

<sup>1</sup>Т.И. Нурмаханов, <sup>1</sup>Е.Б. Сансызбаев, <sup>2</sup>А.Б. Даниярова, <sup>1</sup>З.З. Саякова, <sup>1</sup>А.Н. Вилкова, <sup>1</sup>О.У. Есходжаев,  
<sup>1</sup>В.П. Садовская, <sup>3</sup>Р. Сайлаубекулы, <sup>3</sup>М.В. Кулемин  
<sup>1</sup>РГП «КНЦКЗИ им. М. Айкимбаева» г. Алматы,  
<sup>2</sup>КазНУ им. Аль-Фараби г. Аматы,  
<sup>3</sup>РГУ «Шымкентская ПЧС» г. Шымкент

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ВИРУСА КРЫМ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ В ЮЖНО-КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Для изучения распространенности вируса Крым-Конго геморрагической лихорадки среди переносчиков в очагах Южно-Казахстанской области были исследованы клещи методами ПЦР и ИФА. В результате проведенных анализов антитела и РНК вируса ККГЛ были обнаружены в клещах *H. anatolicum*, *H. scupense*, *H. asiaticum*. Самым многочисленным видом клещей в Южно-Казахстанской области, доминирующим в отловах, были *H. anatolicum* 47,3% с индексом инфицированности – 0,542, а самым распространенным и вторым по количеству 26,3% – *H. scupense*. Клещи этого вида были обнаружены в 11 из 12 обследованных районов с индексом инфицированности – 0,136.

**Ключевые слова:** Крым-Конго геморрагическая лихорадка, Южно-Казахстанская область, иксодовые клещи, ПЦР в режиме реального времени, ИФА.

**Введение.** Крым-Конго геморрагическая лихорадка (ККГЛ) – зоонозная природно-очаговая арбовирусная инфекционная болезнь с преимущественно трансмиссивным механизмом передачи возбудителя. Возбудителем ККГЛ является РНК-содержащий вирус из семейства *Bunyaviridae* рода *Nairovirus*. Впервые данное заболевание описано М. П. Чумаковым в 1944 г. на Крымском полуострове [1, 2].

В Казахстане первые случаи заболевания ККГЛ были зарегистрированы в 1948 г. на территориях Махта-Аральского и Келесского (Сарыагашский) районов Южно-Казахстанской области (ЮКО) [3, 4]. Ретроспективный анализ всех случаев ККГЛ показал, что с 1948 г. по 2016 г. в ЮКО было зарегистрировано 308 случаев ККГЛ. Анализ заболеваемости по районам в период 1991-2016 г. г. выявил, что наибольшее количество случаев заболеваний приходится на Созакский район – 38%.

Основным сдерживающим фактором заболеваемости ККГЛ на современном этапе остаются мероприятия направленные на уничтожение клещей (обработка инсектоакарицидными препаратами домашних животных и территорий обитания клещей). Примером может служить случай снижения объема противоклещевых обработок в 2005 г. в связи с отсутствием финансирования из местного бюджета, которое вызвало рост случаев ККГЛ в Южно-Казахстанской области, в 2005 – 2 случая, 2006 – 5, 2007 – 10, 2009 г. – 22.

Разнообразие природно-климатических условий ЮКО обеспечивает обитание широкого числа видов иксодовых клещей: *Hyalomma asiaticum*, *H. anatolicum*, *H. scupense*, *H. marginatum*, *Dermacentor niveus*, *D. marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *H. sulcata*, *Boophilus calcaratus*, [5]. Перечисленные виды клещей это только те, которые вовлечены в циркуляцию вируса ККГЛ. Подсчёт клещей на сельскохозяйственных животных в ЮКО, проведенный в 2010 - 2012 гг. Шымкентской ПЧС показал, что количество клещей снятых с животных может достигать 1,5 тысяч взрослых клещей, а количество нимф на одном животном может достигать иногда 2-3 тысяч экземпляров. В основном это были клещи *H. asiaticum*, *H. marginatum*, *H. anatolicum*, *Haemaphysalis erinacei* и *Rhipicephalus schulzei*.

Целью работы было определить опасные для населения виды клещей на исследованных территориях, показать их зараженность вирусом ККГЛ, создать карты мест сбора клещей и обнаружения положительных результатов исследования на ККГЛ.

