Изучение зараженности клещей нескольких регионов РФ *Borrelia burgdorferi*, вирусом клещевого энцефалита и патогенными *Ehrlichia spp.*

Флямер Илья
Научный руководитель: **М. А. Турчанинова.**

ЗАО «НПФ ДНК-Технология»
Гимназия на Юго-Западе №1543

2009 год.

Цели:

Изучить зараженность клещей нескольких регионов РФ трансмиссивными инфекциями: вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), *B. burgdorferi* и патогенными *Ehrlichia spp*.

Задачи:

- Разработать ПЦР-тест-систему для выявления патогенных *Ehrlichia spp*.
- Определить с помощью метода ПЦР зараженность клещей ВКЭ, боррелиями и эрлихиями.
- Проанализировать полученные данные путем сопоставления с имеющимися в литературе данными.

Обзор литературы
Клещи

Царство: Animalia

Тип: Arthropoda
Подтип: Chelicerata
Класс: Arachnida

Подкласс: Acari

Надотряд: Parasitiformes

Отряд: Ixodida

Самые распространенные клещи, переносящие инфекции: *Ixodes persulcatus, I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus, Dermacentor variabilis, Amblyomma americanum, Rhipicephalus sanguineus*.

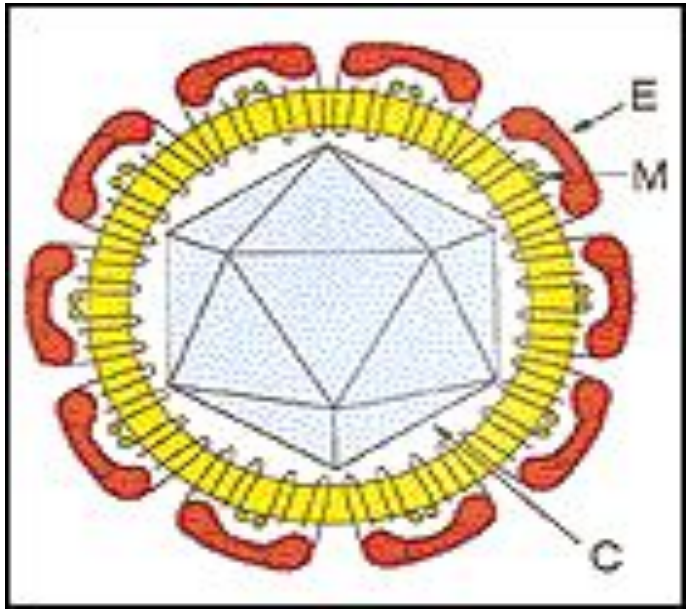
Большинство клещей из семейства Ixodidae — эктопаразиты, переносящие многие заболевания млекопитающих, в частности, человека. Могут переносить сразу несколько инфекций.

Лайм-боррелиоз

Царство: Bacteria
Тип: Spirochaetes
Класс: Spirochaetes
Отряд: Spirochaetales
Семейство: Spirochaetaceae
Род: Borrelia
Вид (комплекс): Borrelia burgdorferi sensu lato.

- Инфицированность клещей: **8-61%.**
- В среднем, **10-11 тысяч** случаев за год в России (**≈6,9 случаев на 100 тысяч** человек).

Вирусный клещевой энцефалит



Группа: Группа IV ((+)ssRNA)

Семейство: Flaviviridae

Род: Flavivirus

Вид: Tick-borne meningoencephalitis virus.

- Инфицированность клещей: **1-3%** (в отдельные годы - **15-20%**).
- С января по июль зарегистрировано **2264 случая** (**1,59 случаев на 100 тыс. человек**) **-** рост на 35,6% по сравнению с 2008 годом.

Эрлихиоз

Царство: Bacteria
Тип: Proteobacteria
Класс: Alphaproteobacteria
Отряд: Rickettsiales
Семейство: Anaplasmataceae

Род: Ehrlichia

Вид: Ehrlichia chaffeensis, E. muris, E ewingii, E. canis.

Зараженность *I. persulcatus E. muris* составляет **от 1,4 до 8,5%.**

Использованные методики

- Экстракция НК фенольным методом.
- Реакция обратной транскрипции.
- Real-time ПЦР.
- Проверка чувствительности тест-системы методом «конечных разведений».
- Автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру (методом «терминаторов»).
- Электрофорез ДНК в агарозном геле.
- Подбор последовательностей праймеров и пробы для real-time ПЦР.

