

Н.Н. Ливанова<sup>1,2</sup>, Н.В. Фоменко<sup>1</sup>,  
С.Г. Ливанов<sup>1</sup>

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BORRELIA*, ФОРМИРУЮЩИХ ПРИРОДНЫЕ ОЧАГИ БЛИЗЬ СЕВЕРНОЙ ГРАНИЦЕ АРЕАЛА ТАЕЖНОГО КЛЕЩА НА УРАЛЕ

<sup>1</sup> Институт систематики и экологии животных  
СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундамен-  
тальной медицины СО РАН, Новосибирск

### Введение

Известно, что наиболее напряженные природные очаги трансмиссивных инфекций, передаваемых клещами, приурочены к лесным ландшафтам подзон южной тайги, подтаежных лесов и к их высотно-поясным аналогам в горах [1]. Севернее указанных территорий, а также с увеличением высоты над уровнем моря, из-за недостатка тепла циркуляция возбудителей затруднена, а, вероятнее всего, и невозможна, из-за отсутствия условий для существования не только переносчика, но и немногочисленности основных резервуарных хозяев. Имеющиеся сведения об единичных находках таежного клеща за пределами его ареала свидетельствуют лишь о возможности заноса членистоногих на ту или иную территорию [2]. Данных, демонстрирующих либо отсутствие, либо наличие природных очагов трансмиссивных инфекций на сегодняшний день для территорий с пессимальными и пограничными условиями существования таежного клеща, практически, нет.

В 2004-2006 гг. нами получены подтверждения устойчивого обитания таежного клеща [*Ixodes persulcatus* Schulze, 1930] на Северном Урале и проведена оценка видовой разнообразия патогенов, передаваемых с его участием [3; 4; 5; 6]. В том числе, в биологических образцах взрослых голодных таежных клещей и мелких млекопитающих выявлены ДНК возбудителей

иксодовых клещевых боррелиозов – спирохет комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.), представляющих серьезную опасность для здоровья человека и занимающих одно из ведущих мест по широте распространения и уровню заболеваемости среди инфекций, передаваемых клещами [7; 8].

Таким образом, целью настоящей работы стало выявление генетического разнообразия возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов в регионально пессимальных условиях обитания таежного клеща.

### Материалы и методы

Исследования проведены в 2003-2008 гг. на территории заповедника «Денежкин Камень» и его окрестностях (Североуральский и Ивдельский р-ны Свердловской обл.). Ключевой участок расположен на восточном макросклоне Урала, в пределах Североуральской физико-географической провинции (59030' - 60000' в.д. и 60000' - 61030' с.ш.). Голодных имаго (около 700 особей) таежного клеща собирали ежегодно (2004 - 2008 гг.). Для проведения паразитологического осмотра и сбора биологических образцов на участках максимального обилия *I. persulcatus* мелких млекопитающих отлавливали живоловками в июне - 1-й половине августа 2004-2005 гг. Клещей после определения видовой принадлежности помещали в камеры дифференцированной влажности, где хранили до проведения исследования. Образцы крови зверьков помещали в индивидуальные пробирки с добавлением антикоагулянта и цитостатики и до исследования хранили при +40°C [3].

Боррелий от 258 имаго таежных клещей изолировали на искусственной среде BSK-H. Бактериологический посев и контроль за ростом боррелий осуществлены по методикам, описанным ранее [9; 10]. ДНК от клещей и из клеток боррелий выделены с применением коммерческих наборов производства «ДНК-технология» (г. Москва). Из образцов крови ДНК выделяли с использованием метода, описанного ранее [11].

ДНК боррелий выявлены с использовани-

ем метода двухраундовой ПЦР. Использованы праймеры, направленные к концам генов 5S и 23S рРНК. фрагментам генов 16S и OspA [12].

Определение нуклеотидных последовательностей выполнено для фрагментов генов 5S и 23S рРНК. нуклеотидные последовательности их фрагментов определены с использованием праймеров, соответствующих анализируемому ПЦР-фрагменту. Использован набор Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit, анализ осуществлен в «Центре коллективного пользования секвенирования ДНК» СО РАН (<http://www.sequest.niboch.nsc.ru>).

Сравнение и анализ нуклеотидных последовательностей выполнены с помощью программ BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) и MEGA 4.0. (Tamura et al., 2007). Определенные последовательности внесены в базу данных GenBank под номерами: FJ 976195 – 976197 и FJ 976201 – 976199.

