



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

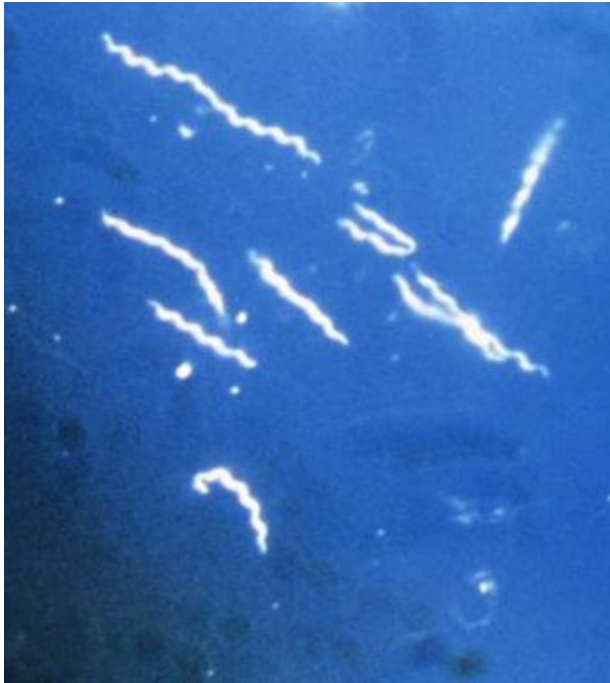
Отряд: Ixodida

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

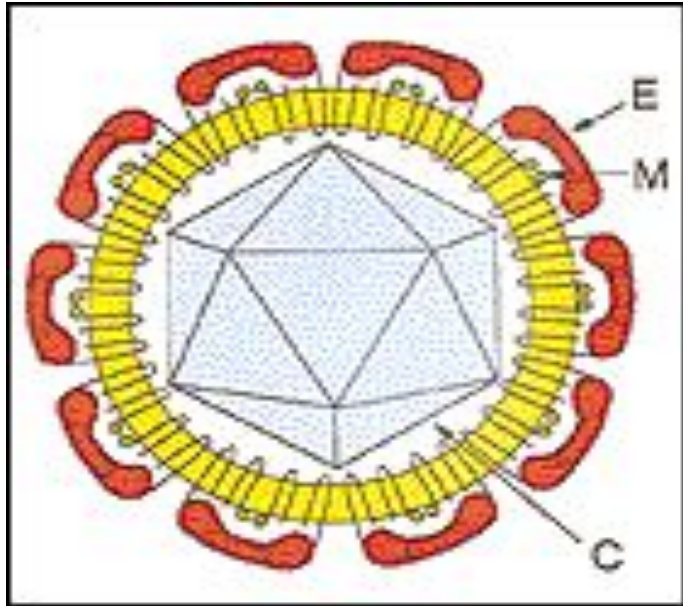
Род: Borrelia

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.



