

Разнообразие *Borrelia burgdorferi sensu lato* в природных очагах Новосибирской области

Фоменко Н.В.¹, Романова Е.В.², Каравая Ю.Ю.³, Панов В.В.⁴,
Черноусова Н.Я.³, Ливанова Н.Н.⁴

Diversity *Borrelia burgdorferi sensu lato* in natural foci of Novosibirsk region

Fomenko N.V., Romanova Ye.V., Karavaeva Yu.Yu., Panov V.V.,
Chernousova N.Ya., Livanova N.N.

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

² Новосибирская государственная медицинская академия, г. Новосибирск

³ Муниципальная инфекционная клиническая больница №1, г. Новосибирск

⁴ Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск

© Фоменко Н.В., Романова Е.В., Каравая Ю.Ю. и др.

Методом ПЦР исследованы образцы от *Ixodes persulcatus*, кровь и ткани органов мелких млекопитающих, образцы крови человека, а также изоляты боррелий от голодных имаго. Показано, что на территории Новосибирской области распространены боррелии двух видов — *B. garinii* и *B. afzelii*. Образцы, содержащие ДНК *B. garinii* подгруппы NT29, преобладали среди исследованных.

Ключевые слова: боррелии, ПЦР, мелкие млекопитающие, *Ixodes persulcatus*.

PCR assays were used to test sample from *Ixodes persulcatus*, blood and tissues of small mammals, human blood after tick bites, as well as isolates from adult ticks. It was demonstrated the presence of two *Borrelia* species: *B. garinii* and *B. afzelii*. Mainly DNA *B. garinii* NT29 were determined.

Key words: borrelia, PCR, small mammals, *Ixodes persulcatus*.

УДК 616.98:579.834.114

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) — трансмиссивные природно-очаговые заболевания, возбудителями которых являются спирохеты комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.). В настоящее время в составе комплекса выделяют 13 видов боррелий, однако патогенность доказана для *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (s.s.), *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* [26] и *Borrelia spielmani* [24]. На территории России в природных очагах с участием клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus* циркулируют виды *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi s.s.* и *Borrelia valaisiana*, при этом два последних вида боррелий детектированы только в образцах от *I. ricinus* [3, 19]. В западносибирских природных очагах ИКБ основная роль в циркуляции боррелий принадлежит таежному клещу. В ча-

стности, высокие показатели уровня инфицированности *I. persulcatus* боррелиями (32,0%) регистрируют в приобских борах, в осиново-березовых лесах (24,0%) и северной лесостепи (27,8%); южнее уровень зараженности клещей снижается и в основном не превышает 18,5% [2, 6]. Видовой состав боррелий, циркулирующих на территории Новосибирской области, установлен в 1997 г. [22]; при идентификации изолятов спирохет из имаго *I. persulcatus* выявлены виды *B. afzelii* и *B. garini*. Несколько позже показано, что вид *B. garinii* представлен двумя подгруппами — 20047 и NT29, выявляемыми как у клещей-переносчиков, так и у мелких млекопитающих [4, 16].

Организация генома боррелий комплекса *B. burgdorferi s.l.* отличается не только от геномов других

спирохет, но и всех бактерий. Строение 90% плазмид боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi s.l.* не имеет гомологии с охарактеризованными к настоящему времени плазмидами других микроорганизмов [10]. Показано, что плазмиды кодируют гены более 130 различных липопротеинов, часть из которых являются белками поверхностного слоя оболочки боррелий и иммунодоминантными антигенами. Гуморальный иммунный ответ человека на боррелиозную инфекцию может быть представлен антителами к более чем 20 антигенам боррелий. При этом часть иммунодоминантных белков боррелий кодируется генами хромосомы, другие — генами внехромосомных плазмид [9, 10]. Состав белков-антигенов и их соотношение значительно отличаются не только у боррелий разных видов (гетерогенность ряда их поверхностных белков достигает 40%), но и в изолятах одного вида [14]. Кроме того, в процессе развития инфекции значительно изменяется уровень экспрессии некоторых иммунодоминантных белков. Поэтому спектр специфичности антител у инфицированных людей может варьировать в зависимости от вида возбудителя и, что не менее важно, у одного больного на разных стадиях инфекции [12, 14]. Ранее неоднократно отмечалось, что при использовании видов и даже штаммов боррелий, не соответствующих штамму, вызвавшему развитие болезни, могут быть получены ложноотрицательные результаты серологических тестов [12]. Получение данных о разнообразии видов боррелий, циркулирующих в природных очагах и принимающих участие в патогенезе на исследованной территории, может помочь при разработке методов диагностики ИКБ.

