

УДК 616.98 : 579.834.114

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ БОРРЕЛИЯМИ  
ТАЕЖНЫХ КЛЕЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОГО  
НАУЧНОГО ЦЕНТРА СО РАН**

© В. Ю. Боргояков,<sup>1</sup> Н. В. Фоменко,<sup>2</sup> В. В. Панов,<sup>3</sup> Е. Д. Чикова<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090

<sup>1</sup> E-mail: ternsu@gmail.com

<sup>3</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН

ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630191

Поступила 23.06.2010

Выявление боррелий проведено как в клещах *Ixodes persulcatus*, отловленных с растительности на флаг, так и снятых с людей, обратившихся за помощью в пункт вакцинопрофилактики, расположенный в Новосибирском научном центре СО РАН (ННЦ СО РАН). Изоляцией боррелий на искусственную питательную среду показано, что на территории ННЦ выявляются как боррелии *B. garinii*, *B. afzelii*, так и *B. miyamotoi*. Однако изоляты *B. miyamotoi* не сохраняют способности к росту при последующем культивировании. При проведении ПЦР в образцах клещей как отловленных на флаг, так и снятых с людей, выявлена ДНК тех же 3 видов боррелий. Наиболее часто детектирована ДНК *B. garinii*, реже *B. afzelii* и наименьшее число положительных проб показано для *B. miyamotoi*. В образцах клещей, отловленных на флаг ДНК, *B. garinii* выявлена в 38.6 %, *B. afzelii* — 9.9 и *B. miyamotoi* — на 3.9 % проб. При проведении ПЦР в образцах клещей, снятых с людей, отмечено меньшее число положительных проб. Так, ДНК *B. garinii* выявлена в среднем в 24.2 %, *B. afzelii* — 6.9 и *B. miyamotoi* — 5.6 %. Показано одновременное присутствие ДНК двух видов боррелий в одном клеще, причем ДНК *B. miyamotoi* детектирована чаще одновременно с ДНК *B. garinii*.

*Ключевые слова:* *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Borrelia miyamotoi*, таежный клещ.

Новосибирская обл. расположена на юго-востоке Западно-Сибирской равнины, 11 % территории области занимают леса. Новосибирский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ННЦ СО РАН) построен в 1960-х годах в массиве березово-сосновых лесов, входящих в систему Приобских ленточных боров (Природа..., 2007). ННЦ СО РАН является районом Новосибирска и располагается в 25 км к югу от центра города на берегу Оби, около 25 % территории научного центра занято сосновым бором и сосново-березовым смешанным лесом (Природа..., 2007).

На территории Новосибирской обл. основное эпидемиологическое значение среди природно-очаговых инфекций, переносимых клещами, занимают клещевой энцефалит и иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) (Иерусалимский, 2001). ИКБ — инфекционное природно-очаговое заболевание, вызываемое спирохетами рода *Borrelia*, переносчиками которых являются иксодовые клещи (Коренберг и др., 2002). На современном этапе ИКБ относится к наиболее распространенным инфекциям с трансмиссивным механизмом передачи. В комплексе *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s. l.) патогенность для человека доказана для 4 видов: *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (s. s.) и *Borrelia spielmanii* (Pistic et al., 1997; Richter et al., 2006).

В Новосибирской обл. основным переносчиком ИКБ является таежный клещ *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930), ареалом обитания которого являются хвойные, лиственные и смешанные леса. В 1997 г. при изоляции спирохет от таежных клещей установлен видовой состав боррелий, циркулирующих на территории Новосибирской обл., выявлены виды *B. afzelii* и *B. garinii* (Pistic et al., 1997). Позже показано, что вид *B. garinii* представлен двумя генетическими подгруппами 20047 и NT29, а вид *B. afzelii* подгруппами NT28 и VS461 (Коренберг и др., 2002; Фоменко и др., 2006). По оценкам, проведенным разными методами, уровень инфицирования *I. persulcatus* боррелиями комплекса *B. burgdorferi* s. l. составляет 38—45 % (Оберт и др., 2001; Фоменко и др., 2006; Рудакова и др., 2007). Помимо боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. в таежных клещах, отловленных в рекреационной зоне ННЦ, выявлены боррелии *Borrelia miyamotoi* (Фоменко, 2008; Fomenko et al., 2008). Вид *B. miyamotoi* впервые изолирован в 1995 г. в Японии от клещей *I. persulcatus*, позже отнесен к группе клещевых возвратных лихорадок (tick-born relapsing fever, TBRF, КВЛ) рода *Borrelia*, сем. Spirochaetaceae (Fukunaga et al., 1995). Данные о патогенности данного вида боррелий в настоящее время не получены, однако показано, что ДНК *B. miyamotoi* выявлена в крови больных с острыми лихорадочными заболеваниями, развившимися после присасывания таежных клещей (Колясникова и др., 2010; Фоменко и др., 2010).

В настоящее время средний уровень заболеваемости ИКБ в России составляет около 6—7 тыс. случаев в год. Сибирский федеральный округ занимает третье место по заболеваемости ИКБ среди регионов России (Рудакова и др., 2007). Диагностика ИКБ является актуальной и серьезной проблемой современной эпидемиологии, так как в большинстве случаев заражение боррелиями не имеет выраженных клинических признаков, и, как следствие, противобактериальная терапия не назначается. При развитии заболевания спирохеты диссеминируют по кровотоку в ткани, что становится причиной многих органных поражений, в дальнейшем заболевание может переходить в хроническую стадию (Лесняк, 1999). Поэтому очень большое значение имеет ранняя и эффективная диагностика ИКБ.

