

**Т.Н.Орлова, Н.Ф.Василенко, Е.Н.Афанасьев, И.С.Тюменцева, Б.К.Котти, О.В.Малецкая, Г.К.Исмаилова, Ю.М.Тохов, А.Д.Антоненко, А.Н.Куличенко**

## **СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛАЙМ-БОРРЕЛИОЗА**

*Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь*

На основе кремнезема – алюмосиликата, модифицированного карбоксиметилированным лигнином и карбодиимидом, получены композиционные микрогранулированные магнитные иммуносорбенты (МИС), имеющие высокую адсорбционную активность, характеризующиеся стандартностью структурных характеристик и обладающие механической прочностью. Применение МИС позволяет на этапе подготовки проб иксодовых клещей путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освободиться от всевозможных примесей, тем самым исключать их отрицательное влияние на проводимый анализ, максимально концентрировать искомый возбудитель, что повышает специфичность и чувствительность ПЦР-анализа.

*Ключевые слова:* Лайм-боррелиоз, иксодовые клещи, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Borrelia burgdorferi s.l.*, полимеразная цепная реакция, магнитный иммуносорбент, индикация.

**T.N.Orlova, N.F.Vasilenko, E.N.Afanas'ev, I.S.Tyumentseva, B.K.Kotti, O.V.Maletskaaya, G.K.Ismailova, Yu.M.Tokhov, A.D.Antonenko, A.N.Kulichenko**

### **Improvement of Lyme Borreliosis Agent Indication Methods**

*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol*

On the basis of silica – aluminosilicate, modified by carboxymethylated lignin and carbodiimide, obtained are the composite microgranulated magnetic immunoadsorbents (MIA) with high adsorption activity, which are characterized by the standardized structural characteristics and mechanical strength. Application of MIAs makes it possible, at the stage of tick samples preparation, to eliminate various admixtures via reiterative irrigations of the sorbent with the infectious agent fixed on it. Therefore negative influence of admixtures on the performed analysis is excluded, and the target agent is concentrated to the maximum limit. Thus the specificity and sensitivity of PCR-analysis enhances.

*Key words:* Lyme Borreliosis, ticks, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Borrelia burgdorferi s.l.*, polymerase chain reaction, magnetic immunoadsorbents, indication.

Лайм-боррелиоз или иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) является наиболее распространенной зоонозной природно-очаговой инфекцией, связанной с клещами рода *Ixodes*. Возбудителями Лайм-боррелиоза (ЛБ) являются спирохеты, входящие в комплекс *Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.)*. Лайм-боррелиоз широко распространен в Скандинавии и странах центральной Европы [7, 9]. На территории Российской Федерации располагается большая часть мирового ареала ИКБ [1, 3, 6]. Исключением не являются Южный и Северо-Кавказский федеральные округа РФ.

Попытка изучения зараженности иксодовых клещей возбудителем Лайм-боррелиоза на территории Ставропольского края была предпринята в 1996 г. [6]. С тех пор исследования в данном направлении не проводились. Однако многообразие ландшафтно-географических зон, климатические условия, а также широкое распространение и высокая численность иксодовых клещей способствовали возникновению случаев заболеваний ЛБ в данном регионе. В связи с этим актуальной проблемой является разработка и совершенствование экспрессных методов индикации возбудителя ЛБ с целью повышения их чувствительности и специфичности.

Цель исследования – разработка магнитного иммунного сорбента для индикации возбудителя Лайм-

боррелиоза в полевом материале методом ПЦР.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования служили иксодовые клещи, сбор которых осуществляли с апреля по ноябрь в 2006–2008 гг., в период их активного паразитирования, на стандартный флаг по общепринятой методике. Исследовали как единичных клещей, так и пулы, состоящие не более чем из 15 особей. При формировании пулов учитывали фазу развития клеща, место сбора, вид хозяина (в случае, если клещи сняты с животного).

Исследование суспензий клещей осуществляли с помощью тест-системы «Ампли-Сенс ®*Borrelia burgdorferi sensu lato* для выявления 16S рНК *Borrelia burgdorferi sensu lato (B. burgdorferi sensu stricto, B. afzelii, B. garinii)* в биологическом материале». Подготовку проб и анализ проводили согласно инструкции по применению. Параллельно исследовали эти пробы методом ПЦР после предварительного селективного концентрирования на магнитных иммунных сорбентах.