Всего проанализировано 540 образцов взрослых голодных таежных клещей и 207 образцов крови мелких млекопитающих.

#### Результаты и их обсуждение

Анализ нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера 5S – 23S РНК позволил установить, что на обследованной территории

в клещах и зверьках циркулируют боррелии видов *B. garinii* и *B. afzelii*. Сравнение полученных последовательностей ДНК с опубликованными ранее показало, что для отнесённых к одному виду последовательностей межгенного спейсера ДНК боррелий уровень гомологии варьирует от 96 до 99% (рис. 1).

Помимо *B. afzelii* подгруппы VS461, широко распространенной в природных очагах иксодовых клещевых боррелиозов, на обследованной территории встречается *B. afzelii* подгруппы NT28, впервые детектированная в Японии Масузава с соавторами [13]. Позднее показано, что подгруппа NT28 вида *B. afzelii* широко распространена на территории России и сопредельных стран [8]. Основные отличия, характеризующие генетическую подгруппу этого вида, выявлены между 94-98 нуклеотидами. для проведения внутривидовой дифференцировки данного вида *B. afzelii* возможно использовать только определение нуклеотидных последовательностей локуса. В обследованном регионе ДНК *B. afzelii* подгруппы NT28 зафиксирована в образцах клещей и крови мелких млекопитающих (табл.1).

Таблица 1

Встречаемость ДНК *B. burgdorferi* s.l. в клещах *I. persulcatus* и мелких млекопитающих, отловленных на Северном Урале

Источник ДНК	<i>B. garinii</i> NT 29	<i>B. garinii</i> 20047	<i>B. afzelii</i> VS461	<i>B. afzelii</i> NT28	<i>B. afzelii</i> + NT 29	<i>B. afzelii</i> + 20047	нетипичные
Живые голодные имаго таежного клеща	17	5	8	2	1	1	1
Изоляты боррелий	5	2	2	-	-	-	1
Кровь мелких млекопитающих	3	0	3	3	0	0	1
Всего	25	7	13	5	1	1	3

На обследованной территории устойчиво встречаются боррелии двух генетических подгрупп вида *B. garinii*: NT29 и 20047. Данные генетические подгруппы широко распространены в природных очагах ИКБ на территории России. Известно, что лесных клещах (*Ixodes*

*ricinus*) *B. garinii* подгруппы NT29 не выявлена [13]. В ходе исследования нами выявлены два ранее не встречавшихся варианта последовательности ДНК межгенного спейсера *B. garinii* подгруппы 20047.

*B. a.* VS461 CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTATTTTATACTTTAAACCTTGAATTTATTTTAAATGTTTATAT-----TATTG-----AAT  
*B. a.* NT28 CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTATTTTATACTTTAAACCTTGAATTTATTTTAAAT-TTTATAT-----TATTG-----AAT  
**NU06Rut05** CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTATTTTATACTTTAAACCTTGAATTTATTTTAAAT-TTTATAT-----TATTG-----AAT  
**NU74Glar05** CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTATTTTATACTTTAAACCTTGAATTTATTTTAAATGTTTATAT-----TATTG-----AAT  
*B. g.* Chyl3p CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTGTTTTATACTTTAAACATTGATTTTATTTTTTA-----TAT-----TATTG-----AAT  
**NU22Rut05** CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTGTTTTATACTTTAAACATTGATTTTATTTTTTA-----TAT-----TATTG-----AAT  
*B. g.* NT29 CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTATTTTATACTTTAAACATTGATTTTATTTTTATGTTTTAGATGTTTCATGTTTTG-----AAT  
**NU81m05** CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTATTTTATACTTTAAACATTGATTTTATTTTTATGTTTTAGATGTTTCATGTTTTG-----AAT  
*B. g.* 20047 CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTGTTTTATACTTTAAACATTGATTTTATTTTTATGTTTTAGATGTTTCATGTTTTG-----AAT  
**NU04m07** CTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTATTGCCAGGGTTTTGTTTTATACTTTAAACATTGATTTTATTTTTATGTTTTAGATGTTTCATGTTTTG-----AAT

