


МІКРОБІОЛОГІЯ, ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 636.09:616.9/95.422:619

Оптимізація полімеразної ланцюгової реакції для моніторингу інфікованості іксодових кліщів *Borrelia burgdorferi*

Пантелєєнко О.В. , Царенко Т.М. 

Білоцерківський національний аграрний університет

 Пантелєєнко О.В. E-mail: olga.panteleienko@btsau.edu.ua



Пантелєєнко О.В., Царенко Т.М. Оптимізація полімеразної ланцюгової реакції для моніторингу інфікованості іксодових кліщів *Borrelia burgdorferi*. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2022. № 2. С. 20–32.

Panteleienko O., Tsarenko T. Optimization of polymerase chain reaction for monitoring of *Borrelia burgdorferi* infection by ixodid ticks. *Nauk. visn. vet. med.*, 2022. № 2. PP. 20–32.

Рукопис отримано: 14.12.2022 р.

Прийнято: 22.12.2022 р.

Затверджено до друку: 27.12.2022 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2022-176-2-20-32

Визначення показників інфікованості іксодових кліщів збудниками кліщового бореліозу та встановлення належності до патогенного генотипу за допомогою методу ПЛР є важливою складовою для проведення моніторингу, оцінки ризиків та контролю епізоотичної ситуації щодо Лайм-бореліозу на різних територіях.

Наведено результати апробації та оптимізації внутрішньолабораторного протоколу класичної полімеразної реакції для ідентифікації збудників хвороби Лайма. Методом класичної ПЛР дослідили вісім проб екстрагованого ДНК з іксодових кліщів, зібраних із рослинності в лісопарковому урочищі «Голендерня», м. Біла Церква Київська область. Проби були сформовані з пулів по десять екземплярів кліщів: сім пулів – кліщі роду *I. ricinus* та один пул – кліщі роду *D. reticulatus*. Використали набори праймерів для виявлення ДНК комплексу борелій *Borrelia burgdorferi sensu lato*; *Borrelia burgdorferi* та патогенних борелій: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* та *Borrelia afzelii*.

Було модифіковано протокол виділення нуклеїнових кислот з кліщів за допомогою комерційного набору Indi Spin Pathogen Kit. Оптимізацію температурних режимів ампліфікації провели методом градієнта температур відпалу для кожної пари праймерів.

За результатами дослідження розроблено внутрішньолабораторні протоколи класичної ПЛР з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів. Встановили, що в кожному з пулів *I. ricinus* та *D. reticulatus* були наявні інфіковані екземпляри кліщів комплексом борелій *Borrelia burgdorferi sensu lato* та генотипом *Borrelia afzelii*, а також ідентифіковано генотип *Borrelia burgdorferi sensu stricto* в одному з пулів *I. ricinus* та *D. reticulatus*, ДНК генотип *Borrelia garinii* не виявлено.

Розроблені внутрішньолабораторні протоколи класичної ПЛР в подальшому будуть використані для досліджень інфікованості іксодових кліщів збудниками кліщового бореліозу: *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* та *Borrelia afzelii*.

Ключові слова: Лайм-бореліоз, іксодові кліщі, полімеразна ланцюгова реакція, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Кліщі роду *Ixodes ricinus* – поширені по всій території України та є універсальними ектопаразитами, які уражують велику кількість видів ссавців, птахів, рептилій та людину. Вони переносять широкий спектр

патогенних мікроорганізмів, зокрема комплекс спірохет – *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi s. l.*), які зумовлюють у людей і тварин захворювання під назвою Лайм-бореліоз (ЛБ) (синоніми: хвороба Лайма, бореліоз, іксодовий кліщовий бореліоз). За різними

даними, зараженість кліщів *I. ricinus* збудниками Лайм-бореліозу в країнах Європи становить 2,5–29,0 % [1–3]. В Україні за даними моніторингу Міністерства охорони здоров'я із 2015 до 2019 рр. зараженість іксодових кліщів *I. ricinus* та *D. reticulatus* коливалась в межах 8,09–27,1 %, сумарна зараженість інших родів іксодових кліщів: *D. marginatus*, *Rhipicephalus rossicus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *Haemaphysalis punctata* і *Hyalomma marginatum* становила 8,31–12,28 % [4].

Нині комплекс спірохет *B. burgdorferi s. l.* налічує 21 генотип. Нозоареали ЛБ відрізняються за генотиповим складом *B. burgdorferi s. l.* на різних континентах та територіях. Наприклад, в США найпоширенішим патогенним генотипом для людей та собак є *B. burgdorferi sensu stricto* (*B. burgdorferi s. s.*), водночас встановлені випадки ідентифікації інших генотипів: *B. californiensis*, *B. americana*, *B. carolinensis* та *B. kurtenbachii*. Натомість в європейських країнах та в Україні переважно виявляють три патогенні генотипи: *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii*, *B. garinii*, інші генотипи були ідентифіковані як патогенні в окремих випадках: *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. bissettae*, *B. bavariensis* та *B. spielmanii*. У Східній Азії генотиповий склад борелій представлений: *B. japonica*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. afzelii*, *B. tanukii*, *B. sinica*, *B. yangtzensis* та рідше інші генотипи [5].

Фенотипову мінливість та імуногенність бактерій *B. burgdorferi s. l.* визначають імуногенні поверхневі білки, позначають їх як Osp (outer surface proteins) [6, 7]. Геномні відмінності борелій мають клінічне значення для розвитку симптомокомплексів ЛБ. Наприклад, *B. burgdorferi s. s.* зазвичай асоціюють з проявами симптомів пов'язаних з ураженням суглобів та розвитком артритів, *B. garinii* – з ураженням периферичної та центральної нервової системи, а *B. afzelii* – з ранньою інфекцією та шкірними проявами ЛБ – мігруюча еритема [8].

Інфікованість іксодових кліщів бореліями можна встановити кількома методами. Наприклад, мікроскопічне дослідження кишечника кліща дозволяє виявити борелії та визначити ступінь інфікованості іксодового кліща за підрахунку бактерій в полі зору мікроскопа. Цей метод не потребує додаткових витрат на діагностичні засоби та матеріали, однак підготовка кліщів для дослідження є тривалою й трудомісткою, також метод мікроскопії не дає можливості ідентифікувати генотипи *B. burgdorferi s. l.*

Борелії є вибагливими, повільно зростаючими та біохімічно неактивними мікроор-

ганізмами, які потребують особливих умов для росту культури бактерій: анаеробне середовище, рН 7,6 і температура 33 °С. Також у борелій низька метаболічна здатність, вони не синтезують амінокислоти, нуклеотиди та жирні кислоти, тому для їх культивування *in vitro* використовують багатокомпонентне поживне середовище (BSK-H). Основними недоліками мікробіологічного методу культивування *B. burgdorferi s. l.* є довготривалість (до 12 тижнів), малопродуктивність та низька чутливість методу, тому його не застосовують для рутинної діагностики.

Чутливішими методами виявлення та ідентифікації збудників кліщового бореліозу вважають методи молекулярної діагностики. Методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) встановлюють наявність ДНК збудників бореліозу в іксодових кліщах та його належність до генотипу [9–12]. За проведення ПЛР як мішені використовують специфічні ділянки геному борелій. Однак генетична будова ділянок розташування генів у різних генотипів борелій відрізняється за їх ступенем гетерогенності, що обмежує вибір мішеней та підбір праймерів для проведення ПЛР.

Мета дослідження. Апробація застосування модифікованого методу виділення ДНК та оптимізація протоколів класичної полімеразної ланцюгової реакції для дослідження інфікованості іксодових кліщів бореліями та ідентифікації комплексу *B. burgdorferi s. l.* і окремих генотипів патогенних борелій *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii* та *B. garinii*.