### Материалы и методы.

**Полевой материал – иксодовые клещи.** Хранение и доставка материала в лабораторию осуществлялась в течение 5 дней после сбора при температуре +4°C, где проводилась видовая идентификация [6, 7]. Клещи объединялись по виду и по местам сбора в пулы. Измельчение клещей проводили в пластиковых пробирках с металлическими шариками (3,2 мм) в гомогенизаторе Mini-Bead Beater (Малайзия) с добавлением 700 мкл питательной среды Игла MEM. Полученную суспензию хранили до начала исследования при t -80°C.

**Иммуноферментный анализ.** Исследование клещей проводили комплектом реагентов Вектор Бест-КГЛ-антиген (Россия), считывание результатов – на анализаторе BioTek (США). Анализ проводили согласно инструкции производителя диагностического набора,

**ПЦР в режиме реального времени (real time qPCR).** Выделение РНК из суспензии клещей проводили набором QIAGEN RNeasya MiniKit (Германия). Выделенные пробы РНК хранились при температуре -80°C до начала исследования. ПЦР анализ проводили со специфическими праймерами к вирусу ККГЛ (SIGMA). Амплификацию и учет результатов проводили на аппарате Light Cyler 2.0 (Австрия) согласно протоколу, предложенному В. Atkinson с соавторами [8].

**Вычисление вирусоформности.** Расчет индекса инфицированности проводили по формуле Беклемишева [9]:  $X = (\lg N - \lg n_0) * 100 / 0.434 * m$  где: X - процент зараженных эктопаразитов в исследуемой партии; lg N - десятичный логарифм общего числа исследованных проб; lg n<sub>0</sub> - десятичный логарифм числа исследованных проб, давших отрицательный результат; m – среднее число эктопаразитов в пробе (пробах).

**Картографирование.** Полученная информация по клещам была оцифрована посредством создания электронных баз данных в программе Excel, а затем адаптирована для работы в программе ArcMap.

### Результаты, обсуждение.

Клещи были собраны с домашних животных: крупного рогатого скота (КРС), мелкого рогатого скота (МРС), лошадей и птиц, в местах их обитания в частных дворах и фермах. В природе на открытых стациях клещей собирали на флаги. Отловленных клещей затем помещали в индивидуальные пробирки, с обозначением места сбора, вида животного,

даты сбора и количества экземпляров. В период с мая по сентябрь было собрано 2809 экземпляров клещей из 12 районов Южно-Казахстанской области.

Определена видовая принадлежность 2809 экз. клещей из них было собрано: с КРС – 2039 экз., из скотопомещений – 366 экз., из открытых стаций – 167 экз., с лошадей – 95 экз., из нор больших песчанок – 52 экз., из курятников – 51 экз., с МРС – 33 экз., из гнезд хищных птиц – 6 экз. В результате проведенной идентификации, клещи были отнесены к 12 видам. Основная часть отловленных клещей 97,55% относилась к семейству Ixodidae, и, были представлены родами *Hyalomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*. Остальные 2,45% были отнесены к семейству аргасовых клещей (Argasidae) двух родов - *Argas* и *Ornithodoros* (таблица 1).

Таблица 1 - Видовое распределение собранных клещей в ЮКО

Исследуемые районы ЮКО	<i>Hyalomma scapense</i>	<i>H. anaticum</i>	<i>H. asiaticum</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>Haemaphysalis punctata</i>	<i>H. sulcata</i>	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	<i>Dermacentor niveus</i>	<i>Ornithodoros papillipes</i>	<i>Argas persicus</i>	Индекс инфицированности по районам
Сайрамский	55/9/0	120/12/4	-	-	30/6/0	-	-	30/3/0	-	6/1/0	-	1,778
Мактаральский	125/13/1	920/88/3	31/5/0	-	-	-	13/3/0	316/33/0	4/1/0	-	20/3/0	0,284
Созакский	175/20/0	21/2/0	66/7/2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,791
Байдибекский	65/12/0	-	-	5/1/0	-	10/2/0	-	-	-	-	-	-
Отырарский	149/17/0	-	64/6/0	-	5/1/0	-	-	-	-	-	-	-
Тулькубасский	55/9/0	20/2/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Казыгуртский	70/7/0	30/3/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Арысский	-	36/4/0	62/7/0	-	-	-	-	-	10/2/0	-	38/5/0	-
Толейский	10/1/0	-	-	-	5/1/0	-	-	-	-	-	-	-
Ордабасинский	5/1/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Сарыагашский	-	10/1/0	-	-	-	-	1/1/0	-	-	-	5/1/0	-
Шардаринский	3/1/0	171/18/0	-	-	-	-	5/1/0	16/4/0	-	-	-	-
г. Туркестан	27/6/0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Итого:	739/96/1	1328/130/7	223/25/2	5/1/0	40/8/0	10/2/0	19/5/0	362/40/0	14/3/0	6/1/0	63/9/0	-
Индекс инфицированности клещей	0,136	0,542	0,935	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Итого (%)	26,3/30/1	47,3/40,6/5,4	7,9/7,8/8	0,2/0,3/0	1,4/2,5/0	0,4/0,6/0	0,7/1,6/0	12,9/12,5/0	0,5/0,9/0	0,2/0,3/0	2,2/2,8/0	