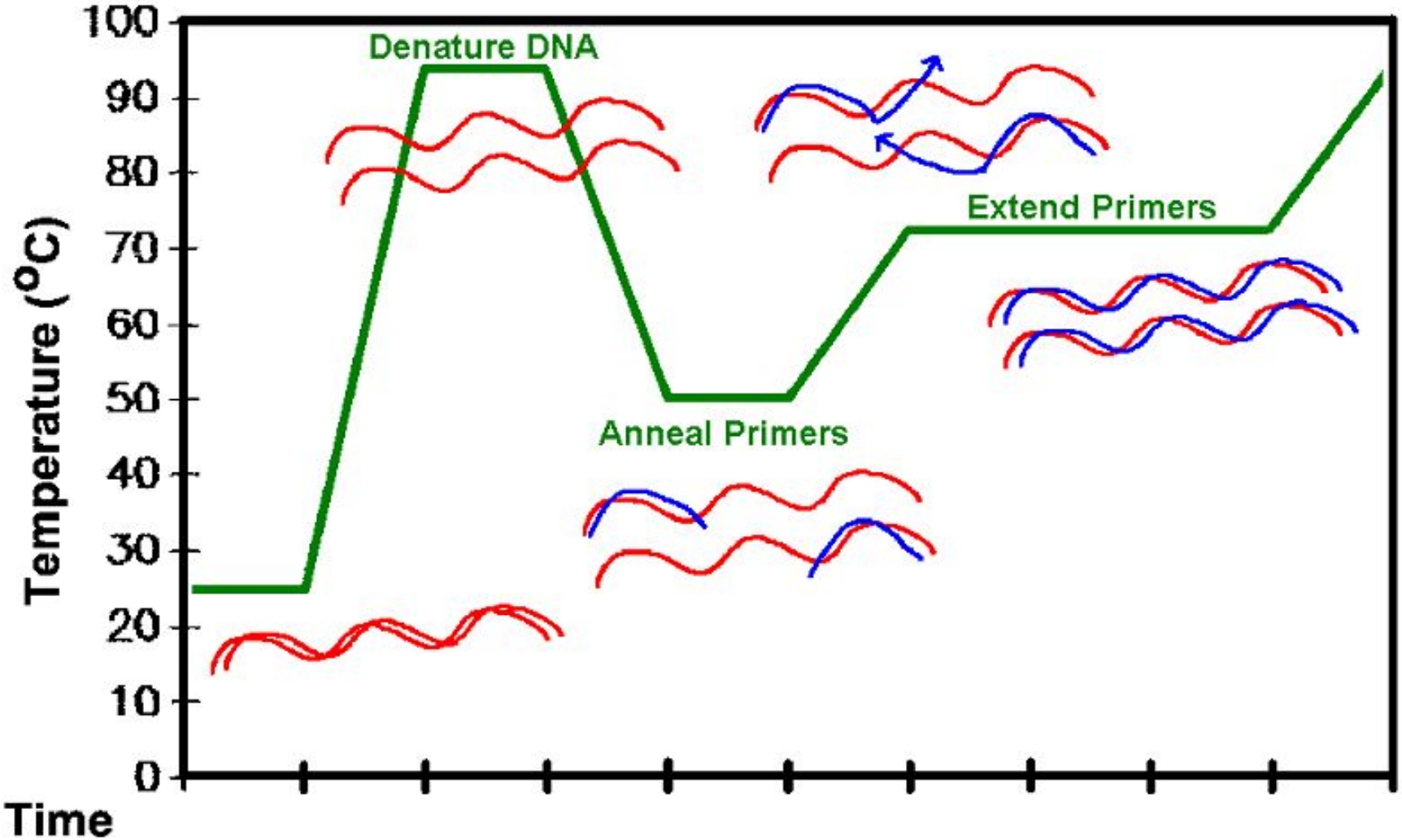
ПЦР

Суть ПЦР состоит в многократном избирательном копировании определенного участка ДНК при помощи ферментов *in vitro*.

Компоненты ПЦР:

- анализируемый образец ДНК
- праймеры
- термостабильная (чаще всего – *Taq-)* полимераза
- смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ)
- буфер.

Принцип метода ПЦР



Способы детекции результатов ПЦР

- **После проведения реакции**

(«по конечной точке» - электрофорез, FLASH).