Матеріал і методи дослідження. Для досліджень використали іксодових кліщів раніше зібраних з рослинності в Київській області, м. Біла Церква, в лісопарковому урочищі «Голлендерня», яких законсервували у 70 % етиловому спирті та зберігали в холодильнику за 5 °С [13]. Загалом дослідили 70 екземплярів кліщів роду *I. ricinus* та 10 екземплярів кліщів роду *D. reticulatus*.

Пробопідготовка та виділення ДНК з кліщів. Перед виділенням ДНК, кліщів кілька разів промивали стерильною дистильованою водою та просушували на фільтрувальному папері. Далі в пробірки типу «Епендорф» об'ємом 2 мл поміщали по 10 екземплярів іксодових кліщів, які належали до одного роду. Загалом отримали 7 пулів *I. ricinus* та 1 пул *D. reticulatus*. В кожну пробірку з кліщами додавали по 200 мкл 0,9 % розчину натрію хлориду. Далі проводили механічну руйнацію кліщів стерильними ножицями. До отриманих суспензій (проб) додавали по 25 мкл розчину протеїнази К, перемішували та інкубували протягом 1,5 год

за температури 56 °C у твердотільному термостаті. Після інкубації суміш перемішували та короткочасно центрифугували. Подальшу ізоляцію нуклеїнових кислот проводили відповідно до інструкції виробника набору Indi Spin Pathogen Kit (Indical Bioscience, Німеччина), який дозволяє виділяти з проби ДНК та РНК. Об'єм розчину екстрагованих нуклеїнових кислот (зокрема ДНК) з кожного пулу кліщів становив 150 мкл.

Класична полімеразна ланцюгова реакція. Для дослідження застосували дві пари праймерів LD та SC, націлені на ділянку гена 16S рРНК *B. burgdorferi s. l.*; пару праймерів SL спрямованих на хромосому ДНК *B. burgdorferi s. l.*; для вкладної ПЛР використали зовнішні OspA ext. та внутрішні OspA int. праймери, що націлені на ділянку гена *B. burgdorferi* OspA; три пари праймерів для ідентифікації окремих генотипів *B. burgdorferi s. l.*: праймер BB для ідентифікації *B. burgdorferi s. s.*, BG – *B. garinii* та VS461 – *B. afzelii* відповідно. Загальний опис праймерів наведено в таблиці 1.

Реакцію ПЛР проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка містила: 12,5 мкл готового міксу для ПЛР One Taq Quick-Load 2X Master Mix зі стандартним буфером #M0486 (New England Biolabs, США), по 0,5 мкл відповідного набору F та R праймерів, 8,5 мкл деіонізованої води та 3 мкл екстрагованої ДНК з кліщів. Вкладену ПЛР з праймерами OspA ext. та OspA int. проводили в два етапи. В першому етапі ампліфікації використали

зовнішні праймери OspA ext. для отримання фрагмента 702 bp., реакційна суміш містила компоненти в таких же пропорціях як описано вище: мікс, F та R праймери OspA ext., деіонізовану воду та екстраговану ДНК з кліщів. У другому етапі для отримання фрагменту розміром 345 bp реакційна суміш містила мікс, F та R праймери OspA int., деіонізовану воду та 3 мкл продукту ампліфікації з праймерами OspA ext. першого етапу вкладної ПЛР. Ампліфікацію нуклеїнових кислот проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США).

Для праймерів було розраховано оптимальну температуру відпалу (T_a), враховуючи дані паспорта кожного набору праймерів, рекомендації протоколу проведення ПЛР з готовим міксом One Taq Quick-Load 2X Master Mix #M0486 та онлайн-калькулятора NEB Tm Calculator версія 1.15.0 (<https://tcalculator.neb.com>). Оптимальні температурні режими ампліфікації для кожної пари праймерів наведено в таблиці 2.

Детекцію отриманих продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі з додаванням 50 мкл етидію броміду на 100 мл гелю. Візуалізацію гелю-електрофорезу проводили з УФ-підсвічуванням, визначаючи наявність специфічних фрагментів ДНК відповідної довжини. Розмір специфічного фрагмента ДНК визначали за його положенням відносно маркера молекулярної ваги.

Таблиця 1 – Олігонуклеотидні ПЛР-праймери для виявлення та ідентифікації генотипів *B. burgdorferi s. l.*

Цільові генотипи	Назва праймерів	Послідовність нуклеотидів	Розмір продукту ампліфікації (bp)	Посилання
<i>B. burgdorferi s. l.</i>	LD	ATGCACACTTGGTGTAACTA	357	[14]
		GACTTATCACCGGCAGTCTTA		
<i>B. burgdorferi s. l.</i>	SC	GCTGGCAGTGCCTCTTAA	325	[15]
		CTTAGCTGCTGCCCTCCCGTA		
<i>B. burgdorferi s. l.</i>	SL	AATAGGTCTAATAATAGCCTTAATAGC	307	[16]
		CTAGTGTTTTGCCATCTTCTTTGAAAA		
<i>B. burgdorferi</i>	OspA ext.	AAAAAATATTTATTGGGAATAGG	702	[17]
		GTTTTTTTGCTGTTTACACSTAATTGTAA		
	OspA int.	GGAGTACTTGAAGGC	345	
		GCTTAAAGTAACAGTTCC		
<i>B. burgdorferi s. s.</i>	BB	GGGATGTAGCAATACATTC	574	[14]
		ATATAGTTTCCAACATAGG		
<i>B. garinii</i>	BG	GGGATGTAGCAATACATCT	574	[14]
		ATATAGTTTCCAACATAGT		
<i>B. afzelii</i>	VS461	GCATGCAAGTCAAACGGA	591	[14]
		ATATAGTTTCCAACATAGC		

Таблиця 2 – Температурні режими ампліфікації

Назва праймера	Активация полімерази	Ампліфікація 40 циклів			Фінальна елонгація
		денатурація	відпал	елонгація	
LD	94 °C / 1 хв	94 °C / 30 с	51 °C / 30 с	68 °C / 1 хв	68 °C / 5 хв
SC	94 °C / 1 хв	94 °C / 30 с	56 °C / 30 с	68 °C / 1 хв	68 °C / 5 хв
SL	94 °C / 1 хв	94 °C / 30 с	56 °C / 30 с	68 °C / 1 хв	68 °C / 5 хв
OspA ext.	94 °C / 1 хв	94 °C / 30 с	51 °C / 30 с	68 °C / 1 хв	68 °C / 5 хв
OspA int.	94 °C / 1 хв	94 °C / 30 с	45 °C / 30 с	68 °C / 1 хв	68 °C / 5 хв
BB	94 °C / 1 хв	94 °C / 30 с	46 °C / 30 с	68 °C / 1 хв	68 °C / 5 хв
BG	94 °C / 1 хв	94 °C / 30 с	45 °C / 30 с	68 °C / 1 хв	68 °C / 5 хв
VS461	94 °C / 1 хв	94 °C / 30 с	46 °C / 30 с	68 °C / 1 хв	68 °C / 5 хв

Як негативні контролю використали ДНК лептоспир *Leptospira canicola* та *Leptospira pomona*. Негативний контроль на етапі виділення ДНК та негативний контроль на етапі збору реакційної суміші містили всі компоненти реакції та деіонізовану воду замість досліджуваної ДНК матриці.