Самым распространенным видом клещей по результатам отлова в ЮКО оказался *H. scapense* (26,3%), который был собран в 11 из 12 районов, далее *H. anaticum* (47,3%) несмотря на высокую численность, данный вид был отловлен только в 8 районах, из них большая часть 70% была отловлена в Мактааральском районе. В данном же районе собрано более 87% третьего по численности в выборке вида *B. annulatus*. Клещи рода *H. asiaticum* были сняты с животных в 4 районах, а доля данного вида в общей выборке составила 7,9%. Численность остальных видов была менее 3%.

Всего методами ПЦР и ИФА было исследовано 320 пулов клещей в среднем по 10 экз. в каждой пробе. Всего было выявлено 10 положительных на ККГЛ проб. Для подтверждения результатов ИФА, положительные пробы были исследованы ПЦР «в режиме реального времени». Проведенный ПЦР анализ подтвердил наличие РНК вируса ККГЛ в 10 пробах.

Все положительные на ККГЛ образцы были получены от клещей рода *Hyalomma*. Из 252 пулов клещей этого рода самыми зараженными были клещи *H. anaticum* – 2,8%. У клещей *H. asiaticum* положительными были 2 пробы – 0,79%. Несмотря на широкую представленность клещей *H. scapense* РНК вируса была обнаружена только в 1 пробе что составило – 0,39%. В остальных видах клещей антигены и РНК вируса ККГЛ не были обнаружены.

Немаловажное значение имеет оценка инфицированности клещей вирусом ККГЛ, так как трансмиссивная передача вируса ККГЛ через клещей является отличительной чертой представителей рода *Nairovirus* от других родов семейства Bunyaviridae [10, 11, 12].

Индекс инфицированности клещей в исследованных пробах был самым высоким в клещах *H. anaticum* с индексом инфицированности – 0,42%. У *H. scapense* индекс инфицированности составил – 0,136%; у клещей *H. asiaticum* индекс инфицированности составил – 0,935%. Общий индекс инфицированности клещей рода *Hyalomma* составил 0,445%.

Самый высокий индекс инфицированности клещей был отмечен в Сайрамском районе – 1,778%, несколько ниже в Созакском – 0,791% и Мактааральском – 0,284%. Результаты проведенных исследований представлены на рисунке 1.

