

3. Jiang W., Bonnert T.P., Venugopal K., et al. A single chain antibody fragment expressed in bacteria neutralizes tick-borne flaviviruses // *Virology*. – 1994. – Vol. 200. №1. – P.21-28.

4. Levanov L.N., Matveev L.E., Goncharova E.P., et al. Chimeric antibodies against tick-borne encephalitis virus // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – P.5265-5271.

5. Tsekhanovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., et al. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses

using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype) // *Virus Res.* – 1993. – Vol. 30. №1. – P.1-16.

6. Wang Z., Raifu M., Howard M., et al. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity // *J. Immunol. Methods.* – 2000. – Vol. 233. №1-2. – P.167-177.

Информация об авторах: 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8, тел. (383) 3635157, e-mail: ivan_baykov@mail.ru, tikunova@niboch.nsc.ru, Байков Иван Константинович – инженер; Матвеев Леонид Эдуардович – ведущий инженер; Матвеев Андрей Леонидович – инженер, аспирант; Тикунова Нина Викторовна – зав. лаб., д.б.н., доцент.

© БОНДАРЕНКО Е.И., ТИМОФЕЕВ Д.И., ФОМЕНКО Н.В., ЯКИМЕНКО В.В., ТАНЦЕВ А.К., РАР В.А. – 2012
УДК: 579.61:616-078

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕНОСИМЫХ КЛЕЩАМИ, С ПОМОЩЬЮ ПЦР-АНАЛИЗА С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Евгений Иванович Бондаренко¹, Денис Игоревич Тимофеев¹, Наталия Владимировна Фоменко¹,
Валерий Викторович Якименко², Алексей Константинович Танцев², Вера Александровна Рар³
(¹ЗАО «Вектор-Бест» г. Новосибирск, генеральный директор – М.Д. Хусаинов, лаборатория ПЦР, зав. –
к.б.н. М.К. Иванов; ²Омский НИИ природно-очаговых инфекций, директор – д.м.н., проф. Н.В. Рудаков,
лаборатория арбовирусных инфекций, зав. – д.б.н. В.В. Якименко; ³Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, директор – акад. РАН В.В. Власов, лаборатория
молекулярной микробиологии, зав. – д.б.н. Н.В. Тикунова)

Резюме. Проведен комплексный анализ клещей и образцов крови грызунов с целью выявления патогенов, передающихся клещами: возбудителей иксодового клещевого боррелиоза, гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека, а также вируса клещевого энцефалита и *Borrelia miyamotoi*. Всего с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием наборов серии «Реал-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) исследовано 706 клещей *Ixodes* spp. из Новосибирской области и 111 образцов крови мышевидных грызунов из Омской области. Как в клещах, так и в образцах крови была обнаружена ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, а также РНК вируса клещевого энцефалита. Было показано, что ДНК/РНК хотя бы одного из исследуемых патогенов выявляется в образцах от более 60% клещей и грызунов, при этом наблюдалось одновременное инфицирование клещей и животных двумя, тремя и даже четырьмя возбудителями.

Ключевые слова: инфекции, переносимые клещами; возбудители клещевого энцефалита, иксодовый клещевой боррелиоз, гранулоцитарный анаплазмоз человека, моноцитарный эрлихиоз человека.

A COMPREHENSIVE APPROACH TO REVEALING THE INFECTION CAUSATIVE AGENTS TRANSMITTED BY TICKS USING REAL-TIME PCR

E.I. Bondarenko¹, D.I. Timofeev¹, N.V. Fomenko¹, V.V. Yakimenko², A.K. Tancev², V.A. Rar³
(¹Joint-stock company «Vector-Best», Novosibirsk; ²Omsk Research Institute of Natural Foci Infections, Omsk;
³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk)

