

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА

Академик *И. Тодераш*¹, научный сотрудник *А. Мовилэ*¹, Ph.D. *Л. Герн*², докторант *А. Гэтеуд*³, Ph.D. *В. Доует*², профессор медицины *Д. Раульт*⁴, профессор эпидемиологии *Д. Фиш*³

1 – Центр общей и молекулярной биологии, Институт Зоологии АН Молдова

2 – Лаборатория эко-эпидемиологии, Университет Нойшатель, Швейцария

3 – Департамент эпидемиологии и здоровья населения, Йельский университет, США

4 – Марсельский университет медицины, Франция

Введение

В последнее время, сообщается о выявлении на территории Европы сочетанных полиморфных клещевых очагов, в которых циркулирует до семи различных патогенов человека [1, 8]. Спирохеты *Borrelia burgdorferi sensu lato*, Грам-отрицательные внутриклеточные риккетсиоподобные микроорганизмы родов *Ehrlichia*, *Anaplasma* и пироплазмиды *Babesia* sp. являются наиболее распространёнными патогенами, передающимися иксодовыми клещами [1].

В настоящее время, для диагностики разнообразия очагов различных зоонозов широко используется молекулярное маркирование, основанное на различных вариациях полимеразной цепной реакции (PCR), которое заключается в выявлении специфических последовательностей ДНК.

Комплексное молекулярное маркирование иксодовых клещей, патогенных микроорганизмов и позвоночных хозяев в клещевых очагах на территории Республики Молдова ранее не проводилось. Подавляющее число исследова-

ний относится к определению присутствия *B. burgdorferi* s.l. в клещах без детальной геномной спецификации и выполнены на феноменологическом уровне [2, 4].

Материал и методы

Для молекулярно-биологических тестов были использованы иксодовые клещи собранные в стационарных очагах (урбаноценоз Кишинэу, зона отдыха Вадул луй Водэ, заповедники «Codri» и «Pădurea Domnească») в течении 2005 – 2007 гг.

Молекулярно-генетический скрининг патогенных микроорганизмов:

а) Выявление *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Диагностика всего видового комплекса осуществлялась протоколом Коси et al. [6] для basic PCR, с молекулярным маркером 5S-23S рДНК и nested PCR участка 16S-23S рДНК по Liveris et al. [7]. Генотайпинг видов *B. burgdorferi* s.l. осуществлялся методами PCR-RFLP с использованием рестриктазы *MsuI* [9], PCR- Reverse Line Blot (RLB) по методу Poupon et al.[10].

а) Выявление *Ehrlichia/Anaplasma* sp. Для тестирования был использован протокол Basic PCR амплифицирующий фрагмент 420 п.о. гена 16S рДНК с последующим сиквенированием.

б) Выявление пироплазмид *Babesia* sp. Выявление *Babesia* sp. осуществлялось по генетическому маркеру 18S рДНК. Видовой генотайпинг бабезий проводился методом RLB с видоспецифическими олигонуклеотидами для *B. microti*, *B. divergens*, *B. bovis*, *B. sp EU1.*, *B. odocoiei*.

Определение ДНК позвоночных хозяев в организме иксодовых клещей. Метод «blood meal host DNA» проводился PCR-RLB с использованием универсальной пары праймеров для большинства членов надкласса Tetrapoda (за исключением класса Amphibia), амплифицирующий 12S рДНК с последующей гибридизацией ампликонов иммобилизованных на биотинной мембране с видоспецифическими олигонуклеотидами [3].

Секвенирование ПЦР продуктов. Очистка ПЦР продуктов проводилась на MiniElute PCR Purification Plate (Qiagen, Valencia, CA). Реакции проводились на автоматизированном сиквенаторе Applied Biosystem с использованием Big Dye termination cycle 1.0 kit.

Методы биоинформатики. Нуклеотидное выравнивание секвенированных участков ДНК, проведение BLAST анализа, расчёт эволюционных изменений нуклеотидных последовательностей генетических макромолекул по двух-параметрическому методу Кимуры проводились при помощи компьютерного софта MEGA 3.1.

Результаты

Сравнение генетического разнообразия боррелий, анаплазм/эрлихий и позвоночных хозяев в разных очагах Молдовы выявило существенные различия в формировании и функционировании клещевых очагов.

В целом по территории Республики Молдова отмечено высокое присутствие (23%), по сравнению с другими патогенами передающимися иксодовыми клещами, пироплазмид вида *Babesia* sp. Видовой генотайпинг показал, что на территории Республики Молдова обитают три вида бабезий: *B. microti*, *B. divergens*, *B. bovis*. *B. microti* была выявлена только в нимфах и самцах клещей, а *B. divergens* - во всех стадиях развития, а *B. bovis* - только в имаго.