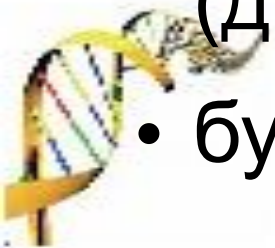
ПЦР



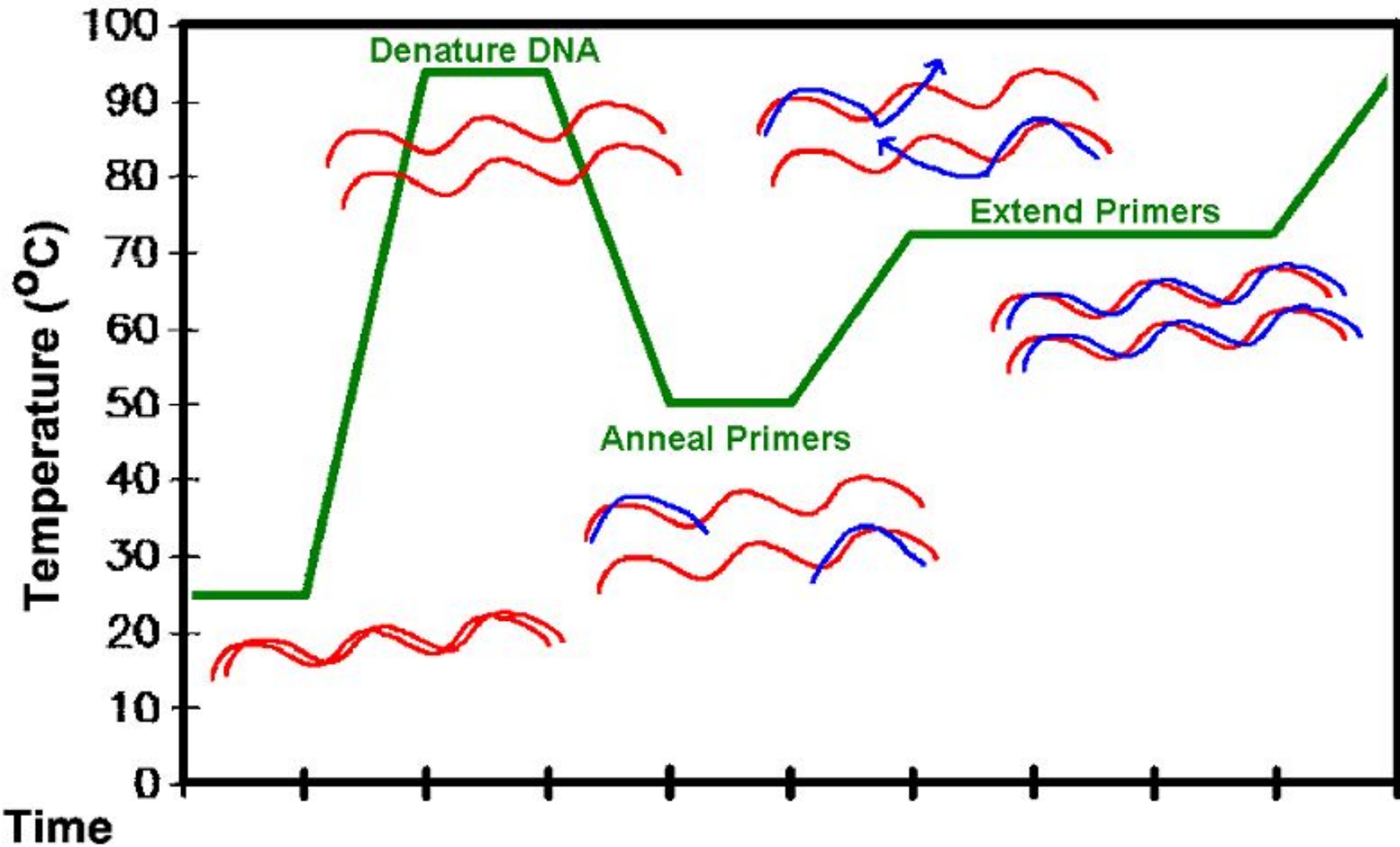
Суть ПЦР состоит в многократном избирательном копировании определенного участка ДНК при помощи ферментов *in vitro*.

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
4. 64,0 °C - 00:15
4. 94,0 °C - 00:10
- 64,0 °C - 00:15