- **Во время реакции**

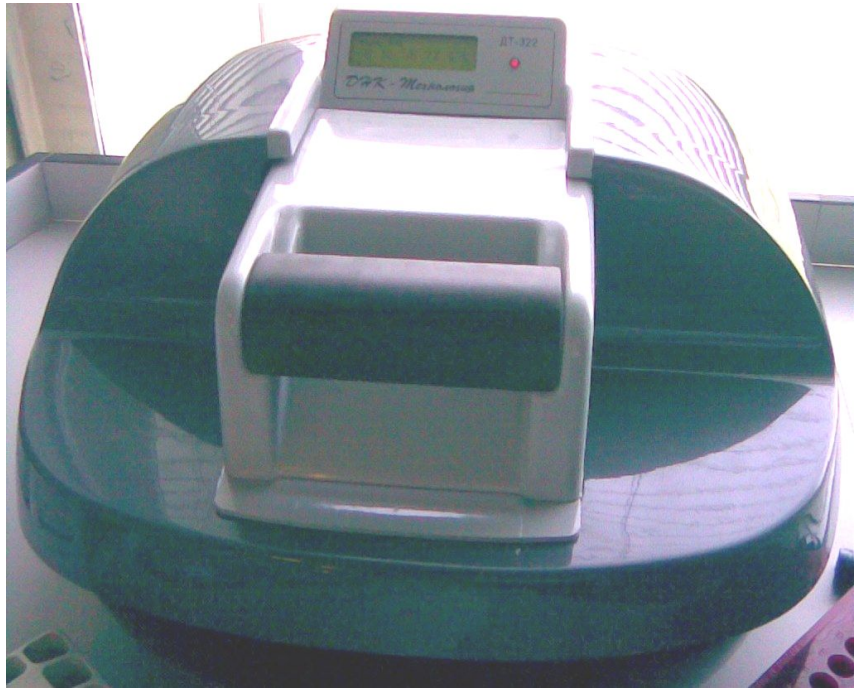
(«в реальном времени»).

Мы использовали флуоресцентно меченые пробы типа TaqMan.

Температурный режим:

t° Время

1. 80,0 °C - 01:00
2. 94,0 °C - 01:30
3. 94,0 °C - 00:20] *5
   64,0 °C - 00:15]
4. 94,0 °C - 00:10] *45
   64,0 °C - 00:15]



ПЦР «в реальном времени» мы проводили на амплификаторе ДТ-322 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»).

Написанная тест-система для детекции патогенных *Ehrlichia spp*.

Написана на ген 16s rRNA, должна детектировать *Ehrlichia muris*, *E. chaffensis* и *E. canis*, а также патогенных бактерий близкородственного рода *Anaplasma*. Длина ПЦР-продукта – 198 пар нуклеотидов.

Результаты и обсуждение

Проверка чувствительности имевшихся тест-систем

Проверку делали методом «конечных разведений».

Патоген.	Расчетная чувствительность (число стартовых молекул ДНК на о амплификационную пробирку)
B. burgdorferi	**1,54**
TBEV	**2,16**

Проверка специфичности системы для детекции *Ehrlichia* spp

Изучение зараженности клещей *B. burdorferi*, TBEV и *Ehrlichia spp.*

	Н. Тагил.	Московская область.	Оренбург.
B. burgdorferi	1 (6,6%)	0	10 (11,9%)
TBEV	0	0	0
Ehrlichia spp.	Не изучалось	6 (66,6%)	21 (25 %)
Всего клещей:	19	9	84

Выводы:

1. Освоены методы: подбор последовательностей праймеров и проб, выделение нуклеиновых кислот фенольным методом экстракции, постановка реакции обратной транскрипции, проведение real-time ПЦР с «горячим стартом», электрофореза ДНК в агарозном геле, автоматического секвенирования методом «терминаторов».
2. Разработана тест-система, детектирующая патогенных *Ehrlichia spp.*, встречающихся на территории РФ.
3. Получены данные о зараженности клещей трансмиссивными инфекциями из нескольких регионов РФ.
4. Полученные нами данные сопоставлены с имеющимися в литературе данными.

Благодарности

Автор выражает благодарность коллективу ЗАО «НПФ ДНК-Технология» за методическую помощь, всем участникам Оренбургской биологической практики гимназии №1543, помогавшим собирать материал, рецензенту Д. Кнорре за ценные указания и С. М. Глаголеву за организацию практики.

Литература

1. **В. В. Малеев.** Обзор Европейских рекомендаций по диагностике клещевых бактериальных инфекций. Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия 2005 г.

2. **Е. П. Шувалова.** Инфекционные болезни. Медицина. 1990 г.

3. **C. Kuyler Doyle, Marcelo B. Labruna, Edward B. Breitschwerdt, Yi-Wei Tang, Richard E. Corstvet, Barbara C. Hegarty, Karen C. Bloch, Ping Li, David H. Walker, and Jere W. McBride.** Detection of Medically Important *Ehrlichia* by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. Journal of Molecular Diagnostics. 2005 г.

4. **Olga V. Morozova, Andrey K. Dobrotvorsky, Natalya N. Livanova, Sergey E. Tkachev, Valentina N. Bakhvalova, Anatoly B. Beklemishev, and Felipe C. Cabello.** PCR Detection of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, Tick-Borne Encephalitis Virus, and the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in *Ixodes persulcatus* Ticks from Western Siberia, Russia. Journal of Clinical Microbiology. 2002 г.

