

ГЕНОВИДОВОЙ СОСТАВ СПИРОХЕТ *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ, ОТЛОВЛЕННЫХ ВЕСНОЙ 2008 Г. В РЕКРЕАЦИОННОЙ ЗОНЕ Г. НОВОСИБИРСКА

Алексей Львович МАМАЕВ, Александр Владимирович РЯБЧЕНКО,
Анатолий Борисович БЕКЛЕМИШЕВ

НИИ биохимии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

В работе исследовалась зараженность клещей *Ixodes persulcatus*, населяющих лесопарковую зону Новосибирского научного центра, спирохетами *Borrelia burgdorferi* sensu lato, которая составила в 2008 г. 21,3 %. В исследуемой популяции клещей (всего 300 особей) наряду с обнаруживаемыми в 1999–2006 гг. двумя геновидами боррелий: двух разных подгрупп *Borrelia garinii* [NT29 (2,3 %) и 20047^T (17,3 %)] и *Borrelia afzelii* (0,67 %), — были выявлены представители геновида *Borrelia japonica* (0,67 %). Два клеща были инфицированы одновременно спирохетами *Borrelia garinii* NT29 и *Borrelia garinii* 20047^T (0,67 %).

Ключевые слова: *Ixodes persulcatus*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, зараженность, иксодовый клещевой боррелиоз, болезнь Лайма, ПЦР, генотипирование.

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) или болезнь Лайма, представляет собой инфекционное трансмиссивное заболевание, характеризующееся большим полиморфизмом клинических проявлений. Инфекция передается человеку при укусе иксодовых клещей и вызывается по крайней мере тремя геновидами спирохет, относящихся к комплексу *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.): *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*. Каждый из названных генов вызывает свойственные для него клинические формы заболевания: соответственно артрит, нейроборрелиоз, хронический атрофический дерматит [1, 2]. По данным ранних исследований утверждалось, что в популяциях иксодовых клещей, распространенных на территории России, циркулируют только два геновида боррелий — *B. garinii* и *B. afzelii* с доминирующим распространением первого [3, 4]. В работе [3] сообщалось о различиях встречаемости двух групп геновида *B. garinii*: группы 20047 и группы NT29. Первая из них распространена в природных очагах Евразии с основными переносчиками *Ixodes persulcatus* и *I. ricinus*, а вторая, NT29, — практически только в паразитарных системах с основным переносчиком *I. persulcatus*. Однако уже в 2001 г. появились сообщения об обнаружении геновида *B. burgdorferi* sensu stricto в отдельных популяциях клещей *I. persulcatus* Schulze в европейской части России [5–8], что свидетельствует о распространении этого геновида с территории Западной Европы на восток. Таким образом, ежегодный мониторинг зараженности иксодовых клещей возбудителями ИКБ на урбанизированных территориях России

важен как для оценки эпидемиологического состояния по этой инфекции, так и для прогноза заболеваемости ИКБ и форм его течения. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование зараженности клещей *I. persulcatus*, населяющих рекреационную зону Новосибирского научного центра (ННЦ), спирохетами *Borrelia burgdorferi* s.l. и определение геновидового состава спирохет.

Материал и методы

Сбор клещей. Клещей (*Ixodes persulcatus* Schulze) отлавливали флажковым методом в лесопарковой зоне ННЦ, во второй декаде мая 2008 г. Было отловлено 303 взрослых особи обоих полов. Клещей хранили завернутыми во влажный бинт при +4 °С в течение не более двух недель до проведения процедуры выделения из них ДНК.

Выделение суммарного препарата ДНК из клещей. Живых клещей промывали дистиллированной водой, помещали на 1 мин в 70%-ный этанол, подсушивали на фильтровальной бумаге и затем из клещей выделяли ДНК. Каждого клеща гомогенизировали в 100 мкл 4М раствора гуанидинтиоцианата, содержащего гликоген, и прогревали при 60 °С в течение часа в твердотельном термостате. Затем проводили фенольно-хлороформную экстракцию ДНК из лизата клещей. ДНК осаждали из водной фазы равным объемом этанола, осадки промывали дважды 70%-ным этанолом и один раз 96%-ным этанолом, подсушивали и растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера. Препараты ДНК хранили в ТЕ-буфере при –20 °С. В полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали по 3 мкл препарата на 30 мкл реакционной смеси.