]} *5

]} *45



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

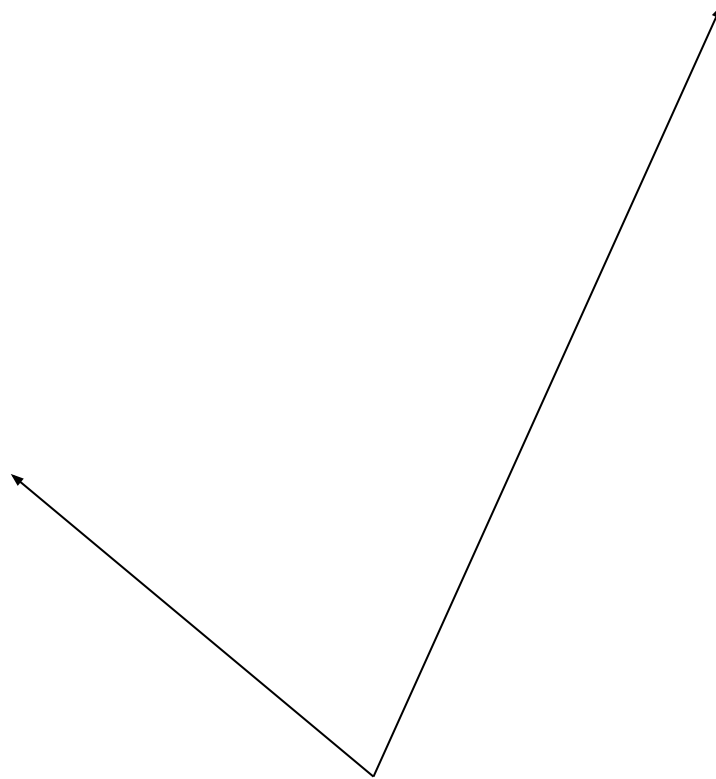


Проверку делали методом «конечных разведений».

Патоген.	Расчетная чувствительность (число стартовых молекул ДНК на одну амплификационную пробирку)
<i>B. burgdorferi</i>	1,54
TBEV	2,16



Проверка специфичности системы для детекции *Ehrlichia* *spp*

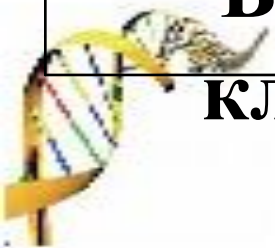


Изучение зараженности клещей *B. burgdorferi*, TBEV и *Ehrlichia spp.*



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

клещей:



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



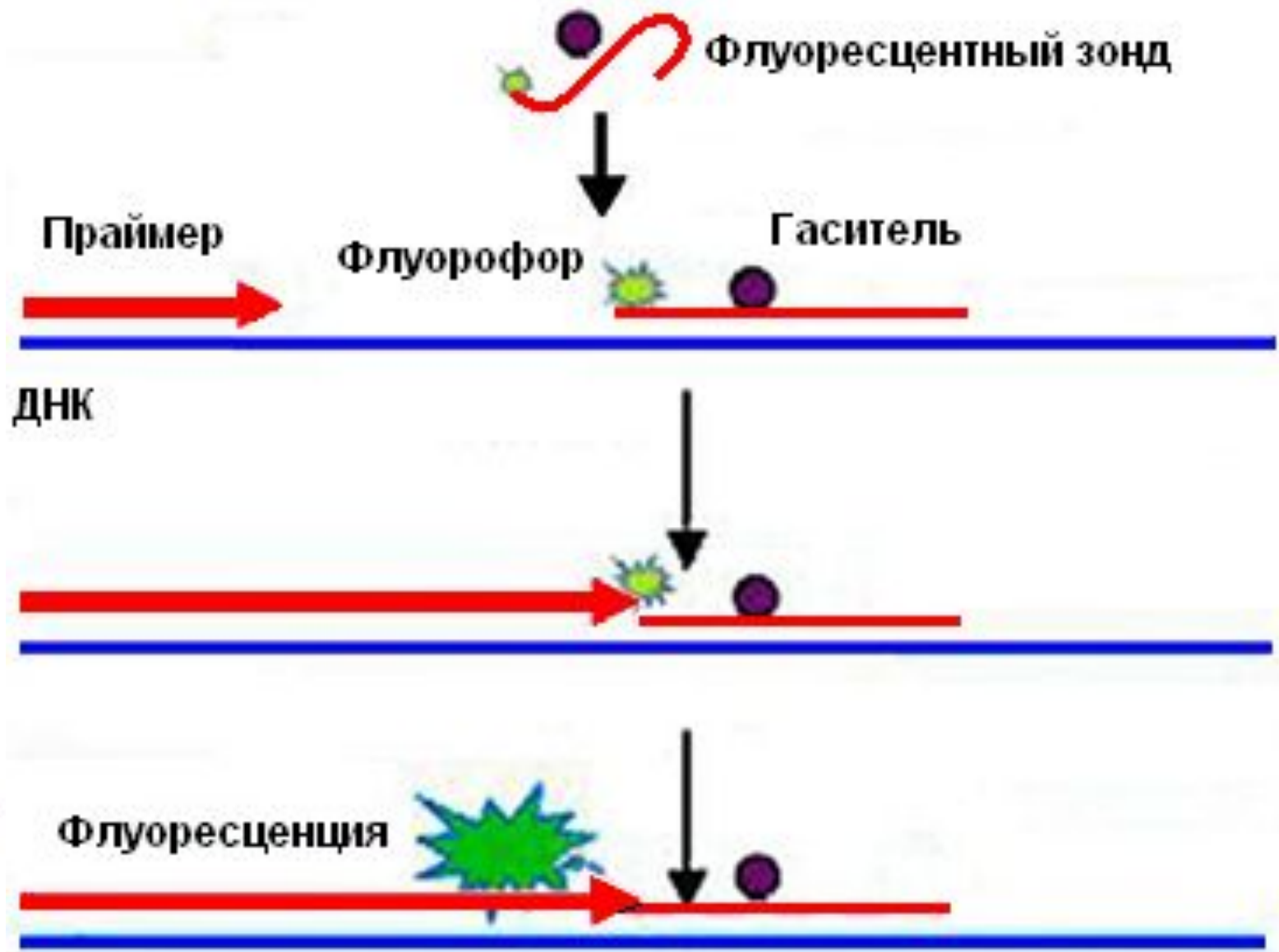
1. **В. В. Малеев.** Обзор Европейских рекомендаций по диагностике клещевых бактериальных инфекций. Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия 2005 г.
2. **Е. П. Шувалова.** Инфекционные болезни. Медицина. 1990 г.
3. **C. Kuyler Doyle, Marcelo B. Labruna, Edward B. Breitschwerdt, Yi-Wei Tang, 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 Reaction-Based Limiting Dilutions Assays. AIDS research and human retroviruses. 1997 г.
10. **Rudenko N, Golovchenko M, Cihlářova 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/erlihozy_i_anaplazmozy.pdf
15. http://www.molbiol.ru/protocol/13_03.html#a2