5. **Hui-Min Feng and David H. Walker.** Mechanisms of Immunity to *Ehrlichia muris*: a Model of Monocytotropic Ehrlichiosis. Infection and immunity. 2004 г.

6. **Christopher D. Paddock and James E. Childs.** *Ehrlichia chaffeensis:* a Prototypical Emerging Pathogen. Clinical Microbiology Reviews. 2003 г.

7. **И. Н. Манзенюк, О. Ю. Манзенюк.** Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма). Информационно-методическое пособие. ЗАО "Вектор-Бест". 2005 г.

8. **А. Д. Амосов.** Клещевой энцефалит. Информационно-методическое пособие. ЗАО "Вектор-Бест". 2006 г.

9. **Allen G. Rodrigo, Paul C. Goracke, Kiarash Rowhanian, James I. Mullins.** Quantitation of Target Molecules from Polymerase Chain Rection-Based Limiting Dilutions Assays. AIDS research and human retroviruses. 1997 г.

10. **Rudenko N, Golovchenko M, Cihlárova V, Grubhoffer L.** Tick-borne encephalitis virus-specific RT-PCR--a rapid test for detection of the pathogen without viral RNA purification. Acta Virol. 2004 г.

11. **Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов, П. А. Семенов, А. М. Савилова, И. А. Кофиади, Д. Д. Абрамов.** ПЦР «в реальном времени». БИНОМ. Лаборатория знаний. 2009 г.

12. **Anu Jääskeläinen, Xiuqi Han, Matthias Niedrig, Antti Vaheri, and Olli Vapalahti.** Diagnosis of Tick-Borne Encephalitis by a μ-Capture Immunoglobulin M-Enzyme Immunoassay Based on Secreted Recombinant Antigen Produced in Insect Cells. Journal of Clinical Microbiology. 2003 г.

Интернет-ресурсы:

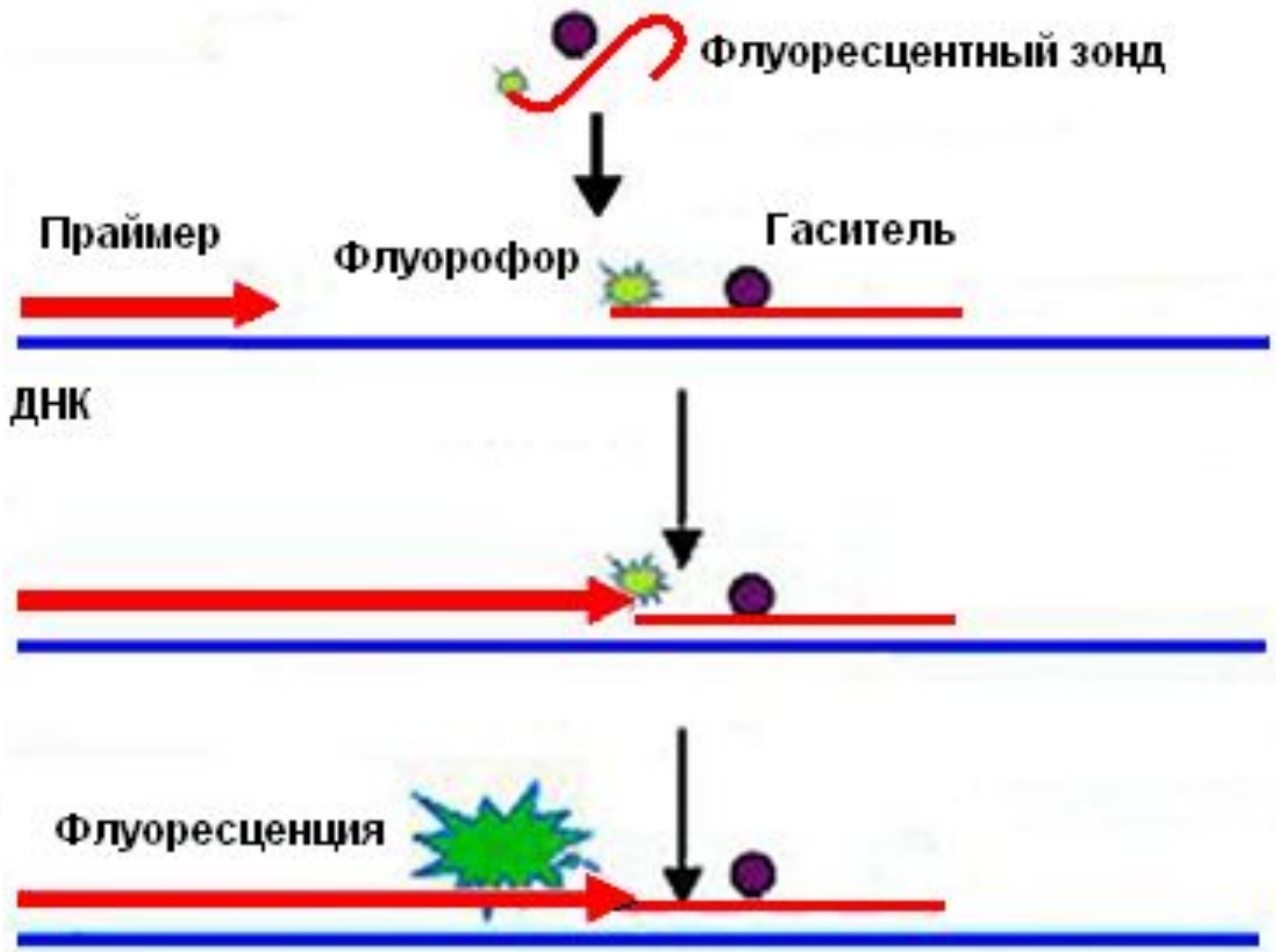
13. **http://www.infectology.ru/nosology/infectious/rikketsiosis/ehrlichioses.aspx**