Summary. *Ixodes* ticks and the blood samples of small mammals were analyzed for the presence of tick-transmitted agents of following diseases – Lyme borreliosis, human granulocytic anaplasmosis and human monocytic ehrlichiosis as well as tick-borne encephalitis virus and *Borrelia miyamotoi*. Totally, 706 *Ixodes* spp. ticks from Novosibirsk region and 111 blood samples of small mammals from Omsk region were analyzed by real-time PCR using «Real-Best» kits (Joint-stock company «Vector-Best», Novosibirsk). Both ticks and blood samples were shown to contain *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia muris* DNA as well as tick-borne encephalitis virus RNA. It was shown that more than 60% of ticks and blood samples analyzed contain DNA/RNA of at least one of the tested agents. A simultaneous infection of ticks and mammals by 2, 3 and even 4 agents was demonstrated.

Key words: tick-transmitted infections, agents of tick-borne encephalitis, Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, human monocytotropic ehrlichiosis.

Территория Российской Федерации входит в состав одного из наибольших в мире ареалов иксодовых клещей, простирающегося через всю Евразию. В России регистрируется порядка полумиллиона в год пострадавших от укусов клещей, однако реальное число пострадавших людей может значительно превышать имеющиеся статистические данные.

Иксодовые клещи являются переносчиками возбудителей целого ряда заболеваний человека, объединяемых термином «инфекции, переносимые клещами» (ИПК). В России систематически осуществляется лабораторная диагностика и эпидемиологический надзор лишь за клещевым энцефалитом (КЭ), иксодовым

клещевым боррелиозом (ИКБ) и риккетсиозом. В то же время лабораторный контроль других ИПК, таких как, гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ), лихорадка, вызванная *Borrelia miyamotoi*, и систематический эпидемиологический надзор над ними до сих пор не получили должного распространения. При этом в РФ этиология сезонных острых лихорадочных проявлений, возникающих после присасывания клещей, довольно часто (до 40% и более) остается невыясненной [1,10].

Заболевания ГАЧ и МЭЧ, объединенные в недавнем прошлом под термином «эрлихиозы человека», – острые инфекционные трансмиссивные заболевания, перено-

симые иксодовыми клещами. Возбудителями эрлихиозов являются размножающиеся в лейкоцитах внутриклеточные грам-отрицательные бактерии из семейства *Anaplasmataceae*: *Anaplasma phagocytophilum* (в случае ГАЧ), *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* (в случае МЭЧ) [5]. Клинически ГАЧ и МЭЧ почти неразличимы и имеют широкий спектр проявлений: от бессимптомной или субклинической формы до летального исхода, составляющего от 0,5% до 3,5% [12]. При своевременном диагностировании ГАЧ и МЭЧ успешно поддаются лечению с помощью доксицилина и других антибиотиков тетрациклинового ряда [5,12].

В настоящее время патогенность *Borrelia miyamotoi* для людей не общепризнана, тем не менее, работы последних лет свидетельствуют, что ДНК данных бактерий обнаруживается у больных с острыми лихорадками с присасыванием клещей в анамнезе [7,13].

Отсутствие особых патогномоничных симптомов при инфекциях, передающихся иксодовыми клещами, за исключением мигрирующей эритемы у части больных при заболевании ИКБ, определяет необходимость использования методов специфической лабораторной диагностики ИПК. Клинические признаки большинства заболеваний, переносимых клещами, могут проявиться лишь спустя длительное время. Поэтому при укусе клеща актуально проведение превентивной терапии, основанием для назначения которой является обнаружение в клеще возбудителей ИПК. Показано, что назначение соответствующих антибиотиков в первые 5 дней с момента укуса предотвращает развитие заболевания ИКБ в 95-99% случаев [3]. Наличие в анамнезе укуса клеща, зараженного одним или несколькими возбудителями ИПК, может способствовать постановке правильного диагноза заболевания и его адекватного лечения.