В связи с этим целью данной работы были детекции и сравнительный анализ выявления боррелий как в клещах, отловленных с растительности на флаг, так и в клещах, снятых с людей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Отлов имаго таежного клеща *I. persulcatus* (1471 особь) проведен в лесопарковой зоне ННЦ СО РАН (Академгородок) в радиусе 5 км. Дополнительно отлов проведен в пойме р. Шадриха (10 км к юго-востоку). Биотоп 1 (городской биотоп) представлен березовым лесом с примесью осины и зарослями кустарников. Биотоп 2 — пойма р. Зырянка, заросли ивовых и черемуховых кустов с примесью березы и осины. Биотоп 3 — мелколиственный березовый лес с примесью сосны, на отдельных участках березово-осиновый лес. Биотоп 4 — сосновый лес с незначительной примесью березы, местами заросли кустарника (ива, черемуха и крушина). Биотоп 5 — пойма р. Шадриха, заросли кустарника (ива и черемуха) с примесью березы и осины.

Таежные клещи *B. burgdorferi* (1908), снятые с людей, были собраны в пункте вакцинопрофилактики «Автономной некоммерческой организации Центр новых медицинских технологий в Академгородке» (АНО ЦНМТ) в 2007—2009 гг. При анализе географического распределения мест, в которых произошло присасывание таежного клеща, выделены следующие территориальные единицы: ННЦ — научный центр и его окрестности, НСК — г. Новосибирск и его ближайшие окрестности, НСО — административные районы Новосибирской обл., удаленные от г. Новосибирска и ННЦ СО РАН и АК — традиционные зоны отдыха, расположенные на территории Алтайского края. Образцы, для которых пострадавшие затруднились назвать географическое место, в котором произошло присасывание клеща, отнесены в графу НО. Всего в данной работе исследовано 3379 образцов от таежных клещей.

385 таежных клещей, отловленных в окрестностях ННЦ, были использованы для изоляции боррелий на питательной среде. Изоляцию проводили с использованием искусственной питательной среды BSK-H и набора антибиотиков, рекомендованных к применению с данной питательной средой (Sigma, США), как описано ранее (Fomenko et al., 2008).

Выделение суммарной ДНК от 1086 клещей, отловленных в природных очагах, 558 клещей, снятых с людей и из клеток боррелий, проводили с применением коммерческих наборов производства «ДНК-технология» (Россия). Выделение суммарной ДНК от 1350 клещей, собранных в пункте вакцинопрофилактики АНО ЦНМТ в 2009 г., проведено с применением коммерческих наборов «Рибо-Преп» (AmpliSens, Россия).

Выявление ДНК боррелий проводили методом двухраундовой мультиплексной ПЦР. Для боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. использованы праймеры, направленные к генам 5S и 23S рРНК, позволяющие амплифицировать вариабельный межгенный спейсер 5S-23S рРНК. Для боррелий вида *B. miyamotoi* использованы праймеры, направленные к гену glpQ. Амплификацию ДНК боррелий проводили с внешними NC1, NC2, Q1 и Q2 (по 0.1 мкМ каждого) и внутренними NC3, NC4, Q3 и Q4 (по 0.1 мкМ каждого) праймерами в условиях, приведенных в табл. 1. В качестве матрицы в реакционную смесь добавляли 2 мкл тестируемой ДНК. Ожидаемый размер ПЦР-фрагментов, с внешней парой 363—369 н. п., для пары праймеров NC1—NC2, 633 н. п. — для Q1—Q2, с внутренней 237—271 н. п. для пары NC3—NC4 и 421 н. п. для Q3—Q4. Продукты амплификации, полу-

Таблица 1

Праймеры и условия проведения ПЦР

Table 1. Primers and conditions for PCR

| Праймер               | Последовательность (5'→3') | Условия проведения реакции                                | Ссылка               |
|-----------------------|----------------------------|---|----------------------|
| NC1 (→ <sup>1</sup> ) | cctgttatcattccgaacacag     | 30 циклов: 94 °C —<br>10 с, 50 °C — 15 с,<br>72 °C — 30 с | Fomenko et al., 2008 |
| NC2 (←)               | tactccattcggtaatcttggg     |   | То же                |
| Q1 (→)                | caccattgatcatagctcacag     |   | Данная работа        |
| Q2 (←)                | ctgttggtgcttcattccagtc     |   | » »                  |
| NC3 (→)               | ctgcgagttcgcgggaga         | 35 циклов: 94 °C —<br>5 с, 52 °C — 10 с,<br>72 °C — 30 с  | Postic et al., 1994  |
| NC4 (←)               | tcttaggcattcaccata         |   | То же                |
| Q3 (→)                | gctagtgggtatcttccagaac     |   | Данная работа        |
| Q4 (←)                | ctgttgtttatgccagaagggt     |   | » »                  |
| F7 (→)                | ttcaaggatactgttagagag      | 30 циклов: 94 °C —<br>10 с, 50 °C — 15 с,<br>72 °C — 30 с | Фоменко и др., 2007  |
| F10 (←)               | aagaaggcttactaatggtgatg    |   | Данная работа        |
| F5 (→)                | acctggtgatgtaagttctcc'     | 35 циклов: 94 °C —<br>5 с, 54 °C — 10 с,<br>72 °C — 30 с  | » »                  |
| F12 (←)               | ctaacctcattgtttagactt      |   | » »                  |

Примечание. <sup>1</sup> — (→) — прямой, (←) — обратный праймер.

ченные с внутренней парой праймеров, разделяли в 2%-ном/ агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия. Для исключения контаминации образцов приняты следующие меры предосторожности: выделение ДНК, первый и второй раунд ПЦР и электрофорез проводили в разных помещениях; использованы наконечники с аэрозольными фильтрами (QSP, США), в обоих раундах ПЦР обязательным условием было наличие отрицательного контроля. Размеры полученных фрагментов ДНК определены визуально сопоставлением с молекулярными маркерами DNA Molecular Weight Marker XIV (Roche Applied Science, Германия).

Выявление ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. в образцах тяжелых клещей, собранных в пункте вакцинопрофилактики АНО ЦНМТ в 2009 г., проведено с применением коммерческих тест-систем «АмплиСенс® *Borrelia burgdorferi sensu lato*-FL», «АмплиСенс® *Borrelia burgdorferi sensu lato*-EPh» электрофоретического или флуоресцентного анализа в реальном времени продуктов ПЦР и «Ампли-Лайм». Учет результатов проводили по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплификации или по наличию флуоресцентного сигнала на приборе фирмы Corbett Research «Rotor-Gene 3000». Выявление ДНК *B. miyamotoi* в положительных образцах проведено с внешними праймерами Q1 и Q2 и внутренними Q3 и Q4.