14. **http://lib2005.rat-info.ru/files/erlihiozy_i_anaplazmozy.pdf**

15. **http://www.molbiol.ru/protocol/13_03.html#a2**

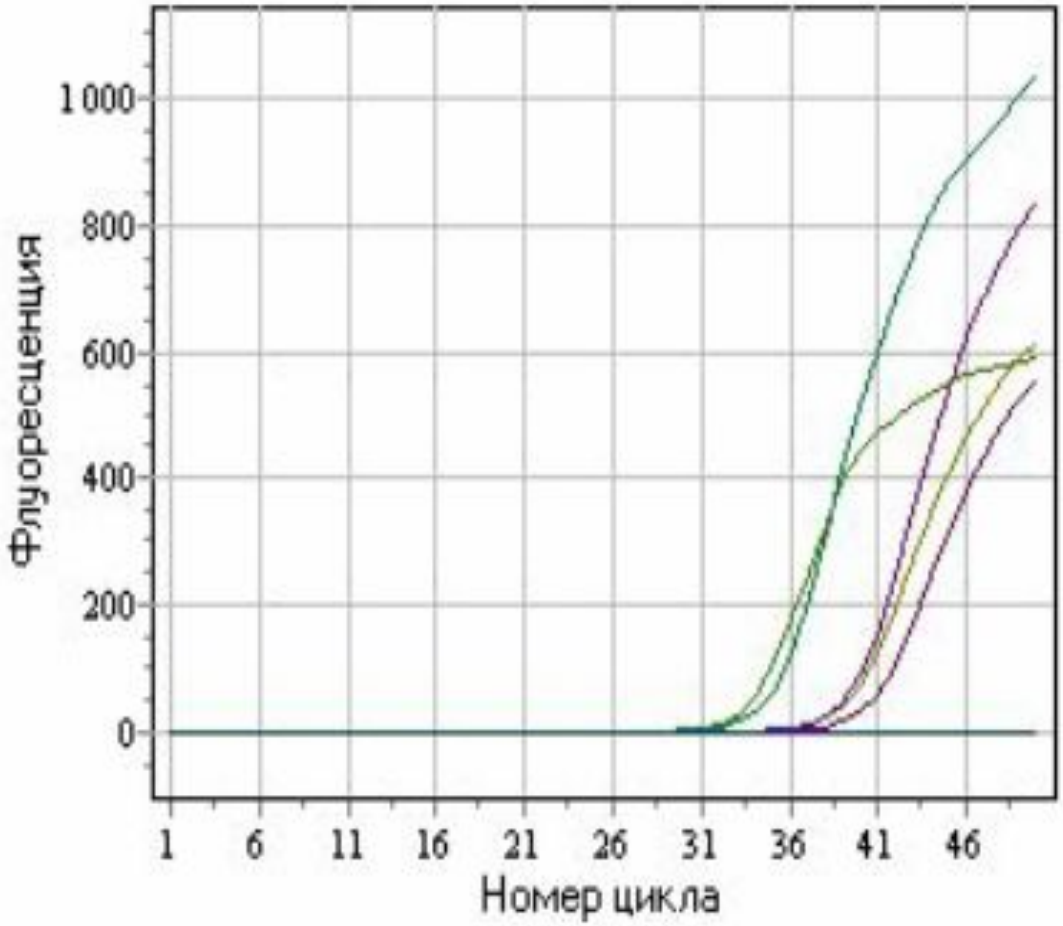
Спасибо за внимание!

