

**АНАЛИЗ ЗАРАЖЕННОСТИ БАКТЕРИЯМИ РОДА *Borrelia*  
КЛЕЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

**Е.А. БЕССОЛИЦЫНА**

кандидат биологических наук

**И.С. БЕРДИНСКИХ**

студент

**Ф.С. СТОЛБОВА**

кандидат биологических наук

**И.В. ДАРМОВ**

доктор медицинских наук

*Вятский государственный университет,*

*г. Киров, 610000, Московская, 36, e-mail: bess2000@mail.ru*

**Изучена зараженность боррелиями клещей, собранных в различных районах Кировской области, в зависимости от вида, пола и объекта сбора. Показано, что переносчиками бактерий рода *Borrelia* являются *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus*, обнаруженные в Кировской области, и что переносчиками возбудителя могут быть и самцы клещей.**

Ключевые слова: боррелиоз, *Borrelia*, *Dermacentor reticulatus*, ПЦР, Кировская область.

Бактерии рода *Borrelia* играют существенную роль в инфекционной патологии человека, являясь возбудителями таких болезней как эпидемический (вшиевый) возвратный тиф, эндемический (клещевой) возвратный тиф и боррелиоз. В Кировской области, как и во многих других регионах России, основную опасность представляет боррелиоз (болезнь Лайма).

Боррелиоз – это системная болезнь, характеризующаяся многообразием клинических проявлений и часто имеющая хроническое и рецидивирующее течение. При боррелиозе поражаются кожные покровы, нервная и сердечно-сосудистая системы, опорно-двигательный аппарат [1].

Инфицирование человека боррелиями происходит преимущественно в результате присасывания клеща. После укуса и присасывания клещ может передавать боррелий, если они уже находятся в слюнных железах, то есть при генерализованной инфекции, которая отмечается лишь у 5–7 % инфицированных клещей. В остальных случаях передача инфекции осуществляется через 1–2 сут после присасывания [6].

Официальная регистрация боррелиоза в России ведется с 1992 г. В настоящее время болезнь регистрируют в 70 субъектах Российской Федерации при средней заболеваемости 5,1 на 100 тыс. населения [6]. Мониторинг зараженности клещей осуществляется медицинскими учреждениями, поэтому анализируют только клещей, снятых с человека. Однако в прокормлении клещей и заносе их в места возможного контакта с человеком участвуют также домашние животные, прежде всего собаки, поэтому важен анализ клещей, снятых не только с человека, но и с домашних животных, а также изъятых из среды обитания клещей.

Важным вопросом является также оценка зараженности клещей в

зависимости от их пола. Считается, что инфекция передается в организм человека при укусе самок. Но не исключено и участие самцов. Кратковременное и безболезненное питание самца можно и не заметить. Часто встречающиеся случаи боррелиоза связаны с нападением самцов.

Основными переносчиками боррелий в Кировской области являются таежные клещи *Ixodes persulcatus*. Однако в связи с изменениями климата, отмечаемыми в последние годы, в некоторых районах Кировской области были выделены луговые клещи *Dermacentor reticulatus* [7].

Целью исследования было определение зараженности боррелиями клещей в зависимости от места и объекта сбора на территории Кировской области, а также их видовой и половой принадлежности.

### **Материалы и методы**

Сбор клещей проводили с растительного покрова на движущегося учетчика и флаг или волокушу из вафельной ткани размером 60 × 100 см [3], а также с людей и домашних животных (собак, кошек).

Идентификацию клещей, выделенных из природных очагов, проводили по определительным таблицам Филипповой [8].

**Выделение и амплификация ДНК.** Суммарную ДНК экстрагировали с помощью гуанидинтиоизоцианатного метода [10] из клещей, фиксированных в 70%-ном этиловом спирте.

Для амплификации использовали пару праймеров: 5S-23S spacer F 5'-GAGAGTAGGTTATGCCAGGG-3' и 5S-23S spacer R 5'-ACCATAGACTCTTATGACTTTGACCA-3' [9].

Состав реакционной смеси для ПЦР: 0,5 мкл пробы (50 нг), однократный буфер для ПЦР без магния («Sybenzyme»), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкмоль смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов («Sybenzyme»), прямой и обратный праймеры по 10 пмоль каждого («Syntol»), 1,25 ед. а. Таq-полимеразы («Sybenzyme»), вода до конечного объема 10 мкл.

Условия ПЦР: 1 цикл денатурации – 94 °С, 5 мин; 40 циклов – 94 °С, 30 сек; 42 °С, 30 сек и 72 °С, 30 сек; 1 цикл достройки – 72 °С, 5 мин.