Установление видовой принадлежности боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. проведено на основании анализа полиморфизма для ПЦР-фрагментов (ПДФ анализ). Для этого выбраны праймеры, направленные к гену r83/100, позволяющие амплифицировать переменный участок гена содержащий делеции и инсерции. Амплификацию ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. проводили с внешними праймерами F7-F10 и внутренни-

ми — F5-F12 в условиях, приведенных в табл. 1. Данные праймеры специфичны для боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. и не дают перекрестных реакций с ДНК боррелий вида *B. miyamotoi*. Ожидаемый размер ПЦР-фрагментов с внешней парой праймеров F7-F10 527 н. п. для вида *B. garinii*, 334 п. н. для *B. afzelii*; с внутренней парой праймеров F5-F12 424 н. п. для вида *B. garinii*, 334 п. н. для *B. afzelii*. ПЦР-фрагменты, полученные с внутренней парой праймеров, разделяли в 2%-ном агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия.

Для образцов, в которых выявлена ДНК *B. miyamotoi*, проведено определение нуклеотидных последовательностей гена *glpQ*. Определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *glpQ* проведено, как описывалось ранее (Фоменко и др., 2010).

Статистическая обработка проведена с использованием общепринятых методов статистического анализа (Плохинский, 1961).

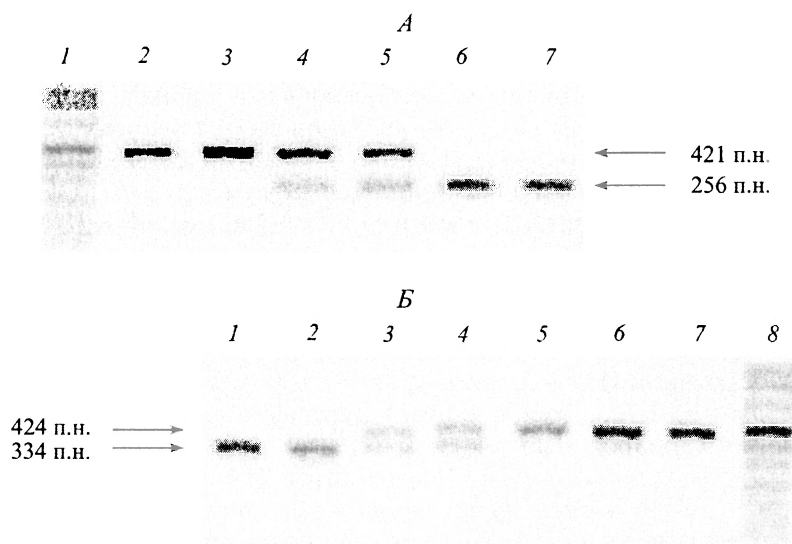
## РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе проведена изоляция боррелий от 385 таежных клещей, отловленных на территории ННЦ СО РАН. При изоляции боррелий от таежных клещей, собранных в Новосибирской обл. на питательной среде BSK-H, получено 50 первичных изолятов. Однако только 47 из них сохранили способность к росту при последующих пересевах, хотя при микроскопическом исследовании с предварительной окраской акридиновым-оранжевым во всех этих изолятах определялись спирохетоподобные клетки. Установление видовой принадлежности показало, что среди изолятов, сохраняющих способность к дальнейшему росту, нет ни одного изолята *B. miyamotoi*, все изоляты представлены боррелиями комплекса *B. burgdorferi* s. l. Все первичные изоляты *B. miyamotoi* не сохраняли способности к дальнейшему росту. В четырех первичных изолятах детектированы как *B. miyamotoi*, так и боррелии *B. burgdorferi* s. l., при их дальнейшем культивировании способность к росту сохранили только боррелии *B. burgdorferi* s. l. Среди 43 изолятов *B. burgdorferi* s. l. 28 (7.3 %) относятся к боррелиям вида *B. garinii*, 10 (2.6 %) — *B. afzelii*, а в пяти (1.3 %) изолятах присутствуют *B. garinii* и *B. afzelii* одновременно (табл. 2).

Выявление ДНК боррелий в 1644 образцах таежных клещей, отловленных на территории ННЦ СО РАН и его окрестностей, а также клещей, снятых с людей, обратившихся за помощью в АНО ЦНМТ в 2007 и 2008 гг. проведено методом мультиплексной ПЦР. Реакцию проводили с праймерами, направленными к уникальным локусам боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. и боррелий вида *B. miyamotoi*, что позволило избежать неспецифических перекрестных реакций. При проведении ПЦР-реакции с праймерами NC3-NC4, позволяющими амплифицировать фрагмент ДНК, включающий переменный межгенный спейсер 5S-23S рРНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. и Q3-Q4 ограничивающими фрагмент гена *glpQ* *B. miyamotoi*, получен набор ПЦР-фрагментов длиной 250—256 н. п. и 421 н. п. Данные ПЦР-фрагменты эффективно разделяются при проведении электрофореза в 2%-ном агарозном геле (см. рисунок, А). Результаты проведенного анализа позволяют выявить как ДНК боррелий комп-