В связи с этим возникает острая необходимость разработки комплексного подхода для лабораторного анализа клещей, снятых с пострадавших, с целью одновременного выявления в них всех актуальных для конкретного региона возбудителей ИПК. Для решения этой задачи наиболее перспективным является выявление нуклеиновых кислот возбудителей ИПК при помощи ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ позволяет по единой методике выявлять сразу несколько маркеров в одной пробе и при этом характеризуется относительно высокой скоростью исполнения, позволяющей получить результат анализа в течение нескольких часов с момента забора пробы.

В настоящее время в ЗАО «Вектор-Бест» производятся наборы реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l.», «РеалБест РНК ВКЭ» и «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*» для выявления нуклеиновых кислот (НК) возбудителей КЭ, ИКБ, ГАЧ и МЭЧ как в клинических образцах, так и в клещах при помощи ПЦР-РВ. Кроме того, идет разработка ПЦР-набора для выявления ДНК бактерий *B. miyamotoi*, также переносимых иксодовыми клещами. Цель данной работы – оценить уровень зараженности клещей и мелких лесных грызунов вышеперечисленными возбудителями ИПК в нескольких районах Омской и Новосибирской областей с использованием комплекса наборов реагентов серии «РеалБест».

Материалы и методы

Для исследования были использованы 2 выборки клещей рода *Ixodes*, содержащие 306 и 400 особей, собранные «на флаг» в Тоугинском районе Новосибирской области в 2009 и 2011 гг. Выделение суммарной НК из суспензий клещей после их индивидуального измельчения проводили с помощью набора «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск), как описано ранее [2]. Кроме того, исследованы образцы кро-

ви мышевидных грызунов, отловленных на двух участках в Омской области, представляющих собой лесные биотопы в Тевризском и Большешуковском районах. На первом участке в мае-июне 2011 были отловлены 57 лесных полевок рода *Myodes*, 2 полевки рода *Microtus* и одна полевая мышь *Apodemus agrarius*. На втором участке в августе 2011 были отловлены 50 полевок *Myodes* spp. и одна полевая мышь.

От каждого животного взято по 200 мкл крови. Кровь собирали в стерильные пробирки, содержащие по 30 мкл 0,5 М раствора ЭДТА, добавляли по 400 мкл буфера для лизиса (4 М гуанидин тиоционат, 0,1 М Трис-НСI pH 6,4, 0,045 М ЭДТА pH 8,0, 1,3% Тритон X-100), перемешивали и хранили при температуре +4°C. Для выделения ДНК, проводимого с помощью набора «РеалБест экстракция 100», брали по 100 мкл полученной суспензии. Для постановки ПЦР использовали по 50 мкл образца суммарной НК (при выделении из суспензии клещей) и по 10 мкл НК (при выделении из крови животных). Выявление НК микроорганизмов в клещах и крови животных проводили на амплификаторе с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «CFX» («Bio-Rad», США) с помощью наборов реагентов «РеалБест РНК ВКЭ», «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l.», «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*», а также системы праймеров и зондов по выявлению участка гена *glpQ* микроорганизма *Borrelia miyamotoi*. Для обработки результатов использовали сервисную программу «РеалБест диагностика» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). ДНК *A. phagocytophilum* и *E. muris* была также определена в образцах крови методом двухраундовой ПЦР, как описано ранее [14].

Видовую принадлежность выявленных бактерий подтверждали при помощи секвенирования полиморфных участков генома на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3100 DNA Analyser» («Applied Biosystems», США) с последующим филогенетическим анализом последовательностей ДНК с помощью программы MEGA 4.0 [15]. Сравнение установленных нуклеотидных последовательностей с данными, представленными в базе данных GenBank, проводили с помощью поисковой системы «BLAST».