Мамаев А.Л. — младш.н.с. лаборатории генной инженерии, e-mail: alexeymataev@ngs.ru

Рябченко А.В. — старш.н.с. лаборатории генной инженерии

Беклемишев А.Б. — д.б.н., зав. лабораторией генной инженерии

Обнаружение спирохет *B. burgdorferi* s.l. в клещах.

О наличии боррелий в клеще судили по результатам выявления их геномных ДНК в суммарном препарате ДНК, выделенном из каждого клеща. Обнаружение ДНК боррелий проводили с помощью ПЦР по методике [9] с некоторыми модификациями [4]. В качестве амплифицируемой мишени использовали специфичную для представителей комплекса *B. burgdorferi* s.l. межгенную область генов рибосомальных 5S (*rrf*) и 23S (*rrl*) РНК. Амплификацию межгенной области *rrf-rrl* проводили в присутствии праймеров: № 126 5'-TGCGAGTTCGCGGGAG-3' и № 127 5'-TCCTAGGCATTACCATAGACTCTT-3'. Для определения ложноотрицательных результатов ПЦР-анализа, обусловленных присутствием в препарате исследуемой ДНК ингибиторов Taq-полимеразы, реакцию проводили в присутствии ДНК внутреннего контроля с дополнительной парой соответствующих ей праймеров. В качестве ДНК внутреннего контроля использовали ампликон фрагмента генома вируса гепатита В (HBV) [4] с праймерами: № 64 5'-CCATTTGTTTCAGTGGTTCG-3', № 65 5'-GTAAAGAGAGGTGCGCCC-3'; или плазмиду pREB-ESAT с соответствующей парой праймеров, необходимой для амплификации гена ESAT: № 78 5'-TGGTGACCTGCGAACATCCCAGTGAC-3' и № 79 5'-TGGAATTCATGACAGAGCAGCAGTGGGAAT-3'. Размер ампликонов, синтезируемых на плазмиде pREB-ESAT и ампликоне фрагмента генома вируса гепатита В, составляли 300 и 150 пар нуклеотидов (п. н.) соответственно. ПЦР проводили на термощелке «Терцик» («ДНК-технология», Москва). Ампликоны анализировали в 2%-ном агарозном геле.

Генотипирование боррелий осуществляли с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, получаемых гидролизом ампликонов межгенной области *rrf-rrl* эндонуклеазой рестрикции *Tru9I* [9] (7). Продукты гидролиза анализировали в 16%-ном акриламидном геле.

Электрофоретический анализ ДНК. Электрофорез ДНК в полиакриламидном и агарозном гелях проводили по общепринятым методикам [10]. Гель окрашивали раствором бромистого этидия, визуально анализировали и фотографировали с помощью цифровой фотокамеры фирмы «Sony» (модель DSC-F717, Япония) при освещении УФ-светом с длиной волны 312 нм.

Результаты и обсуждение

Зараженность клещей спирохетами *B. burgdorferi* s.l. оценивали с помощью обнаружения геномных ДНК боррелий методом ПЦР. Способ включал выделение суммарного препарата ДНК из каждого клеща и последующее выявление в нем геномной ДНК спирохет. Предварительно в препарат анализируемой ДНК вносили ДНК внутреннего контроля. Продукты ПЦР анализировали в 2%-ном агарозном геле. В случае положительного ответа длина ампликона составляет 250–270 п. н. В качестве положительного контроля в ПЦР ис-

