

УДК 576.895.421 + 579.834.114

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ ИНДИКАЦИИ
БОРРЕЛИЙ В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ (IXODIDAE)
МЕТОДАМИ ТЕМНОПОЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)**

**© В. В. Нефедова, Э. И. Коренберг, Л. Н. Нестеренко,
А. Л. Гинцбург, Ю. В. Ковалевский, Н. Б. Горелова**

Темнопольной микроскопией витальных препаратов и методом ПЦР параллельно проведена индикация боррелий (*B. burgdorferi sensu lato*) у 205 взрослых голодных клещей *I. persulcatus* из природного очага. Методом ПЦР выявлена зараженность значительного числа клещей, у которых боррелии не обнаружены при микроскопии 250 полей зрения в препарате от каждой особи. Тем не менее в целом для изучения уровня зараженности клещей в природе метод ПЦР не имеет преимуществ перед темнопольной микроскопией витальных препаратов.

Индикация возбудителей иксодовых клещей боррелиозов (спирохет *Borrelia burgdorferi sensu lato*) в иксодовых клещах — их основных переносчиках и оценка уровня зараженности последних могут осуществляться посевом взятого от них материала на соответствующую среду (Burgdorfer e. a., 1983; Steere e. a., 1983; Barbour, 1984), прямым (Piesman e. a., 1986) или непрямым иммунофлуоресцентными методами (Stiernstedt, 1985; Коренберг и др., 1987; Gustafson e. a., 1995; Григорьева, Третьяков, 1998), светлопольной микроскопией фиксированных мазков (Ковалевский и др., 1988), темнопольной (Burgdorfer e. a., 1982; Ковалевский и др., 1988, 1990; Pelz e. a., 1989, и др.) или фазово-контрастной микроскопией витальных препаратов (Jaenson e. a., 1989; Mejlou, Jaenson, 1993), методом полимеразной цепной реакции — ПЦР (Bergstrom e. a., 1985; Persing e. a., 1990b, и др.), а также твердофазным иммуноферментным методом (Burkot e. a., 1993, 1994; Буракова и др., 1997). Имеется множество публикаций, в которых приведены конкретные показатели зараженности клещей, полученных тем или иным методом, и их число стремительно увеличивается. Между тем пока очень мало специальных работ (Ковалевский и др., 1988; Левин и др., 1993; Wittenbrink e. a., 1994; Junttila e. a., 1999), позволяющих сравнивать результативность различных методов. Это делает накапливающиеся материалы трудно сопоставимыми и затрудняет их обобщение.

Наиболее простой распространенный и отработанный способ выявления клещей, инфицированных боррелиями, — темнопольная микроскопия витальных препаратов, содержащих материал из кишечника этих членистоногих. Статистическая обработка результатов микроскопии показала, что при общем увеличении $\times 600$ и просмотре 250 полей зрения возможность пропуска инфицированного препарата составляет (в долях от 1) всего 0.05 даже при наличии клещей с низким содержанием спирохет (Ковалевский и др., 1991, 1996). За рубежом для первичной индикации боррелий в клещах чаще применяют метод ПЦР. Широкое распространение, особенно после обнаружения этим методом ДНК *B. burgdorferi* в музейных сборах клещей, многие

годы хранившихся в этаноле (Persing e. a., 1990a), получило представление об его чрезвычайно высокой чувствительности. В России этот метод, требующий специального лабораторного оснащения, в эпизоотологических целях пока ограниченно применялся только на лабораторной базе зарубежных партнеров, хотя праймеры для индикации *B. burgdorferi sensu lato* были синтезированы в лаборатории генной инженерии патогенных микроорганизмов НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН еще в 1995 г. и используются для практической диагностики иксодовых клещевых боррелиозов. В этой связи основная задача настоящего исследования состояла в апробации пригодности этих праймеров для выявления боррелий у естественно инфицированных клещей и в оценке результативности метода ПЦР в сравнении с данными темнопольной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В мае—июне 1999 г. в природном очаге, расположенном в Чусовском р-не Пермской обл., стандартным флагом по общепринятой методике с растительности были собраны и в дальнейшем параллельно исследованы методами темнопольной микроскопии и ПЦР 205 самок клеща *Ixodes persulcatus*. По данным многолетних исследований, на этой территории циркулируют *Borrelia garinii* и *B. afzelii*, а общий уровень зараженности взрослых клещей боррелиями по результатам микроскопии витальных препаратов составляет в разные годы от 29.5 до 60.8 % (Горелова и др., 1998; Kogenberg e. a., 1999).

