

А. В. Рябченко, А. Б. Беклемишев

Научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН
ул. Акад. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия
E-mail: ibch@soramn.ru

МОНИТОРИНГ ЗАРАЖЕННОСТИ КЛЕЩЕЙ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ЛАЙМ-БОРРЕЛИОЗА В РЕКРЕАЦИОННОЙ ЗОНЕ НОВОСИБИРСКА

Настоящая работа посвящена изучению зараженности клещей *Ixodes persulcatus Schulze* спирохетами *Borrelia burgdorferi s. l.* Исследовались клещи, отловленные весной 2003 и 2005 г. в рекреационной зоне Новосибирского научного центра. Инфицированность клещей спирохетами определяли методом одноразовой ПЦР. Зараженность клещей составила $31,7 \pm 6,0\%$ в 2003 г. и $21,2 \pm 2,3\%$ в 2005 г. Установлено, что в исследованной популяции клещей циркулируют только два геновида боррелий: *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii*, причем первый тип спирохет оказался преобладающим (более 70%).

Ключевые слова: *Ixodes persulcatus*, *Borrelia*, Лайм-боррелиоз.

Лайм-боррелиоз (син.: иксодовый клещевой боррелиоз, болезнь Лайма) – трансмиссивное природно-очаговое инфекционное заболевание, передаваемое человеку с укусами иксодовых клещей (*Ixodes persulcatus Schulze*). Возбудителями Лайм-боррелиоза (ЛБ) являются спирохеты трех геновидов, относящихся к комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato (s. l.)*: *B. burgdorferi sensu stricto (s. s.)*, *B. afzelii* и *B. garinii*. Каждый из этих геновидов вызывает свойственные для него клинические формы заболевания: артрит, нейроборрелиоз, хронический атрофический дерматит соответственно [1]. Еще в 90-х годах прошлого века было установлено, что в популяциях иксодовых клещей, распространенных на территории России, циркулируют только два геновида боррелий: *B. garinii* и *B. afzelii* с доминирующим распространением первого [2; 3]. Однако уже в 2001 г. появились сообщения об обнаружении геновида *B. burgdorferi s. s.* в отдельных популяциях клещей *I. persulcatus Schulze* в европейской части России [4–6], что свидетельствует о распространении этого геновида с территории Западной Европы на восток.

Таким образом, ежегодный мониторинг зараженности иксодовых клещей возбудителями ЛБ на урбанизированных территориях России важен как для оценки эпидемиологического состояния по ЛБ, так и для

прогноза заболеваемости, форм болезни и ее течения. В связи с этим целью работы явилось исследование зараженности клещей *I. persulcatus*, населяющих рекреационную зону Новосибирского научного центра (Советский район г. Новосибирска), спирохетами *Borrelia burgdorferi s. l.* и определение геновидового состава спирохет.

Материал и методы

Сбор клещей *Ixodes persulcatus Schulze* проводили в лесопарковой зоне Новосибирского научного центра в мае 2003 и 2005 г. Исследовано 210 и 306 взрослых особей обоих полов соответственно.

Культивирование боррелий проводили в среде BSK-II, содержащей налидиксовую кислоту и рифампицин, используя два различных способа [7; 8]. В первом случае в качестве посевного материала использовали гомогенат клещей. Каждого клеща (всего 150 особей, по 5 особей на культуру и мышь) стерилизовали 70% спиртом, гомогенизировали в физрастворе и полученный гомогенат инокулировали в среду BSK-II. Во втором случае гомогенат клеща инъецировали внутрибрюшинно белой беспородной мышью (всего 25 мышей). Мышей после инъекций содержали 20 дней в виварии и затем забивали. Кровь, сердце и мочевой пузырь животных стерильно извлекали и помещали в среду BSK-II.

Культивирование как гомогената клещей, так и органов инфицированных мышей в среде BSK-II длилось 30 дней при 32 ± 1 °С, после чего культуры пересевали на свежую среду и выращивали еще 15 дней.

Выделение суммарного препарата нуклеиновых кислот из культур боррелий проводили с использованием гуанидинизотионата и последующей фенольно-хлороформной экстракции [9]. Клетки бактерий осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 4 М растворе гуанидинизотионата и инкубировали 30 мин при 60 °С. Затем проводили фенольно-хлороформную экстракцию, ДНК осаждали из водной фазы равным объемом изопропилового спирта, осадок промывали дважды 70 % этанолом, подсушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера. Препараты ДНК хранили в ТЕ-буфере при -20 °С. Для ПЦР использовали по 3 мкл препарата на 30 мкл реакционной смеси.