Детекцию ДНК боррелий проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, соответствующих концам генов 5S и 23S рРНК [4, 8, 16, 23]. Амплификация межгенного спейсера 5S—23S рРНК позволяет избежать перекрестных реакций даже с близкородственными спирохетами, поскольку данный межгенный спейсер присутствует только у представителей комплекса *B. burgdorferi s.l.* [11, 18, 21, 26]. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей и полиморфизма длин фрагментов рестрикции ПЦР-продуктов (ПЦР-ПДРФ) межгенного спейсера позволили определить наличие в исследуемых образцах ДНК двух видов боррелий комплекса *B. burgdorferi s.l.* Однако

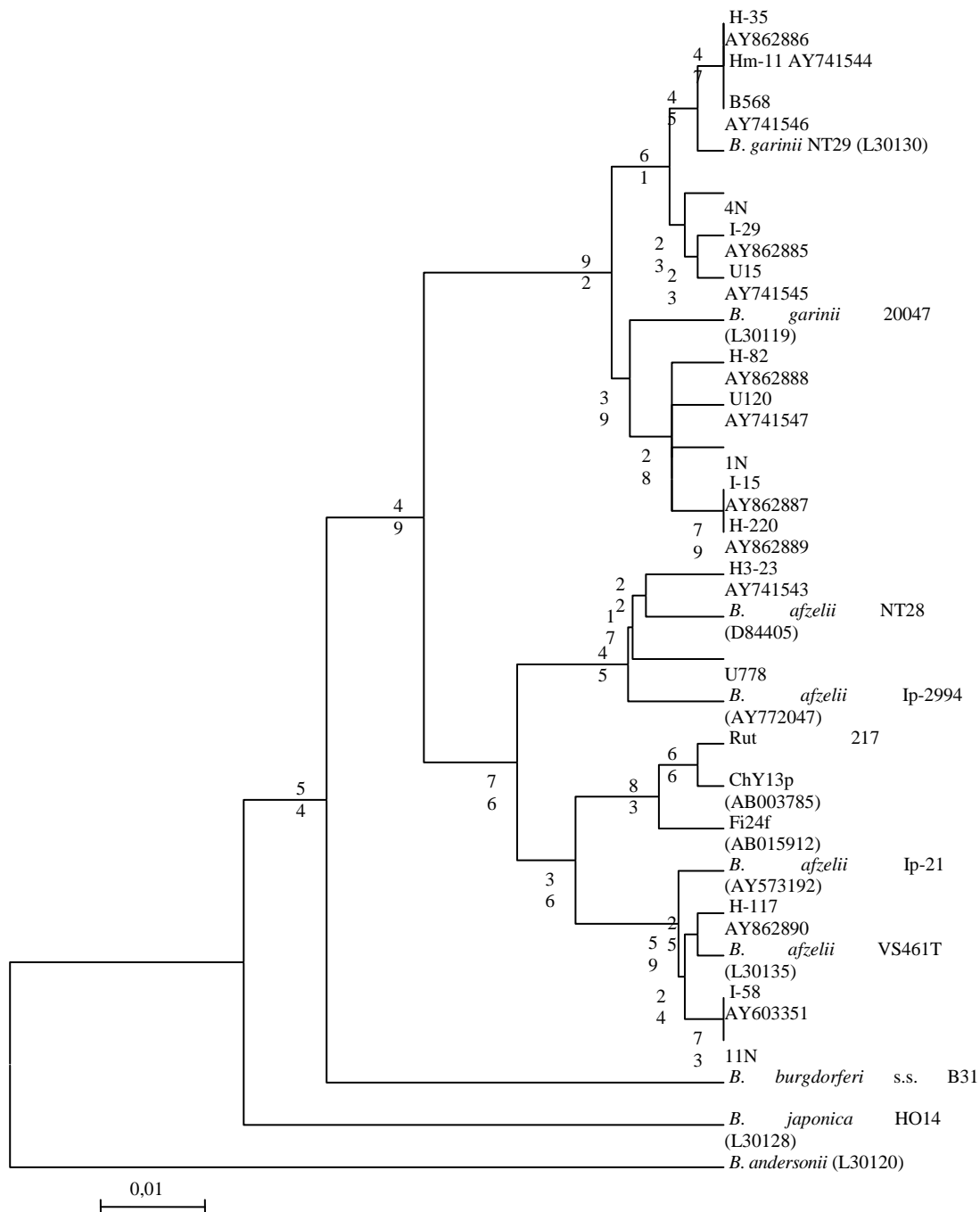
следует учитывать, что с использованием ПЦР без предварительного культивирования возможно проведение лишь косвенной оценки встречаемости различных видов боррелий по наличию ДНК. Филогенетический анализ последовательностей межгенного спейсера 5S—23S рРНК, полученных из образцов клещей, мелких млекопитающих и людей, подтвердил, что во всех случаях детектируется ДНК боррелий видов *B. garinii* и *B. afzelii* (рисунок). Сравнение полученных последовательностей ДНК с опубликованными ранее показало, что для относящихся к одному виду последовательностей межгенного спейсера ДНК боррелий уровень гомологии варьирует от 96 до 99% (рисунок).

