

А.В. Морозов, Ю.В. Ковалевский, Э.И. Коренберг, Н.Б. Горелова, Л.А. Подлесный

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *BABESIA MICROTI* У МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИРОДНОГО ОЧАГА НА СРЕДНЕМ УРАЛЕ

ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (Москва)

Изучена широта распространения *Babesia microti* среди семи различных видов (*Clethrionomus gleriolis*, *Clethrionomus rutilus*, *Clethrionomus rufocanus*, *Microtus oeconomus*, *Sorex araneus*, *Apodemus uralensis*, *Sorex caecutiens*) мелких млекопитающих (всего 92 зверька), отловленных на территории одного природного очага в Пермском крае в 2006 г. У представителей каждого из семи видов зверьков обнаружены последовательности ДНК *Babesia microti*. Из результатов проведенной работы можно сделать предварительный вывод о том, что все 7 проанализированных видов мелких млекопитающих вовлечены в циркуляцию возбудителя бабезиоза человека в природе, т.е. находятся с ним в постоянном контакте.

Ключевые слова: бабезиоз, резервуарные хозяева, Пермский край

PRELIMINARY RESULTS OF *BABESIA MICROTI* DNA DETECTION IN SMALL MAMMALS INHABITING NATURAL FOCI IN MIDDLE URAL

A.V. Morozov, U.V. Kovalevsky, E.I. Korenberg, N.B. Gorelova, L.A. Podlesniy

N.F. Gamaleya's State Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

We studied spread of *Babesia microti* infection in small rodents (92 totally), representing 7 different species (*Clethrionomus gleriolis*, *Clethrionomus rutilus*, *Clethrionomus rufocanus*, *Microtus oeconomus*, *Sorex araneus*, *Apodemus uralensis*, *Sorex caecutiens*), caught on the territory of one natural foci in Perm region in 2006. We discovered *B. microti*-positive samples in every specie we tested. As a conclusion we suppose that all the species that were analyzed are involved in circulation of *B. microti* in nature, e.g. are in constant contact with it.

Key words: babesiosis, reservoir owner, Perm region

ВВЕДЕНИЕ

Бабезиоз вызывается внутриэритроцитарными паразитами — бабезиями, относящимися к роду *Babesia* отряда *Piroplasmida*, передающимися через укус клеща. Известно два вида бабезий патогенных для человека — *Babesia microti* и *Babesia divergens*. Основные резервуарные хозяева бабезий в природе — различные виды мелких млекопитающих, а переносчики — иксодовые клещи. *B. microti* распространена на территории США, Европы и Юго-Восточной Азии; *B. divergens* встречается в Европе [5–7, 9, 10–14]. В России *B. microti* впервые была обнаружена в 2002 г. у рыжих полевков (*Clethrionomys glareolus*) в Пермском крае [1]. Позднее ДНК *B. microti* обнаружена у мелких млекопитающих 4 видов на Северном Урале [3] и у таежных клещей (*Ixodes persulcatus*) в Ленинградской области [4]. Этими сведениями пока исчерпывается информация о природной очаговости бабезиоза в России.

В данной работе приведены предварительные результаты оценки распространения *B. microti* среди мелких млекопитающих различных видов в том самом природном очаге, где этот возбудитель впервые обнаружен в нашей стране [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования получен летом 2006 г. в лесном массиве низкогорий Среднего

Урала (Чусовской район Пермского края). Эта территория, ее фауна мелких млекопитающих и иксодовых клещей подробно описаны ранее в связи с изучением биоценотической структуры природных очагов иксодовых клещевых боррелиозов. Основу населения мелких млекопитающих в этой местности составляют рыжая (*Cl. glareolus*), красная (*Cl. rutilus*) и красно-серая (*Cl. rufocanus*) полевки, обыкновенная (*Sorex araneus*) и средняя (*S. caecutiens*) бурозубки. Кроме того, встречаются мелкие млекопитающие еще 12 видов, среди которых заметное место в их населении принадлежит полевке-экономке (*Microtus oeconomus*) и малой лесной мыши (*Apodemus uralensis*). Разные виды этих грызунов и насекомыхядных в большей или меньшей степени обеспечивают прокормление предимагинальных фаз клеща *I. persulcatus*, а также различных фаз клеща *I. trianguliceps* [2].

Зверьков отлавливали живоловками, усыпляли эфиром и брали кровь из сердца на фильтровальную бумагу. Образцы крови хранили при –70 °С. Для данного исследования были отобраны 92 образца крови в основном от перезимовавших животных 7 видов.

Образцы крови помещали в 1 мл нагретого до комнатной температуры фосфатно-солевого буфера (150 mM NaCl, 50 mM (K₂HPO₄, KH₂PO₄)). Затем отбирали фракцию крови, содержащую эритроциты и 100 мкл этой фракции использовали для выделения ДНК с помощью набора «Про-

Таблица 1

Наименования использованных праймеров и соответствующие последовательности нуклеотидов

Название	Последовательность праймера
Bab 1a	CTT AGT ATA AGC TTT TAT ACA GC
Bab 4b	ATA GGT CAG AAA CTT GAA TGA TAC A
Bab 2c	GTT ATA GTT TAT TTG ATG TTC GTT T
Bab 4d	AAG CCA TGC GAT TCG CTA AT

ба-НК» (ДНК-Технология, Россия) согласно протоколу фирмы-производителя.