Результаты и обсуждение

Методом ПЦР-РВ с помощью наборов серии «РеалБест» на наличие НК возбудителей ИКБ, ВКЭ, ГАЧ и МЭЧ было проанализировано 306 клещей из первой выборки, собранных на территории Новосибирской области. У 190 из них (62,1% клещей) была обнаружена НК хотя бы одного из вышеперечисленных патогенов. При этом у 13,4% клещей (41 особь) была одновременно обнаружена ДНК двух или трех возбудителей ИПК (табл. 1). Наибольший вклад в инфицированность клещей вносят возбудители ИКБ. Так, ДНК *B. burgdorferi* s.l. выявлена у 55,9% клещей (171 из 306), из них, как показано на основании определения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *recA*, у 68,4% клещей была обнаружена ДНК *B. garinii*, а у 31,6% – *B. afzelii*. РНК ВКЭ обнаружена у 6,5% клещей (20 особей), ДНК *A. phagocytophilum* – у 3,6% клещей (11 особей) и ДНК *E. muris* – у 10,1% клещей (31 особь).

Полученные данные свидетельствуют о высокой зараженности исследованных клещей возбудителями ИПК, что указывает на значительный риск инфици-

Таблица 1

Выявление в клещах НК различных возбудителей ИПК методом ПЦР-РВ

Общее число клещей	Число (%) клещей, содержащих НК								
	одного возбудителя ИПК				нескольких возбудителей ИПК				
	ВКЭ	Б	А	Е	ВКЭ/Б	Б/А	Б/Е	ВКЭ/Б/Е	Б/А/Е
306	11 (3,6)	131 (42,8)	2 (0,7)	5 (1,6)	8 (2,6)	7 (2,3)	23 (7,5)	1 (0,3)	2 (0,7)

Примечание: ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; Б – *B. burgdorferi* s.l., А – *A. phagocytophilum*, Е – *E. muris*.

рования людей вследствие присасывания клещей и на вероятность развития у людей смешанных инфекций. Значения уровня инфицированности клещей различными возбудителями, полученные нами на территории Новосибирской области, не противоречат данным по РФ, опубликованным ранее [1,4,6,9,11,14].

Анализ выборки 2 из 400 клещей с помощью ПЦР-РВ на наличие ДНК *B. burgdorferi s.l.* и *B. miyamotoi* показал, что встречаемость *B. miyamotoi* составляет 2,2%. Во всех клещах, инфицированных *B. miyamotoi*, выявлена также ДНК *B. burgdorferi s.l.* Такое микст-инфицирование скорее всего обусловлено высокой встречаемостью в клещах одного микроорганизма (более 55%) и низкой встречаемостью другого (порядка 2,2%).

Для оценки возможности выявления возбудителей ИПК с помощью разработанных наборов серии "Реал-Бест" в образцах крови были исследованы образцы ДНК из крови 111 мышевидных грызунов, отловленных на двух участках Омской области. Образцы анализировали на присутствие ДНК возбудителей ИКБ, ГАЧ, МЭЧ, а также на наличие ДНК *B. miyamotoi*.

В образцах крови грызунов, отловленных на обоих участках, была обнаружена ДНК всех вышеперечисленных патогенов, однако частота выявляемости этих патогенов существенно различалась в зависимости от места

Таблица 2
Выявление ДНК возбудителей ИПК в крови мелких грызунов

Место отлова животных	Общее число особей	Число (%) особей, содержащих ДНК			
		ВВ	ВМ	А	Е
Участок 1	60	17 (28,3)	5 (8,3)	20 (33,3)	18 (30,0)
Участок 2	51	4 (7,8)	1 (2,0)	24 (47,1)	1 (2,0)

Примечания: ВВ – *B. burgdorferi s.l.*, ВМ – *B. miyamotoi*, А – *A. phagocytophilum*, Е – *E. muris*.