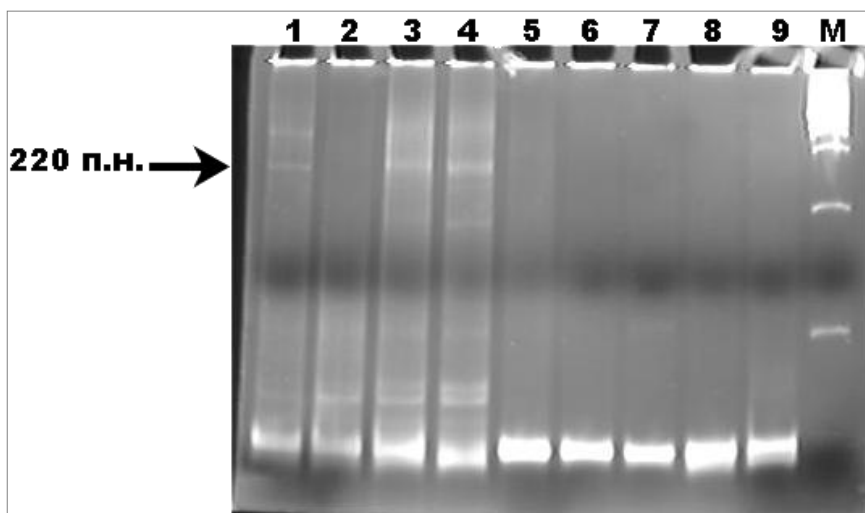
Продукты амплификации разделяли в 6%-ном нативном полиакриламидном геле, гель окрашивали бромистым этидием [10].

Достоверность различий оценивали с использованием двустороннего критерия Фишера [2] с уровнем значимости 0,05.

### **Результаты и обсуждение**

В период с 2007 по 2010 гг. исследовано 208 клещей из 9 районов Кировской области: Афанасьевского (6 клещей), Зуевского (22), Кирово-Чепецкого (21), Оричевского (41), Куменского (10), Арбажского (22), Тужинского (8), Яранского (30), Кильмезского (10) и окрестностей города Кирова (29). Из 208 исследованных клещей было 158 самок, 49 самцов, одна нимфа. Основная часть клещей относилась к таежным клещам (*I. persulcatus*), но 30 клещей, собранных в Яранском и Тужинском районах, принадлежали к виду *D. reticulatus* (луговой клещ). С растительного покрова было собрано 120 клещей; с людей – 17, кошек – 8, собак – 63. Все клещи были исследованы на зараженность боррелиями.

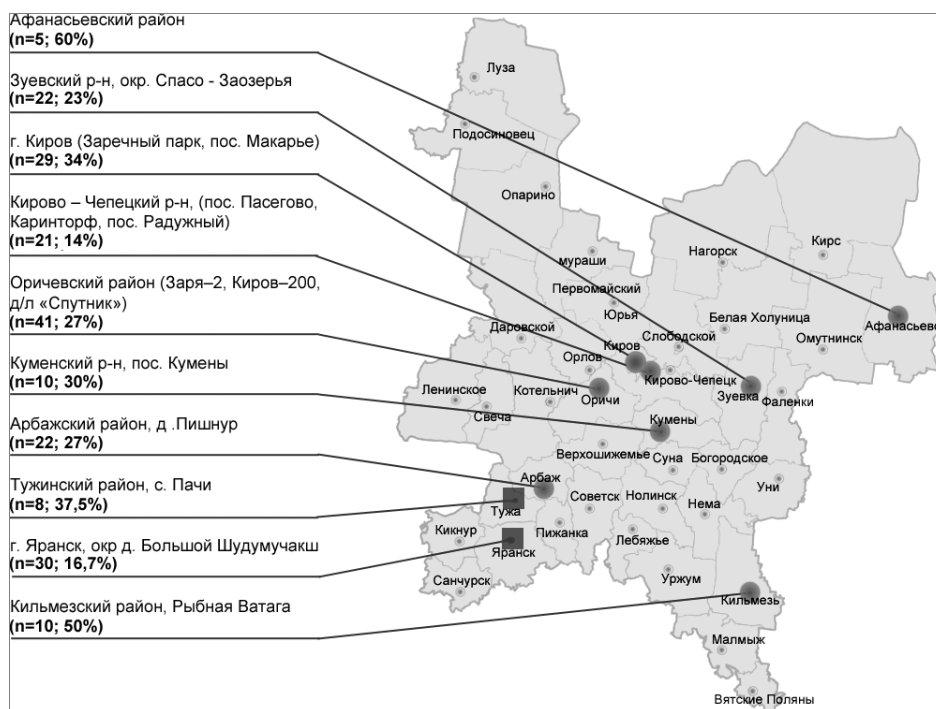
Зараженность боррелиями определяли при исследовании суммарной ДНК, выделенной из каждого клеща, по наличию ампликона размером 220 пар нуклеотидов при постановке ПЦР с праймерами к участку между генами 16S и 23S рибосомных РНК. Данный фрагмент уникален для бактерий рода *Borrelia* [9]. Пример геле-электрофореза продуктов амплификации показан на рисунке 1.