Выделение суммарного препарата нуклеиновых кислот из клещей. ДНК выделяли только из живых клещей. Каждого клеща гомогенизировали в 100 мкл 4 М раствора гуанидинизотионата, содержащего гликоген, прогревали при 60 °С в течение часа в твердотельном термостате. Далее ДНК очищали так же, как и в предыдущей методике выделения ДНК.

Обнаружение ДНК боррелий с помощью ПЦР проводили по методике [10] с некоторыми модификациями [3]. Ампликоны анализировали в 6 % полиакриламидном геле (ПААГ) или 1,5 % агарозном геле.

Генотипирование боррелий осуществляли двумя методами. Один из них основан на однораундовой ПЦР, в которой в качестве обнаруживаемой мишени служили гены лизил-тРНК синтетазы (класс I), специфичные для каждого из трех геновидов спирохет (*B. burgdorferi s. s.*, *B. garinii* и *B. afzelii*) [11]. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Второй метод основан на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), получаемых гидролизом ампликонов межгенной области *rrf-rrl* рестриктазой *MseI* или *Tru9I* [10]. Продукты гидролиза анализировали в 6 % ПААГ.

Электрофорез ДНК в ПААГ и агарозном геле проводили по общепринятым методикам [9]. Гель окрашивали раствором бромид-

стого этидия и визуально анализировали, фотографировали при освещении ультрафиолетом с длиной волны 312 нм на цифровой фотоаппарат с соответствующим светофильтром.

Результаты исследования и обсуждение

Зараженность клещей боррелиями оценивали с помощью обнаружения геномных ДНК спирохет методом ПЦР. Способ включал выделение суммарного препарата ДНК из каждого клеща и последующее выявление в нем геномной ДНК боррелий с помощью ПЦР. В качестве амплифицируемой мишени использовали специфичную для представителей комплекса *B. burgdorferi s. l.* межгенную область генов рибосомальных 5S (*rrf*) и 23S (*rrl*) РНК [10]. Продукты ПЦР анализировали в 6 % ПААГ. В случае положительного ответа длина ампликона составляет 250–270 п. н. Для выявления ложноотрицательных результатов анализа, обусловленных присутствием в препарате исследуемой ДНК ингибиторов ПЦР, 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). Размер ампликона, получаемого на ДНК внутреннего контроля, составляет 150 п. н. В качестве положительного контроля в ПЦР использовали геномную ДНК *B. burgdorferi s. s.* эталонного штамма B31, размер ампликона межгенной области *rrf-rrl* которого составляет 250 п. н. Представлены результаты типичного анализа образцов ДНК клещей на присутствие в них геномных ДНК боррелий (рис. 1).

На дорожках 4, 7, 8 и 12 присутствует полоса продукта ПЦР, соответствующего по своему размеру ампликону межгенной области *rrf-rrl* (~ 250 п. н.). Иными словами, в образцах ДНК клещей присутствовала ДНК спирохет *B. burgdorferi s. l.*

В целом за 2003 и 2005 гг. нами были проанализированы 516 клещей (табл.).

Определение геновидовой принадлежности спирохет *B. burgdorferi s. l.*, обнаруженных в исследованных клещах, проводили с помощью двух методов генотипирования их геномных ДНК.

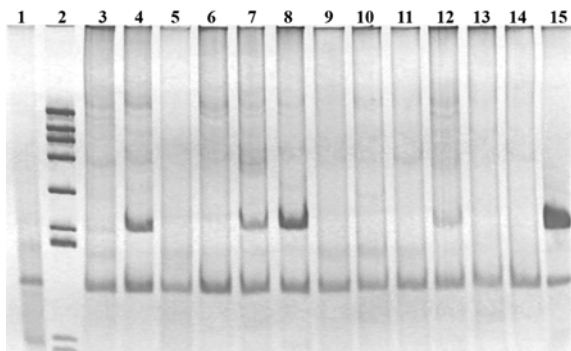


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации межгенной области *rrf-rrl*, полученных методом ПЦР на образцах ДНК, выделенных из клещей. Электрофорез ДНК проводили в 6 % полиакриламидном геле.