В качестве матриц при производстве магнитных сорбентов (МС) использовали природный отечественный алюмосиликат, магнетит, карбоксиметилированный лигнин. МС с высокой сорбционной

активностью синтезировали методом формирования пористой структуры носителя в присутствии органических полимеров [2].

Биологическим сырьем при конструировании магнитного иммуносорбента служили иммунные сыворотки крови доноров с высокими титрами специфических антител к возбудителю ЛБ. Антитела к возбудителю ЛБ в сыворотках крови доноров выявляли методом ИФА с использованием тест-системы «ЛаймБест» ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), представляющей собой набор, основой которого являются рекомбинантные антигены *Borrelia burgdorferi s.l.*, иммобилизованные на поверхности лунок полистиролового планшета. Иммуноглобулины класса G выделяли методом фракционирования белков полиэтиленгликолем (ПЭГ) – 6000 [10].

Математическую обработку результатов экспериментов проводили на компьютере в программе MS Office Excel XP.

### Результаты и обсуждение

Видовой состав иксодид, вызывающих ЛБ на территории Евразии, в наших сборах был представлен видом *I. ricinus*. Наряду с этим видом, исследовали иксодовых клещей, характерных для лесостепной и предгорной ландшафтных зон: *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus rossicus*.

В течение 2006–2008 гг. на территории Ставропольского края методом ОТ-ПЦР выявлены 30 положительных проб иксодовых клещей из 252 исследованных на наличие возбудителя ЛБ, что составило (11,9±1,6) % от общего количества исследованных пулов. Наиболее высокая зараженность установлена в 2008 г. – 4,85 %, что в 15,2 раза выше, чем в 2006 г. и в 69 раз больше по сравнению с 2007 г. Установлена высокая зараженность лесного клеща *I. ricinus* возбудителем ЛБ – (10,7±1,8) %, при этом имаго составили 88,9 %, нимфы – 11,1 %. Кроме того, специфическая рРНК впервые выявлена у клеща *D. marginatus* – (1,2±0,4) %, который широко распространен на территории Ставропольского края, что указывает на вовлечение в эпизоотический процесс других видов иксодовых клещей.

ПЦР-диагностика иксодовых клещевых боррелиозов до настоящего времени находится в стадии разработки. Главной проблемой при этом является большое количество ложноотрицательных результатов, часто ничтожно малое количество боррелий в исследуемом материале, что недостаточно для надежной индикации методом ПЦР [5, 8]. Кроме того, трудной задачей представляется обработка проб внешней среды, так как в этом случае необходимо использовать особые методические приемы, позволяющие избавиться от посторонних примесей, способных значительно снизить чувствительность ПЦР, и максимально сконцентрировать искомую ДНК (рНК).

Для устранения этих недостатков мы объединили два метода: высокоэффективное избирательное концентрирование патогена на магнимоносорбенте с последующей постановкой ОТ-ПЦР.

В качестве основного структурного компонента, формирующего остов композиционной твердофазной матрицы, использован природный отечественный алюмосиликат. Химическое модифицирование сорбента осуществляли в присутствии карбоксиметилированного лигнина и карбодиимида. В качестве магнитного компонента при синтезе применяли магнетит (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

Структура композиционного магносорбента представлена корпускулярной системой, которая состоит из частиц кремнезема, покрытых полимером – карбонизированным лигнином, связанных друг с другом в пространственном каркасе. Размер корпускул определяет величину удельной поверхности МС, а плотность их упаковки – объем и радиус пор.

На основе проведенных исследований определены оптимальные условия получения лигнинсодержащего магносорбента: соотношение компонентов синтеза 1,5:1:1, соответственно SiO<sub>2</sub>: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: карбоксиметилированный лигнин; время гелеобразования – 2 ч; значение pH гелеобразования – 7,0.

