

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ НОВОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ КЛЕЩАМИ

Г.О. Александров, А.М. Кондранова, Е.Е. Буйко

Научный руководитель: профессор, д.м.н. М.Р. Карпова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: zoom2097@gmail.com

USING MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS FOR THE DETECTION OF TOMSK REGION NEW PATHOGENS TRANSMITTED BY TICKS

G. O. Alexandrov, A. M. Kondranova, E.E. Buyko.

Scientific Supervisor: Prof., Dr. M.R. Karpova

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050

E-mail: zoom2097@gmail.com

Abstract. Tomsk Region is one of the leading places in Russia for the dissemination of natural focal infections spread by ticks. In addition to known pathogens in recent years in the grip of steel spirochetes identify new species - *Borrelia miyamotoi*, which causes relapsing fever. For the first time that *Borrelia* has been isolated from the taiga tick in Japan (Fukunaga et al., 1995) and has since recorded over a wide geographical area of Eurasia and North America, including a number of regions of Russia. *B. miyamotoi* transmitted by the same tick species as *Ixodes tick borreliosis* pathogen *B. burgdorferi.s.l.* In the absence of a specific diagnosis borrelioses caused by this pathogen are under diagnosed *Ixodes tick borreliosis* and determine the polymorphism of clinical. Infection with *B. miyamotoi* ticks lower than *B. burgdorferi.s.l.*, Symptomatic disease this kind are considered very rare. The frequency of relapsing fever caused by *B. miyamotoi*, may increase with the introduction of routine diagnosis of tick-borne infections PCR test systems for the detection of *B. miyamotoi*. Due to the fact that on the territory of the Tomsk region attempts to highlight *B. miyamotoi* was no detection of the pathogen in ticks and blood of patients it is important.

Введение. Боррелии (лат. *Borrelia*) – представляют собой подвижные палочки, которые имеют от 3 до 10 завитков. Относятся к роду бактерий, семейству Spirochaetaceae, порядку спирохет. Представители рода являются возбудителями опасных заболеваний. Такие как боррелиоз, болезнь Лайма и другие. Род насчитывает около 36 различных видов. Только 12 видов боррелий представляют угрозу жизни человека.

Томская область занимает одно из ведущих мест в России по распространению природно-очаговых инфекций, распространяемых клещами. Помимо известных возбудителей в последние годы в клещах стали выявлять спирохеты нового вида – *Borrelia miyamotoi*, который вызывает возвратную лихорадку [6]. Впервые эта боррелия была выделена из таёжного клеща в Японии [7] и с тех пор регистрируется в широкой географической зоне Евразии и Северной Америки, в том числе и ряде областей России [4, 5]. *B. miyamotoi* передается теми же видами клещей, что и возбудитель иксодового клещевого боррелиоза *B. burgdorferi*. В связи с тем, что на территории Томской области попыток

выделения *B. miyamotoi* не было, детекция этого возбудителя в клещах и крови больных является актуальным.

Целью работы является детекция *B. miyamotoi* в клещах и крови пациентов на территории Томской области с использованием ПЦР.

Материалы и методы исследования. В работе использовали молекулярно-генетические методы. Исследование проводилось в эпидемический сезон клещевых инфекций 2016 г. Было обследовано 203 клеща (имаго) и 15 пациентов. Изучаемые клещи относились к двум видам – *I. persulcatus* и *I. Pavlovsky* [4], из них 43 особи были собраны «на флаг» в соответствии с методическими указаниями № 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней» Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на территории г. Томска и Томской области. Остальные 160 клещей были сняты с людей, обратившихся в консультативно-диагностическую поликлинику Филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Томске «НПО «Вирион». Клещи присасывались к людям в разных районах г. Томска и Томской области.

На первом этапе исследования проводилась эвисцерация органкомплекса клещей с дальнейшей экстракцией нуклеиновых кислот с использованием набора реагентов С-8896 РеалБест экстракция 100. Предварительно клещей последовательно отмывали в 70% спирте и физиологическом растворе. Гомогенизацию клещей проводили вручную с использованием жидкого азота согласно инструкции к набору реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.*» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) [3]. Полученный гомогенат суспендировали в 250 мкл раствора для приготовления образцов.