1 – отрицательный контроль; 2 – маркерная ДНК (pBR322 гидролизованная рестриктазой *AluI*); 3–14 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК клещей; 15 – продукт ПЦР на геномной ДНК *B. burgdorferi s. s.* шт. В31 (положительный контроль)

Заражённость взрослых клещей *I. persulcatus*, отловленных в рекреационной зоне ННЦ в 2003 и 2005 гг., различными геновидами спирохет *B. burgdorferi s. l.*

Год	Кол-во клещей	Доля ПЦР-положительных клещей, %	Количество генотипированных ПЦР-положительных образцов ДНК из клещей				
			суммарное кол-во	<i>B. garinii</i> NT29	<i>B. garinii</i> 20047T	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i>
2003	210	31,7 ± 6,0	37	10	14	3	10
2005	306	21,2 ± 2,3	64	8	31	15	10
Всего	516	22,6 ± 4,4	101	18	45	18	20

Первый способ генотипирования осуществляли путем однораундовой ПЦР, в которой в качестве обнаруживаемой мишени служили гены лизил-тРНК синтетазы (класс I) спирохет *B. burgdorferi s. l.* [11]. Сначала этот способ был апробирован в экспериментах по обнаружению и типированию геномных ДНК спирохет, полученных культивированием. Нами было проведено культивирование в среде BSK-II гомогенатов взрослых особей клещей *I. persulcatus*, а также кусочков органов и тканей (сердце, мочевой пузырь, кровь) мышей, инфицированных гомогенатами клещей (всего 73 культуры). По окончании культивирования, из части объема каждой культуры выделяли суммарные препараты нуклеиновых кислот для обнаружения геномных ДНК спирохет *B. burgdorferi s. l.* и генотипирования изолятов. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле. О присутствии в культуре спирохет и их геновидовой принадлежности судили по наличию ампликона, имеющего размер, специфичный для каждого геновида: *B. burgdorferi s. s.* (709 п. н.), *B. garinii* (856 п. н.) и *B. afzelii* (619 п. н.) (рис. 2).

На дорожках электрофореграммы выделяются отчетливые полосы ампликонов размером ~ 850–860 п. н. (дорожки 2–5), ~ 620–630 п. н. (дорожка 6) и двух ампликонов, имеющих размеры ~ 850–860 п. н. и ~ 620–630 п. н. (дорожка 7). Результаты анализа свидетельствуют о том, что препа-

раты ДНК 4-х исследованных культур содержат геномные ДНК спирохет геновида *B. garinii* (дорожки 2–5), одной культуры *B. afzelii* (дорожка 6) и одной культуры – смесь геномных ДНК *B. garinii* и *B. afzelii* (дорожка 7).

В целом, в результате проведенного анализа 73-х культур только в 37-и обнаружены и типированы спирохеты *B. burgdorferi s. l.* В 24-х культурах идентифицированы спирохеты геновида *B. garinii*, в 3-х – *B. afzelii* и в 10-и культурах – спирохеты обоих геновидов. Геновид *B. burgdorferi s. s.* не был обнаружен ни в одной из исследованных культур.

В завершение этого эксперимента после проведения второго пассажа культивирования были получены 23 культуры западно-сибирских изолятов *B. burgdorferi s. l.*, которые были заложены в музей бактериальных культур.

Таким образом, использованный в работе метод выявления и типирования геномных ДНК спирохет *B. burgdorferi s. l.* [11] является сравнительно простым, информативным и быстрым, может применяться для анализа культивируемых изолятов боррелий. Однако этот метод не позволяет идентифицировать геномные группы спирохет внутри геновида *B. garinii*, что представляется важным для изучения распространения спирохет этого геновида на обследуемых территориях. Кроме того, судя по результатам наших исследований, метод не приемлем для прямого обнаружения и типирова-

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, осуществляемой на препаратах ДНК культур, исследуемых на наличие геномных ДНК спирохет *B. burgdorferi s. l.* и определение их геновидовой принадлежности по методике [11]. Электрофорез ампликонов в 1,5 % агарозном геле.