Оптимізація протоколів ПЛР. Перший етап полягав власне у виявленні специфічного ДНК комплексу *B. burgdorferi s. l.* та окремих генотипів: *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii*, *B. garinii* з кожного пулу екстрагованого ДНК з *I. ricinus* та *D. reticulatus*. Температурні режими ампліфікації проводили за схемами наведеними в таблиці 2. Для проведення наступного етапу, проби, що містили специфічні фрагменти ДНК комплексу *B. burgdorferi s. l.* та ДНК окремих генотипів об'єднували у пули, за допомогою змішування по 20 мкл з кожної проби відповідно. Другий етап, власне оптимізація протоколів класичної ПЛР, проводили через визначення оптимальних температур відпалу для кожної пари праймерів, в діапазоні *Ta* від 47 до 59 °C з кроком у 4 °C.

Специфічність класичної ПЛР. Встановлення специфічності визначали з використанням ДНК лептоспир *Leptospira canicola* та *Leptospira pomona*.

Чутливість класичної ПЛР. Попередньо методом спектрофотометрії визначали кількісний вміст виділених нуклеїнових кислот (НК) в досліджуваних пробах. Вимірювання проводили на спектрофотометрі СФ-46, використавши кварцові кювети об'ємом 1 см³. Для спектрофотометрії змішували 50 мкл досліджуваної проби з 950 мкл деіонізованої води, для контролю змішували 50 мкл АВЕ буфера з 950 мкл деіонізованої води. Чистоту зразків перевіряли вимірюваннями оптичної густини (ОГ) зразків за довжин хвиль 230, 260 і 280 нм. Зразки вважали чистими, якщо співвідношення ОГ проб вимірюваних за 260 та 280 нм не перевищувало 1,8, а за 260 та 230 нм – не перевищува-

ло 2,2 відповідно. Концентрацію нуклеїнових кислот розраховували у такий спосіб: якщо ОГ дорівнює 1,0 за довжини хвилі 260 нм, то вміст нуклеїнових кислот становить 50 мкг/мл [18]. Після визначення концентрації НК у досліджуваних пробах робили збірну пробу, яка відповідає середній концентрації НК. Для визначення чутливості ПЛР виконали серійні розведення збірної проби з деіонізованою водою в наступних розведеннях: 1:10; 1:100. Постановку ПЛР проводили за попередньо визначеними оптимальними температурними параметрами для кожної пари праймерів.

Результати дослідження. Методом ПЛР дослідили вісім проб екстрагованої ДНК з іксодових кліщів на встановлення наявності специфічних фрагментів ДНК збудників бореліозу комплексу *B. burgdorferi s. l.* та окремих генотипів: *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii*, *B. garinii*. Температурні режими проведення реакції відповідали даним таблиці 2. Розміри отриманих продуктів ампліфікації визначали за лінійкою маркера молекулярної маси. В результаті проведення ампліфікації з праймерами SL націлених на хромосому ДНК *B. burgdorferi s. l.*, з праймерами SC націленими на ділянку гена 16S рНК *B. burgdorferi s. l.* та з праймерами для вкладної ПЛР, що націлені на ділянку гена *B. burgdorferi* OspA встановили, що у всіх пробах наявні специфічні фрагменти ДНК борелій комплексу *B. burgdorferi s. l.* В результаті ПЛР з праймерами LD націлених на ділянку гена 16S рНК *B. burgdorferi s. l.* отримали 1-шу, 2-, 4-, 5-, 6- та 8-му позитивні проби.

ПЛР проведена з наборами праймерів для ідентифікації окремих генотипів комплексу *B. burgdorferi s. l.* дала наступний результат: вісім позитивних проб з набором праймерів VS461 для ідентифікації генотипу *B. afzelii*; 1 та 8 позитивні проби з праймерами BB для ідентифікації генотипу *B. burgdorferi s. s.*; всі негативні проби з парою праймерів BG для ідентифікації *B. garinii*, відповідно.

Оптимізація протоколів ПЛР. Для оптимізації температурних режимів ампліфікації робили окремі збірні проби екстрагованого ДНК з кліщів, в яких встановлена наявність специфічного ДНК *B. burgdorferi s. l.* та ДНК окремих генотипів борелій: *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii*, *B. garinii* на попередньому етапі дослідження. Позитивні проби об'єднували по 20 мкл згідно з даними таблиці 3.

На попередньому етапі ПЛР дослідження з набором праймерів BG, в продуктах ампліфікації не виявили специфічних фрагментів ДНК *B. garinii*, що може бути пов'язано із низькою температурою відпалу (45 °C). Тому для подальшої оптимізації протоколу ПЛР з використанням праймерів BG об'єднали всі проби ДНК.

З кожною збірною пробою екстрагованого ДНК з кліщів та наборами праймерів робили реакційну суміш у трьох повтореннях. Суміш готували безпосередньо перед проведенням ампліфікації. Температуру відпалу для кожної пари праймерів оптимізували, виконуючи ампліфікацію починаючи з T_a 47 °C і наступними кроками в 4 °C. Залежно від результатів отриманих після ПЛР з окремими наборами праймерів, оптимізацію ПЛР завершували на T_m , за якої були відсутні продукти реакції. Всі інші температурні режими проведення ПЛР: активація полімерази, денатурація, елонгація та фінальна елонгація були такими як описано в таблиці 2.

Результати оптимізації протоколів ПЛР на кожному кроці візуально оцінювали після електрофорезу в агарозному гелі. Розмір продуктів ампліфікації визначали за шкалою маркера молекулярної маси. Критеріями оцінки були: наявність або відсутність чітких смуг відповідного розміру продуктів ПЛР, наявність неспецифічних фрагментів або їхня відсутність.

В результаті оптимізації ПЛР проведеної з парою праймерів LD, які націлені на ділянку гена 16S рРНК *B. burgdorferi s. l.* встановили, що діапазоном оптимальних температур відпалу для даного праймеру є 51–55 °C. Після електрофорезу продуктів ампліфікації в агарозному гелі спостерігали чіткі смуги специфічного ДНК розміром 357 бп, неспецифічні фрагменти – відсутні. Електрофорез продуктів ампліфікації отриманих після ПЛР з T_a 47 °C показав наявність нечітких смужок фрагментів ДНК розміром 357 бп та наявність неспецифічних фрагментів у досліджуваних пробах. Результат електрофорезу в агарозному гелі продуктів ампліфікації за T_a 59 °C демонструє наявність порівняно широких смуг ДНК 357 бп та наявність неспецифічних продуктів. Ампліфікація проведена з T_a 63 °C – в результаті специфічні фрагменти ДНК відповідного розміру були відсутні. Візуалізація результатів проведення оптимізації протоколу ПЛР з набором праймерів LD зображена на рисунку 1.

Оптимізація протоколів ПЛР з набором праймерів SC, які націлені на ділянку гена 16S рРНК *B. burgdorferi s. l.* показала, що оптимальні температури відпалу знаходяться в діапазоні 51–59 °C. За результатами електрофорезу в агарозному гелі продуктів ампліфікації за зазначених вище T_a встановлена наявність чітких смуг специфічного ДНК розміром 325 бп. Результати ампліфікації проведеної за T_a 47 °C показали наявність смуг специфічних фрагментів ДНК – 325 бп та нагромадження неспецифічних фрагментів в досліджуваних пробах. За проведення ампліфікації з підвищенням T_a до 63 °C специфічні фрагменти ДНК в агарозному гелі були відсутні. Результат проведення оптимізації протоколів ПЛР для пари праймерів SC зображений на рисунку 2.