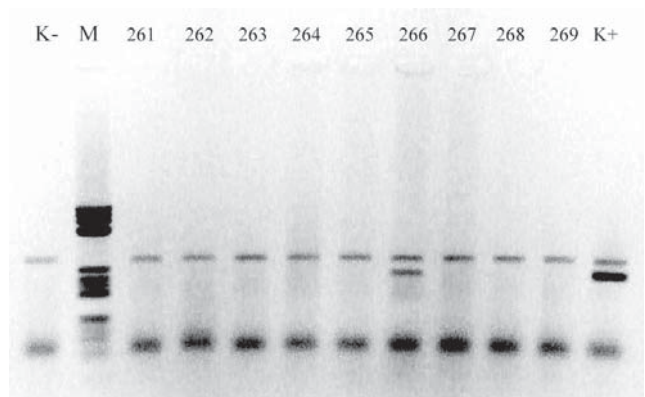


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации межгенной области *rrf-rrl* спирохет *B. burgdorferi* s.l., полученных методом ПЦР на образцах ДНК, выделенных из клещей *I. persulcatus*. Электрофорез ДНК проводили в 2%-ном агарозном геле 30 минут при 100 В. Дорожки: K- – отрицательный контроль; M – маркерная ДНК (pBR322/*Alu I*); 261–268 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК клещей; K+ – продукт ПЦР, полученный на препарате геномной ДНК *B. burgdorferi sensu stricto*.

пользовали геномную ДНК *B. burgdorferi sensu stricto* эталонного штамма B31, размер ампликона межгенной области *rrf-rrl* которого составляет 250 п. н. На рис. 1 представлена электрофореграмма типичного анализа образцов ДНК клещей на наличие геномной ДНК боррелий методом ПЦР.

На рис. 1 четко видно, что на дорожке, соответствующей образцу ДНК клеща № 266, присутствует полоса продукта ПЦР, соответствующего по своему размеру ампликону межгенной области *rrf-rrl* (~250 п. н.). Иными словами, в образце ДНК клеща № 266 присутствует ДНК спирохет *B. burgdorferi* s.l. В итоге этого раздела исследований из 303 проанализированных клещей в 64 особях были обнаружены ДНК спирохет *B. burgdorferi* s.l. Ошибка определения зараженности, или ошибки выборки (ОВ), рассчитывалась следующим образом: $ОВ = \pm 1,95 (P \times (100 - P)/n)^{0,5}$, где P – количество позитивных особей, n – размер выборки. Результаты анализов представлены в таблице.

На следующем этапе работы определяли генотиповую принадлежность спирохет *B. burgdorferi* s.l., обнаруженных в исследованных клещах, с помощью метода типирования их геномных ДНК, предложенного Postic et al. [9]. Представителям каждого геновида и геномной группы спирохет *B. burgdorferi* s.l. свойственен определенный набор отличающихся по размерам рестрикционных фрагментов ампликона межгенной области *rrf-rrl* [9], получаемых в результате гидролиза ампликона эндонуклеазой рестрикции *MseI* или ее изоизомером *Tru9I*. Таким образом, по результатам электрофоретического анализа полученных рестрикционных фрагментов можно судить о генотиповой принад-

Таблица

Зараженность взрослых клещей *I. persulcatus*, отловленных в рекреационной зоне ННЦ в весенний период 2008 г., различными генотипами спирохет *B. burgdorferi s.l.*

Количество обследованных клещей	Доля клещей, зараженных спирохетами, %	Количество клещей, зараженных идентифицированными генотипами <i>B. burgdorferi s.l.</i>					
		суммарное количество	<i>B. garinii</i> NT29	<i>B. garinii</i> 20047 ^T	<i>B. garinii</i> NT29 + 20047 ^T	<i>B. afzelii</i>	<i>B. japonica</i>
303	21 ± 5	63	5	52	2	2	2

лежности боррелий, содержащихся в исследуемом клеще. С использованием этого метода нами были исследованы все 64 образца ДНК, в которых по данным ПЦР-анализа была обнаружена геномная ДНК спирохет *B. burgdorferi s.l.* На рис. 2 представлены результаты одного из таких анализов.

