

В.В. Нефедова, Э.И. Коренберг, Н.Б. Горелова, Ю.В. Ковалевский

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ *BORRELIA GARINII* В ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ СРЕДНЕГО УРАЛА

ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (Москва)

Методом секвенирования *rrfA-rrlB* участка 77 изолятов *B. garinii* (одного из возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов), показано, что в природном очаге на Среднем Урале одновременно циркулируют две известные генетические подгруппы (20047 и NT29) и, возможно, одна новая подгруппа этого геновида, чьи представители ранее были обнаружены в Западной Сибири. Эти подгруппы представлены 11 генетическими *rrfA-rrlB*-вариантами, несвязанными с определенным хозяином или переносчиком, что способствует поддержанию генетической гетерогенности популяции *B. garinii* в природном очаге.

Ключевые слова: *Borrelia garinii*, гетерогенность, *rrfA-rrlB*

GENETIC HETEROGENEITY OF *BORRELIA GARINII* IN THE NATURAL FOCUS OF THE MIDDLE URALS

V.V. Nefedova, E.I. Korenberg, N.B. Gorelova, Yu.V. Kovalevskii

N. F. Gamaleya's Research Institute for Epidemiology and Microbiology RAMS, Moscow

As shown by sequence analyses of the *rrf-rrl* intergenic spacer in 77 isolates of *Borrelia garinii* (one of the causative agents of ixodid tick-borne borrelioses - ITBBs), that in the natural focus located in the Middle Urals two different genetic subgroups (20047, NT29) and probably new genetic subgroup *B. garinii*, which simultaneously circulate. These subgroups are represented by 11 genetic variants *rrfA-rrlB* spacer, are not linked with a definite host or vector, which maintains the genetic heterogeneity of *B. garinii* population in the natural focus.

Key words: *Borrelia garinii*, heterogeneity, *rrfA-rrlB*

Патогенные для человека виды *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*), передающиеся иксодовыми клещами комплекса *I. (Ixodes) ricinus/persulcatus*, вызывают самостоятельные заболевания, выделенные в группу иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) или инфекций группы Лайм-боррелиоза [4, 6].

Геновид *B. garinii* представлен двумя подгруппами: 20047 и NT29. Первый из них распространен в природных очагах Евразии с основными переносчиками *I. persulcatus* и *I. ricinus*, а второй (NT29) — практически только в паразитарных системах с основным переносчиком *I. persulcatus*. Теперь эти подгруппы называют евразийской и азиатской [10].

В России практически повсеместно распространены и совместно циркулируют в природных очагах спирохеты *B. afzelii* и *B. garinii*, изолированные от иксодовых клещей *I. persulcatus*, *I. ricinus* и *I. trianguliceps*. *B. garinii* 20047 встречается у всех этих переносчиков, а также у *I. pavlovskyi*; *B. garinii* NT29 — только у *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* [2, 5, 10]. Повсеместно среди мелких млекопитающих распространены те же геновиды и те же варианты боррелий, что и среди иксодовых клещей, причем обе генетические подгруппы как *B. garinii*, так и *B. afzelii*, выделены от трех видов лесных полевок (род *Clethrionomys*) и от полевки-экономки (*Microtus oeconomus*). Тесной связи определенного геновида

боррелий с определенным видом хозяина не наблюдается [1, 3, 5, 10].

Существует мнение, согласно которому во внутренних органах мелких млекопитающих и в их коже персистируют неодинаковые геновиды боррелий. Полагают, в частности, что *B. garinii* присутствуют, главным образом, только во внутренних органах зверьков и не передается питающимися на них клещам, поскольку боррелии этого вида отсутствуют в каждом покрове хозяев. На этом основании делают вывод, что мелкие млекопитающие не являются резервуарными хозяевами *B. garinii* и передают клещам только *B. afzelii* [7]. По нашим данным, накопленным в 1992 — 2003 гг. при изучении природных очагов ИКБ в Пермском крае, подавляющая часть изолятов, полученных из ушных кожных биоптатов зверьков, как и от снятых с них личинок *I. persulcatus*, относилась к циркулирующим здесь подгруппам *B. garinii*. При этом во внутренних органах (мочевой пузырь) боррелии встречались даже несколько реже, нежели в коже. Следовательно, мелкие млекопитающие — хорошие резервуарные хозяева не только *B. afzelii*, но и обеих подгрупп *B. garinii*. Этиологию, эпидемиологию и клинические проявления ИКБ в нашей стране в основном определяют широко распространенные *B. afzelii* и *B. garinii* [10].

Поскольку *B. garinii* широко распространена, циркулирует в различных экосистемах, имеет большой круг резервуарных хозяев и переносчи-

ков, этому геновиду должна быть свойственна определенная популяционная генетическая гетерогенность, так же как и *B. afzelii* [1, 3]. Ранее у *B. garinii* из различных стран, на основании случайной амплификации полиморфной ДНК анализом «отпечатка пальцев» (RAPD fingerprinting analysis) 16S рРНК гена было выявлено 6 RAPD суб-групп, 11 *ospC*-групп, из них 7 — инвазивных [9] и 3 *ospA*-геногруппы [8].

