Для проведения исследования клещи отлавливались на территории Алматинской области, являющейся эндемичной по клещевому энцефалиту. В сезоны высокой активности кровососущих насекомых, в 2021-2022 гг. было отобрано 477 образцов иксодовых клещей. В ходе идентификации были установлены, что собранные клещи принадлежали к 4 видам клещей семейства *Ixodidae*: *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Hyalomma asiaticum*, *Hyalomma scupense*. В результате проведенных исследований были обнаружены 0,63% положительные пробы к вирусу клещевого энцефалита. Также проведены электронно-микроскопические исследования, что подтверждает о наличие вируса клещевого энцефалита, так как в результате были выявлены вирионы вируса семейства *Flaviviridae*.

Ключевые слова: Иксодовые клещи, клещевой энцефалит, *Flavivirus*, ПЦР, микроскоп.

Shynybekova G.O.

Mukhami N.N.

Kozhabergenov N.S.

Abayeva M.R.

Zhaksylyk S.B.

Sultankulova K.T.

Scientific Research Institute of Biological Safety Problems of the Ministry
Zhambyl region, uts of Gvardeysky

Chorov M.J.

Kyrgyz State University named after I. Arabaev

Bishkek c.

sh.gaukhar@biosafety.kz

DETECTION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN IXODES TICKS

Annotation. The tick-borne encephalitis virus, which causes infections of the central nervous system, is a serious health problem worldwide. Tick-borne encephalitis virus circulates in all-natural areas of Kazakhstan. Comprehensive monitoring will make it possible to determine the epidemiological situation in the regions, identify new and potential foci of various viruses, identify new or modified types of pathogens that pose a danger to animals and humans. A variety of steppe, semi desert and desert natural complexes are the habitat of many animals – potential feeders for ticks. Ixodes ticks are the main vectors of a virus that threatens animal and human health. The variety of landscape and climatic conditions and wildlife of the country creates prerequisites for the existence of foci of various pathogens, primarily associated with ticks. Over the past few decades, there has been an increase in both the number of ticks in Kazakhstan and the number of cases of tick-borne diseases. Most cases of tick-borne encephalitis occur in spring and autumn, which correlates with increased tick activity.

This work was carried out in order to identify the tick-borne encephalitis virus in ixodes ticks collected from farm animals: cattle, small cattle, horses, in their habitats, in private yards and farms, as well as from herbaceous and shrubby vegetation. To conduct the study, ticks were caught on the territory of the Almaty region, which is endemic for tick-borne encephalitis. During the seasons of high activity of blood-sucking insects, in 2021-2022, 477 samples of ixodes ticks were selected. During identification, it was established that the collected ticks belonged to 4 species of ticks of the *Ixodidae* family: *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Hyalomma asiaticum*, *Hyalomma scupense*. As a result of the conducted studies, 0.63% positive samples for the tick-borne encephalitis virus were found. Electron microscopic studies were also carried out, which confirms the presence of tick-borne encephalitis virus, as virions of the *Flaviviridae* virus family were identified as a result.

Keywords: Ixodes ticks, tick-borne encephalitis, *Flavivirus*, PCR, microscope.

Введение

Клещевой энцефалит – природно-очаговая трансмиссивная острая вирусная болезнь с преимущественным поражением центральной нервной системы. Вирус является представителем рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*, вызывает смертельный энцефалит с тяжелыми последствиями у людей. Основными переносчиками вируса клещевого энцефалита являются иксодовые клещи [3, с. 13]. КЭ является одним из социально-значимым клещевых патогенов в Алматинской и Восточно-Казахстанской областях.

Существуют две сезонные волны заболеваемости КЭ, одна из которых приходится на май-август и еще одна волна в октябре-ноябре в Алматинской области, в то время как в Восточном Казахстане случаи КЭ обычно регистрируются в июне-июле. Климат в Алматинской области более теплый и мягкий, чем в восточном Казахстане, что приводит к более длительному периоду активности клещей. В настоящее время только Алматинская область официально признана эндемичной по КЭ в регионе [9, с. 7]. Целью данной работы является выявления вируса клещевого энцефалита у иксодовых клещей, собранных в Алматинской области.