Схема детекции результатов методом TaqMan



Пример графиков накопления продуктов амплификации

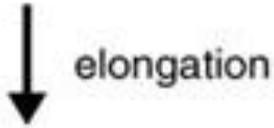
Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла

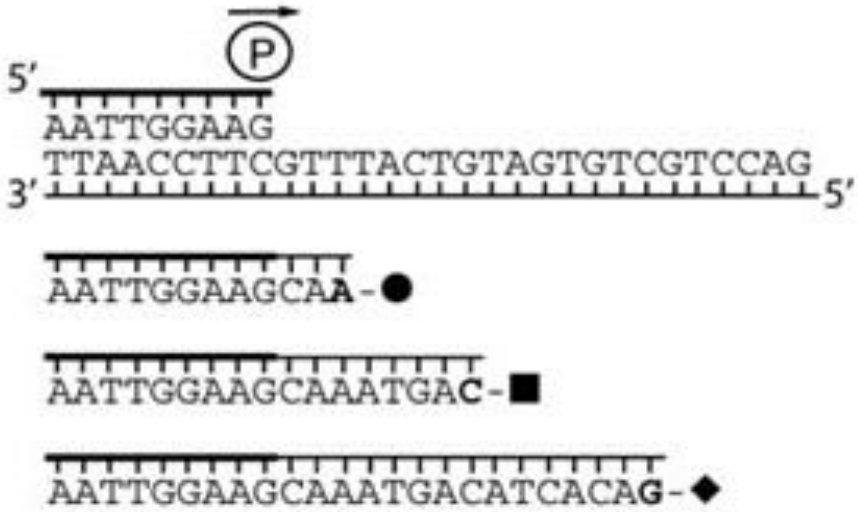


Секвенирование ДНК

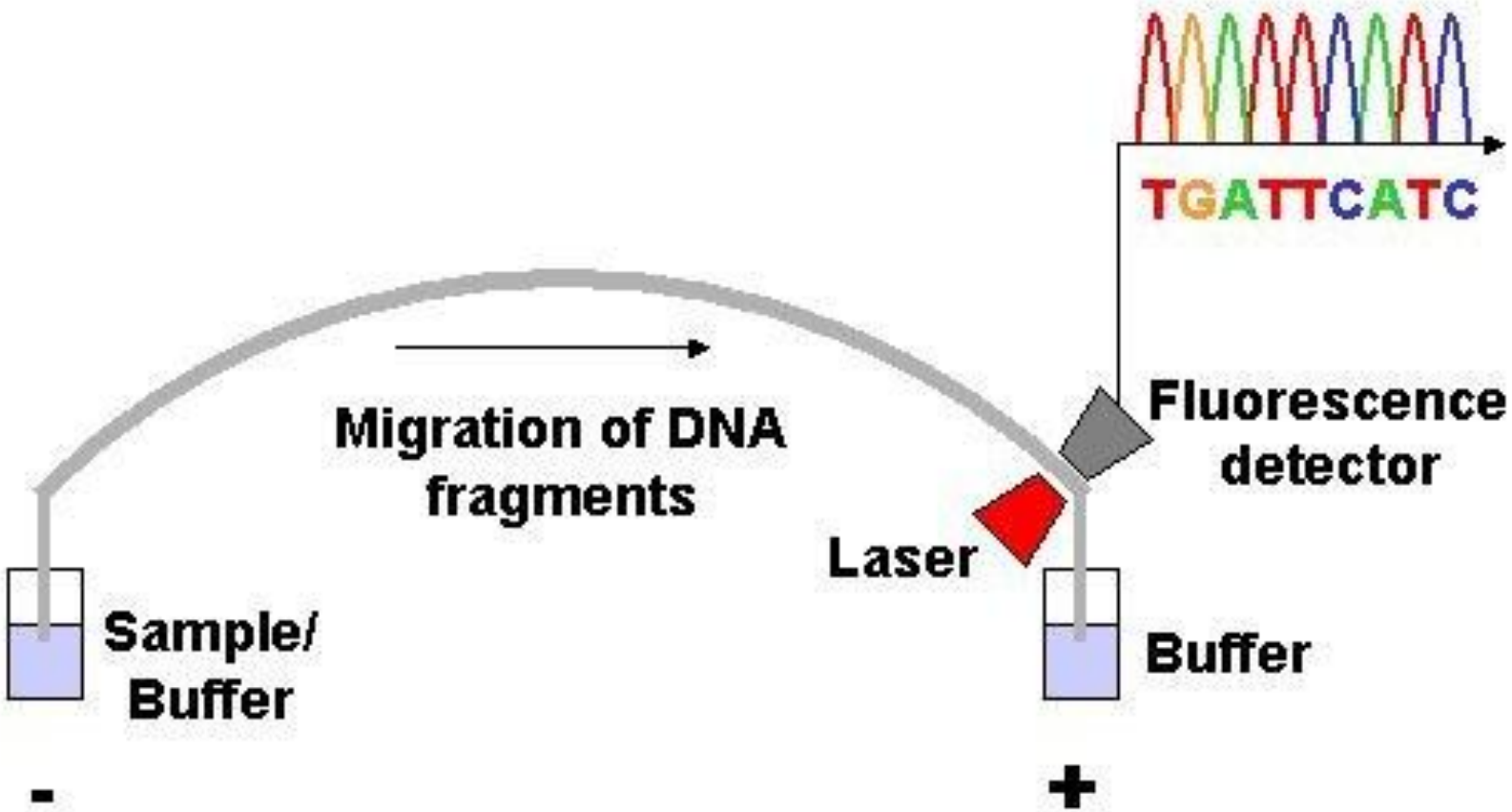
Секвенирование ДНК –определение нуклеотидной последовательности фрагмента анализируемой ДНК.