Спасибо за
внимание!

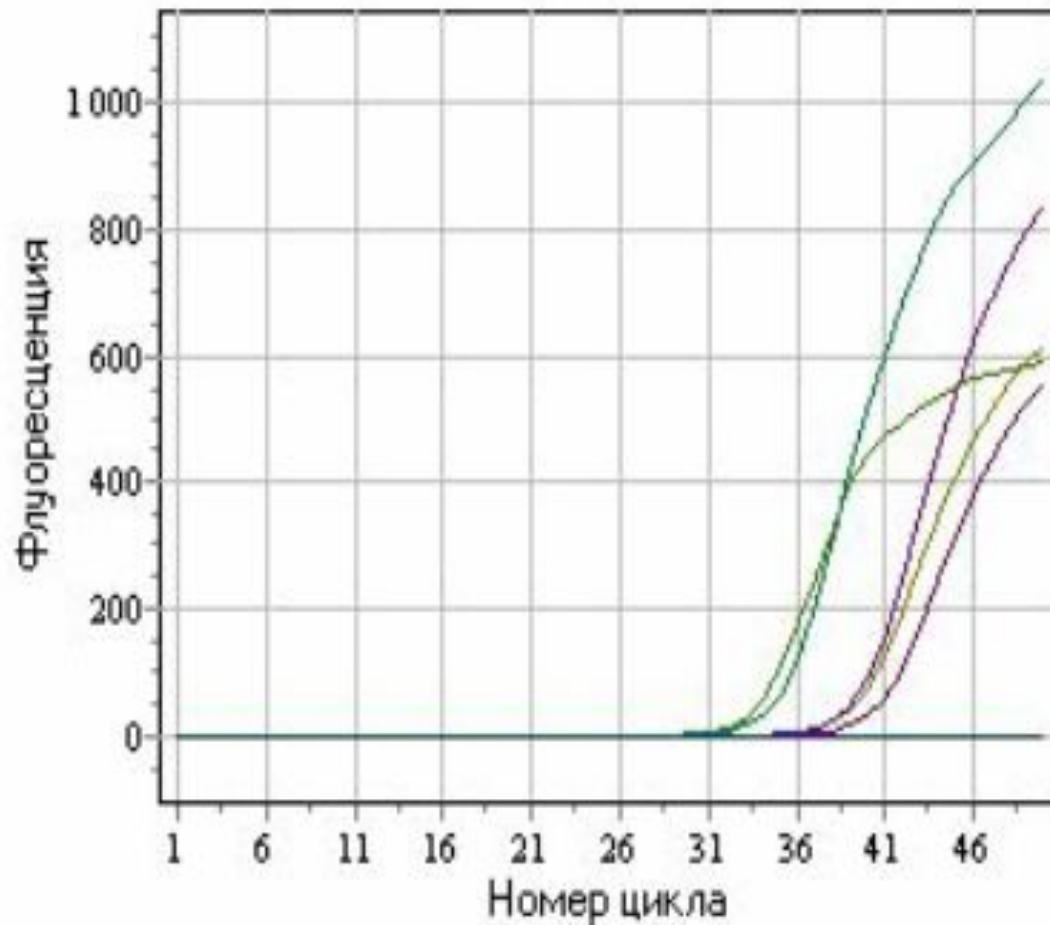
Схема детекции результатов методом TaqMan