Материалы и методы исследований

Сбор биологического материала. В период с мая по июнь месяцы 2021-2022 гг. проведены выездные экспедиции для сбора клещей. Собраны образцы различных видов клещей из Алматинской области. Клещи отлавливались в открытых стациях методом «на флаг» [7, с. 120], и снимались с сельскохозяйственных животных. Клещи идентифицированы с помощью стереомикроскопа Altami (Россия) в соответствии с их морфологическими характеристиками [1, с. 232]. Проведена пробоподготовка гомогенизацией тканей клещей в фосфатном буфере. Выделение РНК из суспензии клещей совершали коммерческим набором PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Для выявления вируса КЭ методом ПЦР в режиме реального времени использован набор реагентов ОМ-Скрин-КЭ-РВ (Синтол, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Препараты исследованы в электронном микроскопе JEM-100 CX JEOL (Япония) методом негативного контрастирования 2%-ным водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты, нейтрализованной 1М КОН до pH 6,8-7,0.

Результаты и обсуждение исследований

В ходе работы всего было собраны 477 экземпляров клещей из Алматинской области. Результаты проведенного анализа показали, что видовой состав отловленных клещей представлен 4 различными видами: *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Hyalomma asiaticum*, *Hyalomma scupense*. Видовая принадлежность и численность отловленных иксодовых клещей по регионам представлены в таблице 1.

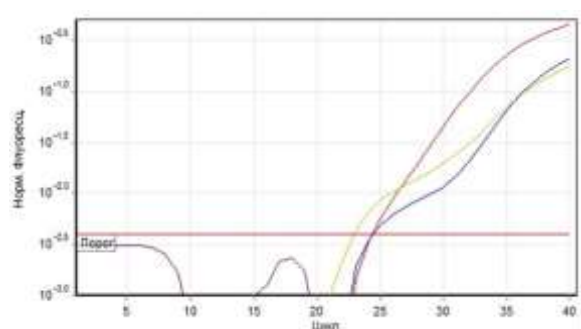
Таблица 1 – Виды и количество клещей, собранные в 2021-2022 гг.

Год сбора	Виды клещей				Количество клещей
	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>Hyalomma asiaticum</i>	<i>Hyalomma scupense</i>	
2021	51	-	30	21	102
2022	134	34	121	86	375
Общее количество					477

Для выявления вируса КЭ выбран метод ОТ-ПЦР в режиме реального времени на термоциклере Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany), использован набор реагентов «ОМ-

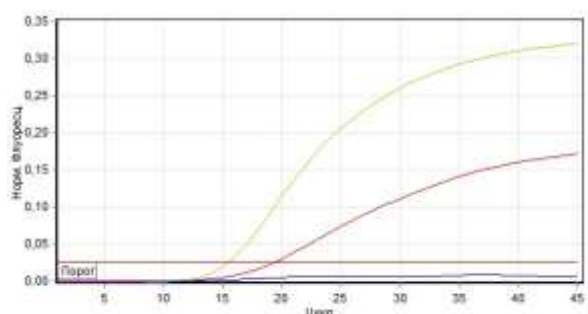
Скрин-КЭ-РВ» (Синтол, Россия). Постановка ОТ-ПЦР-РВ производится последовательно добавляя по 15 мкл разбавителя (РВ) в реакционную смесь в стрипованных микропробирках (РС-КЭ) соответственно порядку исследования, затем вносят 20 мкл ОКО для отрицательного контроля, по 20 мкл исследуемых образцов в необходимой повторности и далее 20 мкл ПКО-КЭ для положительного контроля. Использована программа амплификации: 1 стадия: 50°C – 15 мин; 2 стадия: 95°C – 5 мин; 3 стадия: 50 циклов (60°C – 40 с, 95°C – 15 с). Считывание сигнала флуоресценции проведено при температуре 60°C.