*B. a.* VS461 AAAACATTCAAAATAATAAAAAATAATATATATAT--TGACATGGATTTAAACAAAGATATATATTTCTATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGATGGAAGATAAAAAAT  
**NU06Rut05** **GTTTT**ATAATAATAATAAAAAATAATATATATAT--TGACATGGATTTAAACAAAGATATATATTTCTATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGATGGAAGATAAAAAAT  
**NU74Glar05** **GTTTT**ATTCAAAATAATAATAAAAAATAATATATATAT--TGACATGGATTTAAACAAAGATATATATTTCTATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGATGGAAGATAAAAAAT  
*B. g.* Chyl3p AAAACATTCAAA--AACATAAAAAATAAAATATATAT--TGACATGGATTTAAACAAAGATATATATTTCTATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGATGGAAGATAAAAAAT  
**NU22Rut05** AAAACATTCAAA--AACATAAAAAATAAAATATATAT--TGACATGGATTTAAACAAAGATATATATTTCTATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGATGGAAGATAAAAAAT  
*B. g.* NT29 GTTTTATTCAAAATAATAATAAAAAATAAAATATATAT--TGACATGGATTTAAACAAAGATATATATTTCTATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGATGGAAGATAAAAAAT  
**NU81m05** GTTTTATTCAAAATAATAATAAAAAATAAAATATATAT--TGACATGGATTTAAACAAAGATATATATTTCTATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGATGGAAGATAAAAAAT  
*B. g.* 20047 GTTTTATTCAAAATAATAATAAAAAATAAAATATATAT--TGACATGGATTTAAACAAAGATATATATTTCTATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGATGGAAGATAAAAAAT  
**NU81m05** GTTTTATTCAAAATAATAATAAAAAATAAAATATATAT--TGACATGGATTTAAACAAAGATATATATTTCTATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGATGGAAGATAAAAAAT

*B. a.* VS461 ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA  
*B. a.* NT28 ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA  
**NU06Rut05** ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA  
**NU74Glar05** ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA  
*B. g.* Chyl3p ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA  
**NU22Rut05** ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA  
*B. g.* NT29 ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA  
**NU81m05** ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA  
*B. g.* 20047 ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA  
**NU04m07** ATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGA

Рис. 1. Сравнение нуклеотидных последовательностей межгенного спейсера 5S-23S рРНК видов *B. garinii* и *B. afzelii*

Сокращения: *B. a.* - *B. afzelii*, *B. g.* - *B. garinii*. Жирным шрифтом отмечены последовательности, полученные в данной работе и инсерция АТ. Жирным и подчеркнутым шрифтом выделены – GTTTT мотив в последовательностях *B. afzelii*. Серым фоном выделены сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции *MseI*, подчеркнут дополнительный сайт узнавания и делеция ТА.

В сравнении с последовательностями типового штамма *B. garinii* 20047 в одном случае зафиксирована делеция двух нуклеотидов (ТА), в другом - инсерция пары нуклеотидов (ТА). Сравнительный анализ последовательности ДНК, содержащей инсерцию, с имеющимися в GenBank выявил две аналогичные последовательности межгенного спейсера боррелий (AY772203, AY772202). Данные боррелии изолированы от клещей *Ixodes pavlovskiyi*, отловленных на территории Казахстана [14].

У мелких млекопитающих – группы участвующей в прокормлении всех фаз развития таежного клеща, ДНК *B. garinii* подгруппы NT29 выявлена с той же частотой, что и генетические группы вида *B. afzelii*.

В 2006 г. проведена изоляция боррелий от годовых имаго таежных клещей на среде BSK-H. Проанализировано 260 клещей, получено 11 изолятов. В 10 случаях выявлены виды: *B. afzelii* и *B. garinii*. Дополнительный анализ изолята с праймерами к фрагментам генов *r66*, *glpQ* и *16S rРНК* (в печати) показал, что он принадлежит виду *Borrelia miyamotoi*. Впервые боррелии *B. miyamotoi* изолированы в 1995 г. из таежных клещей в Японии (Fukunaga et al., 1995). Результаты целого ряда исследований [15-19], показали их генетическую близость боррелиям группы клещевых возвратных лихорадок (КВЛ), как известно, переносимых клещами семейства *Argasidae*. Позже *B. miyamotoi* зафиксирована в клещах *Ixodes ricinus* (L. 1758), *Ixodes pacificus* (Cooley et Kohls, 1943) и *Ixodes scapularis* (Say, 1821) [20; 21]. При дальнейшем пересеве полученный изолят утратил ростовые свойства.