Выявлено, что помимо *B. afzelii* подгруппы VS461, широко распространенной на территории Новосибирской области [7], встречается *B. afzelii* подгруппы NT28, впервые детектированной Т. Masuzawa с соавт. в Японии [17]. Позднее было показано, что подгруппа NT28 вида *B. afzelii* широко распространена на территории России и сопредельных стран [7]. При определении видовой принадлежности методом ПЦР-ПДРФ разделение на внутривидовые подгруппы для вида *B. afzelii* невозможно [7], поэтому для внутривидовой дифференцировки необходимо определение нуклеотидных последовательностей исследуемых локусов. На территории Новосибирской области при установлении видовой принадлежности методом определения нуклеотидных последовательностей ДНК *B. afzelii* подгруппы NT28 определена только в одном образце кожи мелкого млекопитающего, а также в двух изолятах от клещей *I. persulcatus* одновременно с *B. afzelii* подгруппы VS461.

Анализ последовательностей межгенного спейсера ДНК вида *B. garinii*, выявленных в образцах, собранных на территории Новосибирской области, показал, что на обследованной территории устойчиво детектируются боррелии двух генетических подгрупп вида *B. garinii*: NT29 и 20047. Данные генетические подгруппы широко распространены в природных очагах ИКБ на территории России. *B. garinii* подгруппы 20047 выявляется и в *I. persulcatus*, и в *I. ricinus*, тогда как *B. garinii* подгруппы NT29 в клещах *I. ricinus* не обнаружена [17—19]. В ходе исследования выявлены два ранее не встречавшихся варианта последовательности ДНК межгенного спейсера *B. garinii* подгруппы 20047.

В одном случае наблюдается делеция двух нуклеотидов (ТА) по сравнению с последовательностью типового штамма 20047 вида *B. garinii*, в другом — инсерция пары нуклеотидов (ТА) [8]. При сравнении последовательности ДНК, содержащей инсерцию, с имеющимися

в GenBank, найдены две аналогичные последовательности межгенного спейсера боррелий (AY772203, AY772202), изолированных от клещей *Ixodes pavlovskyi*, собранных



Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера 5S—23S РНК боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l. с применением пакета программ Mega 3.0. [15]. В скобках указаны номера GenBank для ранее опубликованных

последовательностей, без скобок — номера GenBank последовательностей, полученных в данной работе. Без номеров приведены недепонированные последовательности. Шкала представляет 1% дивергенции

на территории Казахстана. Кроме часто определяемых последовательностей межгенного спейсера 5S—23S РНК, детектирован вариант, о котором сообщалось лишь дважды. Последовательность образца Rut 217, детектированная в одном образце крови красной полевки, гомологична последовательностям межгенного спейсера боррелий, изолированных от *I. persulcatus* и *Haemaphysalis flava* в Китае и Японии [13]. При сравнении нуклеотидной последовательности Rut 217 (AY643482) с ранее опубликованными установлено, что уровень гомологии между данной последовательностью и последовательностью *B. afzelii* (L30135) составляет 97%.

