

НАУКА И ПРАКТИКА

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-142>



Разработка и практическое применение методики для идентификации поверхностных антигенов *Borrelia miyamotoi*

Мионов К.О.^{1✉}, Титков А.В.¹, Кулешов К.В.¹, Колясникова Н.М.^{1,2},
Бондаренко Е.И.³, Платонов А.Е.¹

¹Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия;

³АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

Аннотация

Введение. *Borrelia miyamotoi* — возбудитель безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) — заболевания, широко распространённого в России. В геноме *B. miyamotoi* присутствуют гены десятков вариабельных основных поверхностных белков (Vmp). Vmp разделяют на два семейства — Vsp и Vlp (с подсемействами δ , γ , α и β). В конкретный момент времени отдельная *B. miyamotoi* экспрессирует единственный вариант гена Vmp.

Цель работы — создание методики для идентификации гена Vmp, находящегося в сайте экспрессии.

Материалы и методы. Методика реализована в формате мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Для её испытания были использованы образцы ДНК *B. miyamotoi*, выделенные из крови 172 больных ИКБ и 109 клещей. Образцы были собраны в 14 регионах России.

Результаты. Разработанная методика позволила идентифицировать экспрессирующийся Vmp в 82% исследованных проб, т.е. показала достаточную эффективность. Отрицательные результаты значимо реже наблюдались среди проб от больных, чем среди проб клещей. При этом доля проб с Vmp только одного типа одинакова среди клинических образцов и клещей, а доля проб, в которых детектируются одновременно два типа Vmp, значимо выше среди образцов от больных, где наиболее часто встречалась комбинация Vlp- δ и Vsp.

Обсуждение. Тот факт, что в образцах крови чаще выявляется сочетание двух типов Vmp, может говорить об одновременном присутствии нескольких субпопуляций *B. miyamotoi* в организме больных ИКБ. После того как к основному поверхностному белку штамма, занесённого клещом, вырабатываются протективные антитела, происходит переключение на синтез нового антигенного варианта Vmp. Такой феномен, называемый «иммунным избеганием», позволяет патогену персистировать в организме хозяина.

Заключение. Созданная методика мультиплексной ПЦР в режиме реального времени позволяет проводить одновременную детекцию нескольких антигенных вариантов вариабельных основных поверхностных белков *B. miyamotoi*. Изучение антигенного спектра штаммов *B. miyamotoi* в сопоставлении с характеристикой консервативных участков генома методом мультилокусного секвенирования позволит прояснить этапы эволюции и распространения *B. miyamotoi sensu lato*.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, *Borrelia miyamotoi*, ПЦР, поверхностные основные вариабельные белки Vmp, вариабельные большие белки Vlp, вариабельные малые белки Vsp, иммунное избегание

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическими комитетами ЦНИИ Эпидемиологии (протокол № 83 от 26.06.2018) и Ижевской государственной медицинской академии (протокол № 17 от 24.12.2012).

Благодарность. Мы признательны всем исследователям, клиницистам и эпидемиологам, участвовавшим в сборе биологических образцов, использованных в настоящей работе, в первую очередь М.Г. Топорковой, Д.С. Сарксяну, С.Ю. Ковалеву, Е.И. Красновой, В.А. Рар, В.И. Черных, Н.С. Миноранской, А.Б. Коньковой-Рейдман.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00072П).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. В работе использованы наборы реагентов и реактивы «АмплиСенс®» производства ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Для цитирования: Миронов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В., Колясникова Н.М., Бондаренко Е.И., Платонов А.Е. Разработка и практическое применение методики для идентификации поверхностных антигенов *Borrelia miyamotoi*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021;98(3):339–350. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-142>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-142>

Development and application of the technique for identification of *Borrelia miyamotoi* surface antigens

Konstantin O. Mironov^{1✉}, Anton V. Titkov¹, Konstantin V. Kuleshov¹, Nadezhda M. Kolyasnikova^{1,2}, Evgeniy I. Bondarenko³, Alexander E. Platonov¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia;

²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of RAS, Moscow, Russia;

³JSC «Vector-Best», Novosibirsk, Russia

Abstract

Introduction. *Borrelia miyamotoi* is a pathogen causing erythema-free ixodid tick-borne borreliosis (ITBB), a disease widespread in Russia. The genome of *B. miyamotoi* contains genes of multiple variable major proteins (Vmps). Vmps fall into two families — Vsps and Vlps (with subfamilies δ , γ , α and β). At a particular time, a single *B. miyamotoi* expresses only one variant of Vmp gene.

The purpose of the work is to develop a technique for identification of the Vmp present at the expression site.