Таким образом, в природных очагах ИКБ, расположенных на территории Новосибирской области, нами 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. Сравнительный анализ с литературными данными показал, что генетическая гетероген-

ность боррелий, циркулирующих на северной границе распространения таежного клеща не ниже, чем это выявлено для территорий с более благоприятными условиями существования таежных клещей. в частности, для природных очагов Среднего Предуралья [22-24].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Korenberg E.I., Gorelova N.B., Kovalevskii Y.V. Ecology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Russia // In: Lyme borreliosis: Biology, epidemiology and control (Gray J., Kahl O., Lane R.S., Stanek G. eds.).- CAB International, 2002.- P. 175-200.
2. Uspensky E.J., Garruto R.M., Goldfarb L. The taiga tick *Ixodes persulcatus* (Acari: Ixodidae) in the Skha Republic (Yakutia) of Russia: distributional and reproductive ranges // J. Med. Entomol. – 2003. – 40 (1). P. 119-122.
3. Ливанова Н.Н., Рар В.А., Ливанов С.Г., Иголкина Я.П. Разнообразие паразитарных систем с участием мелких млекопитающих и *Ixodes persulcatus* на Северном Урале // Сибирский экологический журнал. 2005.- Т. 10, № 5, С. 1079-1084.
4. Ливанова Н.Н., Ливанов С.Г. Численность и распределение *Ixodes persulcatus* Schulze близ северной границы его распространения на Урале // Паразитология. 2006. - Т. 40, № 4. – С. 396-399.
5. Ткачев С.Е., Ливанова Н.Н., Ливанов С.Г. Исследование генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита сибирского генетического типа, выявленного в клещах *Ixodes persulcatus* на Северном Урале в 2006 году // Бюллетень СО РАМН. 2007, - №4. С. 49-52.
6. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., Kozlova I.V., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Tkachev S.E., Ivanov L.I. Prevalence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals from different regions of the Asian part of Russia // Int. J. Med. Microbiol., 2008, V. 298. P. 222-230.
7. Коренберг Э.И. Инфекции группы Лайм боррелиоза – иксодовые клещевые борре-

- лиозы в России / Э.И.Коренберг // Мед. паразитол. – 1996. - №3. – С. 14-18.
8. Коренберг Э.И. Иксодовые клещевые боррелиозы как группа заболеваний человека и главные итоги ее изучения в России / Э.И.Коренберг // Журнал инф. патол. – 1997. - №2-3. – С. 22-24.
  9. Barbour A.G., Maupin G.O., Teltow G.J., Carter C.J., Piesman J., 1996. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. *J. Infect. Dis.* 173: 403-409.
  10. Fomenko, N.V., Livanova, N.N., Chernousova, N.Y., 2008. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in natural foci of Novosibirsk region. *IJMM*. 298. Supplement 1, 139-148.
  11. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495-503.
  12. Фоменко Н.В., Ливанова Н.Н., Романова Е.В., Караваева Ю.Ю., Панов В.В., Черноусова Н.Я. Выявление видового состава возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов в Новосибирской области // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. -№ 7. – С. 22-28.
  13. 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.
  14. Фоменко Н.В. Сабитова Ю.В., Хаснатинов М.А. Гольцова Н.А., Данчинова Г.А., Амбед Д., Стронин О.В. Гетерогенность гена *r83* боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* sensu lato . Мол. генетика и микробиология вирусология. 2007. 4. С.3137.
  15. Fukunaga M, Hamase A., Okada K., Inoue H., Tsuruta Y., Miyamoto K., Nakao M. Characterization of spirochetes isolated from ticks (*Ixodes tanuki*, *Ixodes turdus*, and *Ixodes columnae*) and comparison of the sequences with those of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996b. V. 62. P. 2338-2344.
  16. Fukunaga, M., Takahashi, Y., Tsuruta, Y., Matsushita, O., Ralph, D., McClelland, M., Nakao, M., 1995a. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45. 804–810.
  17. Fukunaga M, Koreki Y. 1995b. The flagellin gene of *Borrelia miyamotoi* sp. nov. and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species. *FEMS Microbiol Lett.* 134, 255-258.
  18. Fukunaga, M., Okada, K., Nakao, M., Konishi, T., Sato, Y., 1996a. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 898–905
  19. Fraenkel, C., Garpino, U., Berglund, J., 2002. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3308–3312.
  20. 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
  21. 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.
  22. Фадеева И.А., Коренберг Э.И., Нефедова В.В. и др. Генетическая гетерогенность *Borrelia afzelii* в природных очагах на Среднем Урале // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. 2006. № 3. С. 27-30.
  23. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Фадеева И.А. Генетическая характеристика патогенных для человека боррелий, изолированных от клещей *Ixodes trianguliceps* Bir. и *Ixodes pavlovskyi* Pom // Ме. паразитол. 2005. №2. С.9-12.