Исследованы 462 образца крови больных, госпитализированных в муниципальную инфекционную Клиническую больницу № 1 г. Новосибирска и инфекционное отделение центральной клинической больницы СО РАН. ДНК-фрагменты, соответствующие вариативному межгенному спейсеру боррелий, обнаружены в 63 образцах (таблица). ДНК боррелий детектирована в первый месяц после присасывания клещей как у больных с эритемной формой ИКБ, так и у больных с подтвержденным диагнозом клещевого энцефалита (КЭ). У 129 больных с эритемной формой ИКБ была зафиксирована первая из трех условно выделяемых стадий ИКБ [9], в этой группе ДНК боррелий детектирована в 40 случаях, что составило 31,0%. Определе-

ние видовой принадлежности показало, что в пробах крови присутствовали ДНК видов *B. garinii* и *B. afzelii*. В 13 образцах ДНК выявлена *B. afzelii*, в 47 — *B. garinii* (таблица). Одновременное присутствие ДНК *B. garinii* подгруппы NT29 и *B. afzelii* обнаружено в 3 образцах крови. В пробах крови 70 пациентов с диагнозом КЭ ДНК боррелий детектирована в 15,7% случаев. У больных, госпитализированных с подозрением на КЭ

(в дальнейшем диагноз не подтвержден), ДНК боррелий обнаружена в 11,3% случаев. В целом в образцах крови всех исследованных больных преимущественно детектирована ДНК *B. garinii*. По литературным данным, этот вид боррелий изолирован при посевах биоптатов из эритем больных ИКБ в Хабаровском крае [20]. Анализ клиники ИКБ в различных регионах России указывает на преобладание неврологической симптоматики [1, 6]. Принято считать, что с неврологическими проявлениями ИКБ связывают вид *B. garinii*, однако в последнее время неоднократно сообщалось об отсутствии четкой взаимосвязи между видовой принадлежностью и клиническими симптомами. В приведенных исследованиях в крови больных с проявлениями поражения центральной нервной системы (ЦНС) была обнаружена ДНК *B. garinii* подгруппы NT29, как в случае моноинфекции ИКБ, так и в случае одновременного заболевания ИКБ и КЭ.

Абсолютное число образцов, в которых детектирована ДНК боррелий (% ± m_p от числа типированных) по видам и генетическим подгруппам *B. burgdorferi* s.l., выявленным в Новосибирской области с 1999 по 2005 гг.

Источник выделения	Число образцов	<i>B. garinii</i> подгруппы NT29	<i>B. garinii</i> подгруппы 20047	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i> подгруппы NT29 + 20047	<i>B. afzelii</i> подгруппы NT28 + VS461	<i>B. afzelii</i> + <i>B. garinii</i> подгруппы NT29
Люди							
Кровь	462 (63)	40 (63,5 ± 6,0)	7 (11,1 ± 3,9)	13 (20,6 ± 5,0)	—	—	3 (4,8 ± 2,7)
Мелкие млекопитающие							
Кожные биоптаты, кровь, мочевого пузыря	740 (60)	32 (53,3 ± 6,4)	12 (20 ± 5,2)	13 (21,7 ± 5,3)	—	—	3 (5,0 ± 2,8)
<i>Ixodes persulcatus</i>							
Голодные имаго, частично напитавшиеся личинки, нимфы	945 (82)	33 (68,3 ± 5,1)	23 (28,0 ± 4,9)	18 (21,9 ± 4,6)	—	—	8 (9,8 ± 3,3)
Изоляты <i>B. burgdorferi</i> s.l.							
Имаго <i>I. persulcatus</i>	9 (9)	2 (22,2 ± 13,9)	2 (22,2 ± 13,9)	2 (22,2 ± 13,9)	1 (11,1 ± 10,5)	2 (22,2 ± 13,9)	—

Всего	2156 (214)	107 (50,0 ± 3,4)	44 (20,6 ± 2,8)	46 (21,5 ± 2,8)	1 (0,5 ± 0,5)	2 (0,9 ± 0,6)	14 (6,5 ± 1,7)
-------	---------------	---------------------	--------------------	--------------------	------------------	------------------	-------------------

Примечание. m_p — ошибка доли, %.