отлова животных. Так, в 28-33% образцов от животных, отловленных на первом участке, была обнаружена ДНК возбудителей ИКБ, ГАЧ и МЭЧ и в 8,3% образцов – ДНК *B. miyamotoi* (табл. 2). При этом доля животных, инфицированных одновременно несколькими возбудителями, была также высока и составляла 28,3% (табл. 3). Следует подчеркнуть, что в одном образце была обнаружена ДНК всех четырех исследуемых патогенов. У 47,1% грызунов, отловленных на втором участке, была обнаружена ДНК возбудителя ГАЧ, частота выявляемости остальных патогенов была существенно ниже и составляла 7,8% в случае ДНК *B. burgdorferi s.l.* и 2% в случае ДНК *B. miyamotoi* и возбудителей МЭЧ (табл. 2). Доля микст-инфицированных животных на втором участке также была существенно ниже и составляла 7,8% (табл. 3).

Достоверность полученных результатов по выявлению возбудителей ГАЧ и МЭЧ была подтверждена проведением двухраундовой ПЦР в присутствии видоспецифичных праймеров. Сравнение двух методов показало 100% совпадение результатов в случае детекции *E. muris* и 95,4% совпадение в случае выявления ДНК *A. phagocytophilum*.

ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьева М.В., Коренберг Э.И., Воробьева Н.Н. и др. Место заболеваний, передающихся иксодовыми клещами, в инфекционной патологии Пермской области // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2004. – №2. – С.27-29.
- Бондаренко Е.И., Тимофеев Д.И., Иванов М.К. Новый набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.*» // Новости «Вектор-Бест». – 2010. – №1 (55). – С.2-7.
- Лобзин Ю.В., Рахманова А.Г., Антонов В.С. и др.

Анализ нуклеотидных последовательностей 50 случайно выбранных положительных образцов, полученных из клещей и грызунов и содержащих ДНК *A. phagocytophilum*, *E. muris* и *B. miyamotoi*, подтвердил принадлежность детектированных микроорганизмов

Таблица 3

Выявление случаев микст-инфицированности животных

Место отлова животных	Общее число особей	Число (%) особей, содержащих одновременно ДНК						
		ВВ/ ВМ	ВВ/ А	ВВ/ Е	А/ Е	ВВ/ А/ Е	ВВ/ Е/ ВМ	ВВ/ А/ Е/ ВМ
Участок 1	60	1 (1,7)	4 (6,7)	3 (5,0)	3 (5,0)	3 (5,0)	2 (3,3)	1 (1,7)
Участок 2	51	1 (2,0)	2 (3,9)	-	-	1 (2,0)	-	-

Примечания: ВВ – *B. burgdorferi s.l.*, ВМ – *B. miyamotoi*, А – *A. phagocytophilum*, Е – *E. muris*.

к данным видам. Образцы, содержащие ДНК эрлийи, показали на основании определения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gltA* наличие в этих образцах ДНК *E. muris* (отметим, что на сегодняшний день на территории РФ из двух известных возбудителей МЭЧ удалось выявить только *E. muris*).

Работ по выявлению возбудителей ИПК в крови млекопитающих на территории России значительно меньше, чем по их выявлению в клещах, что затрудняет сопоставление полученных результатов с литературными данными. Ранее показано, что частота выявляемости ДНК *A. phagocytophilum* и *E. muris* в крови мелких млекопитающих существенно различается в различных регионах и варьирует от 3,8% до 16,6% в случае детекции *A. phagocytophilum* и от 3,8% до 7% в случае детекции *E. muris* [14]. Частота выявления ДНК *B. miyamotoi* в мелких млекопитающих, отловленных на территории Новосибирской области, составляла 8% [8], что соответствует результатам, полученным в настоящей работе. Что касается *B. burgdorferi s.l.*, то ранее показано, что ДНК данных спирохет была выявлена в образцах крови у 4-13% мелких млекопитающих [8], что существенно ниже доли инфицированных животных, выявленной в данной работе на участке 1. Следует подчеркнуть, что на участке 1 животные были отловлены в мае в период пика активности таежных клещей, а на втором участке – двумя месяцами позже, и доля образцов, содержащих ДНК *B. burgdorferi s.l.*, оказалась во второй выборке в 3,6 раза меньше. Кроме того, при выявлении методом ПЦР-РВ ДНК *B. burgdorferi s.l.* у большинства положительных образцов величины *St* составляли 38-40, что соответствует единичным копиям ДНК бактерий в пробе и находится на пределе чувствительности метода ПЦР. Результаты по инфицированности грызунов боррелиями комплекса *B. burgdorferi s.l.* на участке 1 дополнительно подтверждены методом ПЦР-РВ с использованием в качестве мишеней участков генов *23S rRNA* и *recA*.