Таблица 2  
 Результаты установления видовой принадлежности боррелий  
 Table 2. Results of the *Borrelia* species identification

| Место  | Число исследов./<br>положит. | Число положительных образцов / % $\pm$ m <sub>p</sub> от числа положительных образцов |                   |                  |                  |                 |                  |
|--|------------------------------|---|-------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
|  |                              | Bg  | Ba                | Bm               | Bm + Bg          | Bm + Ba         | Bg + Ba          |
| Первичные изоляты, полученные от клещей, отловленные на флаг                 |                              |   |                   |                  |                  |                 |                  |
| 1  | 230/29                       | 18/7.8 $\pm$ 1.8  | 4/1.7 $\pm$ 0.9   | 2/0.9 $\pm$ 0.6  | 2/0.9 $\pm$ 0.6  | 0               | 3/1.3 $\pm$ 0.7  |
| 2  | 155/21                       | 10/6.5 $\pm$ 1.9  | 6/3.9 $\pm$ 1.6   | 1/0.6 $\pm$ 0.6  | 2/1.3 $\pm$ 0.8  | 0               | 2/1.3 $\pm$ 0.8  |
| Всего  | 385/50                       | 28/7.3 $\pm$ 1.8  | 10/2.6 $\pm$ 0.8  | 3/0.8 $\pm$ 0.5  | 4/1.1 $\pm$ 0.5  | 0               | 5/1.3 $\pm$ 0.6  |
| Клещи, отловленные на флаг   |                              |   |                   |                  |                  |                 |                  |
| 1  | 110/53                       | 39/35.5 $\pm$ 4.6   | 8/7.3 $\pm$ 2.5   | 0                | 4/3.6 $\pm$ 1.8  | 0               | 2/1.8 $\pm$ 1.3  |
| 2  | 357/197                      | 137/38.4 $\pm$ 2.6  | 35/9.8 $\pm$ 1.6  | 4/1.1 $\pm$ 0.6  | 12/3.4 $\pm$ 1.0 | 2/0.6 $\pm$ 0.4 | 7/2.0 $\pm$ 0.7  |
| 3  | 240/92                       | 65/27.1 $\pm$ 2.9   | 12/5.0 $\pm$ 1.41 | 3/1.3 $\pm$ 0.73 | 8/3.3 $\pm$ 1.15 | 0               | 4/1.7 $\pm$ 0.8  |
| 4  | 208/95                       | 71/34.1 $\pm$ 3.3   | 17/8.2 $\pm$ 1.09 | 1/0.5 $\pm$ 0.49 | 4/1.9 $\pm$ 0.95 | 0               | 2/1.0 $\pm$ 0.7  |
| 5  | 171/79                       | 56/32.8 $\pm$ 3.59  | 13/7.6 $\pm$ 2.03 | 2/1.2 $\pm$ 0.83 | 2/1.2 $\pm$ 0.83 | 0               | 6/3.5 $\pm$ 1.4  |
| Всего  | 1086/516                     | 368/33.9 $\pm$ 1.4  | 85/7.8 $\pm$ 0.8  | 10/0.9 $\pm$ 0.3 | 30/2.8 $\pm$ 0.5 | 2/0.2 $\pm$ 0.1 | 21/1.9 $\pm$ 0.4 |
| Клещи, снятые с людей, проанализированные двухраундовой ПЦР                  |                              |   |                   |                  |                  |                 |                  |
| ННЦ  | 460/177                      | 111/24.1 $\pm$ 1.9  | 40/8.7 $\pm$ 1.3  | 6/1.3 $\pm$ 0.5  | 10/2.2 $\pm$ 0.7 | 4/0.9 $\pm$ 0.4 | 6/1.3 $\pm$ 0.5  |
| НСК  | 27/5                         | 3/11.1 $\pm$ 6.1  | 2/7.4 $\pm$ 5.1   | 0                | 0                | 0               | 0                |
| НСО  | 42/13                        | 6/14.3 $\pm$ 5.4  | 3/7.1 $\pm$ 3.9   | 2/4.8 $\pm$ 3.3  | 2/4.8 $\pm$ 3.3  | 0               | 0                |
| НО   | 29/15                        | 6/20.7 $\pm$ 7.5  | 1/3.5 $\pm$ 3.4   | 1/3.5 $\pm$ 3.4  | 5/17.2 $\pm$ 7.0 | 1/3.5 $\pm$ 3.4 | 1/3.5 $\pm$ 3.4  |
| Всего  | 558/210                      | 126/22.6 $\pm$ 1.8  | 46/8.2 $\pm$ 1.2  | 9/1.6 $\pm$ 0.5  | 17/3.1 $\pm$ 0.7 | 5/0.9 $\pm$ 0.4 | 7/1.3 $\pm$ 0.4  |
| Клещи, снятые с людей, проанализированные ПЦР с детекцией в реальном времени |                              |   |                   |                  |                  |                 |                  |
| ННЦ  | 761/221                      | 178/23.4 $\pm$ 1.5  | 21/2.8 $\pm$ 0.6  | 12/1.6 $\pm$ 0.7 | 9/1.2 $\pm$ 0.4  | 0               | 1/0.1 $\pm$ 0.1  |
| НСК  | 84/21                        | 17/20.2 $\pm$ 4.4   | 2/2.4 $\pm$ 1.7   | 1/1.2 $\pm$ 1.2  | 1/1.2 $\pm$ 1.2  | 0               | 0                |
| НСО  | 265/51                       | 37/14.0 $\pm$ 2.2   | 9/3.4 $\pm$ 1.1   | 1/0.4 $\pm$ 0.4  | 1/0.4 $\pm$ 0.4  | 1/0.4 $\pm$ 0.4 | 2/0.8 $\pm$ 0.6  |
| ЛК   | 64/17                        | 10/15.6 $\pm$ 4.5   | 2/3.1 $\pm$ 2.2   | 0                | 3/4.7 $\pm$ 2.7  | 2/3.1 $\pm$ 2.2 | 0                |
| НО   | 176/35                       | 26/14.8 $\pm$ 2.7   | 5/2.8 $\pm$ 1.2   | 1/0.6 $\pm$ 0.6  | 3/1.7 $\pm$ 0.9  | 0               | 0                |
| Всего  | 1350/345                     | 268/19.9 $\pm$ 1.1  | 39/2.9 $\pm$ 0.5  | 15/1.1 $\pm$ 0.3 | 17/1.3 $\pm$ 0.3 | 3/0.2 $\pm$ 0.1 | 3/0.2 $\pm$ 0.1  |



ПЦР-анализ ДНК боррелий в образцах таежных клещей.