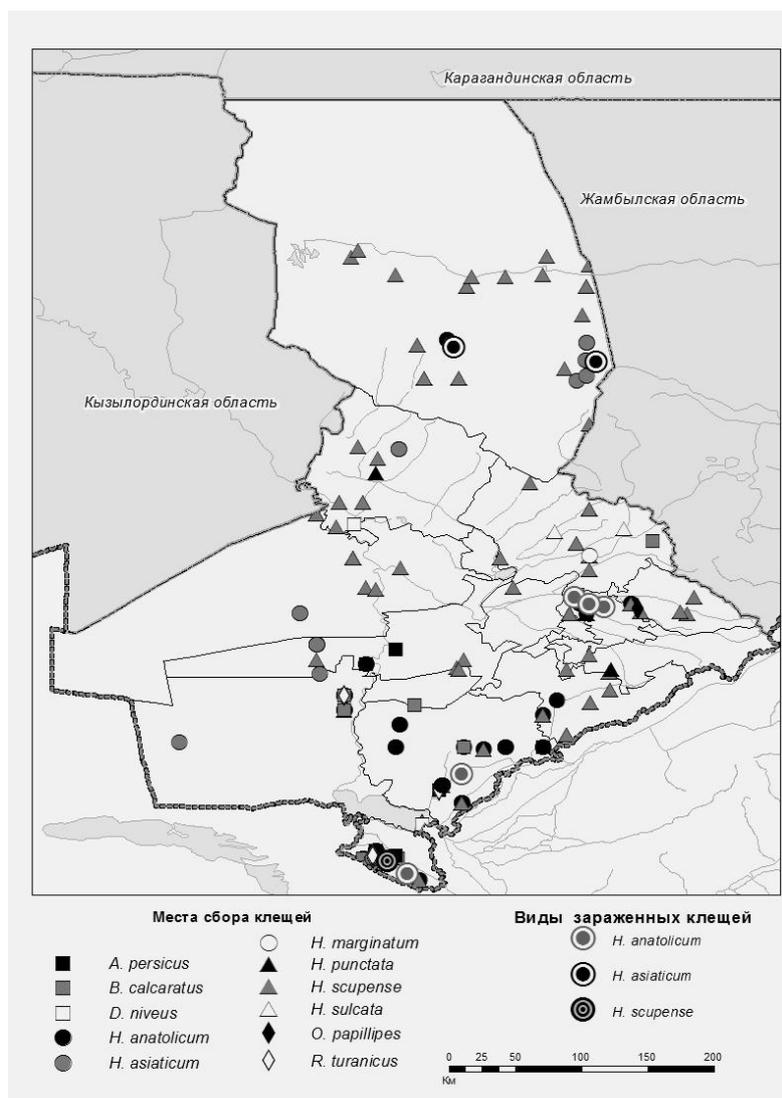


Рисунок 1 - Места сбора клещей и точки обнаружения положительных на ККГЛ клещей методами ИФА и ПЦР на территории ЮКО

Хозяевами-прокормителями имаго иксодовых клещей *Hyalomma anatolicum* и *H. scupense* в населенных пунктах области являются сельскохозяйственные животные, однако жизненный цикл их различается. *H. anatolicum* является трёххозяиным видом, имаго обнаруживают на животных с апреля по июнь, личинки – в июле-августе, а нимфы – осенью и зимой. Паразиты имеют одну генерацию в течение года. *H. scupense* однохозяинный клещ - личинка, нимфа и половозрелые особи питаются на одном и том же животном, на котором происходит их линька [13].

#### Выводы.

1. Самыми распространенными видами клещей в ЮКО оказались *H. anatolicum* и *H. scupense*, представители этих видов были обнаружены практически во всех районах.
2. Наибольшее количество положительных пулов с антигеном к вирусу ККГЛ было выявлено в *H. anatolicum*, вирус был обнаружен в 7 пробах из 10 положительных в ИФА, клещи *H. scupense* являются вторыми по численности, но с меньшей инфицированностью 0,136% видами клещей. Наиболее инфицированным видом можно считать *H. anatolicum* с индексом инфицированности – 0,542%.
3. На основе результатов проведенных исследований мы можем предположить, что *H. asiaticum* в ЮКО не является основным переносчиком ККГЛ в населенных пунктах, как это предполагалось ранее, так как инфицированность его низкая по сравнению с *H. anatolicum* и *H. scupense*.
4. Несмотря на широкое распространение иксодовых клещей на территории ЮКО, инфицированность ККГЛ исследованных нами видов была отмечена только в трех районах ЮКО: в Созакском, Сайрамском и Мактааральском. Полученные данные позволят скорректировать профилактические противоклещевые мероприятия с учетом фенологии клещей *H. anatolicum* и *H. scupense*, как наиболее опасных для населения переносчиков вируса ККГЛ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Богомолов Л.И. Крымская геморрагическая лихорадка // Опыт советской медицины в Великой Отечественной войне 1941-1945 гг. - М.: 1955. - Т.31. - С. 245-261.
- 2 Casals J. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus // Proc. Soc. exp. Biol. - N.Y.: 2002. - №131. - P. 233 - 235.
- 3 Jung- Sun F., Genis D. E. natural foci of hemorrhagic fever tick in the semi-desert area of southern Kazakhstan (preliminary report) // Proc. IPVE AMS USSR - M.: 1965. - №7. - P. 312 - 314.
- 4 Темирбеков Ж. Т., Добрица П. Г., Контарук Б. И. и др. Исследование крымской геморрагической лихорадки в Чимкентской области Казахской ССР // Тр. ИПВЭ АМН СССР - М.: 1971. - Т. 19. - С. 160 - 166.
- 5 Кожабаяев М. К., Аманжол Р., Тулеуханов А. Распространение иксодовых клещей на юге Казахстана // Теория и практика паразитарных болезней животных. - 2011. - №12. - С.242-244.
- 6 Галузо, И. Г. Кровососущие клещи Казахстана // Изд-во АН Казахской ССР. - 1947. - Т. 2. - С. 280-286.
- 7 Филиппова Н.А. Паукообразные. Аргасовые клещи (Argasidae) // Фауна СССР. - 1966. - Вып.3. - С. 256-261.
- 8 Atkinson, B. et al. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. // Vector Borne Zoonotic. - 2012. - №12. - P. 786-793.
- 9 Беклемишев В. Н. К изучению зараженности клещей переносчиков энцефалита методом биопробы // Вопросы вирусологии. - 1962. - №2. - С. 240-242.
- 10 Lasecka L., Baron M. D. The molecular biology of nairoviruses, an emerging group of tick-borne arboviruses // ArchVirolog. - 2014. - 159(6). - P. 1249-1265.
- 11 Gergova I., Kunchev M., Kamarinchev B. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-tick survey in endemic areas in Bulgaria // J MedVirolog. - 2012. - 84(4). - P. 608-614.
- 12 Anne J. Jaaskelainen, Hannimari Kallio-Kokko, Aykut Ozkul, et al. Development and Evaluation of a Real-Time RT-qPCR for Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Representing Different Genotypes // Vector Borne and Zoonotic Diseases. - 2014. - №14. - P. 870-872.
- 13 Gharbi M, Aziz Darghouth M. A review of Hyalomma scupense (Acari, Ixodidae) in the Maghreb region: from biology to control // Parasite. - 2014. - №21. - P. 42-48.