В данной работе приведены результаты изучения по *rrfA-rrlB* спейсеру генотипической структуры популяции *B. garinii*, циркулирующих в подробно описанном ранее [10] природном очаге ИКБ в горнотаежных лесах Среднего Урала (Пермский край).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего исследовано 77 первичных изолятов из музея лаборатории переносчиков инфекций ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (г. Москва). Они были получены в 1992 — 2003 гг. посевом на среду BSK материала от различных фаз развития клещей *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*, а также от шести видов мелких млекопитающих — резервуарных хозяев боррелий. Все изоляты предварительно идентифицированы как *B. garinii* методом полиморфизма длины фрагментов рестрикции [5].

В соответствии с системой, принятой в лаборатории переносчиков инфекций ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, маркировка любого первичного изолята включает его журнальный номер, перед которым указаны первые буквы латинского названия источника изоляции: Ip, Ipl, Ipn — от клеща *I. persulcatus* (соответственно от имаго, личинок и нимф); It, Itl, Itn — от клеща *I. trianguliceps*. Буквенная маркировка изолятов, выделенных из органов мелких млекопитающих, расшифровывается следующим образом: Mo — *Microtus oeconomus*, Cg — *Clethrionomys glareolus*, Crf — *Clethrionomys rufocanus*, Crt — *Clethrionomys rutilus*, Sa — *Sorex araneus*, Sb — *Sicista betulina*.

Работа методически выполнена по аналогии с проведенным ранее исследованием по изучению генетической гетерогенности *B. afzelii* в природных очагах [1, 3]. О гетерогенности генетической группы *B. garinii* в природном очаге Среднего Урала судили по различиям нуклеотидных последовательностей *rrfA-rrlB* участка у изученных изолятов. Размер секвенированного фрагмента спейсерного участка составил 253 п.н. у 66 изолятов, 255 п.н. — у 2 изолятов, 261 п.н. — у 2 и 271 п.н. — у 7. Нуклеотидные последовательности 22 исследованных нами изолятов были депонированы в GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При сравнении между собой полученных нуклеотидных последовательностей установлено, что изученные изоляты *B. garinii* имеют 20 вариаций, вызванных инсерциями нуклеотидов (у 11 изолятов), делецией (у 2 изолятов) и заменами в позициях нуклеотидов, с образованием генетических вариантов по *rrfA-rrlB* межгенному спейсеру. Кроме часто встречающихся последовательностей, характерных

для *B. garinii*, выявлены изоляты с редко встречающимися вариациями последовательностей нуклеотидов спейсера. Таких оказалось 11 изолятов. Из них 5, полученные от личинок *I. persulcatus*, и 1 — от *S. betulina*, имели степень гомологии с нетипичной *B. garinii*, изолированной от *I. persulcatus* в Западной Сибири: 100 % с Nov9906 (EF488986; Новосибирский регион) и 99,6 % с Том 1003 (DQ469901; Томский регион), а 1 изолят от *Cl. glareolus* — 99,6 % с Nov9906 и 99,2 % с Том 1003. Два изолята (Itn, Cg) с инсерцией пары нуклеотидов (AT) имели уровень гомологии 98,0 % с изолятами Ipv-5002 (AY772202) и Ipv-5007 (AY772203) из Казахстана, содержащие аналогичную инсерцию. У двух изолятов (Ipn-1397 и Ipn-2465), чей размер спейсера составил 261 п.н. и степень сходства между собой 99,6 %, обнаружены последовательности нуклеотидов, которые до наших исследований не были представлены в GenBank.

Анализ сходства последовательностей *rrfA-rrlB* спейсера показал, что большая часть исследованных изолятов представляет две описанные ранее геномные подгруппы *B. garinii* 20047 и NT29. Уровень гомологии с типовым штаммом 20047 (L30119) составил 96,9 — 99,6 %, со штаммом NT29 (L30130) — 97,6 — 100 % соответственно. Девять изолятов невозможно было отнести ни к одной из этих подгрупп: их последовательности демонстрировали только 90,8 — 93,5 % и 91,9 — 94,6 % гомологии со штаммами 20047 и NT29.

Исследованные изоляты на дендрограмме группируются в 13 кластеров. Полученные данные позволяют рассматривать совокупность изолятов каждого кластера как внутривидовой генетический вариант *B. garinii*. Среди изолятов Среднего Урала выявлено не менее 11 генетических вариантов этих боррелий.

Оказалось, что 19 изолятов (или 24,7 % от числа исследованных), полученных от всех фаз развития клеща *I. persulcatus* и пяти видов мелких млекопитающих, имеют полную гомологию с NT29, группируются в генетический вариант № 1. Поэтому есть основания предполагать, что именно этот геновариант *B. garinii* чаще других вызывает заболевание ИКБ в регионе наших исследований. 18 изолятов (23,4 % от числа исследованных), выделенные от разных фаз развития *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* и 4 видов полевок, с уровнем гомологии 97,6 % с NT29 и 97,2 % с 20047, образуют второй большой кластер — геновариант № 12. Различные *rrfA-rrlB*-варианты *B. garinii* выявлены во все годы, когда из природного очага удавалось получить значительное число изолятов. Практически в каждом кластере имеются изоляты, выделенные как от основного переносчика клеща *I. persulcatus*, так и от полевок рода *Clethrionomys* — главных резервуарных хозяев боррелий.