А. Дорожка 1 — ДНК-маркер, DNA Molecular Weight Marker XIV. Дорожки 2—7 — результаты мультиплексной ПЦР (2, 3 — *B. miyamotoi*, 4, 5 — микстинфекция *B. miyamotoi* и *B. burgdorferi* s. l., 6, 7 — *B. burgdorferi* s. l.). Б. Дорожки 1—7 — результаты ПЦР с праймерами, направленными к гсnu р83/100 (1, 2 — *B. afzelii*, 4, 5 — микстинфекция *B. afzelii* и *B. garinii*, 6, 7 — *B. garinii*). Дорожка 8 — ДНК-маркер, DNA Molecular Weight Marker XIV.

PCR analysis of the *Borrelia* DNA in the samples of taiga ticks.

лекса *B. burgdorferi* s. l. и *B. miyamotoi*, так и их одновременное присутствие.

Показано, что в 46.6 % образцов клещей, отловленных с растительности, выявляется ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. (табл. 2). Значительного отличия между пятью рассмотренными биотипами, где проведен отлов клещей, не выявлено. Максимальное количество положительных проб выявлено на территории биотопа 2 (55.3 %), а минимальное — на территории биотопа 3 (37.1 %) (табл. 2). Для образцов клещей, снятых с людей, число образцов, в которых детектирована ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l., несколько ниже — 36.1 % (табл. 2). ДНК вида *B. miyamotoi* детектирована достоверно реже ( $p < 0.01$ ) и в тех и в других образцах. Так, в образцах клещей, отловленных с растительности, ДНК выявлена в 3.9 %, а в клещах, снятых с людей — 5.6 % (табл. 2). Показано одновременное присутствие ДНК *B. miyamotoi* и боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. в образце одного и того же клеща (табл. 2).

На основании результатов, полученных при изоляции, и ПЦР детекции боррелий в таежных клещах, собранных на территории ННЦ, в 2009 г. в Лаборатории генной диагностики на базе АНО ЦНМТ, проведено широко-масштабное исследование клещей, снятых с людей, обратившихся за помощью в пункт вакцинопрофилактики АНО ЦНМТ. Основная часть людей, обратившихся за помощью в АНО ЦНМТ, пострадала от присасывания таежных клещей на территории ННЦ СО РАН и его окрестностей, а также г. Новосибирска и его окрестностей, различных районов Новосибирской обл. и Алтайского края (табл. 2). Методом однораундовой ПЦР с детек-

цией продуктов в режиме реального времени проанализировано 1350 клещей. ДНК *B. burgdorferi* s. l. выявлена в 332 (24.6 %) образцах. Наибольший процент (27.5 %) положительных проб выявлен в клещах, отловленных в ННЦ СО РАН. Для всех *B. burgdorferi* s. l.-положительных образцов проведено выявление ДНК *B. miyamotoi* методом мультиплексной ПЦР с последующим установлением видовой принадлежности. ДНК *B. miyamotoi* выявлена в 35 (2.6 %) образцах, причем в 15 (1.1 %) из них ДНК *B. burgdorferi* s. l. не выявлена (табл. 2).

Установлена видовая принадлежность боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l., выявляемых как в клещах, отловленных с растительности на флаг, так и в клещах, снятых с людей. Видовая принадлежность боррелий определена на основании ПДФ-анализа гена r83/100. Проведение ПЦР реакции с праймерами F5-F12, позволяющими амплифицировать фрагмент ДНК, включающий вариабельный участок гена r83/100 боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. дает набор ПЦР-фрагментов 424 н. п. для вида *B. garinii* и 334 н. п. для *B. afzelii* (см. рисунок, Б). Разделение полученных ПЦР-фрагментов в 2%-ном агарозном геле позволяет детектировать ДНК *B. garinii*, *B. afzelii* и их одновременное присутствие в образце от одного клеща (см. рисунок, Б). Показано, что достоверно чаще ( $p < 0.01$ ) выявляется ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. (36.1 %), чем *B. miyamotoi* (5.6 %). При установлении видовой принадлежности боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l., выявленных в образцах клещей, отловленных с растительности, показано, что достоверно чаще ( $p < 0.01$ ) в 33.9 % детектируется ДНК *B. garinii* (табл. 2). Одновременное присутствие ДНК *B. garinii* и *B. afzelii* показано в 1.9 %, а *B. garinii* и *B. miyamotoi* в 2.8 % проб. Одновременное присутствие ДНК *B. miyamotoi* и *B. afzelii* показано в 0.2 % только при исследовании проб из биотопа 2 (табл. 2).

В образцах таежных клещей, снятых с людей и проанализированных как двухраундовой ПЦР, так и ПЦР с детекцией в реальном времени, также достоверно чаще ( $p < 0.01$ ) детектирована ДНК *B. garinii* (табл. 2). ДНК *B. afzelii* выявлена в 8.2 и 2.9 % образцов соответственно. ДНК *B. miyamotoi* детектирована в 1.6 % образцов. Одновременное присутствие ДНК *B. garinii* и *B. miyamotoi* обнаружено в 3.1 % образцов, ДНК *B. afzelii* и *B. miyamotoi* — в 0.9 %, а ДНК *B. garinii* и *B. afzelii* — в 1.3 % образцов.

В целом в клещах, снятых с людей, достоверно чаще ( $p < 0.01$ ) выявляется ДНК *B. garinii* (20.7 %), чем ДНК *B. afzelii* (4.5 %). Одновременное присутствие ДНК *B. garinii* и *B. afzelii* обнаружено в 0.5 % образцов. Наибольший процент ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. выявляется в клещах, снятых с людей, в районе ННЦ (31.1 %), в районе НСК (22.5 %) и наиболее редко в НСО (19.8 %). В образцах таежных клещей, отловленных на рассмотренных территориях, ДНК *B. garinii* выявляется достоверно чаще ( $p < 0.01$ ), в 23.7, 18.0 и 14.0 % образцов соответственно. ДНК *B. afzelii* выявлена в 5, 3.6 и 3.9 % образцов клещей; кроме того, отмечено одновременное присутствие ДНК обоих видов (табл. 2).



## ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее при культивировании боррелий от таежных клещей, отловленных на территории Новосибирской обл., показана возможность получения первичных изолятов не только *B. garinii* и *B. afzelii*, но и *B. miyamotoi* (Фоменко и др., 2006; Fomenko et al., 2008). Анализ изолятов, полученных в данной работе, также показал наличие трех видов боррелий *B. garinii*, *B. afzelii* и *B. miyamotoi*, причем стабильно растущими являлись только изоляты видов *B. garinii* и *B. afzelii*. В настоящее время стабильно растущие изоляты *B. miyamotoi* получены только в Японии от таежного клеща и из крови *Apo-demus argenteus* (Fukunaga et al., 1995, 1996). Показано, что боррелии группы КВЛ не все одинаково хорошо культивируются на искусственных питательных средах, для некоторых видов и на сегодняшний день не получены изоляты, способные к росту на питательной среде (Cutler et al., 1999).

На основании результатов, полученных при изоляции боррелий от таежных клещей, мы провели исследование, направленное на установление относительной частоты встречаемости ДНК *B. miyamotoi* и *B. burgdorferi* s. l. в голодных имаго таежных клещей. Для этого были исследованы как таежные клещи, отловленные с растительности на флаг, так и клещи, снятые с людей. Проведенный анализ позволил выявить наличие смешанной инфекции в образце одного клеща. ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. выявлена в 46.6 % образцов клещей, отловленных с растительности на территории ННЦ, полученные данные согласуются с приводимыми ранее данными по выявлению ДНК боррелий в таежных клещах на территории Новосибирской обл. (Фоменко и др., 2006; Fomenko et al., 2008). Некоторые расхождения выявлены при сравнении результатов, полученных при анализе клещей, отловленных на флаг, и клещей, снятых с людей (табл. 2). Показано, что в таежных клещах, отловленных на флаг, ДНК *B. burgdorferi* s. l. детектируется достоверно чаще ( $p < 0.01$ ).

Ранее была показана возможность выявления ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. методом ПЦР с последующим флуоресцентным анализом продуктов реакции в реальном времени (Rauter et al., 2002; Wang et al., 2003). Выявление ДНК боррелий с использованием коммерческих тест-систем с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени «Ампли-Сенс® *Borrelia burgdorferi* sensu lato-EPH» успешно проведено при исследовании зараженности клещей в Ставропольском крае (Орлова и др., 2008). Общее количество положительных образцов при детекции методом двухраундовой ПЦР составляет 37.6 %, а при детекции методом ПЦР в реальном времени — 25.6 %. С использованием системы ПЦР в реальном времени был проведен скрининг, ориентированный на детекцию ДНК боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* s. l. Однако дальнейшее установление видовой принадлежности боррелий показало, что в некоторых случаях выявляется ДНК *B. miyamotoi*, причем как одновременно с видами *B. garinii* и *B. afzelii*, так и в виде моноинфекции. Можно предположить, что данная ПЦР-система с праймерами, направленными к гену 16S рРНК, выявляет как ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l., так и ДНК *B. miyamotoi*.

Анализ клещей, отловленных на территории Новосибирской обл. и исследованных методом ПЦР с последующим анализом продуктов реакции в

римальном времени, показал, что наибольший процент ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. обнаружен в клещах, снятых с людей, подвергшихся нападению в ННЦ (27.5 %). Наименьший процент положительных образцов выявлен в клещах, снятых с людей, подвергшихся нападению на территории НСО (18.9 %) (табл. 2). Следует обратить внимание, что по сравнению с другими число исследованных клещей из НСК значительно меньше, поэтому мы в данной работе не можем получить достоверное представление о соотношении числа положительных проб, исследованных для других территориальных единиц. В то же время можно говорить о наличии достоверных отличий в количестве положительных проб клещей, снятых в ННЦ и НСО ( $p < 0.01$ ).

Суммируя все вышесказанное, можно предположить, что один из очагов ИКБ Новосибирской обл. находится в окрестностях ННЦ СО РАН, и по мере удаления от него число зараженных клещей постепенно снижается. Это может быть связано как с природными особенностями местоположения ННЦ, так и с влиянием антропогенных факторов (Нафеев и др., 2008). В настоящее время в ННЦ и территориях, прилегающих к нему, не осталось мест, не испытавших воздействие человека. Антропогенное воздействие (садово-огородническая деятельность, вырубка лесов, расширение строительства и т. д.) привело к большой активности грызунов, являющихся основными переносчиками и резервуарами боррелий и, как следствие, увеличение числа инфицированных клещей (Коренберг и др., 2008; Нафеев и др., 2008).

Анализ выявления ДНК *B. miyamotoi* в образцах от клещей, отловленных в различных биотопах ННЦ, показал, что число положительных проб варьирует от 2.2 до 4.6 % (табл. 2). Показано, что ДНК *B. miyamotoi* во всех исследованных образцах клещей выявлена достоверно реже ( $p < 0.01$ ), чем ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. Полученные результаты согласуются с результатами выявления *B. miyamotoi* в других иксодовых клещах. Наиболее близкие результаты получены для таежных клещей, отловленных на территории Восточно-Казахстанской области, где ДНК *B. miyamotoi* была выявлена в 2 % (Карань и др., 2010). Для клещей *Ixodes ricinus* (L., 1758) также показано близкое распределение боррелий двух групп, выявление *B. miyamotoi* варьирует от 0.2 до 5 %, тогда как *B. burgdorferi* s. l. — от 10 до 33 % (Fraenkel et al., 2002; Richter et al., 2003). Хотелось бы отметить, что *B. miyamotoi* в большинстве случаев детектирована одновременно с *B. burgdorferi* s. l., причем частота одновременного присутствия ДНК нескольких видов (68.5 %) превышает теоретически рассчитанную (33.6 %). В образцах от клещей, отловленных на флаг ДНК *B. miyamotoi* и *B. burgdorferi* s. l. детектирована в 3 %, а ДНК *B. miyamotoi* в виде моноинфекции в 0.9 % проб (табл. 2).