Materials and methods. The technique is designed in the format of a real-time multiplex PCR. It was tested by using *B. miyamotoi* DNA samples extracted from blood collected from 172 ITBB patients and 109 ticks. The samples were collected in 14 regions of Russia.

Results. The new technique made it possible to identify the expressed Vmp in 82% of the examined samples, thus having demonstrated its efficiency. Negative results were much less often observed with samples from patients than with samples from ticks. At the same time, the percentage of samples with one type of Vmp is identical for clinical samples and ticks, while the percentage of samples containing concurrently two types of Vmps is significantly higher among samples from patients with the most frequent occurrence of the Vlp- δ and Vsp combination.

Discussion. The frequent occurrence of the combination of two Vmp types in the blood samples can indicate the concurrent presence of several subpopulations of *B. miyamotoi* in ITBB patients. A new antigenic Vmp variant is synthesized after protective antibodies have been produced for the major protein of the strain transmitted by a tick. This phenomenon known as immune evasion allows the pathogen to persist within a host.

Conclusion. The developed technique of real-time multiplex PCR allows to simultaneously detect of several antigenic variants of the variable basic surface proteins of *B. miyamotoi*. The study of the antigenic spectrum of *B. miyamotoi* strains in comparison with the characteristics of conserved regions of the genome by the method of multilocus sequencing will clarify the stages of evolution and distribution of *B. miyamotoi sensu lato*.

Keywords: ixodid tick-borne borreliosis, *Borrelia miyamotoi*, PCR, variable major proteins Vmps, variable large proteins Vlps, variable small proteins Vsps, immune evasion

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committees of the Central Research Institute of Epidemiology (protocol N 83, 26.06.2018) and Izhevsk State Medical Academy (protocol N 17, 24.12.2012).

Acknowledgments. We are grateful to all researchers, clinicians and epidemiologists who participated in the collection of biological samples used in this work, primarily M.G. Toporkova, D.S. Sarksyian, S.Yu. Kovalev, E.I. Krasnova, V.A. Rahr, V.I. Chernykh, N.S. Minoranskaya, A.B. Kon'kova-Reidman.

Funding source. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 15-15-00072П).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All reagents for PCR and AmpliSens® *Borrelia miyamotoi*-FL reagent kit were made at the Central Research Institute of Epidemiology.

For citation: Mironov K.O., Titkov A.V., Kuleshov K.V., Kolyasnikova N.M., Bondarenko E.I., Platonov A.E. Development and application of the technique for identification of *Borrelia miyamotoi* surface antigens. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):339–350. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-142>

Введение

Borrelia miyamotoi — возбудитель безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ). Впервые культуры *B. miyamotoi* были получены из клеща *Ixodes persulcatus* (штамм НТ31) и мыши *Apodemus argenteus* (штамм FR64b) в 1992 г. в Японии [1–3]. После обнаружения в 2003 г. сотрудниками ЦНИИ Эпидемиологии ДНК *B. miyamotoi* в крови больных с безэритемной формой ИКБ в Удмуртии активно изучаются биологические свойства возбудителя, особенности клинического течения и эпидемиологии ИКБ, вызванного *B. miyamotoi* (ИКБ-БМ) [3–10].

Основная сложность при изучении патогенеза ИКБ-БМ долгое время состояла в невозможности культивировать *B. miyamotoi* из организма заболевшего человека, что затрудняло проведение полногеномного анализа и полноценную генетическую характеристику патогенов. Позже эта проблема была решена [11–13]; на момент начала данного исследования были доступны полные нуклеотидные последовательности хромосом и последовательности всех или некоторых плазмид 10 штаммов *B. miyamotoi*: штамма FR64b, 3 штаммов СТ13–2396, СА17–2241 и LB-2001, выделенных из клещей на территории США [14, 15], и 6 штаммов Izh-4, Izh-5, Izh-14, Izh-16, Yekat-1, Yekat-6, выделенных из крови пациентов с ИКБ-БМ на территории России [11, 12, 16, 17].

B. miyamotoi экспрессируют переменные основные поверхностные белки (variable major protein, Vmp), к которым в восприимчивом организме в ходе инфекции вырабатываются IgM- и IgG-антитела, обладающие протективной активностью. На основании гомологии аминокислотных последовательностей Vmp разделяют на два семейства: Vlp (variable large proteins) и Vsp (variable small proteins) с размером приблизительно 330 и 200 аминокислот соответственно. Vlp подразделяют на 4 подсемейства или кластера: альфа (α), бета (β), гамма (γ) и дельта (δ). В российских штаммах было показано присутствие нескольких вариантов экспрессии Vmp и их сочетаний [14, 17, 18]. Далее мы упрощённо будем говорить об этих 5 вариантах белков (Vlp- δ , Vsp, Vlp- γ , Vlp- α и Vlp- β) как о типах Vmp. Отметим, что ранее некоторыми авторами первые 4 типа (или их представители) обозначались как Vlp15/16, Vsp1, Vlp5 и Vlp18 соответственно. Присутствие гена Vlp- β в геноме *B. miyamotoi* было впервые обнаружено в работе [17], он был назван нами по аналогии с гомологичным белком, экспрессируемым *B. hermsii* и другими возбудителями клещевых возвратных лихорадок. Среднее различие по аминокислотным последовательностям внутри типа Vmp составляет 20–40% [19], между типами — 55–80% (см., например, Fig. 4 и Fig. 5 в работе [17]).