В работе также использовали пробы крови от 15 пациентов, поступивших в инфекционное отделение клиник СибГМУ с лихорадочным состоянием, наличием в анамнезе присасывания клеща и подозрением на заболевание клещевыми инфекциями. Выделение нуклеиновых кислот проводили из лейкоцитарной фракции крови больных с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

С целью определения в исследуемых образцах наличия ДНК *B. miyamotoi* применяли ПЦР-тест систему производства АО «Вектор-Бест».

Для подтверждения наличия специфической ДНК *B. miyamotoi* в крови пациентов было проведено секвенирование по участкам трех генов: *gfpQ*, *23SrRNA*, *recA B. miyamotoi*. Детекцию нарабатываемых ампликонов по участку гена *gfpQ B. miyamotoi* в ПЦР осуществляли с помощью разгорания специфического зонда. Синтез ампликонов определенной длины подтверждали в электрофорезе. Ампликоны были секвенированы по обеим цепям ДНК на автоматическом секвенаторе «ABIPrism 3100 DNAAnalyser» («AppliedBiosystems», США) сотрудниками Межинститутского центра секвенирования ДНК СО РАН (г. Новосибирск). Для филогенетического анализа полученных нуклеотидных последовательностей применяли программу MEGA 4.0, а для их сравнения с данными GenBank – поисковую систему «BLAST».

Результаты. Из 160 клещей, снятых с людей, ДНК *B. miyamotoi* была обнаружена в 10 особях (6,25%). Из 43 клещей, собранных с растительности ДНК *B. miyamotoi* была обнаружена в 4 особях (9,3%). Все клещи, в которых была обнаружена *B. miyamotoi*, принадлежали к виду *Ix. persulcatus*.

Из 15 обследованных пациентов только у одной больной с лихорадкой, развившейся в результате присасывания клеща, с помощью ПЦР-РВ была обнаружена ДНК *B. miyamotoi*. Для подтверждения ее

наличия было проведено секвенирование ДНК, выделенной из крови пациентки. Полученные последовательности ДНК соответствовали последовательностям *B.miyamotoi*, которые депонированы в GenBank, KU845211.1. По участку последовательности гена *glpQ* было отмечено полное совпадение с последовательностью *glpQ B.miyamotoi*, выделенной из крови больного в Хабаровске. По гену *23SrRNA* и по гену *gcsA* соответствие с последовательностями *B.miyamotoi* составляло 99%.

Заключение. Проведенное нами исследование показало наличие *B.miyamotoi* в иксодовых клещах, отловленных с растительности и снятых с людей, на территории Томской области. Используя метод ПЦР-РВ, мы обнаружили генетический маркер патогенной для человека боррелии, относящейся к группе клещевых возвратных лихорадок. Таким образом, впервые была подтверждена циркуляция *B.miyamotoi* на территории Томской области. ДНК, выделенная нами из крови больной с лихорадкой, соответствует ДНК *B.miyamotoi*, что подтвердил анализ последовательностей по трем участкам генов. Это дает основание предполагать участие *B.miyamotoi* в этиологии клещевых инфекций у пациентов на территории Томской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Багаутдинова Л. И., Сарксян Д. С., Дударев М. В., Малинин О. В., Кустарников Г. К., Шахов В. И., Малинин И. Е. Клинический полиморфизм заболевания, вызываемого *Borrelia miyamotoi* // ПМ. 2013. №5 С.125-130.
2. Малинин И. Е., Багаутдинова Л. И., Дударев М. В., Сарксян Д. С. Некоторые кардиологические аспекты клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi* и *Borrelia burgdorferi sensu lato* // ПМ. – 2012. – №60 – С.166-169.
3. Иксодовые клещевые боррелиозы: методическиерекомендации / под ред. заслуженного деятеля науки РФ академика РАМН Ю.В. Лобзина и [и др.]. – СПб, 2010. – 64 с.
4. Fomenko, N. V. et al. Detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes persulcatus* ticks in Russia // Entomological Review. – 2010. – V. 90. – № 8. – P. 1088–1094.
5. P.J. Krause D. Fish, S. Narasimhan. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans //Clinical Microbiology and Infection. –2015. – P 631–339.
6. Heylen, D. et al. Songbirds as general transmitters but selective amplifiers of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genotypes in *Ixodes ricinus* ticks // Environ Microbiol. – 2013. DOI:10.1111/1462–2920.12304.
7. Мухачева Т.А., Ковалев С.Ю. *Borrelia miyamotoi* в клещах на территории Среднего Урала и Западной Сибири // Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций: материалы международной конференции (Санкт–Петербург, 5–7 июня) – СПб: Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 156.