Таблиця 3 – Формування збірних проб для проведення оптимізації протоколів ПЛР

Назва праймеру	bp	№ проби							
		1	2	3	4	5	6	7	8
LD	357	+	+	-	+	+	+	-	+
SC	325	+	+	+	+	+	+	+	+
SL	307	+	+	+	+	+	+	+	+
OspA	345	+	+	+	+	+	+	+	+
BB	574	+	-	-	-	-	-	-	+
BG	574	-	-	-	-	-	-	-	-
VS461	591	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: «+» – в пробі наявне специфічне ДНК борелій відповідно цільового праймеру;
«-» – в пробі відсутнє специфічне ДНК борелій відповідно цільового праймеру.

Оптимізація протоколу ПЛР з парою праймерів SL показала, що за проведення ампліфікації з *Ta* в діапазоні 47–55 °С, в агарозному гелі спостерігаються чіткі смужки ДНК відповідного розміру 307 вб. За результатами електрофорезу продуктів ампліфікації, отриманих

за режиму *Tm* 59 °С смужки ДНК розміром 307 вб стають не чіткими, а за підвищення *Tm* до 63 °С специфічні фрагменти ДНК в агарозному гелі відсутні. Візуалізація результатів оптимізації протоколу ПЛР для пари праймерів SL зображена на рисунку 3.

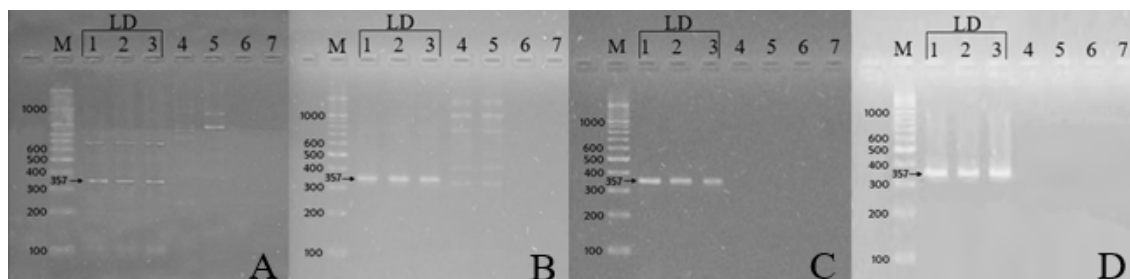


Рис. 1. Електрофорез в 2 % агарозному гелі продуктів ПЛР, отриманих після ампліфікації за різних температур відпау (*Tm*) з набором праймерів LD.

A – Ta=47 °C; B – Ta=51 °C; C – Ta=55 °C; D – Ta=59 °C.

M – молекулярний маркер; 1,2,3 – продукт ПЛР довжиною 357 вб, характерний для LD; 4 – Leptospira canicola; 5 – Leptospira rotomana; 6 – негативний контроль виділення ДНК; 7 – негативний контроль реакційної суміші.

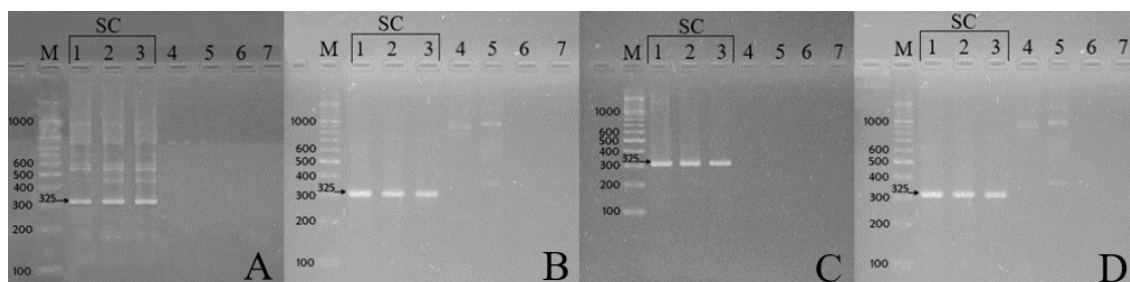


Рис. 2. Електрофорез в 2 % агарозному гелі продуктів ПЛР, отриманих після ампліфікації за різних температур відпау (*Tm*) з набором праймерів SC.

A – Ta=47 °C; B – Ta=51 °C; C – Ta=55 °C; D – Ta=59 °C.

M – молекулярний маркер; 1,2,3 – продукт ПЛР довжиною 325 вб, характерний для SC; 4 – Leptospira canicola; 5 – Leptospira rotomana; 6 – негативний контроль виділення ДНК; 7 – негативний контроль реакційної суміші.

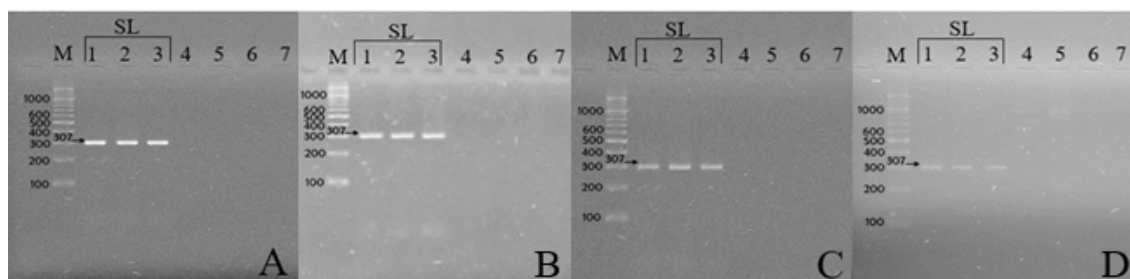


Рис. 3. Електрофорез в 2 % агарозному гелі продуктів ПЛР, отриманих після ампліфікації за різних температур відпау (*Tm*) з набором праймерів SL.

A – Ta=47 °C; B – Ta=51 °C; C – Ta=55 °C; D – Ta=59 °C.

M – молекулярний маркер; 1,2,3 – продукт ПЛР довжиною 307 вб, характерний для SL; 4 – Leptospira canicola; 5 – Leptospira rotomana; 6 – негативний контроль виділення ДНК; 7 – негативний контроль реакційної суміші.

Перший етап вкладної ПЛР з парою зовнішніх праймерів *OspA ext.* провели за визначеними термоциклічними умовами згідно з даними таблиці 2. Далі проводили оптимізацію протоколу другого етапу вкладної ПЛР для внутрішніх праймерів *OspA int.* В результаті отриманих продуктів за *Ta* 47 °С, 51 та 55 °С в агарозному гелі спостерігаються смужки ДНК розміром 345 бр та накопичення неспецифічних продуктів. Після амліфікації проведеної за *Ta* 59 °С відмічали зменшення накопичення неспецифічних фрагментів, смужки специфічного ДНК розміром 345 бр ставали чіткішими та порівняно тоншими. В результаті ампліфікації проведеної з *Ta* 63 °С специфічні продукти ПЛР розміром 345 бр після електрофорезу в агарозному гелі були відсутні. Результати проведеної оптимізації протоколу ПЛР з парою праймерів *OspA int.* зображені на рисунку 4.

Проведення оптимізації протоколу ПЛР з парою праймерів VS461 для ідентифікації генотипу *B. afzelii*, показало, що оптимальною тем-

пературою відпалу є 51°С. За нижчої *Ta* 47 °С спостерігали нагромадження неспецифічних фрагментів ДНК. Електрофорез в агарозному гелі отриманих продуктів ампліфікації за *Ta* 55 °С показав наявність нечітких смужок ДНК розміром 591 бр досліджуваних проб, а за ампліфікації з *Ta* 59 °С – смужки специфічного ДНК в агарозному гелі відсутні. Результати проведеної оптимізації протоколів ПЛР з набором праймерів VS461 відображені на рисунку 5.