Пример графиков накопления продуктов амплификации



Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла



Секвенирование ДНК

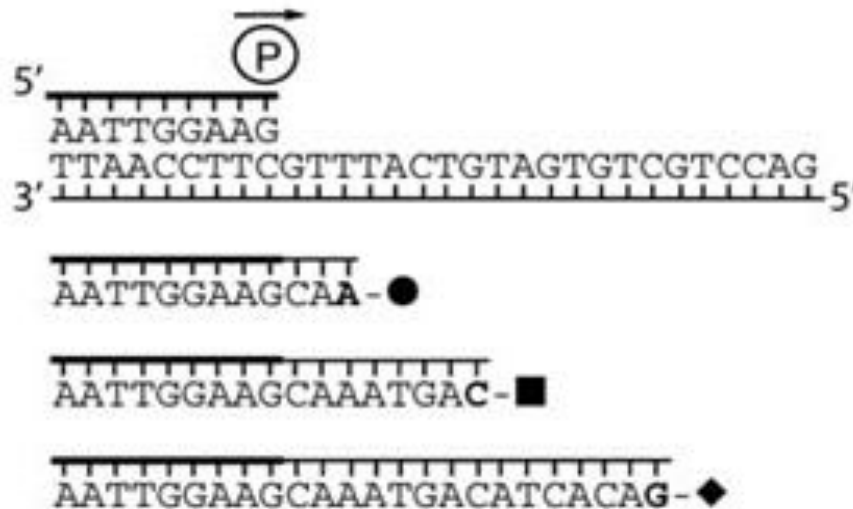


Секвенирование ДНК – определение нуклеотидной последовательности фрагмента анализируемой ДНК.

Ферментативное секвенирование по Сэнгеру.