Для придания магносорбенту биоспецифических свойств и получения магнимоносорбента (МИС) на поверхность МС иммобилизовали специфические IgG, выделенные фракционированием ПЭГ-6000 из сывороток крови людей с высокими титрами боррелиозных антител. Исследования показали, что концентрация белка 2 мг/мл является оптимальной для полного насыщения антителами сорбента в объеме

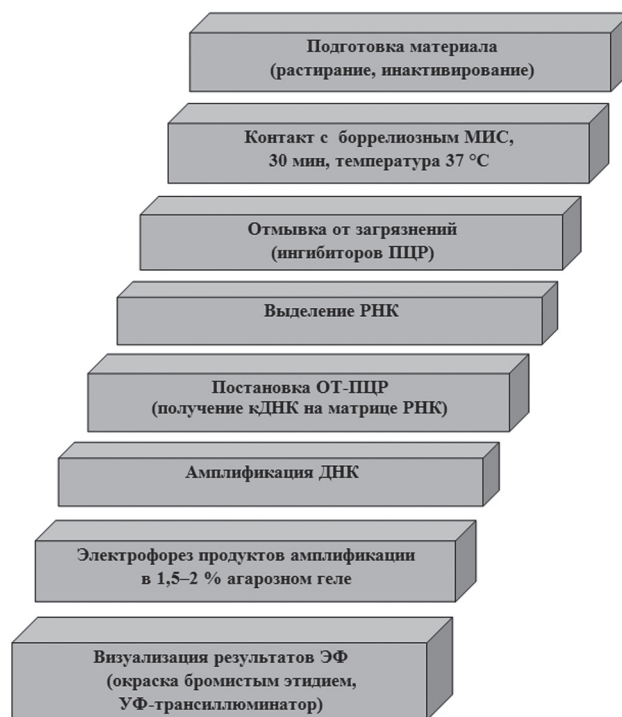


Рис. 1. Схема проведения сочетанного анализа МИС+ОТ-ПЦР для детекции возбудителя Лайм-боррелиоза

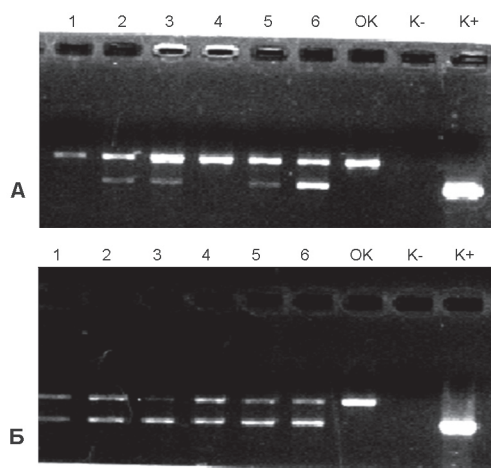


Рис. 2. Результаты выявления рРНК *B. burgdorferi s.l.* методом ОТ-ПЦР до (А) и после (Б) селективного концентрирования проб суспензий клещей на МИС:

А: 1–6 – исследуемые пробы без МИС, ОК – отрицательный контроль выделения, «К-» – контроль отрицательный, «К+» – контроль положительный. Б: 1–6 – те же пробы после концентрирования на МИС, ОК – отрицательный контроль выделения, «К-» – контроль отрицательный, «К+» – контроль положительный

0,2 мл 10 % взвеси.

Установлено, что для полного насыщения магносорбента белком достаточно 2 ч при значении рН раствора 6–7 и температуры от 22 до 37 °С.

Подготовку проб клещей для селективного концентрирования на МИС осуществляли так же, как и для проведения ОТ-ПЦР. Затем в пенициллиновые флаконы вносили 50 мкл 10 % взвеси МИС и весь объем приготовленной суспензии клещей. Инкубировали 30 мин при 37 °С. МИС трижды промывали ФСБ, придерживая постоянным магнитом флаконы с сорбентом, и ресуспендировали в 150 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия. Полученную суспензию использовали для выявления рРНК. Далее все манипуляции проводили, строго следуя указаниям по применению тест-системы. Схема проведения сочетанного анализа МИС+ОТ-ПЦР представлена на рис. 1.

Сочетанным методом МИС+ОТ-ПЦР рРНК выявлена в 56 пробах – (22,2±2,9) %, из них *I. ricinus* – 51 пул, *D. marginatus* 5 пулов, что позволило подтвердить наличие рРНК возбудителя ЛБ в 30 пробах суспензий клещей и дополнительно выявить 26 положительных проб. Применение МИС позволило повысить число положительных находок в 1,9 раза. Результаты выявления рРНК *B. burgdorferi s.l.* методом МИС+ОТ-ПЦР представлены на рис. 2.