За результатами оптимізації протоколів ПЛР з парою праймерів для ідентифікації генотипу *B. burgdorferi s. s.*, оптимальним діапазоном температур відпалу для набору праймерів ВВ є 47–51 °С, в агарозному гелі після електрофорезу спостерігали наявність чітких смужок ДНК відповідного розміру 574 бр. Результати ампліфікації проведеної за *Ta* 55 °С продемонстрували відсутність смужок ДНК в агарозному гелі. Візуалізація результатів оптимізації протоколу ПЛР з парою праймерів SC зображена на рисунку 6.

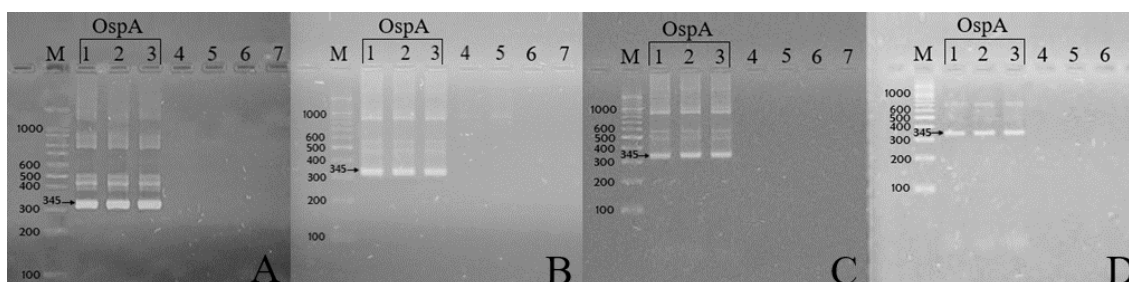


Рис. 4. Електрофорез в 2 % агарозному гелі продуктів ПЛР, отриманих після ампліфікації за різних температур відпалу (*Ta*) з набором праймерів *OspA int.*

A – Ta=47 °C; B – Ta=51 °C; C – Ta=55 °C; D – Ta=59 °C.

M – молекулярний маркер; 1,2,3 – продукт ПЛР довжиною 345 бр, характерний для OspA int.; 4 – Leptospira canicola; 5 – Leptospira rotomana; 6 – негативний контроль виділення ДНК; 7 – негативний контроль реакційної суміші.

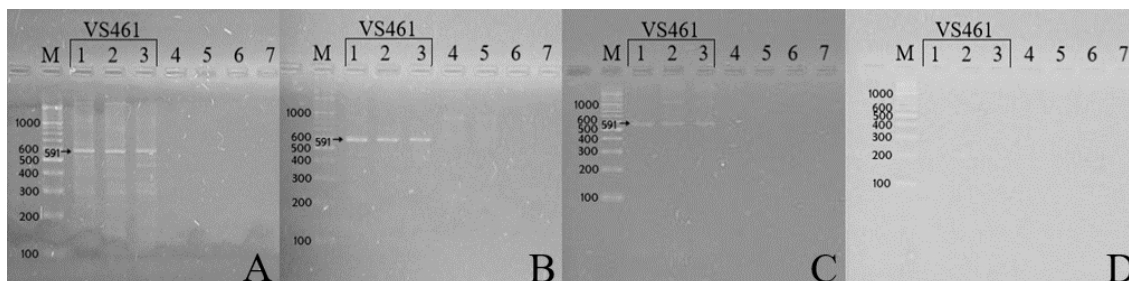


Рис. 5. Електрофорез в 2 % агарозному гелі продуктів ПЛР, отриманих після ампліфікації за різних температур відпалу (*Ta*) з набором праймерів VS461.

A – Ta=47 °C; B – Ta=51 °C; C – Ta=55 °C; D – Ta=59 °C.

M – молекулярний маркер; 1, 2, 3 – продукт ПЛР довжиною 591 бр, характерний для VS461; 4 – Leptospira canicola; 5 – Leptospira rotomana; 6 – негативний контроль виділення ДНК; 7 – негативний контроль реакційної суміші.

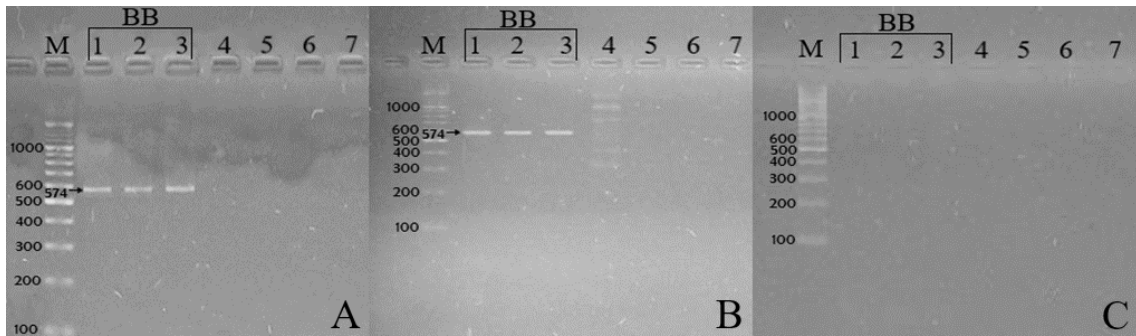


Рис. 6. Електрофорез в 2 % агарозному гелі продуктів ПЛР, отриманих після ампліфікації за різних температур відпалу (T_a) з набором праймерів SC.

A – $T_a=47\text{ }^\circ\text{C}$; B – $T_a=51\text{ }^\circ\text{C}$; C – $T_a=55\text{ }^\circ\text{C}$.

M – молекулярний маркер; 1, 2, 3 – продукт ПЛР довжиною 574 bp, характерний для BB; 4 – *Leptospira canicola*; 5 – *Leptospira rotomona*; 6 – негативний контроль виділення ДНК; 7 – негативний контроль реакційної суміші.

Отже, за 40-циклічної ампліфікації, оптимальною температурою відпалу для всіх наборів праймерів: LD, SC, SL, OspA, BB, та VS461 можна вважати $51\text{ }^\circ\text{C}$. Узагальнюючі результати оптимізації протоколів класичної ПЛР наведені в таблиці 4.

Специфічність класичної ПЛР. На всіх етапах ПЛР використовували як негативний контроль ДНК лептоспір *Leptospira canicola* та *Leptospira rotomona* з кожною парою праймерів. В результатах утворення хибно позитивних продуктів ампліфікації відповідних розмірів характерних для кожної пари праймерів не спостерігали.

Чутливість класичної ПЛР. Попередньо, за допомогою спектрофотометра визначили загальну концентрацію виділених нуклеїнових кислот з іксодових кліщів. Мінімальна концентрація виділених НК становила $18,5\text{ мкг/мл}$, максимальна концентрація НК – 45 мкг/мл , се-

редня концентрація виділених НК – 31 мкг/мл ($SD\pm 10,01$), відповідно.

Для визначення чутливості ПЛР дослідили збірну пробу екстрагованого ДНК з іксодових кліщів з середньою концентрацією НК – 31 мкг/мл . За допомогою методу серійних розведень отримали наступні концентрації НК: 1:10 – концентрація НК $3,1\text{ мкг/мл}$ та 1:100 – $0,31\text{ мкг/мл}$, відповідно.

Чутливість ПЛР визначали за 40-циклічної ампліфікації з температурою відпалу $51\text{ }^\circ\text{C}$ для всіх наборів праймерів. Результати визначення чутливості ПЛР з наборами праймерів для виявлення ДНК борелій та їх генотипів наведені в таблиці 5.