Судя по картине электрофореза образцов ампликонов, гидролизованных рестриктазой *Tru9I* (рис. 2), в исследованных образцах 135, 149, 159, 163, 169, 173, 177 и 188 содержатся геномные ДНК спирохет, относящиеся к генотипу *B. garinii* (геномная группа 20047^T), в одном образце (дорожка 165) – ДНК спирохет генотипа *B. afzelii*, и в двух образцах (дорожки 137 и 166) – ДНК спирохет генотипа *B. japonica*. Результаты генотипирования 63 образцов ДНК представлены в таблице. ДНК одного из 64 ПЦР-положительных образцов нам не удалось отнести к какому-либо описанно-

му генотипу. Как следует из приведенных в таблице данных, доминирующим генотипом являются спирохеты *B. garinii*, включающие представителей двух геномных групп: 20047 (52 образца) и NT29 (5 образцов). В отличие от прошлых лет, в популяции иксодовых клещей, отловленных на территории ННЦ, существенно снизилась доля спирохет генотипа *B. afzelii*. ДНК этого генотипа обнаружена только в 3 ± 2 % зараженных спирохетами клещей. Два клеща были инфицированы спирохетами генотипа *B. japonica*.

Закключение

В результате работы было установлено, что в популяции клещей *I. persulcatus*, населяющих рекреационную зону ННЦ, циркулируют только два генотипа спирохет *B. burgdorferi s.l.*: *B. garinii* (геномные группы 20047^T и NT29) и *B. afzelii*, с существенным преобладанием первого. Эти данные сходны с результатами, полученными нами в предыдущие годы [4, 11] при исследовании генотипового состава спирохет *B. burgdorferi s.l.*, обнаруженных в иксодовых клещах, отловленных на этой же территории. Однако в 2008 г. впервые обнаружены спирохеты *B. japonica*, что свидетельствует о возможном распространении этого непатогенного для человека генотипа с территории Дальнего Востока на запад. Принимая во внимание тот факт, что в популяции иксодовых клещей, населяющих рекреационную зону ННЦ, циркулируют преимущественно спирохеты генотипа *B. garinii*, можно ожидать, что у людей, подвергнутых нападению клещей на этой территории, в случае возникновения ИКБ заболевание будет сопровождаться поражением центральной нервной системы.

Список литературы

1. Van Dam A.P., Kuiper H., Vos K. et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations in Lyme borreliosis // Clin. Infect. Dis. 1993. 17. 708–717.
2. Фоменко Н.В., Мельникова О.В., Черноусова Н.Я., Епихина Т.И. Выявление антител к боррелиям комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* // Бюл. сиб. мед. 2008. Приложение 1. 78–84.
Fomenko N.V., Mel'nikova O.V., Chernousova N.Ya., Yepichina T.I. Detection of antibodies to Bor-

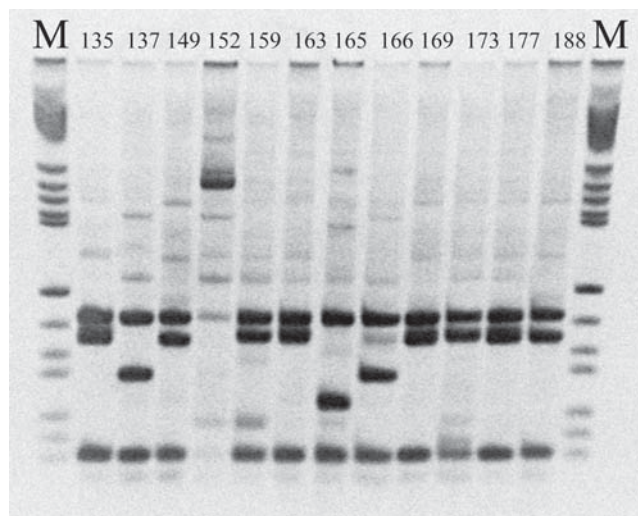


Рис. 2. Электрофореграмма рестрикционных фрагментов, полученных в процессе гидролиза ампликонов межгенной области *rrf-rrl* спирохет *B. burgdorferi s.l.* эндонуклеазой рестрикции *Tru9I*. Электрофорез проводили в 16%-ном полиакриламидном геле 3 часа при 120 В. Дорожки: М – маркер молекулярных масс (pBR322/Alu I); 135–188 – ампликоны межгенной области *rrf-rrl* анализируемых образцов ДНК *B. burgdorferi s.l.*, гидролизованные эндонуклеазой рестрикции *Tru9I*.

relia burgdorferi sensu lato // *Bull. sib. med.* 2008. Suppl. 1. 78–84.