**Рис. 1.** Результат геле-электрофореза в 6%-ном нативном полиакриламидном геле продуктов амплификации суммарной ДНК, выделенной из клещей: Праймеры 5S-23S spacer F/5S и 23S spacer R. Дорожки с 1 по 8 – образцы ДНК, выделенные из клещей с № 39 по № 46; дорожка 9 – отрицательный контроль; дорожка М – маркер «Sybenzyme». Стрелкой отмечен продукт ампликации

За 2007 г. исследовано 28 клещей, из них 10 были инфицированы боррелиями (36 %), за 2008 г. – 42 клеща (12 заражены – 28,5 %), за 2009 г. – 88 клещей (22 заражены – 25 %), за 2010 г. – 50 клещей (11 заражены – 22,22 %). Доля зараженных клещей изменялась незначительно. Статистический анализ достоверных различий между результатами, полученными в 2007–2010 гг., не выявил. По данным Роспотребнадзора, среди укушенных клещами людей наблюдалось увеличение процента зараженности [3]. Подобные различия, возможно, связаны с недостаточной статистической выборкой и тем, что в учреждениях Роспотребнадзора исследовали только клещей, снятых с человека.

При анализе зараженности клещей, собранных в разных районах, было установлено, что процент зараженности варьирует от 14 % (Кирово-Чепецкий район) до 50 % (Афанасьевский). Также высокая доля зараженных клещей выявлена не только в центральных, но и в южных, и северных районах области. По данным Роспотребнадзора, за тот же период сбора наибольшие показатели инфицированности клещей были отмечены в центральных районах (среди них Верхошижемский, Богородский, Куменский, Арбаский, Оричевский). При этом минимальный уровень заболеваемости боррелиозом отмечен в южных районах, расположенных в подзоне широколиственно-хвойных лесов [5], что может быть связано с меньшим поступлением клещей на исследование из других районов, а также исследованием переносчиков, снятых только с людей. Зараженность клещей на территориях, обработанных акарицидами (окрестности города Кирова), достаточно высокая и составляет 34 %. Данные по зараженности клещей из разных районов Кировской области приведены на рисунке 2.



**Рис. 2.** Распределение собранных клещей по различным районам Кировской области и доля клещей, зараженных боррелиями:

Кружками обозначены районы, где были собраны клещи *Ixodes persulcatus*, квадратами – *Dermacentor reticulatus*. В скобках указано: n – количество исследованных и доля зараженных клещей

Предполагают, что случаи заболевания боррелиозом, когда больные отрицают укус клеща, связаны именно с нападением самцов. Для проверки в медицинские учреждения в подавляющем большинстве попадают снятые самки. Это связано с тем, что укус самца кратковременный и безболезненный, поэтому его не замечают. При этом в сборах клещей, снятых с людей, доля самцов варьировала от 0 до 100%. Из 158 самок заражено было 44 (28%), из 49 самцов – 11 (22%). Таким образом, как самцы, так и самки в равной мере могут играть роль переносчиков боррелий.

В Кировской области основными переносчиками боррелий являются клещи вида *I. persulcatus*. Осенью 2010 г. в Яранском районе в большом количестве обнаружены клещи *D. reticulatus*. Этот вид клещей нетипичен для Кировской области [7]. Однако в 2010 г. погодные условия в южных районах области были сходны с отмеченными в Крыму во время осенней вспышки численности клещей этого вида [4].

Из 30 исследованных *D. reticulatus* зараженными боррелиями оказались 17%, тогда как среди исследованных *I. persulcatus* переносчиками боррелий было 28,1%.

В медицинских учреждениях на зараженность боррелиями исследуют только клещей, снятых с человека, хотя их природными прокормителями являются дикие животные, поэтому для получения более полной картины зараженности возникает необходимость исследования клещей, снятых с домашних и диких животных (собак, кошек, ежей, лосей и др.), а также извлеченных из растительного покрова (сбор на флаг).