Живых клещей некоторое время хранили при температуре +4°. Витальные препараты для темнопольной микроскопии готовили по описанному ранее способу (Ковалевский и др., 1990) с использованием обезжиренных предметных стекол не более 1.2 мм толщины и покровных стекол 18 × 18 мм. В каждом препарате просматривали 250 полей зрения при общем увеличении ×600, используя темнопольный конденсатор, имергируемый дистиллированной водой. Концентрацию боррелий в препарате выражали средним количеством микробных клеток на 100 полей зрения. При анализе результатов приняты статистически обоснованные (Ковалевский и др., 1991) градации концентрации (т. е. степени индивидуальной инфицированности клеща).

После приготовления витального препарата каждого клеща немедленно помещали в отдельную полипропиленовую пробирку типа «Eppendorf», объемом 1.5 см³, которую маркировали номером препарата. До подготовки пробы к исследованию методом ПЦР пробирки хранили при –70°.

Выделение ДНК боррелий, которыми клещ мог быть инфицирован, для ее последующей амплификации проводили в этих же пробирках по ранее описанной методике (Гущин, Халилов, 1996). Для этого клеща суспендировали в 50 мкл физиологического раствора с 0.1 М фосфатным буфером (pH=7.2), приготовленным по Мак-Илвейну. После удаления остатков тела клеща в пробирку добавляли 450 мкл лизирующего буфера и 2 мкл носителя (тРНК) в концентрации 5 мг/мл. Денатурация белков и нуклеиновых кислот производилась лизирующим буфером (pH=4.2), состоящим из смеси фенола, гуанидина тиоционата и ацетата натрия, а разделение фаз — добавлением хлороформа с последующим центрифугированием. ДНК из водной фазы осаждали изопропанолом и затем промывали 70-градусным этанолом. Осадок подсушивали и ресуспендировали в 25 мкл деионизированной воды. При необходимости пробы хранили при –20°.

Родоспецифичные праймеры (BB1 и BB2), фланкирующие фрагмент гена 16S рРНК, размером 244 пары нуклеотидов, синтезированы по описанной ранее методике (Adam e. a., 1990) и имеют следующие последовательности.

BB1 (5' — TCG GTA CTA ACT TTT AGT TAA CA –3'),
BB2 (5' — TAC CAC AGC TCA ACT GTG GAC CTA TG –3').

Аmplификацию осуществляли по Salinas-Melendez e. a. (1995) с некоторыми коррективами. В центрифужные пробирки, объемом 0.5 см³, вносили 15 мкл амплификационной смеси, включавшей деионизированную воду, десятикратный буфер (Б × 10 : 100 мМ Трис-НСl рН 8.3, 500 мМ КСl, 0.05 % Brij 35, 20 мМ MgCl₂), дезоксирибонуклеотидтрифосфаты в конечной концентрации 0.2 мМ, 15 pmol каждого праймера, 1.5 ед. фермента Tag-полимераза, 10 мкл испытываемой пробы и одну каплю минерального масла для предотвращения испарения смеси в процессе амплификации. Амплификацию проводили в термоцикле «Терцик» по программе, включавшей 5 циклов: 94° — 1 мин, 40° — 1, 72° — 1 мин, затем 30 циклов в режиме 94° — 1 мин, 50° — 1, 72° — 1 мин. Для отрицательного контроля использована деионизированная вода; для положительного — лизат культуры *B. afzelii* (штамм Ir-21).

Анализ продуктов ПЦР проведен обычным методом электрофореза в горизонтальном 2%-ном агарозном геле (агароза «BIO-RAD», «ultra pure DNA grade») с флуоресцирующим красителем (бромистый этидий) в конечной концентрации 1 мг/мл. Для детектирования результатов электрофореза использована пленка «Микрат 400» и стандартная документирующая система, включающая трансиллюминатор «Флускоп», камеру «Зенит».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед началом исследования методом ПЦР клещей, собранных в природе, возникли опасения, что в процессе подготовки проб может происходить адсорбция ДНК боррелий хитином или другими веществами кутикулы покровов клеща, влияющая на результаты самой реакции. Поэтому по описанной выше методике был поставлен специальный предварительный опыт, в котором использованы незараженные нимфы *I. persulcatus* лабораторного происхождения.¹ В суспензию из 4 голодных нимф были внесены лизаты, полученные из культуры боррелий в пяти концентрациях (от 10² до 10⁶ микробных клеток на 1 мл). Положительный контроль содержал все компоненты, включая лизат боррелий, но без суспензии; пробы для двух отрицательных контролей содержали суспензию с деионизированной водой вместо лизата боррелий или (во втором случае) только деионизированную воду вместо суспензии и лизата. Процесс амплификации дал положительные результаты со всеми опытными пробами при соответствующих положительных или отрицательных результатах в контролях. Это позволяет думать, что при подготовке материала из клеща для амплификации не происходит адсорбции ДНК боррелий элементами кутикулы спонтанно зараженной особи, во всяком случае в таких масштабах, которые влияют на результат ПЦР-анализа.