Установление видовой принадлежности проведено на основании анализа гена r83/100 боррелий. Ранее была показана возможность использования его последовательности для определения видовой принадлежности представителей трех патогенных видов комплекса *B. burgdorferi* s. l. (Фоменко и др., 2007). Установление видовой принадлежности показало, что наиболее часто во всех исследованных образцах выявлена ДНК *B. garinii* от 27.1 до 38.4 % всех исследованных клещей. Ранее при исследовании таежных клещей, отловленных на территории Томска и его пригородах, Ир-

кутска, Новосибирска, а также клещей с различных территорий Западной, Восточной Сибири и Дальнего Востока, в тасжных клещах была выявлена ДНК *B. garinii* (Козлова и др., 2004; Чаусов и др., 2004; Mediannikov et al., 2005; Фоменко и др., 2006; Рудакова и др., 2007; Рябченко, Беклемишев, 2007; Fomenko et al., 2008). В Томске, Иркутске и Новосибирске число клещей, зараженных данным видом, превалирует. Одновременное заражение клещей боррелиями двух видов было выявлено в 3.5 % случаев. Чаще всего встречается одновременное присутствие ДНК *B. miyamotoi* и *B. garinii* (2.1 %) ( $p < 0.01$ ), реже всего — *B. miyamotoi* и *B. afzelii* (0.3 %) ( $p < 0.01$ ). В 1 % образцов тасжных клещей показано наличие ДНК *B. garinii* и *B. afzelii*. Следует отметить, что ДНК *B. miyamotoi* в виде моноинфекции встречается реже (1.1 %) ( $p < 0.01$ ), чем одновременно с ДНК других видов (2.5 %) ( $p < 0.01$ ). Ранее были описаны случаи одновременного присутствия ДНК двух видов боррелий в образце одного клеща, в частности *B. garinii* и *B. afzelii*, однако частота их выявления (11.8 %) превышала приведенную в данном исследовании (Рудакова и др., 2007). Показано, что число образцов, в которых выявлена ДНК видов как *B. garinii*, так и *B. afzelii* в клещах, снятых с людей, ниже (20.7 и 4.5 % соответственно), чем в клещах, отловленных на флаг (33.9 и 7.8 % соответственно) ( $p < 0.01$ ). Напротив, при выявлении ДНК вида *B. miyamotoi* как в клещах, снятых с людей (1.3 %), так и в клещах, отловленных в природе (0.9 %), таких отличий не показано. В целом отмечено уменьшение числа образцов, содержащих ДНК *B. burgdorferi* s. l., от клещей, снятых с людей. Можно предположить, что при попадании крови человека клещу боррелии элиминируются компонентами крови. Ранее было показано, что под воздействием белков системы комплемента в кишечнике клеща может происходить разрушение значительной части боррелий (Steere et al., 2004).

Хотелось бы отдельно отметить выявление ДНК боррелий в тасжных клещах, снятых с людей, подвергшихся нападению на территории Алтайского края. В клещах, отловленных на территории Алтайского края, так же как и в клещах, собранных в Новосибирской обл., выявлена ДНК *B. burgdorferi* s. l.: *B. garinii* и *B. afzelii*, а также *B. miyamotoi* (табл. 2). Однако говорить о более частом выявлении ДНК *B. miyamotoi* по сравнению с образцами из Новосибирской обл. не приходится из-за малого числа проанализированных образцов.

Таким образом, показано, что на территории Новосибирской обл. широкое распространение имеют не только виды комплекса *B. burgdorferi* s. l.: *B. garinii* и *B. afzelii*, но и вид *B. miyamotoi*, относимый к группе КВЛ. Наиболее часто во всех исследованных клещах детектирована ДНК *B. garinii*. Выявление ДНК *B. miyamotoi* в клещах, снятых с людей, говорит о высокой вероятности попадания данного вида людям, что может приводить к развитию заболевания. Выявление ДНК *B. miyamotoi* позволило установить, что данный вид боррелий встречается не только на территории Новосибирской обл., но и на территории Алтайского края.