РНК вируса КЭ был обнаружен методом ОТ-ПЦР-РВ у 3 образцов из исследуемых взрослых клещей. Вирус КЭ выявлен в клещах *Dermacenter marginatus*, *Hyalomma asiaticum* и *Hyalomma scupense* в Жамбылском районе, Алматинской области. На рисунке 1 представлены результаты ОТ-ПЦР-РВ по выявлению вируса КЭ.



№	Имя	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Расч.	Коефф. Вариации %	Сред. Ст
1	+	Положительный контроль	24,31				24,31
2	1	Образец1	22,83				22,83
3	2	Образец2	24,37				24,37
4	-	Отрицательный контроль					

А



№	Тип	СТ	Конц. Стандарта	Конц. Расч.	Коефф. Вариации %	Сред. Ст
1	Образец	19,36				17,41
2	Положительный контроль	15,45				
3	Отрицательный контроль					

Б

Рисунок 1 – Выявление вируса КЭ методом ОТ-ПЦР-РВ

На рисунке 1 (А) представлены результаты, полученные в 2021 году: Образец_1 – проба, полученная из суспензионного материала от клеща *Dermacenter marginatus*, Образец_2 – от клеща *Hyalomma asiaticum*. На рисунке 1 (Б) показан результат, полученный в 2022 году: Образец_1 – проба, полученная из суспензионного материала от клеща *Hyalomma scupense*.

Электронно-микроскопические исследования вирионов изолятов КЭ проводилось методом просвечивающей электронной микроскопии на ЭМ JEM-100 CX (JEOL) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении в 20000 раз выявлены вирионы вируса семейства *Flaviviridae*. В результате исследования были сделаны микрофотографические снимки (Рисунок 2).

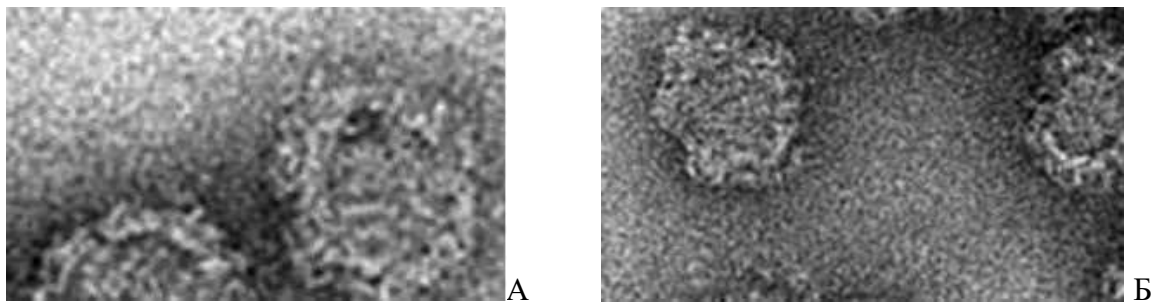


Рисунок 2 – Электронная микрофотография вирионов вируса семейства *Flaviviridae*, выделенных из клещей *Hyalomma anatolicum* и *Hyalomma asiaticum*

В ходе исследования сделаны негативные снимки, где можно увидеть морфологические данные выявленных вирионов. Размеры вирионов вируса семейства *Flaviviridae*, выделенных из клещей *Hyalomma anatolicum* (А) и *Hyalomma asiaticum* (Б) варьируют от 25-30 нм до 30-50 нм.

В республике имеются активные очаги КЭ, не связанные между собой, их суммарная площадь вместе с потенциально очаговой территорией условно составляет 25603 км², однако до сих пор не уточнены их географические границы, ареалы переносчиков [2, с. 103].