Известны данные серологического и бактериологического анализа диких животных и собак, проведенного в 2006–2009 гг. [3]. Выявлен наиболее высокий уровень зараженности боррелиями зайца-беляка (*Lepus timidus L.*): 52,7% (2006 г.), 20,0 (2007 г.) и 47,0% (2008 г.) и лисицы (*Vulpes vulpes L.*):

38,4 % (2006 г.), 37,5 % (2007 г.). Низкий уровень отмечен у енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides* Gray) – 12,5 % (2006 г.) и лося (*Alces alces* L.): 10,0 % (2006 г.), 7,4 (2008 г.), 27,2 % (2009 г.). Наименьший уровень зараженности выявлен у тетеревиных птиц (*Lyrurus tetrix* L., *Tetrao urogallus* L., *Tetrastes bonasia* L.) – 5,8 % (2006 г.) [3]. Однако исследование домашних животных, которые ближе контактируют с человеком, было менее полным: всего было обследовано 24 собаки и 8,3 % из них имели в крови антитела к возбудителю боррелиоза [3].

В нашей работе исследованию подвергали клещей, собранных как с домашних животных и человека, так и с растительного покрова. Данные приведены в таблице 1.

*Зараженность клещей, собранных с различных объектов на территории Кировской области*

С какого объекта сняты	Число обследованных объектов	Заражено	
		число	%
Собака	63	12	19,0
Человек	17	6	35,3
Кошка	8	3	37,5
Растительный покров	120	34	28,3

Процент зараженных клещей, снятых с собак, всего в 1,5–1,8 раза меньше такового, отмеченного у клещей, собранных другими способами, что необходимо учитывать при проведении эпидемиологических исследований и разработке мер борьбы с переносчиками.

Полученные нами результаты позволяют отнести собак к прокормителям иксодовых клещей и резервуарным хозяевам возбудителя боррелиоза, а также считать их индикаторами неблагополучия местности по боррелиозу.

#### *Литература*

1. Манзенюк И.Н., Манзенюк О.Ю. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма). – Кольцово, 2005. – 85 с.
2. Овсепян В.А., Бессолицына Е.А., Загоскина Т.П. Анализ полиморфных вариантов генов цитохрома P-450 (CYP) 1A1, глутатион-S-трансферазы (GST) M1, T1 и P1 у больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2006. – №. 1 – С. 50.
3. Перевозчикова М.А. Эпизоотологические аспекты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Владимир, 2010. – 23 с.
4. Пышкин В.Б., Евстафьев И.Л., Евстафьев А.И. К экологии и биоразнообразию рода *Dermacentor Koch.*, иксодифауны Крыма (*Acrania, Ixodidae*) // Сб. раб. «Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана». – 2006. – С. 30–35.
5. Романовский И.Д. Надсемейство Ixodidae – Иксодовые клещи. Животный мир Кировской области // Уч. зап. Киров. гос. пед. ин-та. – Киров, 1971. – С. 256–261.
6. Рудакова С.А., Оберт А.С., Дроздов В.Н. Иксодовые клещевые боррелиозы в Западной Сибири (этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика). – Омск.: ЦИО, 2004. – 39 с.
7. Столбова Ф.С., Бердинских И.С. Осенняя активность клещей рода *Dermacentor Koch.* на юго-западе Кировской области // Сб. матер. VIII Всерос. науч.-практ. конф. – Киров, 2010. – Ч. 2. – С. 17–21.
8. Филиппова Н.А. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae): морфология, систематика, экология, медицинское значение. –

Ленинград: Наука, 1985. – 420 с.

9. *Leo M., Ingrid Van De Pol, Schot Corrie S.* Detection and Identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi Sensu Lato and Bartonella Specimens in Dutch Ixodes ricinus Ticks Schouls // J. of Clin. Microbiol. – 1999. – V. 37, № 7. – P. 2215–2222.

10. *Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

### **The analysis of contamination by bacteria of genus *Borrelia* ticks in Kirov area**

**E.A. Bessolitsyna, I.S. Berdinskih, F.S. Stolbova, I.V. Darmov**

Bacteria of the *Borrelia* genus are the reason of tick-borne lyme disease. Ticks of *Ixodidae* family are carrying agents of borrelia cells. This research shows contamination of ticks with *Borrelia*. Ticks were gathered in different areas of Kirov region. It also shows how contamination depends on species of ticks, their sex and object from which it were gathered. It was proved that the carrying agent of *Borrelia* in Kirov region are two species of ticks, and moreover, carrying agents can be not only female, but also male.

Keywords: tick-borne lyme disease, *Borrelia*, Ixodidae, PCR.