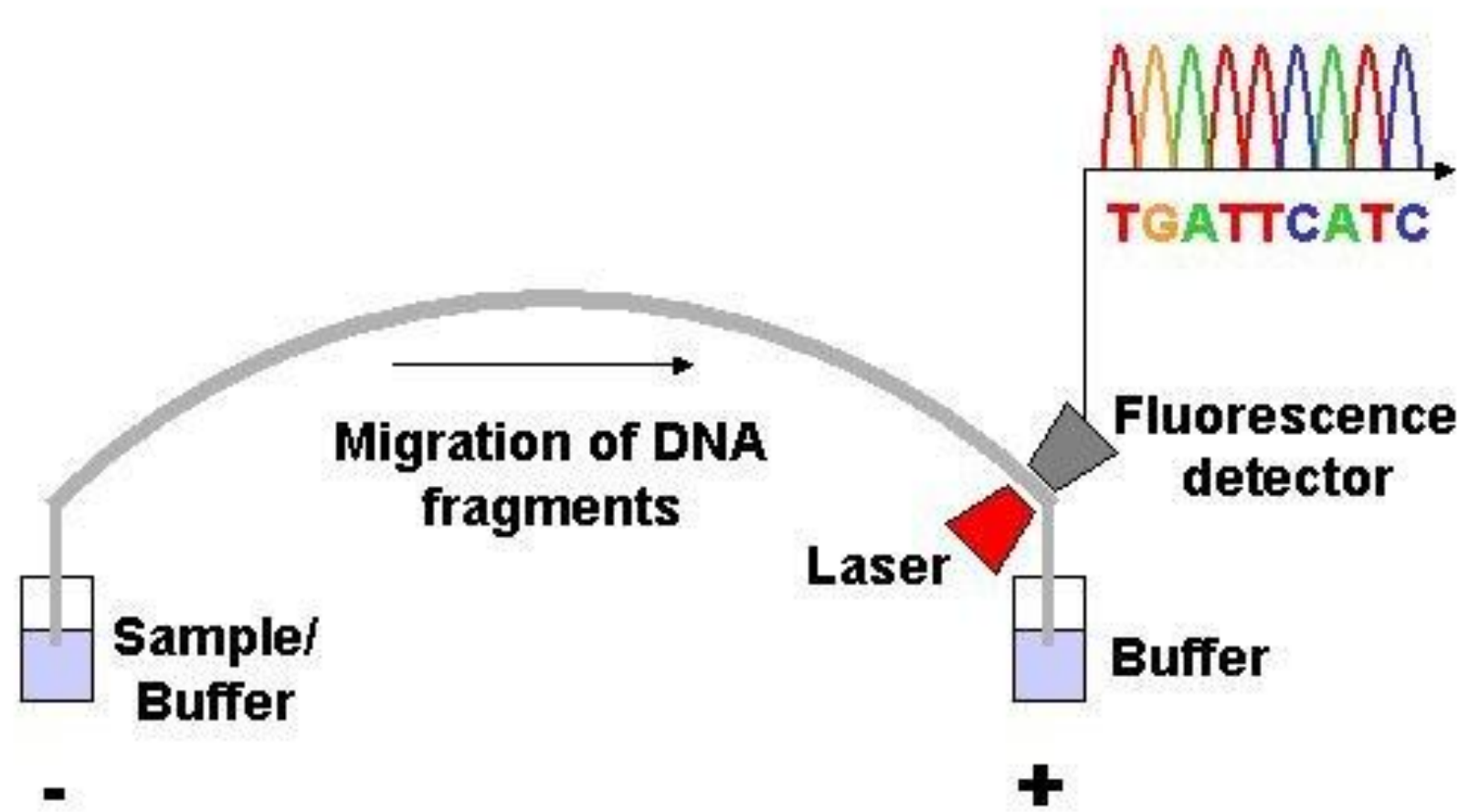


↓ elongation



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





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°C .



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

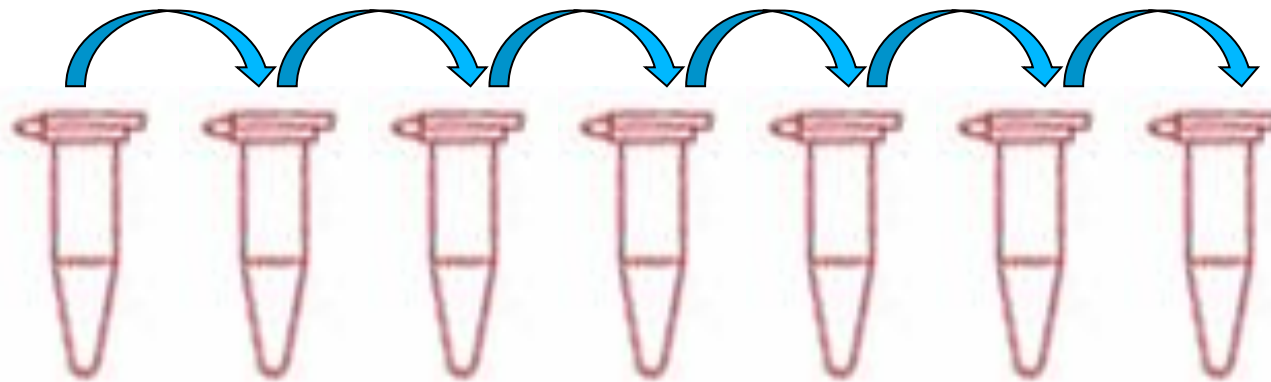


Проверка чувствительности тест-системы методом «конечных разведений»



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



K^+ K_1 K_2 K_3 K_4 K_4 K_6



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



Prob. of false Positive:

Prob. of false Negative:

Dilutions: 3

Dilution:	<input type="text" value="1.0"/>	<input type="text" value="0.2"/>	<input type="text" value="0.04"/>
# of PCRs:	<input type="text" value="10"/>	<input type="text" value="10"/>	<input type="text" value="10"/>
# of positives:	<input type="text" value="6"/>	<input type="text" value="4"/>	<input type="text" value="2"/>
% Non-Resample:	<input type="text" value="0"/>		
# Samples:	<input type="text" value="3"/>		

of copies per unit: 1.54
Standard Error: 0.32

*Чувствительность
тест-системы*

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

Постановка реакции секвенирования



необходимо

При проведении этой реакции в реакционной пробирке 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.

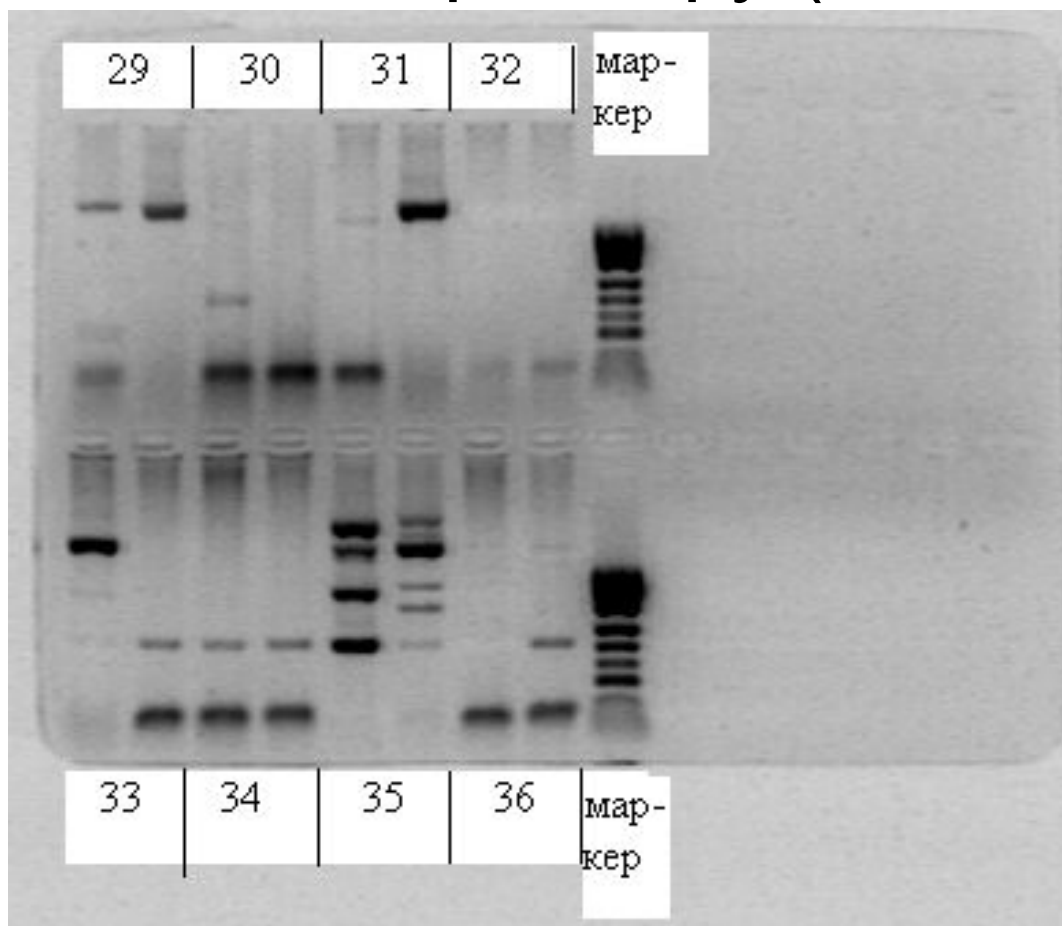


Для проведения электрофореза для секвенирования использовали секвенатор *Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems)*

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 информации, а для поиска сходных последовательностей нуклеотидов использовали сервис **BLAST**. Синтез праймеров и проб выполнялся отделом синтеза олигонуклеотидов ЗАО «НПФ ДНК-Технология».