1, 8 – маркеры молекулярных масс (100–1000 п. н.); 2–7 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК исследуемых культур; 2–5 – культуры геновида *B. garinii* (размер ампликона 856 п. н.); 6 – культура геновида *B. afzelii* (размер ампликона 619 п. н.); 7 – смесь культур геновидов *B. garinii* и *B. afzelii*

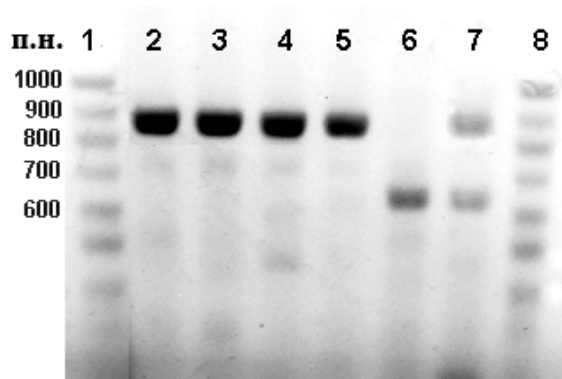
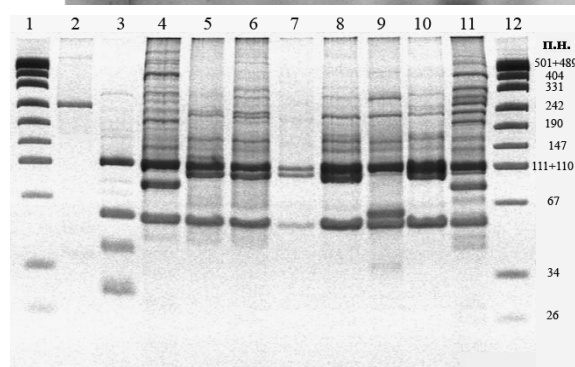


Рис. 3. Электрофореграмма рестриктных фрагментов, полученных в процессе генотипирования анализируемых образцов ДНК *B. burgdorferi s. l.* по методике [10]. Электрофорез проводили в 12 % полиакриламидном геле.

1, 12 – маркеры молекулярных масс ДНК; 2 – ампликон межгенной области *rrf-rrl* геновида *B. burgdorferi s. s.* шт. В31 негидролизованый; 3 – ампликон межгенной области *rrf-rrl* геновида *B. burgdorferi s. s.* шт. В31 гидролизованый рестриктазой *MseI*; 4–11 – ампликоны межгенной области *rrf-rrl* анализируемых образцов ДНК *B. burgdorferi s. l.*, гидролизованные рестриктазой *MseI*



ния спирохет *B. burgdorferi s. l.* непосредственно в гомогенатах клещей. Как правило, при анализе продуктов ПЦР, полученных на препаратах ДНК, выделенных из гомогената клещей, на электрофореграммах выявляется большое количество полос, соответствующих ампликонам различных размеров. Наблюдаемая гетерогенность ампликонов, по-видимому, обусловлена неспецифическим связыванием праймеров с фрагментами геномной ДНК клещей.

В связи с изложенным, для генотипирования геномных ДНК боррелий, выделенных непосредственно из клещей, мы использовали более трудоемкий метод, предложенный D. Postic и др. [10]. Он основан на анализе полиморфизма длин рестриктных фрагментов, полученных гидролизом ампликонов межгенной области *rrf-rrl* рестриктазой *MseI* или *Tru9I*. Представителям каждого геновида и геномной группы спирохет *B. burgdorferi s. l.* свойственен определенный набор отличающихся по размерам рестриктных фрагментов ампликона межгенной области *rrf-rrl* [10]. Таким образом, по результатам электрофоретического анализа полученных рестриктных фрагментов можно судить о геновидовой принадлежности боррелий, содержащихся в исследуемом клеще. С использованием этого метода исследованы образцы ДНК, выделенные из 64-х клещей,

в которых, по данным ПЦР-анализа, обнаружена геномная ДНК спирохет *B. burgdorferi s. l.* (рис. 3).