Результаты обоих сравниваемых методов индикации боррелий свидетельствовали о высоком уровне зараженности клещей, однако методом ПЦР было выявлено примерно на 10 % больше инфицированных, чем темнопольной микроскопией (табл. 1). При этом различия показателей зараженности клещей, полученные разными методами, вполне достоверны (критерий Стьюдента $t = 2.5$). Казалось бы, это свидетельствует о заметно большей чувствительности метода ПЦР. Однако следует учитывать, что увеличение числа просматриваемых полей зрения приводит к существенному уменьшению вероятности пропуска положительного препарата при микроскопии (Ковалевский и др., 1991). Иными словами, если использовать рассчитанную ранее величину возможной ошибки микроскопии в качестве поправочного коэффициента, то данный метод даст величину общей зараженности клещей, приближающуюся к таковой при ПЦР-анализе.

¹ Авторы выражают благодарность Н. И. Шашиной за предоставление нимф для этого эксперимента.

Таблица 1

Общие результаты исследования зараженности боррелиями голодных клещей *Ixodes persulcatus* методами темнопольной микроскопии и ПЦР

Table 1. General results of studies the *Borrelia* prevalence in unfed *Ixodes persulcatus* ticks by methods of dark-field microscopy and PCR

Метод	Исследовано клещей	Из них заражено		Число инфицированных клещей, не выявленных другим методом	
		абс.	%(P ± 2m _p)	абс.	%(P ± 2m _p)
Темнопольная микроскопия	205	100	48.8 ± 7	5	5.0 ± 4.3
ПЦР	205	125	61.0 ± 6.8	30	24.1 ± 7.6

В большинстве случаев (около 70 % исследованных особей) оба метода дали идентичные результаты, однако данные в общей сложности по 35 клещам из 205 (26.9 ± 7.8 %) не совпали. Главным образом это произошло из-за того, что методом ПЦР удалось обнаружить возбудителя у 30 клещей, у которых он не был выявлен темнопольной микроскопией. Вместе с тем 5 проб, подготовленных из достоверно зараженных клещей, оказались негативными в ПЦР.

Более подробно результаты метода ПЦР при разном уровне индивидуальной инфицированности клещей, выявленной темнопольной микроскопией, представлены в табл. 2. Они показывают, что в нашем эксперименте этот метод позволил выявить боррелий примерно у 30 % клещей, которые были отнесены к числу незараженных (на основании просмотра 250 полей зрения в каждом из соответствующих витальных препаратов). Вместе с тем метод ПЦР не выявил в общей сложности примерно 8 % клещей, которые содержали достаточно высокую концентрацию боррелий (более 10 на 100 полей зрения). Скорее всего, это объясняется чисто лабораторными погрешностями, которые могут иметь разные причины и возникают при подготовке многокомпонентной пробы для осуществления ПЦР.

Представленные данные свидетельствуют о возможности успешного использования праймеров, синтезированных лабораторией генной инженерии патогенных микроорганизмов НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, для индикации боррелий с эпизоотологическими целями в биоматериалах методом ПЦР. Вместе с тем изложенное дает нам основание полагать, что при массовом исследовании клещей из природных очагов для определения уровня их зараженности *B. burgdorferi sensu lato* более дорогой и сложный метод ПЦР не имеет преимуществ перед темнопольной микроскопией витальных препаратов. К аналогичному выводу недавно пришли и финские исследователи (Junttila e. a., 1999), которые называют темнопольную микроскопию методом выбора для исследования клещей при мониторинге за очагами боррелиозов по

Таблица 2

Результаты исследования клещей методом ПЦР при разном уровне их индивидуальной инфицированности боррелиями

Table 2. Results of studies the ticks with different level of their individual infection with *Borrelia* by PCR method