Ранее изоляцией боррелий из тканей мелких млекопитающих показано, что последние являются резервуарными хозяевами как боррелий вида *B. afzelii*, так и вида *B. garinii* [3]. Исследования, направленные на выявление видового разнообразия боррелий, циркулирующих в природных очагах ИКБ Новосибирской области, позволили установить следующее. У мелких млекопитающих, являющихся основными прокормителями преимагинальных фаз развития таежного клеща, ДНК *B. garinii* подгруппы NT29 детектируется достоверно чаще, чем ДНК *B. garinii* подгруппы 20047 ($p < 0,01$) и *B. afzelii* ($p < 0,05$). При этом ДНК *B. garinii* подгруппы NT29 выявлена в образцах крови и тканей органов (мочевой пузырь), что свидетельствует о развитии генерализованной инфекции в организме зверьков. Известно, что именно на стадии дессиминации такие млекопитающие передают возбудителей практически всем переносчикам [5, 25]. В процентном соотношении число животных, у которых одновременно диагностированы два вида боррелий, достоверно не отличалось от такового для имаго *I. persulcatus*, а частота одновременного заражения *B. afzelii* и *B. garinii* подгруппы 20047 почти одинакова [4, 16].

По данным микроскопии, встречаемость боррелий в таежных клещах на территории Новосибирской области составляет от 12,4 до 25,0% [6]. При микроскопическом исследовании фиксированных и витальных препаратов боррелии были выявлены как у голодных имаго, собранных с растительности, так и у частично или полностью напивавшихся преимагинальных фаз таежного клеща. Распределение боррелий в индивидуальных зараженных клещах всех фаз крайне неравномерно и варьирует в очень широких пределах. У зараженных личинок и нимф большинство составляли особи со средним и высоким содержанием боррелий [6].

В образцах голодных имаго таежного клеща, собранных с растительности, так же как в образцах личинок и нимф, снятых при осмотрах с мелких млекопитающих, выявлены ДНК двух видов боррелий — *B. garinii* и *B. afzelii*. ДНК *B. garinii* детектирована в 68,3% образцов. В 21,9% образцов определена ДНК вида *B. afzelii*, что сопоставимо с долей (21,6%) обнаружения ДНК вида *B. afzelii* в образцах от мелких млекопи-

тающих. Соотношение образцов, в которых выявлены ДНК генетических групп *B. garinii* NT29 и 20047, приблизительно составляет 1:1. Следует отметить, что в исследованных образцах мелких млекопитающих и клещей ДНК *B. afzelii* выявлена только в сочетании с ДНК *B. garinii* подгруппы NT29. Помимо выявления ДНК боррелий методом ПЦР, в 2005 г. была проведена изоляция боррелий от голодных имаго таежных клещей на среде BSK-H. При посеве образцов от 50 клещей *I. persulcatus* получено девять изолятов, результаты по определению видовой принадлежности боррелий приведены в таблице. Как при определении видовой принадлежности боррелий, изолированных от клещей на питательную среду, так и при прямой детекции методом ПЦР детектировано два вида боррелий — *B. afzelii* и *B. garinii* (см. рисунок, образцы 1N, 4N, 11N).

Таким образом, в природных очагах ИКБ, расположенных на территории Новосибирской области, зафиксированы два вида боррелий *B. garinii* и *B. afzelii*. Генетические варианты этих видов представлены не только дальневосточными *B. garinii* подгруппы NT29 и *B. afzelii* подгруппы NT28, но и европейскими *B. garinii* подгруппы 20047 и *B. afzelii* подгруппы VS461. На репрезентативной выборке показано, что ДНК вида *B. garinii* подгруппы NT29 достоверно чаще выявляется в образцах клещей, мелких млекопитающих и, что немаловажно, в крови людей, подвергшихся нападению таежных клещей.