Таким образом, на основе кремнезема – алюмосиликата, модифицированного карбоксиметилированным лигнином и карбодимидом, получены магнитные иммуносорбенты, применение которых позволяет на этапе подготовки проб путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освобождаться от всевозможных приме-

сей, тем самым исключать их отрицательное влияние на проводимый анализ, максимально концентрировать искомым возбудитель, что повышает специфичность и чувствительность ПЦР-анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аleshkovskaya E.S., Blagov N.A., Druzhinina T.A., Shalepo E.V. Клещевые микстинфекции (иксодовый клещевой боррелиоз и гранулоцитарный эрлихиоз человека) в Ярославской области. Эпидемиол. и инф. бол. 2008; 2:6–8.
2. Афанасьева Е.Е., Брыкалов А.В., Тюменцева И.С. и др. Способ получения иммуносорбента. Патент РФ 2363732, опубл. 10.08.2009. Бюл. № 22.
3. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Ковалевский Ю.В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов в России. Паразитол. 2002; 36(3):177–87.
4. Котти Б.К., Гудиев О.Ю. Иксодовые клещи Ставрополя и его окрестностей. Мед. паразитол. 1997; 4:36–7.
5. Нefедова В.В., Коренберг Э.И., Нестеренко Л.Н. и др. Сравнительная оценка результативности индикаций боррелий в иксодовых клещах (Ixodidae) методами темнопольной микроскопии и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Паразитол. 2001; 35(1):3–8.
6. Скачков М.В., Яковлев А.Г., Плотникова О.А. и др. Роль различных видов иксодовых клещей как переносчиков возбудителей клещевого энцефалита и боррелиозов в Оренбургской области. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2007; 3:27–30.
7. Golde W.T., Robinson-Dunn B., Stobierski M.G., Dykhuizen D., Wang I.N., Carlson V. et al. Culture-confirmed reinfection of a person with different strains of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. J. Clin. Microbiol. 1998; 36(4):1015–9.
8. Goodman J.L., Jurkovich P., Kramber J.M., Johnson R.C. Molecular detection of persistent *Borrelia burgdorferi* in the urine of patients with active Lyme disease. Infect. Immun. 1991; 59(1):269–78.
9. Huppertz H.I., Schmidt H., Karch H. Detection of *Borrelia burgdorferi* by nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and urine of children with neuroborreliosis. Eur. J. Pediatr. 1993; 152(5):414–17.
10. Polson A., Potgieter G.M., Largier J.F., Mears G.E., Joubert F.J. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. Biochim. Biophys. Acta. 1964; 82:463–75.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Aleshkovskaya E.S., Blagov N.A., Druzhinina T.A., Shalepo E.V. [Ixodic mixed-infections (Lyme borreliosis, human granulocytic ehrlichiosis) in the Yaroslavl region]. Epid. Infek. Bolezni. 2008; 2:6–8.
2. Afanas'eva E.E., Brykalov A.V., Tyumentseva I.S. et al. [Method of immunoabsorbent preparation]. RF Patent 2363732. 10 Aug 2009.
3. Korenberg E. I., Gorelova N.B., Kovalevskiy Yu. V. [Main features of natural focalities of ixodid tick-borne borreliosis in Russia]. Parazitologiya. 2002; 36(3):177–87.
4. Kotti B.K., Gudiev O.Yu. [Ixodid ticks of Stavropol city and its surroundings]. Med. Parazitol. 1997; 4:36–7.
5. Nefedova V.V., Korenberg E.I., Nesterenko L.N. et al. [Comparative evaluation of the efficacy of *Borrelia* indication in ticks (Ixodidae) using dark field microscopy and polymerase chain reaction (PCR)]. Parazitologiya. 2001; 35(1):3–8.
6. Skachkov M.V., Yakovlev A.G., Plotnikova O.A., Mamedova N.M., Nazarenko S.V., Petrishcheva G.V. [Role of various ticks as vectors of the causative agents of tick-borne encephalitis and borrelioses in the Orenburg Region]. Med. Parazitol. Parazit. Bol. 2007; 3:27–30.

Authors:

Orlova T.N., Vasilenko N.F., Afanas'ev E.N., Tyumentseva I.S., Kotti B.K., Maletskaya O.V., Ismailova G.K., Tokhov Yu.M., Antonenko A.D., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Орлова Т.Н., Василенко Н.Ф., Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Котти Б.К., Малецкая О.В., Исмаилова Г.К., Тохов Ю.М., Антоненко А.Д., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 19.02.10.