Ежегодно заболевания вирусом КЭ регистрируется на территории Алматинской (Южно-Казахстанский горный очаг), Восточно-Казахстанской (Восточно-Казахстанский горный очаг) областях. В целом 46% всех случаев регистрации КЭ в Республике приходится на ВКО [5, с. 27]. Полупустынный очаг выявлен по результатам проведения вирусологической разведки в нетипичном для этой инфекции пустынном ландшафте Южного Прибалхашья, Жамбылской области в пределах Мойынкумского и Таласского районов, Кызылординской и Южно-Казахстанской области. Вирус в этих регионах был изолирован от клещей рода *Dermacentor niveus*, *Hyalomma asiaticum* [4, с. 31]. КЭ является потенциально смертельной инфекцией центральной нервной системы у людей [8, с. 775]. КЭ является эндемичным во многих странах Европы и Азии, и ежегодно регистрируется до 3 000 случаев КЭ в Европе и до 10 000 случаев в России. Вирус КЭ может передаваться преимущественно через укусы клещей *Ixodes spp.* или *Dermacentor spp.* [10, с. 8] или реже, потреблением сырых молочных продуктов [6, с. 284].

Выводы

Разнообразие ландшафтно-климатических условий и животного мира страны создает предпосылки для существования очагов различных клещевых инфекции, связанных с клещами. Многолетние исследования показывают, что ежегодное проявление природного очага КЭ наблюдается в горных и предгорных ландшафтах Алматинской и Восточно-Казахстанской областях. Так же, в результате данной работы из 477 экземпляров исследованных образцов иксодовых клещей, доставленных из Алматинской области, в 3 исследуемых образцах был выявлен вирус клещевого энцефалита. Полученные результаты показывают, что клещи *D. marginatus*, *H. asiaticum* и *H. scupense* остаются на сегодняшний день одними из основных переносчиков вирусных инфекций на эндемичных территориях.

Список литературы

1. Дубянский В.М., Семенко О.В. Атлас распространения особо опасных инфекций в Республике Казахстан. – Алматы. – 2012. – С. 232.
2. Майканов Н.С. Потенциально очаговая территория по клещевому энцефалиту в Казахстане // Мат. 1 конф. АББЦАиК. – Алматы. – 2009. – С.103.
3. Морозов Н.А., Кашуба Э.А., Орлов М.Д., Крючков М.Я., Бельтикова А.А. Клещевой энцефалит // Инфекционные болезни: новости, мнение, обучения №4. – 2014. – С. 13-20
4. Нурмаханов Т.И., Сансызбаев Е.Б., Атшабар Б.Б. и др. Сравнительная оценка распространенности вирусов ККГЛ и КЭ в Южно-Казахстанской области // Окружающая среда и здоровье населения. – 2013. – № 2Д. – С. 31-32.
5. Эпидемическая ситуация по вирусным геморрагическим лихорадкам и клещевому энцефалиту // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. – Алматы. 2015. – вып. 1(31). – С. 27.
6. Cisak E., Wójcik-Fatla A., Zając V., Sroka J., Buczek A., Dutkiewicz J. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland // Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM. – 2010. – 17(2). – P.283-286.
7. Dantas-Torres F., Paolo Lia R., Capelli G., Otranto D. Efficiency of flagging and dragging for tick collection // Exp Appl Acarol. – 2013, – Vol. 61, – P.119-127.
8. Monath T.P. Flaviviruses. In B. N. Fields, D. N. Knipe (Eds.) // Virology. – 1990. – P.763-814.
9. Perfilyeva Y. V., Shapiyeva Zh. Zh., Ostapchuk Ye. O., Berdygulova Zh. A., Bissenbay A. O., Kulemin M. V., Ismagulova G. A., Skiba Y. A., Sayakova Z. Z., Mamadaliyev S. M., Maltseva E. R., Dmitrovskiy A. M. Tick-borne pathogens and their vectors in Kazakhstan – A review // Ticks and Tick-borne Diseases – Volume 11. – Issue 5. – 2020. – 101498.
10. Süß J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2011. – 2(1). – P.2-15. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.10.007>.

Рецензент: кандидат педагогических наук, доцент Усонгазиева Г.С.