Ферментативное секвенирование по Сэнгеру.





DNA polymerase, Ⓟ
+
dATP, dCTP, dTTP, dGTP
+
four dye-labeled ddNTPs:
ddATP-●
ddCTP-■
ddTTP-▲
ddGTP-◆


TGATTCATC
Migration of DNA fragments
Fluorescence detector
Laser
Sample/ Buffer
Buffer
-
+

Исследованный материал

Клещи из трех регионов:

- Московская область (9 клещей),
- Свердловская область (Н. Тагил - 19 клещей),
- Оренбургская область (84 клещей).

Клещи из Свердловской области были определены как *Ixodes persulcatus*.

Экстракция суммарных нуклеиновых кислот

- Гомогенизация клеща в пробирке с помощью специального пестика.
- Лизис с помощью гуанидина.
- Выделение фенол-хлороформным методом.
- Хранение при -20°С.

Проведение реакции обратной транскрипции (ОТ)

Компоненты реакции:

- ОТ-буфер.
- ОТ-праймеры (случайные или смесь случайных и специфических 1:10)
- Ревертаза (обратная транскриптаза) — фермент, осуществляющий реакцию.
- Исследуемая РНК.

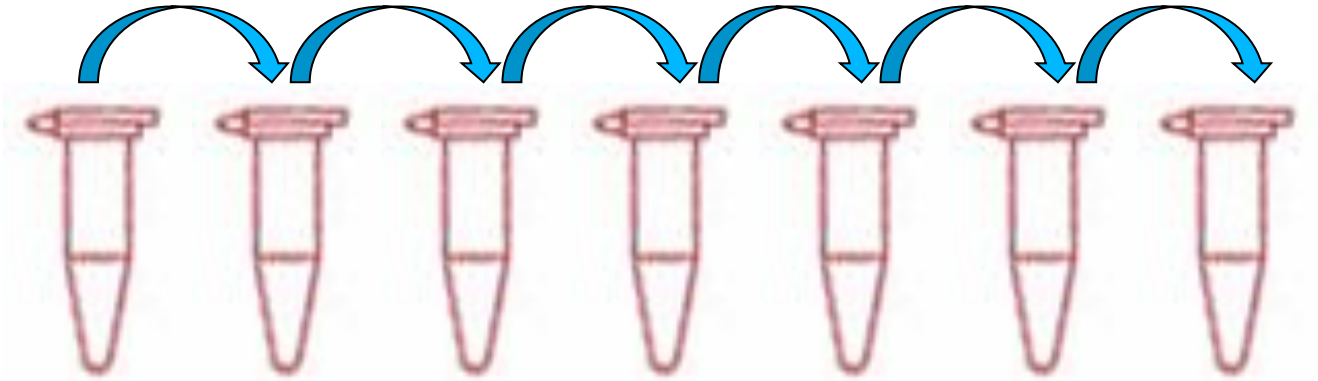
Методика:

- Инкубирование при 40°С в течение 30 мин (синтез кДНК)
- Прогрев при 95°С в течение 5 мин (инактивация фермента)

Проверка чувствительности тест-системы методом «конечных разведений»

Чувствительность тест-системы – параметр, показывающий, какое число молекул матрицы достаточно для положительного срабатывания теста.