**<sup>1</sup>Т.И. Нурмаханов, <sup>1</sup>Е.Б. Сансызбаев, <sup>2</sup>А.Б. Даниярова, <sup>1</sup>З.З. Саякова, <sup>1</sup>А.Н. Вилкова, <sup>1</sup>О.У. Есходжаев, <sup>1</sup>В.П. Садовская, <sup>3</sup>Р. Сайлаубекулы, <sup>3</sup>М.В. Кулемин**

<sup>1</sup>М.Айқымбаев атындағы ҚКЗИФО Алматы қ.,

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ Алматы қ.,

<sup>3</sup>Шымкент ОҚКС Шымкент қ.

#### **ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН ОБЛЫСЫ КЕНЕЛЕРІНДЕ ҚЫРЫМ-КОНГО ГЕМОМРАГИЯЛЫҚ ҚЫЗБАСЫ ТАРАЛУЫНЫҢ ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ**

**Түйін:** Оңтүстік Қазақстан облысының ошақтарында тасымалдаушылардың ішінде Қырым-Конго геморрагиялық қызбасы вирусының таралуын бақылау үшін ПТР мен ИФТ әдістерімен кенелер зерттелінді. Жүргізілген талдаулардың нәтижесінде ҚКГҚ вирусының антигені мен РНҚ *H. anatolicum*, *H. scupense*, *H. asiaticum* кенелерінде анықталды. Оңтүстік Қазақстан облысында жиналған кенелердің ішінде басым бөлігі *H. anatolicum* 47,3% болды, жұқтыру көрсеткіші – 0,542, ал ең көп таралғаны мен саны бойынша екінші кезекте *H. scupense* 26,3% болып анықталды. Кенелердің бұл түрі зерттелінген 12 ауданның ішінде 11 анықталды, жұқтыру көрсеткіші – 0,136.

**Түйінді сөздер:** Қырым-Конго геморрагиялық қызбасы, Оңтүстік Қазақстан облысы, шынайы уақыт режимі

**<sup>1</sup>T.I. Nurmakhanov, <sup>1</sup>E.B. Sansyzbayev, <sup>2</sup>A.B. Daniyarova, <sup>1</sup>Z.Z. Sayakova, <sup>1</sup>A.N. Vilкова, <sup>1</sup>O.U. Yeskhojayev, <sup>1</sup>V.P. Sadovskaya, <sup>3</sup>R. Saylaubekuly, <sup>3</sup>M.V. Kulemin**

<sup>1</sup>M. Aikimbayev's Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Almaty

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Almaty

<sup>3</sup>Shymkent antiplaque station, Shymkent

#### **RESULTS OF RESEARCH OF PREVALENCE OF CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS IN THE SOUTH KAZAKHSTAN REGION**

**Resume:** To study the prevalence of the virus Crimean-Congo hemorrhagic fever among carriers in the centers of the South Kazakhstan region have been investigated ticks by PCR and ELISA. As a result of analysis of antigens and CCHF virus RNA were detected in ticks *H. anatolicum*, *H. scupense*, *H. asiaticum*. The most abundant species of ticks in the South Kazakhstan region dominate the catches were *H. anatolicum* 47, 3% with an index of infection – 0, 542, and the most common and second in 26, 3% *H. scupense*, ticks of this species have been found in 11 of the 12 surveyed areas with an index of infection – 0.136.

**Keywords:** Crimea-Congo hemorrhagic fever, South Kazakhstan region, ixodid mites, real-time PCR, ELISA.