Литература

1. Воробьева Н.Н. Клиника, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов. П., 1998.
2. Коренберг Э.И. Проблемы клещевых боррелиозов. М., 1993.
3. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Ковалевский Ю.В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов России // Паразитология. 2002. № 3. С. 177—191.
4. Ливанова Н.Н., Фоменко Н.В., Добротворский А.К. и др. Участие фоновых видов мелких млекопитающих в циркуляции боррелий в лесостепном Приобье // Сиб. экол. журн. 2004. № 11. С. 567—570.
5. Наумов Р.Л., Васильева И.С., Густова В.П. и др. Лабораторная модель паразитарной системы болезни Лайма // Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2002. № 1. С. 40—43.
6. Оберт А.С., Дроздов В.Н., Рудакова С.А. Иксодовые кле-

- щевые боррелиозы. Нозогеографические и медико-экологические аспекты. Новосибирск: Наука, 2001. 110 с.
7. Фадеева И.А., Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б. Генетические варианты *Borrelia afzelii* — одного из возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 2005. № 3. С. 18—22.
 8. Фоменко Н.В., Рар В.А., Романова Е.В. и др. Молекулярно-генетический анализ инфекций, переносимых клещами, у больных Новосибирской области // Молекуляр. медицина. 2005. № 4. С. 48—52.
 9. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe // Clin. Microbiol. Infect. 2004. V. 10. P. 1108—1132.
 10. Casjens S., Palmer N., van Vugt R. et al. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* // Mol. Microbiol. 2000. V. 35. P. 490—516.
 11. Derdakova M., Beati L., Petko B. et al. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-strand conformation polymorphism analysis of the *rrlA-rrlB* intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech republic // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 509—516.
 12. Dressler F., Ackermann R., Steere A.S. Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis // J. Infect. Dis. 1994. V. 169. P. 313—318.
 13. Hauser U., Krahl H., Peters H. et al. Impact of strain heterogeneity on Lyme disease serology in Europe: comparison of enzyme-linked immunosorbent assays using different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato // J. Clin. Microbiol. 1998. V. 36. P. 427—436.
 14. Ishiguro F., Takada N., Masuzawa T. Molecular evidence of the dispersal of Lyme disease *Borrelia* from the Asian continent to Japan via migratory birds // Jpn. J. Infect. Dis. 2005. V. 58. P. 184—186.
 15. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Br. Bioinform. 2004. V. 5. P. 150—163.
 16. 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 // J. Med. Epidemiol. 2003. V. 18. P. 1155—1158.
 17. Masuzawa T., Komikado T., Iwaki A. et al. Characterization of *Borrelia* sp. isolated from *Ixodes tanuki*, *I. turdus*, and *I. columnae* in Japan by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons // FEMS Microbiol. Letter. 1996. V. 142. P. 77—83.
 18. Masuzawa T. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia // Jpn. J. Infect. Dis. 2004. V. 57. P. 229—235.
 19. Masuzawa T., Kharitonov I.G., Kadosaka T. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Moscow province—a sympatric region for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* // Int. J. Med. Microbiol. 2005. V. 294. P. 455—464.
 20. Medianikov O.Y., Ivanov L., Zdanovskaya N. et al. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russian Far East // Microbiol. Immunol. 2005. V. 49. № 3P. 191—197.
 21. Postic D., Assous M., Grimont P. 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. V. 44. P. 743—752.
 22. 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. V. 148. P. 691—702.
 23. Rar V.A., Fomenko N.V., Dobrotvorskyy A.K. et al. Tickborne Pathogen Detection, Western Siberia, Russia. // Emerg. Inf. Dis. 2005. V. 11. P. 1708—1715.
 24. Richter D., Schlee D., Allgower R. et al. Relationship of a novel Lyme disease spirochete *Borrelia spielmani* sp.nov., with its hosts in Central Europe // Appl. Environmen.l microbiol. 2004. V. 70. P. 6414—6419
 25. Shih C., Pollack R., Telford S. et al. Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice // J. Infect. Dis. 1992. V. 166. P. 827—831.
 26. Wang G., van Dam A., Schwartz I. et al. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications // Clinical Microbiology Reviews. 1999. V. 12. P. 633—653.

Поступила в редакцию 06.01.2006 г.