Чутливість ПЛР з парою праймерів BG не визначали, оскільки на попередніх етапах досліджень не отримали позитивних проб з наявним ДНК борелій генотипу *B. garinii*.

Таблиця 4 – Результати проведення оптимізації температур відпалу (T_a) для кожної пари праймерів

Tm	Назви праймерів						
	LD (357 bp)	SC (325 bp)	SL (307 bp)	OspA (345 bp)	BB (574 bp)	BG (574 bp)	VS461 (591 bp)
47 °C	+/-	+/-	+	+/-	+	-	+/-
51 °C	+	+	+	+/-	+	-	+
55 °C	+	+	+	+/-	-	-	+
59 °C	+/-	+	+	+/-	0	-	-
63 °C	-	-	-	-	0	-	0

Примітки: «+/-» – наявні смужки ДНК відповідного розміру та неспецифічні фрагменти; «+» – наявні чіткі смужки ДНК відповідного розміру; «-» – продукти ампліфікації відсутні; «0» – ампліфікацію не проводили.

Таблиця 5 – Результати визначення чутливості ПЛР з наборами праймерів для виявлення ДНК борелій *B. burgdorferi s.l.*, *B. burgdorferi s.s.* та *B. afzelii* в пробах з різною концентрацією нуклеїнових кислот

Назви праймерів (bp)	Ступінь розведення	Концентрація НК (мкг/мл)	Наявність специфічного продукту ампліфікації
LD (357 bp)	1:10	3,1	Відсутній
	1:100	0,31	Відсутній
SC (325 bp)	1:10	3,1	Наявний (325 bp)
	1:100	0,31	Відсутній
SL (307 bp)	1:10	3,1	Наявний (307 bp)
	1:100	0,31	Відсутній
OspA (345 bp)	1:10	3,1	Відсутній
	1:100	0,31	Відсутній
VS461 (591 bp)	1:10	3,1	Відсутній
	1:100	0,31	Відсутній

За результатами визначення чутливості ПЛР встановили, що протоколи ПЛР з використанням праймерів SC, які націлені на ділянку гена 16S рРНК *B. burgdorferi s.l.* та SL, націлені на хромосому ДНК *B. burgdorferi s.l.* є чутливими за концентрації НК в пробі 3,1 мкг/мл, а у розведенні 1:100 (НК=0,31 мкг/мл) продукти ампліфікації були відсутні. ПЛР проведена з наборами праймерів LD, OspA та VS461 не дали позитивних реакцій в розведеннях 1:10 (НК = 3,1 мкг/мл) та 1:100 (НК = 0,31 мкг/мл).

Обговорення. Полімеразна ланцюгова реакція є чутливим методом, однак певні проблеми з її використанням можуть виникати, наприклад, підбір правильних праймерів, визначення оптимальних температурних режимів ампліфікації, рівень чутливості та специфічності підібраних наборів праймерів тощо. Тому проведення якісних лабораторних досліджень методом класичної ПЛР потребує попередньої апробації та оптимізації протоколів реакції [19].

Крім того, для результативного виконання ПЛР потрібно якісно та ефективно провести етап виділення ДНК збудників хвороб з іксодових кліщів, що інколи може бути проблематичним, через те, що у кліщів наявний твердий хітиновий шар, який важко або взагалі не руйнується лізуючими розчинами, тому необхідно застосовувати відповідну пробопідготовку перед виділенням ДНК. Нині є багато методів екстракції ДНК з іксодових кліщів, однак єдиного погляду щодо найефективнішого методу немає [20]. Вибір методу ізоляції ДНК з кліщів залежить від багатьох умов: затрат часу, складності та багатоетапності методу, вико-

ристання додаткових реактивів, врахування можливостей діагностичної лабораторії тощо. В нашому дослідженні було застосовано модифікований протокол екстракції ДНК з кліщів за допомогою комерційного набору IndiSpin Pathogen Kit (Indical Bioscience, Німеччина). Пробопідготовка полягала в проведенні попередньої механічної руйнації кліщів у фізіологічному розчині та витримкою отриманого гомогенізату з лізуючим розчином протеїнази К в термостаті протягом 1,5 год за температури 56 °С. В результаті спектрофотометричним методом визначили концентрацію виділених НК, яка становила в середньому 31 мкг/мл (SD±10,01). Слід зазначити, що визначали концентрацію загальних нуклеїнових кислот, а не цільового ДНК.

Перед проведенням оптимізації протоколів ПЛР в досліджуваних пробах визначали наявність ДНК найпоширеніших патогенних генотипів борелій: *B. burgdorferi s. s.*, *B. garinii* та *B. afzelii*, також визначали наявність ДНК комплексу борелій *B. burgdorferi s. l.* та специфічні фрагменти гена OspA поверхневого білка борелій. Аналізуючи проведені дослідження, щодо виявлення та ідентифікації збудників хвороби Лайма в іксодових кліщах можна зробити висновок, що іксодові кліщі роду *I. ricinus* – 70 екземплярів та роду *D. reticulatus* – 10 екземплярів, зібрані з рослинності в лісопарковому урочищі «Голендерня», м. Біла Церква Київської області, були інфіковані бореліями комплексу *B. burgdorferi s. l.* та патогенними генотипами *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii*. Генотип *B. garinii* не ідентифіковано. Загалом це узгод-

жується з результатами досліджень іксодових кліщів, зібраних у парках відпочинку м. Київ, які також були інфіковані генотипами борелій: *B. afzelii* (7,7%), потім *B. burgdorferi s. s.* (2,2%) і найменшу частку становив генотип *B. garinii* (0,5%) [21]. Не слід відкидати ймовірність інфікованості іксодових кліщів іншими генотипами борелій, що потребує подальших досліджень з відповідними цільовими наборами праймерів для ідентифікації таких генотипів.

За результатами оптимізації ПЛР розробили внутрішньолабораторні протоколи класичної ПЛР з використанням наборів праймерів для виявлення ДНК борелій та їх генотипів, а також протокол для вкладної ПЛР з набором зовнішніх і внутрішніх праймерів *OspA*. Обрані набори праймерів є специфічними для ідентифікації комплексу борелій *B. burgdorferi s. l.*, для гена *OspA* поверхневих білків борелій, а також генотипів *B. burgdorferi s. s.* та *B. afzelii*. Всі праймери використані в дослідженнях є специфічними та чутливими за концентрацій НК в межах 18,5–45 мкг/мл, а набори праймерів SC та SL чутливі за нижчої концентрації НК – 3,1 мкг/мл.

Висновки. 1. За результатами апробації та оптимізації температурних режимів полімеразної ланцюгової реакції, визначення специфічності та чутливості реакції, було розроблено протоколи класичної ПЛР з використанням праймерів для ідентифікації двох патогенних генотипів борелій *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii*, ДНК комплексу борелій *B. burgdorferi s. l.* та протокол вкладної ПЛР з використанням зовнішніх і внутрішніх пар праймерів для виявлення специфічних фрагментів гену борелій *OspA*.

2. Методом класичної ПЛР ідентифікували два генотипи патогенних борелій *B. afzelii* та *B. burgdorferi s. s.*, а також ДНК комплексу борелій *B. burgdorferi s. l.* та специфічні фрагменти гена *OspA*, який є основним антигеном збудників хвороби Лайма. Генотип *B. garinii* не ідентифікували в жодній з проб, що може вказувати на відсутність інфікованості кліщів цим генотипом борелій.