1:10 1:2 1:2 1:2 1:2 1:2



К+ $К_1$ $К_2$ $К_3$ $К_4$ $К_4$ $К_6$

Для статистической обработки полученных результатов исползовалась программа Quality (java-версия)

Prob. of false Positive: 0.0

Prob. of false Negative: 0.0

Dilutions: 3 + -

Dilution:	1.0	0.2	0.04
# of PCRs:	10	10	10
# of positives:	6	4	2

% Non-Resample: 0

Samples: 3

New Window Go

```
--------------------

   # of copies per unit:      1.54
         Standard Error:      0.32

   Chi^2 goodness of fit:    6.4820
      degrees of freedom:       2.0
                 P-value:    0.0391

Sensitivity analysis:

  Dilution    # PCRs     # pos   Pos exp    +1 pos    -1 pos

     1.00      10.0       6.0       7.9      1.80      1.36
     0.20      10.0       4.0       2.7      1.65      1.45
     0.04      10.0       2.0       0.6      1.77      1.35

Maximum number of samples that can be taken with 0.0% probability of not resampling: 2
If 3 samples are taken, there is a 0.0% probability of not resampling
```

Чувствительность тест-системы

Постановка реакции секвенирования

При проведении это реакции в реакционной пробирке необходимо смешать:

- Смесь дНТФ, ддНТФ и полимеразы
- Специальный буфер.
- Праймер
- Матрица.

Температурный режим:

96°C – 1 мин

96°C – 15 сек

55°C – 10

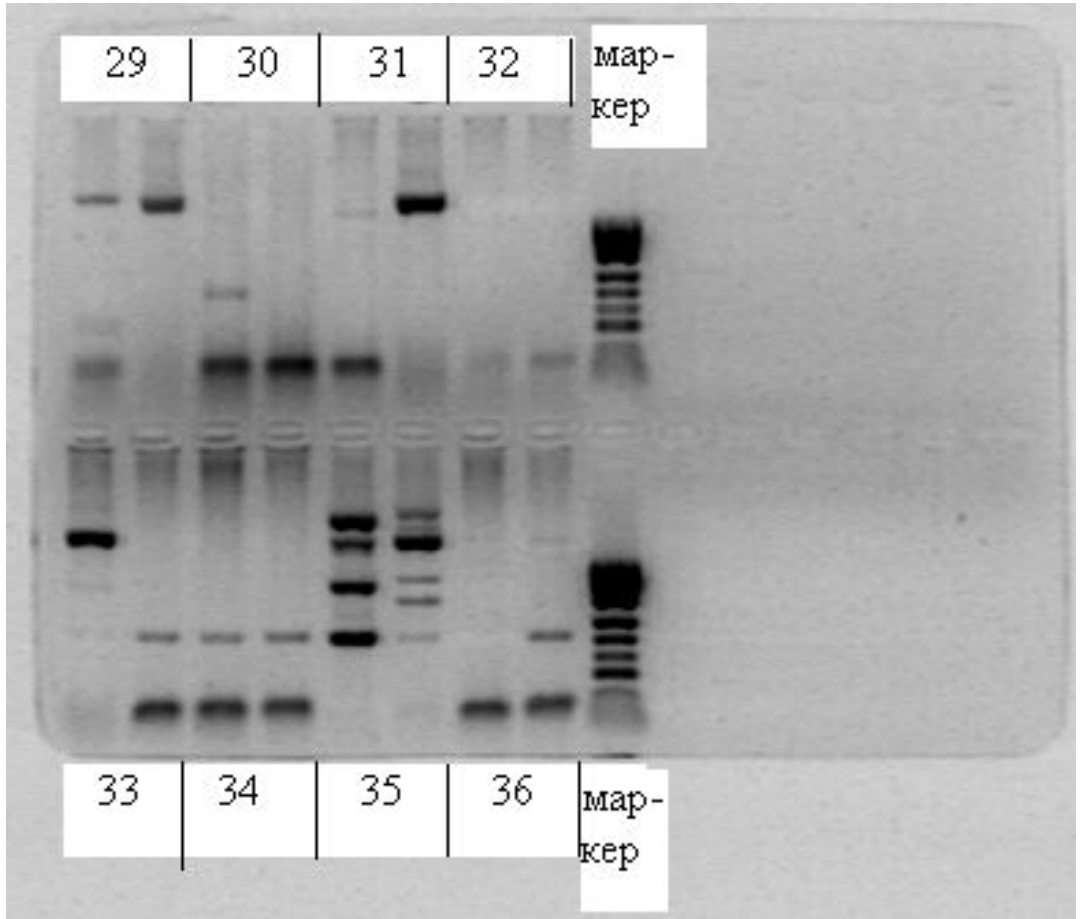
60°C – 3 мин

25 циклов.

Для проведения электрофореза для секвенирования использовали секвенатор *Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems)*

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез ДНК — это аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по размеру (длине).



Подбор последовательностей олигонуклеотидов для детекции *Ehrlichia spp.*

Для изучения свойств олигонуклеотидов мы использовали программу **Oligo 6,31**. Последовательности генов мы брали из сервиса **GenBank** Национального центра биотехнологической информаци, а для поиска сходных последовательностей нуклеотидов использовали сервис **BLAST**. Синтез праймеров и проб выполнялся отделом синтеза олигонуклеотидов ЗАО «НПФ ДНК-Технология».