Таким образом, было показано, что наборы реагентов серии «РеалБест» для выявления НК возбудителей ИПК, могут быть использованы в лабораториях ЛПУ в качестве современного экспресс-метода для выявления в клещах опасных для человека патогенов. Результаты диагностики позволят своевременно предпринять превентивные меры для предупреждения развития целого спектра заболеваний у пострадавших. Кроме того, ПЦР-наборы, использованные в данной работе, могут быть применены для широкомасштабных эпидемиологических исследований по выявлению указанных возбудителей инфекций, передаваемых иксодовыми клещами.

Эпидемиология, этиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов: Рекомендации для врачей. – СПб., 2000. [Электронный ресурс]. <http://www.epid.ru/docs/infdoc5.html>.

4. Матущенко А.А., Рудакова С.А., Коренберг Е.И. Предварительные данные эколого-эпидемиологического исследования болезни Лайма в Западной Сибири // Мед. паразит. – 1993 – №4. – С.27-29.

5. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Оберт А.С. Анаплазмозы и

эрлихиозы человека – новая проблема инфекционной патологии в России: Пособие для врачей. – Омск, 2006. – С.45.

6. Травина Н.С., Скрябин С.М., Карань Л.С. Возбудители трансмиссивных инфекций, передаваемых клещами I. *repsulcatus* в Зауралье // Национальные приоритеты России. Современные аспекты природной очаговости болезней. – 2011 – № 2 (5). – С.76-77.

7. Фоменко Н.В., Епихина Т.И., Черноусова Н.Я. Выявление *Borrelia miyamotoi* в крови людей, заболевших в весенне-летний эпидемиологический период // Молекулярная медицина. – 2010. – №3. – С.28-31.

8. Фоменко Н.В. Генетическая гетерогенность *Borrelia spp.* Западной Сибири: Дисс. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2008. – 147 с.

9. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В. и др. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых клещами в г. Томске и его пригородах // Паразитология. – 2009. – №5 (43). – С.374-388.

10. Шихин А.В., Баженова И.В., Романенко В.Н. и др.

Современная эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым инфекциям в Томской области // Национальные приоритеты России. Современные аспекты природной очаговости болезней. – 2011. – №2 (5). – С.69-70.

11. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К. и др. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане // Мед. паразитол. – 2004. – №2. – С.10-14.

12. CDC (Center for Disease Control and Prevention) <http://www.cdc.gov/ticks/diseases/index.html>.

13. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 17. №10. – P.1816-1823.

14. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., et al. Genetic diversity of Anaplasma and Ehrlichia in Asian part of Russia // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2011. – Vol. 11. №8. – P.1013-1021.

15. Tamura K., Dudley J., Nei M., et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24. №8. – P.1596-1599.

Информация об авторах: Бондаренко Евгений Иванович – к.м.н., научный сотрудник, 630117, г. Новосибирск-117, а/я 492, e-mail: ebondarenko@ngs.ru; Тимофеев Денис Игоревич – к.б.н., старший научный сотрудник, тел. (383) 227-68-24, e-mail: timofeev@vector-best.ru; Фоменко Наталия Владимировна – к.б.н., научный сотрудник, e-mail: nataliyaf@ngs.ru; Якименко Валерий Викторович – д.б.н., заведующий лабораторией, 644080, г. Омск, проспект Мира, 7, тел. (3812) 65-03-04, e-mail: vyakimenko78@yandex.ru; Танцев Алексей Константинович – к.б.н., научный сотрудник, тел. (3812) 65-14-77; Рар Вера Александровна – к.б.н., научный сотрудник, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8, тел. (383) 363-51-37, e-mail: rarv@niboch.nsc.ru.