3. Показники чутливості праймерів визначили за допомогою серійних розведень проб з середньою концентрацією нуклеїнових кислот 31 мкг/мл ($SD \pm 10,01$). Праймери не чутливі за зниження концентрації нуклеїнових кислот в 10 та 100 разів, крім двох наборів праймерів SC та SL для виявлення ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato*, що дали позитивні результати ампліфікації за концентрації НК в пробі 3,1 мкг/мл (розведення 1:10). Усі апробовані ПЛР-протоколи дозволяють ідентифікувати в пробах

цільові фрагменти ДНК за концентрації нуклеїнових кислот в діапазоні 18,5–45 мкг/мл. ПЛР-протоколи з використанням праймерів SC та SL для виявлення ДНК комплексу *B. burgdorferi s. l.* можна застосовувати за концентрації НК 3,1 мкг/мл.

4. Використаний модифікований метод ізоляції ДНК за допомогою комерційного набору IndiSpin Pathogen Kit дозволяє виділи з іксодових кліщів нуклеїнові кислоти в межах концентрації 18,5–45 мкг/мл.

5. Розроблені внутрішньолабораторні протоколи ПЛР з використанням описаних наборів праймерів для ідентифікації ДНК комплексу *B. burgdorferi s. l.* та ДНК генотипів *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii* в подальшому будуть використані для визначення інфікованості іксодових кліщів збудниками хвороби Лайма.

Відомості про конфлікт інтересів (за потреби). Автори декларують, що не мають конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A nationwide study on *Borrelia burgdorferi* *sl* infection rates in questing *Ixodes ricinus*: a six-year snapshot study in protected recreational areas in England and Wales/B. Cull et al. Medical and Veterinary Entomology. 2021. Vol. 35. no. 3. P. 352–360. DOI:10.1111/mve.12503.
2. Prevalence of tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks in Lower Bavaria and Upper Palatinate, Germany/D. Zubriková et al. Ticks and tick-borne diseases. 2020. Vol. 11. no. 3. 101375 p. DOI:10.1016/j.ttbdis.2020.101375.
3. Hubálek Z., Halouzka J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasitol Res. 1998. Vol. 84. P. 167–172. DOI:10.1007/s004360050378.
4. Небогаткін І., Шульхан А. Епідеміологічні та епізоотичні особливості хвороби Лайма в 2019 році в Україні. Актуальна інфектологія. 2020. Том 8. № 5–6. С. 44–48. DOI:10.22141/2312-413x.8.5-6.2020.217959.
5. Mysterud A., Stigum V.M., Jaarsma R.I., Sprong H. Genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* detected in 16 mammal species and questing ticks from northern Europe. Scientific reports. 2019. Vol. 9. no. 1. P. 1–8. DOI:10.1038/s41598-019-41686-0.
6. Radolf J.D., Caimano M.J., Stevenson B., Hu L.T. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. Nature reviews microbiology. 2012. Vol. 10. no. 2. P. 87–99. DOI:10.1038/nrmicro2714.
7. Dulipati V., Meri S., Panelius J. Complement evasion strategies of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. FEBS letters. 2020. Vol. 594. no. 16. P. 2645–2656. DOI:10.1002/1873-3468.13894.

8. Stanek G., Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection*. 2011. Vol. 17. no. 4. P. 487–493. DOI:10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x.

9. Hubálek Z., Halouzka J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitology research*. 1998. Vol. 84. no. 3. P. 167–172. DOI:10.1007/s004360050378.

10. Piesman J., Schneider B.S., Zeidner N.S. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *Journal of clinical microbiology*. 2001. Vol. 39. no. 11. P. 4145–4148. DOI:10.1128/JCM.39.11.4145-4148.2001.

11. Comparison of growth and morphology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in BSK-H and BSK-II media stored for prolonged periods/G. Veinović et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. Vol. 128. no. 10. P. 552–557. DOI:10.1111/apm.13069.

12. Kučerová H.L., Žáková A., Marková J., Bártošová E. Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi sensu lato* in wild small mammals and sensitivity of PCR and cultivation. *Veterinary microbiology*. 2019. Vol. 230. P. 241–243. DOI:10.1016/j.vetmic.2019.02.004.

13. Пантелєєнко О., Царенко Т. Вивчення та порівняння індексу щільності заселення іксодовими кліщами різних біотопів Київської та Черкаської областей. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2022. Вип. 1. С. 63–71. DOI:10.33245/2310-4902-2022-173-1-63-71.

14. Marconi R.T., Garon C.F. Development of Polymerase Chain Reaction Primer Sets for Diagnosis of Lyme Disease and for Species-Specific Identification of Lyme Disease Isolates by 16S rRNA Signature Nucleotide Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993. Vol. 31. no. 4. 1026 p.

15. Detection of pathogens in ixodid ticks collected from animals and vegetation in five regions of Ukraine/V.A. Levyt'ska et al. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2021. Vol. 12. no. 1. DOI:10.1016/j.ttbdis.2020.101586.

16. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients/I. Demaerschallck et al. *Journal of clinical microbiology*. 1995. Vol. 33. no. 3. P. 602–608. DOI:10.1128/jcm.33.3.602-608.1995.

17. Multiple infections of *Ixodes scapularis* ticks by *Borrelia burgdorferi* as revealed by single-strand conformation polymorphism analysis/D.S. Guttman et al. *Journal of clinical microbiology*. 1996. Vol. 34. no. 3. P. 652–656. DOI:10.1128/jcm.34.3.652-656.1996.

18. Spectrophotometric analysis of nucleic acids: oxygenation-dependant hyperchromism of DNA/R. Doshi et al. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010. Vol. 396. no. 6. P. 2331–2339. DOI:10.1007/s00216-010-3461-x.

19. Внутрішньолабораторна апробація праймерів для молекулярно-генетичної ідентифікації грибів роду *Fusarium link*/В.Д. Іщенко та ін. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2019. Том. 82. № 6. DOI:10.31548/dopovidi2019.06.017.

20. Comparison of methods for economic and efficient tick and *Borrelia* DNA purification/M. Okeyo et al. *Ticks and tick-borne diseases*. 2019. Vol. 10. no. 5. P. 1041–1045. DOI:10.1016/j.ttbdis.2019.05.002.

21. Rogovsky A., Batool M., Gillis D.C. Diversity of *Borrelia* spirochetes and other zoonotic agents in ticks from Kyiv, Ukraine. *Ticks and tick-borne diseases*. 2018. Vol. 9. no. 2. P. 404–409. DOI:10.1016/j.ttbdis.2017.12.006.

REFERENCES

1. Cull, B., Hansford, K.M., McGinley, L., Gillingham, E. L., Vaux, A.G.C., Smith, R., Medlock, J.M. (2021). A nationwide study on *Borrelia burgdorferi* sl infection rates in questing *Ixodes ricinus*: a six-year snapshot study in protected recreational areas in England and Wales. *Medical and Veterinary Entomology*. Vol. 35, no. 3, pp. 352–360. DOI:10.1111/mve.12503.

2. Zubriková, D., Wittmann, M., Hönl, V., Švec, P., Víchová, B., Essbauer, S., Dobler, G., Grubhoffer, L., Pfister, K. (2020). Prevalence of tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks in Lower Bavaria and Upper Palatinate, Germany. *Ticks and tick-borne diseases*. Vol. 11, no. 3, 101375 p. DOI:10.1016/j.ttbdis.2020.101375.

3. Hubálek, Z., Halouzka, J. (1998). Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res*. Vol. 84, pp. 167–172. DOI:10.1007/s004360050378.