Число боррелий на 100 полей зрения	Исследовано клещей	Из них положительных в ПЦР	
		абс.	%(P ± 2m _p)
0	105	30	28.6 ± 8.8
0.4—10	36	36	100
10.1—50	37	36	97.3 ± 5.3
50.1 и более	27	23	85.2 ± 13.7

сравнению с культивированием и ПЦР-анализом. Как показывает наш сравнительный анализ, метод ПЦР несомненно дает лучшие результаты по сравнению с темнопольной микроскопией витальных препаратов, когда биоматериал содержит очень небольшую концентрацию бактериальных клеток. Это преимущество метода ПЦР может быть использовано при исследовании соответствующего материала из природных очагов и в экспериментальной работе.

Исследование поддержано грантом РФФИ 98-04-48127.

Список литературы

- Буракова О. В., Арумова Е. А., Джайкиева Р. К. Выявление спирохет *Borrelia burgdorferi* в иксодовых клещах с помощью твердофазного иммуноферментного анализа ТИФА // *Паразитология*. 1997. Т. 31, вып. 6. С. 521—525.
- Горелова Н. Б., Коренберг Э. И., Постик Д., Ковалевский Ю. В. Микстинфицированность переносчиков и носителей в сочетанном очаге иксодовых клещевых боррелиозов // *Природно-очаговые инфекции в России: современная эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения*. Омск, 1998. С. 76—77.
- Григорьева Л. А., Третьяков К. А. Особенности паразитарной системы иксодовые клещи—боррелии—мелкие млекопитающие // *Паразитология*. 1998. Т. 32, вып. 5. С. 422—430.
- Гушин А. Е., Халилов Э. М. Диагностика вирусных гепатитов В и С // *Матер. I Всерос. науч.-практич. конфер. «Применение ПЦР для диагностики инфекционных заболеваний»*. М., 1996. С. 60—66.
- Ковалевский Ю. В., Коренберг Э. И., Никиточкин И. Г. Оптимизация способа оценки зараженности и степени индивидуальной инфицированности клещей боррелиями // *Мед. паразитол.* 1991. № 3. С. 18—21.
- Ковалевский Ю. В., Крючечников В. Н., Коренберг Э. И. Сравнительная оценка двух методов индикации боррелий в клещах-переносчиках болезни Лайма // *Мед. паразитол.* 1988. № 5. С. 75—77.
- Ковалевский Ю. В., Коренберг Э. И., Дауйотас С. В. Оценка различных способов приготовления витальных препаратов для выявления боррелий у иксодовых клещей // *Мед. паразитол.* 1990. № 1. С. 33—35.
- Ковалевский Ю. В., Коренберг Э. И., Кутлина Т. В., Устинова О. А. Нормы просмотра препаратов при исследовании нимф иксодовых клещей методом темнопольной микроскопии в очагах боррелиоза // *Мед. паразитол.* 1996. № 4. С. 18—21.
- Коренберг Э. И., Крючечников В. Н., Ковалевский Ю. В. и др. Клещ *Ixodes persulcatus* Schulce — новый переносчик *Borrelia burgdorferi* // *ДАН СССР*. 1987. Т. 297, № 5. С. 1268—1270.
- Левин М. Л., Ковалевский Ю. В., Пискунова А. Ю., Шеголева Т. В. Оценка степени индивидуальной инфицированности клещей возбудителем болезни Лайма путем микроскопии фиксированных препаратов // *Проблемы клещевых боррелиозов*. М., 1993. С. 157—162.
- Adam T., Graf B., Neubert U., Gobel U. B. Detection and classification of *Borrelia burgdorferi* by direct sequencing of 16S rRNA amplified after reverse transcription // *Med. Microbiol. Lett.* 1990. N 1. P. 120—126.
- Barbour A. G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes // *Yale J. Biol. Med.* 1984. Vol. 57. P. 521—525.
- Bergstrom S., Olsen B., Burman N. e. a. Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes ricinus* in northern Sweden // *Scand. J. Infect. Dis.* 1985. Vol. 45. P. 70—78.
- Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F. e. a. Lyme disease — a tick-borne spirochetosis // *Science*. 1982. Vol. 216. P. 1317—1319.
- Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F. e. a. Ehrlichia chronicum migrans — a tickborne spirochetosis // *Acta tropica*. 1983. Vol. 40. P. 79—83.
- Burkot T. R., Patrican L., Piesman J. Field trial on an outer surface protein A (Osp A) antigen — capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* // *Clin. J. Trop. Med. Hyg.* 1994. Vol. 50. P. 354—358.
- Burkot T. R., Wirtz R. A., Luft B., Piesman J. An Osp A antigen capture enzyme linked immunosorbent assay for detecting North American isolates of *Borrelia burgdorferi* in larval and nymphal *Ixodes dammini* // *J. Clin. Microbiol.* 1993. Vol. 31. P. 272—278.