© БАБКИН И.В., ТИКУНОВА Н.В., ВАСЬКОВА А.А., БАБКИНА И.Н., ФОМЕНКО Н.В. – 2012
УДК 573.6; 57.089:616-7

СОЗДАНИЕ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК P83/100 *BORRELIA GARINII* И *BORRELIA AFZELII*

Игорь Викторович Бабкин¹, Нина Викторовна Тикунова¹, Анна Андреевна Васькова¹, Ирина Николаевна Бабкина¹, Наталья Владимировна Фоменко^{1,2}

(¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, директор – акад. РАН В.В. Власов; ²ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, генеральный директор – М.Д. Хусаинов)

Резюме. Сконструированы штаммы *Escherichia coli* / pUR-p83/100-43T и *Escherichia coli* / pUR-p83/100-52T, продуцирующие рекомбинантные белки бета-галактозидаза-P83/100 *Borrelia garinii*, Tom 9105 и *B. afzelii*, Tom 4106, соответственно. Уровень продукции гибридных белков составил около 20% от суммарного клеточного белка, и большая их часть находится в растворимой форме. Методом вестерн блот анализа было подтверждено, что полученные рекомбинантные белки, в отличие от бета-галактозидазы, выявлялись сыворотками больных иксодовыми клещевыми боррелиозами и не выявлялись сыворотками здоровых доноров.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, рекомбинантный белок, штамм-продуцент.

GENERATION OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS PRODUCING RECOMBINANT PROTEIN P83/100 *BORRELIA GARINII* AND *BORRELIA AFZELII*

I.V. Babkin¹, N.V. Tikunova¹, A.A. Vas'kova¹, I.N. Babkina¹, N.V. Fomenko^{1,2}

(¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk; ²LTD "Vector-Best", Novosibirsk, Russia)

Summary. *Escherichia coli* / pUR-p83/100-43T and *Escherichia coli* / pUR-p83/100-52T strains, producing recombinant proteins beta-galactosidase-P83/100 *Borrelia garinii*, Tom 9105 and *Borrelia afzelii*, Tom 4106, respectively, have been generated. Production level of the recombinant proteins was about 20% from the total level and the most part of them was in a soluble form. It was confirmed by western blot analysis that these recombinant proteins, unlike beta-galactosidase, were developed by serum of ixodes tick-born borreliosis patients and were not developed by serum of healthy donors.

Key words: ixodes tick-born borreliosis, recombinant protein, producing strain.

Значительное место по уровню заболеваемости и широте распространения в Российской Федерации занимают иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ). Эпидемиологическая обстановка по заболеваемости ИКБ продолжает оставаться неблагоприятной. Проблемой является достоверная диагностика ИКБ, что связано с высоким генетическим разнообразием выявляемых на территории РФ боррелий и антигенной изменчивостью этого патогена в ходе заболевания. Для разработки надежных диагностических средств ключевым этапом является выбор и создание антигенов на основе иммунодоминантных белков боррелий, вызыва-

ющих образование антител у больных, на всех стадиях заболевания ИКБ.

Одним из иммунодоминантных белков боррелий является белок P83/100. Показано, что антитела к этому белку обнаруживаются у пациентов как на ранних стадиях ИКБ, так и на поздних стадиях заболевания [8]. Ген *p83/100* (BV0744) локализован на хромосоме, степень гомологии гена *p83/100* для разных видов боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) составляет 88,2-99,1%, причем 5'-конец гена является довольно консервативным, тогда как 3'-конец более вариабелен [9]. У разных видов комплекса *B. burgdorferi* s.l. обнару-