Судя по картине электрофореза образцов ДНК, гидролизованных рестриктазой *MseI* (см. рис. 3), два исследуемых образца (дорожки 4 и 11) содержали геномную ДНК спирохет, относящихся к геновиду *B. afzelii*, 5 образцов (дорожки 5–8 и 10) – к геновиду *B. garinii* (геномная группа 20047) и один образец (дорожка 9) – к геновиду *B. garinii* (геномная группа NT29). Доминирующим геновидом являлись спирохеты *B. garinii*, включающие представителей двух геномных групп (NT29 и 20047) и обнаруживаемые в более чем 70 % инфицированных спирохетами клещей (см. табл.). Десять клещей из шестидесяти четырех были инфицированы спирохетами обоих геновидов.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что, как и в предыдущие годы наблюдений [3; 12], в популяции клещей *I. persulcatus*, населяющих рекреационную зону Новосибирского научного центра, циркулируют только два геновида спирохет *B. burgdorferi s. l.* (*B. garinii* и *B. afzelii*) с существенным преобладанием первого вида (более 70 % случаев).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на протяжении последних семи лет не наблюдается изменений в геновидовом составе спирохет *B. burgdorferi s. l.*, циркулирующих в исследуемой популяции клещей *I. persulcatus*, хотя отмечаются зависимые от года наблюдений колебания в количестве инфицированных спирохетами особей.

Список литературы

1. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations in Lyme borreliosis / A. P. Van Dam, H. Kuiper, K. Vos et al. // Clin. Infect. Dis. 1993. Vol. 17. P. 708–717.
2. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates / D. Postic, E. Korenberg, N. Gorelova et al. // Res. Microbiol. 1997. Vol. 148. P. 691–702.
3. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in *Ixodes persulcatus* ticks in West Siberia, Russia / A. B. Beklemishev, A. K. Dobrotvorsky, A. V. Piterina et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2003. Vol. 227, № 2. P. 157–161.
4. The first isolation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in Russia / N. B. Gorelova, E. I. Korenberg, D. Postic et al. // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2001. Vol. 4. P. 10–12.
5. 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 / А. В. Семенов, А. Н. Алексеев, Н. В. Дубинина и др. // Мед. паразитология и паразитарные болезни. 2001. № 3. С. 11–15.
6. Обнаружение *Borrelia burgdorferi sensu stricto* в Московской области, Россия / Т. Масузава, Р. Л. Наумов, М. Кудекен и др. // Мед. паразитология и паразитарные болезни. 2001. № 2. С. 52.
7. Primary culture of *Borrelia burgdorferi* from *Ixodes ricinus* ticks / M. M. Wittenbrink, C. Reuter, M. L. Manz et al. // Zentralbl. Bakteriologie. 1996. Vol. 285, № 1. P. 20–28.
8. Lyme disease: a selective medium for isolation of the suspected etiological agent, a spirochete / S. E. Johnson, G. C. Klein, G. P. Schmid et al. // J. Clin. Microbiol. 1984. Vol. 19, № 1. P. 81–82.
9. Маниатис Т. и др. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. М., 1984.
10. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf (5S)-rrl (23S)* intergenic spacer amplicons / D. Postic, M. Assous, P. A. D. Grimont et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. Vol. 44. P. 743–752.
11. Differentiation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains using class I lysyl-tRNA synthetase-encoding genes / N. Mejlhede, A. Monthan, M. Theisen et al. // Med. Microbiol. Immunol. 2003. Vol. 192. P. 79–83.
12. Characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from Novosibirsk region (West Siberia, Russia) based on direct PCR / N. N. Livanova, O. V. Morozova, I. V. Morozov et al. // Eur. J. Epidemiol. 2003. Vol. 18, № 12. P. 1155–1158.

Материал принят в печать 13.10.2006

A. V. Ryabchenko, A. B. Beklemishev

Monitoring of infection rate of ticks inhabiting the Novosibirsk recreation zone by Lyme disease agents

The present work is devoted to studying of infection rate of *Ixodes persulcatus* ticks by *Borrelia burgdorferi s. l.* spirochetes. The ticks caught in the spring 2003 and 2005 in recreation zone of the Novosibirsk scientific centre were investigated. The infection rate of ticks by spirochetes was determined by a PCR method and has made $31,7 \pm 6,0\%$ in 2003 and $21,2 \pm 2,3\%$ in 2005. A belonging of spirochetes to certain genospecies was determined with use of the methods described D. Postic et al. (1994) and N. Mejlhede et al. (2003). It has been shown, that only two genospecies of *B. burgdorferi s. l.* – *B. garinii* and *B. afzelii* circulate in the investigated population of ticks, with essential predominance of the first (> 70%).

Keywords: *Ixodes persulcatus Schulze*, *Borrelia*, Lyme disease.