- Gustafson R., Jaenson T. G. T., Gardulf A. e. a. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in Sweden // *Scand. J. Infect. Dis.* 1995. Vol. 27. P. 597—601.
- Jaenson T. G. T., Bergstrom S., Burman N. e. a. Spiroketinficerade fastingar (*Ixodes ricinus*) — risk for angrepp aven i Norrland // *Lakartidningen.* 1989. Vol. 86. P. 2584.
- Junttila J., Peltomaa M., Soini H. e. a. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* Ticks in Urban Recreational Areas of Helsinki // *J. Clin. Microbiol.* 1999. Vol. 37. P. 1361—1365.
- Korenberg E. I., Kovalevskii Yu. V., Karavanov A. S., Moskvitina G. G. Mixed infection by tick-borne encefalitis virus and *Borrelia* in tick // *Med. Vet. Entomol.* 1999. Vol. 13. P. 204—208.
- Mejlon H., Jaenson T. G. T. Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation type in Sweden // *Scand. J. Infect. Dis.* 1993. Vol. 25. P. 449—456.
- Pelz K., Wagner W., Vogt A. *Ixodes ricinus* ticks as vectors of *Borrelia burgdorferi* in the Freiburg area // *Zbl. Bact.* 1989. Suppl. 18. P. 422—430.
- Persing D. H., Telford III S. R., Rys P. N. e. a. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in Museum Specimens of *Ixodes dammini* Ticks // *Science.* 1990a. Vol. 249. P. 1420—1423.
- Persing D. H., Telford III S. R., Spielman A., Barthold S. Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* with the Polymerase Chain Reaction // *J. Clin. Microbiol.* 1990b. Vol. 28. P. 566—572.
- Piesman J., Mather T. N., Donahue J. G. e. a. Comparative prevalence of *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* in populations of *Ixodes dammini* in eastern Massachusetts // *Acta Trop.* 1986. Vol. 43. P. 263—270.
- Salinas-Melendez J. A., Tamez-Gonzales R., Welsh-Lozano O., Barrera-Saldana H. A. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in Human Skin Biopsies and Dog Synovial Fluid by the PCR // *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 1995. Vol. 37. P. 7—10.
- Steere A. C., Grodzicky R. I., Kornblatt A. N. e. a. The spirochetal etiology of Lyme disease // *N. Engl. J. Med.* 1983. Vol. 308. P. 733—742.
- Stiernstedt G. Tick-borne *Borrelia* infection in Sweden // *Scand. J. Infect. Dis.* 1985. Suppl. 45. P. 1—69.
- Wittenbrink M. M., Thiele D., Krauss H. Comparison of dark-field microscopy, culture and polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes ricinus* ticks // *Zbl. Bact.* 1994. Vol. A 281. P. 183—191.

НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи РАМН,
Москва, 123098

Поступила 5.04.2000

COMPARATIVE EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF BORRELIA INDICATION
IN IXODID TICKS (IXODIDAE) BY METHODS OF DARK-FIELD MICROSCOPY
AND POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

V. V. Nefedova, E. I. Korenberg, L. N. Nesterenko, A. L. Gintsburg,
Yu. V. Kovalevskii, N. B. Gorelova

Key words: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Ixodidae, prevalence, IFA and PCR methods.

SUMMARY

Indication of *Borrelia* (*B. burgdorferi* sensu lato) in 205 adult unfed *I. persulcatus* ticks from a natural focus was carried out simultaneously by methods of PCR and dark-field microscopy of vital preparations. PCR method revealed *Borrelia* prevalence in considerable number of ticks, in which *Borrelia* were not found by microscopy of 250 microscopic fields in a preparation from each individual tick. At the same time, PCR method didn't give positive results for approximately 8% of ticks, which contained rather high concentration of *Borrelia* (more than 10 per 100 microscopic fields). In general, PCR method doesn't have advantages in comparison with a microscopy of vital preparations for study the *Borrelia* prevalence in ticks.