Территория урбаноценоза Кишинэу. Нами отмечено присутствие ДНК пяти геновидов боррелий (Таблица 1), при доминировании *B. garinii* (39,3%) и *B. afzelii* (32,3%). Фоновый геновид - *B. lusitaniae* (16,1%). Генотайпинг группы *Anaplasma/Ehrlichia* выявил присутствие только *A. phagocytophilum* в 9% из исследованных клещей. Число микст-инфекций клещей составило 2,5% в следующей комбинации: *A. phagocytophilum* и *B. afzelii* - 3%, *B. lusitaniae/A. phagocytophilum* и *B. valasiana/A. phagocytophilum* - 1% заражения. Проведенные тесты на присутствие ДНК хозяев в организме клещей выявили, что основными прокормителями личинок и нимф клещей на 63% являются птицы, 35% - мелкие млекопитающие, 2% - ящерицы. В прокормлении личинок и нимф участвуют 4 вида мелких млекопитающих: *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* и *Clethrionomys glareolus*. Среди птиц основную роль играют *Garrulus glandarius*, *Erithacus rubecula* и *Passer domesticus*. Имагинальная фаза развития питается на коровах (*Bos taurus taurus*), собаках (*Canis lupus familiaris*) и овцах (*Ovis orientalis aries*).

Таблица 1
Результаты генотайпинга видового комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l. на различных территориях в период 2005-2007 гг.

Точки сбора	Идентифицированные геновиды боррелий, %						
	<i>B.b.</i> s.s.	<i>B.g.</i>	<i>B.</i> <i>afz</i>	<i>B.</i> <i>vs</i>	<i>B.</i> <i>lust</i>	<i>B.b.</i> s.l.	Mix
Кишинэу	3,6	39,3	32,1	16,1	8,9	-	-
Вадуллуй Водэ	10	-	70	-	10	10	-
«Codri»	7,7	7,7	-	38,5	30,7	7,7	7,7
«Pădurea Domnească»	-	14,3	38,1	9,5	28,6	9,5	-
Всего	7,1	20,4	46,7	21,4	19,6	9,1	7,7

Территория зоны отдыха Вадуллуй Водэ.

На территории зон отдыха Вадуллуй Водэ выявлено присутствие трёх геновидов боррелий: *B. afzelii* (70%), *B. burgdorferi* s.s. (10%) и *B. lusitaniae* (10%). В 10% случаев ДНК не была определена до геновида. Нами не было зарегистрировано наличие *Anaplasma/Ehrlichia*. Основную роль в прокормлении предимагинальных стадий развития клещей играют: птицы (*Passer domesticus* и *Sturnus vulgaris*) - 25%, мелкие млекопитающие (*A. agrarius*, *A. flavicollis* и *Cl. glareolus*) - 65%, ящерицы (*Lacerta* sp.) - 10%. Тестирование имаго клещей в присутствии ДНК позвоночных выявило такой же спектр прокормителей, как и для урбаноценоза Кишинэу.

Полученные данные опровергают гипотезу о поддержании очагов Лайм боррелиоза на данной территории птицами. Однако, по данным различных авторов [5, 10], эти хозяева играют значительную роль в прокормлении иксодовых клещей *I. ricinus*.

В то же время, проанализированный коллекционный материал клещей *I. lividus* (собранных в 1980-90-е гг.) - облигатного эктопаразита ласточек береговушек (*Riparia riparia*), впервые выявил присутствие ДНК двух геновидов боррелий: *B. burgdorferi* s.s. и *B. garinii* в этом виде клеща. Учитывая тот факт, что в заброшенных гнездах ласточек береговушек могут гнездиться другие виды птиц, являющиеся прокормителями *I. ricinus* - основного переносчика боррелий, не исключено, что вследствие антропогенной трансформации среды произошла смена видов-доминантов боррелий.

Таким образом, вопрос о значении разных видов позвоночных хозяев в поддержании очагов боррелиоза на данной территории остаётся открытым.

Территория заповедника «Codri». Генотайпинг боррелий выявил присутствие на данной территории 4 геновидов при ярком доминировании *B. valasiana* (38,5%) и *B. lusitaniae* (30,7%). Интересно отметить полное отсутствие геновида *B. afzelii*, доминирующего в пределах Республики Молдовы, на территории заповедника «Codri». *Anaplasma/Ehrlichia* были выявлены в 16,4%: 10,3% - *A. phagocytophilum* и 6,1% - *Candidatus N. massiliensis*. Микст-инфекция *B. garinii* и *B. valasiana* диагностировалась в 7,7% случаев.