### Список литературы

- Иерусалимский А. П. 2001. Клещевой энцефалит. Руководство для врачей. Новосибирск: Гос. мед. акад. МЗ РФ. 360 с.
- Карань Л. С., Егембердиева Р. А., Колясникова Н. М., Федорова М. В. 2010. Изучение инфицированности *I. persulcatus* патогенными для человека микроорганизмами в Восточно-Казахстанской области. Вестн. Уральской гос. мед. акад. 21 : 185—186.
- Козлова И. В., Верховина М. М. 2004. Комплексная экстренная диагностика и специфическая профилактика природно-очаговых трансмиссивных клещевых инфекций в г. Иркутске. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 3 (1) : 134—139.
- Колясникова Н. И., Махнева Н. А., Топоркова М. Г., Надеждина М. В., Есаулкова А. Ю., Романенко В. В., Платонов А. Е., Погодина В. В., Карань Л. С. 2010. Генодиагностика спектра инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Вестн. Уральской гос. мед. акад. 21 : 187—188.
- Коренберг Э. И., Горелова Н. Б., Ковалевский Ю. В. 2002. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов России. Паразитология. 3: 177—191.
- Коренберг Э. И. 2008. Современные черты природной очаговости клещевого энцефалита: новые или хорошо забытые? Мед. паразитол. и паразитарные болезни. 3: 3—8.
- Лесняк О. М. Лайм-боррелиоз. Уральская гос. мед. акад. 125 с.
- Нафеев А. А., Савельева Н. В., Никишин В. А. 2008. Эпидемиологическая разведка имеющихся и обнаружение новых вирусных и бактериальных трансмиссивных природно-очаговых инфекций в Ульяновской области. Мед. паразитол. и паразитарные болезни. 4: 46—47.
- Оберт А. С. 2001. Иксодовые клещевые боррелиозы (нозогеографические и медико-экологические аспекты). Новосибирск: Наука. 110 с.
- Орлова Т. Н., Василенко Н. Ф., Афанасьев Е. Н., Чумакова И. В., Санникова И. В., Куличенко А. Н. 2008. Изучение циркуляции возбудителя Лайм-боррелиоза в Ставропольском крае. Проблемы особо опасных инфекций. 96: 20—22.
- Плохинский Н. А. 1961. Биометрия. Новосибирск. 364 с.
- Природа Академгородка: 50 лет спустя. 2007. Новосибирск: Изд-во Сиб. отд. АН. 249 с.
- Рудакова С. А. 2007. Иксодовые клещевые боррелиозы в сочетанных природных очагах Западной Сибири. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 3 (55): 151—155.
- Рябченко А. В., Беклемишев А. Б. 2007. Мониторинг зараженности клещей возбудителями Лайм-боррелиоза в рекреационной зоне Новосибирска. Вестн. НГУ. 5 (1): 10—110.
- Фоменко Н. В., Романова Е. В., Караваева Ю. Ю., Панов В. В., Черноусова Н. Я., Ливанова Н. Н. 2006. Разнообразие *Borrelia burgdorferi sensu lato* в природных очагах Новосибирской области. Бюл. сибирской медицины. 5. Приложение 1 : 93—98.
- Фоменко Н. В., Сабитова Ю. В., Хаснатинов М. А., Гольцова Н. А., Данчинова Г. А., Батаа Ж., Амбед Д., Стронин О. В. 2007. Гетерогенность гена *p83/100* боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 4: 31—37.
- Фоменко Н. В. 2008. Гетерогенность *Borrelia* spp. в клещах *Ixodes persulcatus* // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития. Алматы. 227—230.
- Фоменко Н. В., Епихина Т. И., Черноусова Н. Я. 2010. Выявление *Borrelia miyamotoi* в крови людей, заболевших в весенне-летний эпидемиологический период. Молекулярная медицина. 3: 28—31.
- Чаусов Е. В., Терновой В. А., Протопопова Е. В., Коновалова С. Н. 2009. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах. Паразитология. 43 (5): 374—387.

- Cutler S. J., Akintunde C. O., Moss J., Fukunaga M., Kurtenbach K., Talbert A. 1999. Successful in vitro cultivation of *Borrelia duttonii* and its comparison with *Borrelia recurrentis*. *Int. Journ. Syst. Bacteriol.* 49: 1793—1799.
- Fomenko N. V., Livanova N. N., Chernousova N. Y. 2008. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in natural foci of Novosibirsk region. *Int. Journ. of Med. Microbiol.* 298 (S1): 139—148.
- Fraenkel C., Garpmo U., Berglund J. 2002. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *Journ. Clin. Microbiol.* 40: 3308—3312.
- Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D., McClelland M., Nakao M. 1995. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int. Journ. Syst. Bacteriol.* 45: 804—810.
- Fukunaga M., Okada K., Nakao M., Konishi T., Sato Y. 1996. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borrelia. *Int. Journ. Syst. Bacteriol.* 46: 898—905.
- Mediannikov O. Y., Ivanov L., Zdanovskaya N., Vorobyova R., Sidelnikov Y., Fournier P. E., Tarasevich I., Raoult D. 2005. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Russian Far East. *Microbiol. Immunol.* 49: 191—197.
- Postic D., Korenberg E., Gorelova N. 1997. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. *Res. Microbiol.* 148: 691—702.
- Rauter C., Oehme R., Diterich I., Engele M., Hartung T. 2002. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *Journ. of clinical microbiology.* 40 (1): 36—43.
- Richter D., Schlee D., Matuschka F. 2003. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg. Inf. Dis.* 9: 697—701.
- Richter D., Postic D., Sertour N. 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. Nov. *Int. Journ. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 873—881.
- Steere A. C., Coburn J., Glickstein L. 2004. The emergence of Lyme disease. *Journ. Clin. Invest.* 113: 1093—1101.
- Wang G., Liveris D., Brei B., Wu H., Falco R. C. 2003. Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Quantification of *Borrelia burgdorferi* in Field-Collected *Ixodes scapularis* Ticks from the Northeastern United States. *Applied and environmental microbiology.* 69 (8): 4561—4565.

STUDY ON THE INFECTION OF TAIGA TICKS WITH BORRELIA  
IN THE TERRITORY OF NOVOSIBIRSK SCIENTIFIC CENTER SB PAS

V. Yu. Borgoyakov, N. V. Fomenko, V. V. Panov, E. D. Chikova

*Key words:* *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*, *Ixodes persulcatus*, ticks, Siberia.

SUMMARY

In our study, *Borrelia* were revealed in the taiga ticks *Ixodes persulcatus* collected on vegetation by flagging, as well as in the ticks removed from the people who asked for help in the vaccination center located in the Novosibirsk Scientific Center of the Siberian Branch of Russian Academy of Science (NS SB RAS). By the isolation of *Borrelia* on BSK-H medium, the occurrence of *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. miyamotoi* was established in the territory of NSC. *B. miyamotoi* isolates were unstable and lost their ability to growth in later passages. DNA of the same three species of *Borrelia* was detected by PCR in the samples of ticks, both collected on vegetation by flagging and removed from humans. DNA of *B. garinii* was recorded most often; DNA of *B. afzelii* was less frequent; and the

least number of positive samples was shown for *B. miyamotoi*. In the ticks collected on vegetation by flagging, DNA of *B. garinii* was found in 38.6 %, *B. afzelii* in 9.9 %, and *B. miyamotoi* in 3.9 % of samples. In the ticks removed from people, number of positive samples was lesser; so, DNA of *B. garinii* was detected in 24.2 %, *B. afzelii* in 6.9 %, and *B. miyamotoi* in 5.6 % of samples. Mixed infection with two *Borrelia* species was recorded, and DNA of *B. miyamotoi* more often detected simultaneously with DNA of *B. garinii*.

---