Разные фазы развития основного переносчика — клеща *I. persulcatus*, дополнительного переносчика — клеща *I. trianguliceps*, а также фоновые виды мелких млекопитающих оказались зараженными боррелиями нескольких геновариантов. Это говорит о том, что разные геноварианты *B. garinii*



Рис. 1. Дендрограмма UPGMA (MEGA v. 3.1, [11]) 77 исследованных изолятов и 34 представителей *B. garinii* из базы данных EMBL/GenBank/DBJ, построенная на основании сходства нуклеотидных последовательностей *rrfA-rrlB* участка. Указаны маркировка, номера изолятов (пояснения – в тексте) и номера доступа GenBank. Цифры в кружках соответствуют кластерам (геновариантам).

не связаны с каким-либо видом переносчика и резервуарного хозяина. Поэтому резервуарные хозяева определяют генетическую гетерогенность популяции боррелий и их широкое распространение в природном очаге.

Таким образом, наши материалы свидетельствуют о значительном полиморфизме *B. garinii*, циркулирующей в конкретном природном очаге Среднего Урала среди различных видов переносчиков и резервуарных хозяев. В частности, в условиях горнотаежных лесов Пермского края на определенной территории одновременно циркулирует популяция возбудителя ИКБ – *B. garinii*, состоящая из двух генетических подгрупп (NT29 и 20047), каждая из которых включает несколько генетических

вариантов. Кроме того, есть основания полагать, что существует еще одна генетическая подгруппа, что должно быть подтверждено дальнейшими исследованиями.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 07-04-00286) и гранта Президента Российской Федерации государственной поддержки молодых российских ученых МК-4940.2006.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генетическая гетерогенность *Borrelia afzelii* в природном очаге Среднего Урала / И.А. Фадеева, Э.И. Коренберг, В.В. Нефедова, Ю.В. Андрейчук и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2006. – № 3. – С. 27 – 30.

2. Генетическая характеристика патогенных для человека боррелий, изолированных от клещей *Ixodes trianguliceps* Bir. и *Ixodes pavlovskiyi* Pom. / В.В. Нефедова, Э.И. Коренберг, И.А. Фадеева, Н.Б. Горелова // Мед. паразитол. — 2005. — № 2. — С. 9–12.
3. Генетические варианты *Borrelia afzelii* — одного из возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов / И.А. Фадеева, В.В. Нефедова, Э.И. Коренберг, Н.Б. Горелова // Мол. Ген. Микробиол. Вирусол. — 2005. — № 3. — С. 18–22.
4. Коренберг Э.И. Таксономия, филогенетические связи и области формообразования спирохет рода *Borrelia*, передающихся иксодовыми клещами / Э.И. Коренберг // Успехи современной биологии. — 1996. — Т. 116, Вып. 4. — С. 389–406.
5. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighboring countries: high incidence of mixed isolates / D. Postic, E.I. Korenberg, N.B. Gorelova et al. // Res. Microbiol. — 1997. — Vol. 148. — P. 691–702.
6. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis / G. Baranton, D. Postic, I. Saint Girons et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1992. — Vol. 42, N 3. — P. 378–383.
7. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England / K. Kurtenbach, M. Peacey, S.G.T. Rijpkema et al. // Applied Environ. Microbiol. — 1998. — Vol. 64 (4). — P. 1169–1174.
8. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russian Far East / O.Y. Mediannikov, L. Ivanov, N. Zdanovskaya et al. // Microbiol. Immunol. — 2005. — Vol. 49 (3). — P. 191–197.
9. Genetic diversity among *Borrelia* strains determined by single-strand conformation polymorphism analysis of the ospC gene and its association with invasiveness / V. Lagal, D. Postic, E. Ruzic-Sabljić, G. Baranton // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41 (11). — P. 5059–5065.
10. Korenberg E.I. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia / E.I. Korenberg, N.B. Gorelova, Yu.V. Kovalevskii // J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (eds.) Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. — Oxford, CAB International. — 2002. — P. 175–200.
11. Kumar S. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment / S. Kumar, K. Tamura, M. Nei // Briefings in Bioinformatics. — 2004. — Vol. 5. — P. 150–163.
12. Masuzawa T. Terrestrial distribution of the Lyme Borreliosis Agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia // Jpn. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 57. — P. 229–235.
13. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis / G. Wang, A.P. van Dam, L. Spanjaard, J. Dankert // J. Clin. Microbiol. — 1998. — Vol. 36 (3). — P. 768–776.
14. Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland / P.F. Humair, O. Peter, R. Wallich, L. Gern // J. Med. Entomol. — 1995. — Vol. 32. — P. 433–438.