3. Postic D., Korenberg E., Gorelova N. et al. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates // *Res. Microbiol.* 1997. 148. 691–702.

4. Beklemishev A.B., Dobrotvorskyy A.K., Piterina A.V. et al. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in *Ixodes persulcatus* ticks in West Siberia, Russia // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. 227. (2). 157–161.

5. Gorelova N.B., Korenberg E.I., Postic D. et al. The first isolation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in Russia // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2001. 4. 10–12.

6. Семенов А.В., Алексеев А.Н., Дубинина Н.В. и др. Определение генетической гетерогенности в популяции *Ixodes persulcatus* Schulze (Acari: Ixodidae) в Северо-западной части России и распространения клещевых патогенов, возбудителей болезни Лайма и эрлихиоза, в различных генотипах клещей // *Мед. паразитол. и паразитарные болезни.* 2001. (3). 11–15.

Semenov A.V., Alekseev A.N., Dubinina N.V. et al. Identification of genetic heterogeneity in populations of *Ixodes persulcatus* Schulze (Acari: Ixodidae) in north-western Russia and the spread of ticks pathogens, Lyme disease and ehrlichiosis pathogens in different genotypes of ticks // *Med. parazitolog. i parazitarnye bolezni.* 2001. (3). 11–15.

7. Масузава Т., Наумов Р.Л., Кудекен М., Харитоненков И.Г. Обнаружение *Borrelia burgdorferi sensu stricto* в Московской области, Россия // *Мед. паразитол. и паразитарные болезни.* 2001. (2). 52.

Masuzava T., Naumov R.L., Kudeken M., Khari-tonenkov I.G. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in the Moscow region, Russia // *Med. parazitolog. i parazitarnye bolezni.* 2001. (2). 52.

8. Коренберг Э.И., Неведова В.В., Фадеева И.А., Горелова Н.Б. Основные итоги генотипирования боррелий в России // *Бюл. сиб. мед.* 2006. Приложение 1. 87–92.

Korenberg E.I., Nefedova V.V., Fadeeva I.A., Gorelova N.B. The main outcome of *Borrelia* genotyping in Russia // *Byul. sib. med.* 2006. Suppl. 1. 87–92.

9. Postic D., Assous M., Grimont P.A.D. et al. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf*(5S)-*rrl*(23S) intergenic spacer amplicons // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994. 44. 743–752.

10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984. 480 с.

Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual // Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 480 p.

11. Livanova N.N., Morozova O.V., Morozov I.V. et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from Novosibirsk region (West Siberia, Russia) based on direct PCR // *Eur. J. Epidemiol.* 2003. 18. (12). 1155–1158.

GENOSPECIES OF THE *BORRELIA BURGDORFERI SENSU LATO* SPIROCHAETE, CIRCULATED IN *IXODES* TICKS COLLECTED IN THE RECREATIONAL ZONE OF NOVOSIBIRSK IN SPRING 2008

Alexey L'vovich MAMAEV, Alexandr Vladimirovich RYABCHENKO, Anatoly Borisovich BEKLEMISHEV

Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov st., 2

Ixodes persulcatus ticks collected in Novosibirsk Akademgorodok recreation zone were investigated and infection rate of 21,3 % was found. As earlier in 1999–2006, two *Borrelia* genotypes, – *Borrelia garinii* subgroups [NT29 (2,3 %) and 20047^T (17,3 %)] and *Borrelia afzelii* (0,67 %) were found in the investigated ticks population (300 ticks). Two ticks were infected with *Borrelia garinii* NT29 and *Borrelia garinii* 20047^T spirochetes (0,67 %) simultaneously. Also, two ticks were infected with *Borrelia japonica* (0,67 %). This genotype of spirochaete was found for the first time in the *Ixodes persulcatus* ticks circulated in the recreational zone of Novosibirsk.

Key words: *Ixodes persulcatus*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, infection rate, Lyme disease, borreliosis, PCR, genotyping.

Mamaev A.L. – junior researcher of laboratory of genetic engineering, e-mail: alexeymamaev@ngs.ru

Ryabchenko A.V. – senior researcher of laboratory of genetic engineering

Beklemishev A.B. – head of laboratory of genetic engineering, doctor of biological sciences