Поиск ДНК бабезий в образцах крови был осуществлен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метода двухраундовой («nested») ПЦР с праймерами, которые были подобраны [12] специально для поиска последовательности фрагмента консервативного участка (237 п.о.) гена 18S рРНК *B. microti*. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в таблице 1. Праймеры Bab1a и Bab4b использовали при первом раунде ПЦР, а праймеры Bab3d и Bab2c — при втором.

Полученные ампликоны были секвенированы. Для этого их выделяли из агарозы, используя набор колонок (Millipore США). Очищенные ампликоны секвенированы с помощью набора ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.2.0 (Applied Biosystems, США) и проанализированы на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, США).

Анализ нуклеотидных последовательностей проведен с помощью пакета программ DNA Star 6.0 (Lasergene, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В общей сложности в 26 образцах крови (28 % от числа тестированных) обнаружена ДНК *B. microti*. Из 32 исследованных *Cl. glareolus* положительными оказались 15 (около 47 %), а из 27 *Cl. rutilus* — только 3 (около 11 %). ДНК *B. microti* выявлена также в крови 2 из 4 исследованных *Cl. rufocanus*, 2 из 8 *S. araneus*, 1 из 5 *S. caecutiens*, 2 из 6 *M. oeconomus* и у 1 из 10 тестированных зверьков *A. uralensis*.

Таким образом, в проанализированной нами крови всех 7 видов мелких млекопитающих обнаружена ДНК *B. microti*. Наши предварительные данные не дают возможности достоверно судить о значении каждого из них в эпизоотологии бабезиоза. Тем не менее, они, несомненно, свидетельствуют об интенсивной циркуляции *B. microti* в описываемом природном очаге, в которую, видимо, могут быть вовлечены мышевидные грызуны и насекомоядные различных видов. Наиболее важная роль в поддержании эпизоотии бабезиоза, по всей видимости, принадлежит *Cl. glareolus*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 07-04-00286-а)

ЛИТЕРАТУРА

1. Выявление в России природных очагов бабезиоза и гранулоцитарного эрлихиоза / S.R. Telford III, Э.И. Коренберг, Н.К. Goethert и др. // Журн. микробиол. — 2002. — № 6. — С. 21–25.
2. Ковалевский Ю.В. Многолетняя динамика эпизоотического процесса природных очагов иксодовых клещей боррелиозов в горнотаетных лесах Среднего Урала / Ю.В. Ковалевский, Э.И. Коренберг, Н.Б. Горелова // Паразитология. — 2004. — № 38 (2). — С. 105–121.
3. Разнообразие паразитарных систем с участием мелких млекопитающих и *Ixodes persulcatus* Shculze на Северном Урале / Н.Н. Ливанова, В.А. Пар, С.Г. Ливанов и др. // Сиб. экол. журн. — 2005. — № 6. — С. 1079–1084.
4. Alekseev A.N. Evidence of *Babesia microti* infection in multi-infected *Ixodes persulcatus* ticks in Russia / A.N. Alekseev, A.V. Semenov, H.V. Dubinina // Exp. Appl. Acarol. — 2003. — Vol. 29. — P. 345–353.
5. *Babesia microti* and *Borrelia bissetii* transmission by *Ixodes spinipapis* ticks among prairie voles, *Microtus ochrogaster* in Colorado / T.R. Burkot, B.S. Schneider, N.J. Pieniazek et al. // Parasitology. — 2000. — Vol. 121. — P. 595–599.
6. *Babesia microti*-Like Parasites Detected in Feral Raccoons (*Procyon lotor*) Captured in Hokkaido, Japan / T. Kawabuchi, M. Tsuji, A. Sado et al. // J. Vet. Med. Sci. — 2005. — Vol. 67 (8). — P. 825–827.
7. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction / D.H. Persing, D. Mathiesen, W.F. Marshall et al. // J. Clin. Microbiol. — 1992. — Vol. 30. — P. 2097–2103.
8. Detection of *Babesia microti*-like Parasite in Filter Paper-Absorbed Blood of Wild Rodents / T. Okabayashi, J. Hagiya, M. Tsuji et al. // J. Vet. Med. Sci. — 2002. — Vol. 64 (2). — P. 145–147.
9. Duh D. Diversity of *Babesia* Infecting European Sheep Ticks (*Ixodes ricinus*) / D. Duh, M. Petrovec, T. Avsic-Zupanc // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39 (9). — P. 3395–3397.
10. Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in Northeastern Eurasia and geographic diversity in the β -tubulin gene sequence / A. Zamoto, M. Tsuji, Q. Wei et al. // J. Vet. Med. Sci. — 2004. — Vol. 66 (7). — P. 785–792.
11. Healy G.R. Human babesiosis: reservoir of infection on Nantucket Island / G.R. Healy, A. Spielman, N. Gleason // Science. — 1976. — Vol. 192. — P. 479–480.

12. Identification of a New Type of *Babesia* Species in Wild Rats (*Bandicota indica*) in Chang Mai Province, Thailand / A. Dantracool, P. Somboon, T. Hashimoto et al. // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42 (2). — P. 850—854.

13. Splenomegaly and reticulocytosis caused by *Babesia microti* infections in natural populations of the

montane vole, *Microtus montanus* / R.A. Watkins, S.E. Moshier, W.D. O'Dell et al. // J. Protozool. — 1991. — Vol. 38. — P. 573—576.

14. The new data about zoonotic reservoir of *Babesia microti* in small mammals in Poland / G. Karbowski, M. Stanko, L. Rychlik et al. // Acta Parasitologica. — 1999. — Vol. 44. — P. 142—144.