Наши результаты свидетельствуют о том, что основная роль в прокормлении предимагинальных стадий развития принадлежит птицам

(*Turdus merula* и *Erithacus rubecula* и *Fringilla* sp.). В 90% случаев полученные сиквенированные последовательности ДНК соответствовали риботипу *B. garinii* 20047, который преобладает в энзоотическом цикле птиц. Роль грызунов на этой территории, как резервуаров боррелий, незначительна – 10%. Среди мелких млекопитающих в прокормлении личинок и нимф участвуют *A. sylvaticus* и *Cl. glareolus*. ДНК тесты выявили, что имаго питается на *Vulpes vulpes* (35%), *Sus scrofa* (35%), *Meles meles* (25%) и *Capreolus capreolus* (5%).

Территория заповедника «Pădurea Domnească». На территории заповедника «Pădurea Domnească» циркулируют четыре геновида боррелий, при ярком доминировании *B. afzelii* (38.1%). Отмечено отсутствие *B. burgdorferi* s.s., *A. phagocytophilum* и *Candidatus N. massilliensis* регистрировали в 0.3% и 6.4% случаев, соответственно.

На данной территории основную роль в поддержании энзоотического цикла играют мелкие млекопитающие (*Cl. glareolus*, *A. flavicollis* и *A. agrarius*) и пресмыкающиеся (*Lacerta* sp.). В прокормлении имаго участвуют тот же круг прокормителей, что и в заповеднике «Codri».

В то же время не исключена значительная роль в прокормлении иксодовых клещей зайцев и ежей, однако ДНК этих животных не было обнаружено в организме иксодовых клещей, что требует дальнейшего изучения.

Заключение

Проведённое молекулярно-биологическое маркирование очагов иксодовых клещей *I. ricinus* выявило наличие в организме переносчиков трёх групп патогенов, возбудителей бабезиоза, различных форм клещевого боррелиоза и гранулоцитарного анаплазмоза человека, а также был выявлен круг позвоночных животных – прокормителей иксодовых клещей и резервуаров патогенных микроорганизмов.

Благодарности

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке грантов АŞМ 30ind, АНМ-РФФИ 06-04-90814 Mol_a, INTAS-ASM 4748 и MRDA-CRDF MTFP Follow On 016/05.

Библиография

1. Алексеев А. Н., Дубинина Е. В. Мониторинг состояния систем «клещи-микроорганизмы» в составе биоты под влиянием вариаций антропогенного пресса// Мониторинг биоразнообразия. – М., 1997. – С.195-201.
2. Конавалов Ю. Н., Спасский А.А., Ерхан Д. К., Руссу С. Ф. Проблема пироплазмидозов и анаплазмозов в Республике Молдова // Ecologia, Evoluția și Ocrotirea Diversității Regnului Animal și Vegetal. Chişinău, 2003 – P. 199 – 205.
3. Francisca M. Cadenas, Olivier Rais, Pierre-Francois Humair, Veronique Douet, Jacqueline Moret, Lise Gern Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a north- and south-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. // Journal of Medical Entomology, 2007, 44, – P. 683 - 693.
4. Gheorgița Stela. Considerații la optimizarea supravegherii epidemiologice în borelioza Lyme. // autoreferat al tezei de doctor în medicină. Chişinau, 2007 – 19 p.
5. Hanincová K., Schafer S.M., Etti S., Sewell H.S., Taragelová V., Žiak D. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe // Parasitol., 2002, 126, - P. 11–20.
6. Koci J., Movila A., Taragel'ova V., Toderas I., Uspenskaia I., Derdakova M., Labuda M. First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. // Exp. Appl. Acarol., 2007, 41., – P. 147–152.
7. Liveris D., Varde S., Iyer R., Koenig S., Bittker S., Cooper D., McKenna D., Nowakowski J., Nadelman R.B., Wormser G.P., Schwaertz I. Genetic Diversity of *Borrelia burgdorferi* in Lyme Disease Patients as Determined by Culture versus Direct PCR with Clinical Specimens. // J. Clinical Microbiology. 1999, - P. 565–569.
8. Pichon B., Godfroid E., Hoyois B., Rodhain F., Perez-Eid C. Simultaneous infection of *Ixodes ricinus* nymphs by two *Borrelia burgdorferi* sensu lato species: possible implications for clinical manifestations // Emerg. Infect. Dis., 1995., 1., – P. 89-90.
9. Postic D., Assous M.V., Grimont P.A.D., Baranton G. 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., 44., – P.743-752.
10. Poupon, M-A., Lommano, E., Humair, P-F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., Jenni L., Gern, L. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Ticks Collected from Migratory Birds in Switzerland. // Appl. Env. Microbiology, 2006, 72, P. 976–976.