4. Nebogatkin, I.V., Shulhan, A.M. (2020). Epidemiological and epizootic features of Lyme disease in 2019 in Ukraine. *Aktualna infektologija* [Actual infectology]. Vol. 8, no. 5–6, pp. 44–48. (in Ukrainian) DOI:10.22141/2312-413x.8.5-6.2020.217959.

5. Mysterud, A., Stigum, V.M., Jaarsma, R.I., Sprong, H. (2019). Genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* detected in 16 mammal species and questing ticks from northern Europe. *Scientific reports*. Vol. 9, no. 1, pp. 1–8. DOI:10.1038/s41598-019-41686-0.

6. Radolf, J.D., Caimano, M.J., Stevenson, B., Hu, L.T. (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature reviews microbiology*. Vol. 10, no. 2, pp. 87–99. DOI:10.1038/nrmicro2714.

7. Dulipati, V., Meri, S., Panelius, J. (2020). Complement evasion strategies of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *FEBS letters*. Vol. 594, no. 16, pp. 2645–2656. DOI:10.1002/1873-3468.13894.

8. Stanek, G., Reiter, M. (2011). The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection*.

Vol. 17, no. 4, pp. 487–493. DOI:10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x.

9. Hubálek, Z., & Halouzka, J. (1998). Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitology research*. Vol. 84, no. 3, pp. 167–172. DOI:10.1007/s004360050378.

10. Piesman, J., Schneider, B.S., & Zeidner, N.S. (2001). Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 39, no. 11, pp. 4145–4148. DOI:10.1128/JCM.39.11.4145-4148.2001.

11. Veinović, G., Čakić, S., Mihaljica, D., Sukara, R., Tomanović, S. (2020). Comparison of growth and morphology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in BSK-H and BSK-II media stored for prolonged periods. *Apmis*. Vol. 128, no. 10, pp. 552–557. DOI:10.1111/apm.13069.

12. Kučerová, H. L., Žáková, A., Marková, J., & Bártová, E. (2019). Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* s.l. in wild small mammals and sensitivity of PCR and cultivation. *Veterinary microbiology*. Vol. 230, pp. 241–243. DOI:10.1016/j.vetmic.2019.02.004.

13. Panteleienko, O., Tsarenko T. (2022). Vyvcheniia ta porivniannia indeksu shchilnosti zaselennia ik-sodovymy klishchamy riznykh biotopiv Kyivskoi ta Cherkaskoi oblasti [Study and comparison of population density indices of Ixodes ticks of different biotopes of Kyiv and Cherkasy regions]. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medytsyny* [Scientific Bulletin of Veterinary Medicine]. Vol. 1, pp. 63–71. (in Ukrainian) DOI:10.33245/2310-4902-2022-173-1-63-71.

14. Marconi, R.T., Garon, C.F. (1993). Development of Polymerase Chain Reaction Primer Sets for Diagnosis of Lyme Disease and for Species-Specific Identification of Lyme Disease Isolates by 16S rRNA Signature Nucleotide Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 31, no. 4, 1026 p.

15. Levytska, V.A., Mushinsky, A.B., Zubrikova, D. (2021). Detection of pathogens in ixodid ticks collected from animals and vegetation in five regions of Ukraine. *Ticks and Tick-borne Diseases*. Vol. 12, no. 1. DOI:10.1016/j.ttbdis.2020. 101586.

16. Demaerschalck, I., Ben Messaoud, A., et al. (1995). Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 33, no. 3, pp. 602–608. DOI:10.1128/jcm.33.3.602-608.1995.

17. Guttman, D.S., Wang, P.W., Wang, I.N., Bosler, E.M., Luft, B.J., Dykhuizen, D.E. (1996). Multiple infections of *Ixodes scapularis* ticks by *Borrelia burgdorferi* as revealed by single-strand conformation polymorphism analysis. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 34, no. 3, pp. 652–656. DOI:10.1128/jcm.34.3.652-656.1996.

18. Doshi, R., Day, P.J., Carampin, P., Blanch, E., Stratford, I.J., Tirelli, N. (2010). Spectrophotomet-

ric analysis of nucleic acids: oxygenation-dependant hyperchromism of DNA. *Analytical and bioanalytical chemistry*. Vol. 396, no. 6, pp. 2331–2339. DOI:10.1007/s00216-010-3461-x.

19. Ishchenko, V.D., Voloshchuk, N.M., Sterlikova, O.M., Humenyuk, L.V., Sklyar, V.V., Kalakailo, L.I., Ishchenko, A.Ya., Ishchenko, L.M. (2019). Vnutrishnolaboratorna aprobatsiia praimeriv dlia molekuliarno-henetychnoi identyfikatsii hrybiv rodu *Fusarium Link* [Interlaboratory aprobatation of primers for molecular genetic identification of *Fusarium link* fungus]. *Naukovi dopovidi Natsionalnoho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy* [Scientific Bulletin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine]. Vol. 6, no. 82. (in Ukraine) DOI:10.31548/dopovidi2019.06.017.

20. Okeyo, M., Hartberger, C., Margos, G., Straubinger, R.K., Sing, A., Fingerle, V. (2019). Comparison of methods for economic and efficient tick and *Borrelia* DNA purification. *Ticks and tick-borne diseases*. Vol. 10, no. 5, pp. 1041–1045. DOI:10.1016/j.ttbdis.2019.05.002.

21. Rogovskyy, A., Batool, M., Gillis, D.C. (2018). Diversity of *Borrelia* spirochetes and other zoonotic agents in ticks from Kyiv, Ukraine. *Ticks and tick-borne diseases*. Vol. 9, no. 2, pp. 404–409. DOI:10.1016/j.ttbdis.2017.12.006.

Optimization of polymerase chain reaction for monitoring of *Borrelia burgdorferi* infection by ixodid ticks

Panteleienko O., Tsarenko T.

Determination of the infection rate of ixodid ticks with tick-borne borreliosis pathogens and determination of belonging to the pathogenic genotype by PCR is an important component for monitoring, risk assessment and control of the epizootic situation of Lyme borreliosis in different territories.

The results of testing and optimization of the internal laboratory protocol of the classical polymerase chain reaction for the identification of Lyme disease pathogens are presented. Eight samples of extracted DNA from ixodid ticks collected from vegetation in the forest park tract "Golendernya", Bila Tserkva, Kyiv region, were examined by classical PCR. Samples were formed from pools of ten tick specimens: seven pools - ticks of the genus *I. ricinus* and one pool - ticks of the genus *D. reticulatus*. For detection of borrelia DNA, primer sets were used to detect DNA of *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex; *Borrelia burgdorferi* and pathogenic borrelia: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii*.

The protocol for nucleic acid extraction from ticks was modified using the commercial IndiSpin Pathogen Kit. Optimization of amplification temperature conditions was carried out by the annealing temperature gradient method for each primer pair.

Based on the results of the study, internal laboratory protocols for classical PCR using specific oligonucle-

otide primers were developed. It was found that in each of the pools of *I. ricinus* and *D. reticulatus* there were infected tick specimens with the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex and *Borrelia afzelii* genus, and also identified the *Borrelia burgdorferi sensu stricto* genus in one of the pools of *I. ricinus* and *D. reticulatus*, DNA of the *Borrelia garinii* genus was not detected.

The developed internal laboratory protocols of classical PCR will be further used to study the infection of ixodid ticks with tick-borne borreliosis pathogens: *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii*.

Key words: Lyme borreliosis, Ixodes ticks, polymerase chain reaction, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*.



Copyright: Пантелеєнко О.В., Царенко Т.М. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



ORCID iD:

Пантелеєнко О.В.

Царенко Т.М.

<https://orcid.org/0000-0002-4311-9680>

<https://orcid.org/0000-0003-4373-5958>