Гены Vmp располагаются не на хромосоме, а на плаزمиде, которых в геноме изученных штаммов *B. miyamotoi* имеется более десятка [17]. При этом считается, что в конкретный момент времени единичная боррелия экспрессирует только один ген Vmp, находящийся в сайте экспрессии в непосредственной близости от бактериального промотора. Но у неё есть «запас» генов Vmp (от 30 до 50), которые при определённых условиях могут заменить прежний в сайте экспрессии и тем самым изменить антигенные свойства штамма [14, 17].

В эпидемиологии идентификация белка определённого класса, присущего конкретному штамму, позволяет проводить внутривидовую характеристику возбудителей, циркулирующих в разное время, на разных территориях и в разных источниках (резервуарах). Информация об антигенных свойствах возбудителей может быть потенциально использована в клинической практике для прогноза течения и исхода инфекционного процесса, а также для создания средств иммунопрофилактики — эффективного способа эпидемиологического контроля инфекционных заболеваний. Применительно к *B. miyamotoi* и другим боррелиям — возбудителям клещевых возвратных лихорадок и болезни Лайма — мишенью для антигенного типирования могут стать основные поверхностные белки.

Прямое серотипирование боррелий — возбудителей ИКБ-БМ пока мало информативно, поскольку выделено незначительное количество штаммов *B. miyamotoi*. Выявление антигенспецифических антител, продуцируемых в ходе заболевания, в принципе возможно [20, 21], но требует создания набора антигенов, не производимых пока с коммерческими целями, и, в случае использования планарных белковых иммуночипов, дополнительного оборудования, которое отсутствует в большинстве диагностических лабораторий [7, 22–26]. Кроме того, в некоторых случаях антитела к Vmp могут давать перекрёстные реакции, например антитела к Vlp- δ отчасти взаимодействуют с антигеном Vlp- γ , и наоборот.

Перспективным инструментом для характеристики антигенного разнообразия *B. miyamotoi* может быть использование основанных на ПЦР молекулярно-биологических методик, направленных на детекцию или секвенирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигены. Подобные подходы разработаны и с успехом используются в отечественной эпидемиологической практике для других патогенных микроорганизмов [27], например пневмококков [28].

В этой связи **цель** данной работы заключалась в создании основанной на ПЦР методике и идентификации с её помощью переменных основных поверхностных белков, экспрессируемых *B. miyamotoi*, циркулирующими на территории России.

Таблица 1. Характеристика биологических образцов, содержащих ДНК *B. miyamotoi*
Table 1. Characteristics of biological samples containing *B. miyamotoi* DNA

Источник ДНК DNA source	Территория Territory	Годы Years	Количество образцов Number of samples
Кровь больных ИКБ-БМ Blood of patients with ixodes tick-borne borreliosis caused by <i>B. miyamotoi</i>	Свердловская область Sverdlovsk region	2015–2018	84
	Удмуртская Республика Udmurt Republic	2016	6
	Челябинская область Chelyabinsk region	2019	3
	Вологодская область Vologda region	2017	1
	Новосибирская область Novosibirsk region	2012, 2017, 2018	44
	Кемеровская область Kemerovo region	2018	16
	Красноярский край Krasnoyarsk Territory	2017–2019	14
	Иркутская область Irkutsk region	2014	2
	Хабаровский край Khabarovsk Territory	2014	2
	Всего Total		172
Суспензии клещей рода <i>Ixodes</i> Suspensions of ticks of <i>Ixodes</i> genus	Новосибирская область Novosibirsk region	2012, 2014, 2017	58
	Томская область Tomsk region	2014	17
	Республика Алтай Altai Republic	2016	6
	Свердловская область Sverdlovsk region	2013, 2014	18
	Амурская область Amur region	2016	10
	Всего Total		109

Материалы и методы

Последовательности ДНК

Для анализа последовательностей фрагментов генов *Vmp* с целью выбора олигонуклеотидов для ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РРВ) были использованы нуклеотидные последовательности штаммов Izh-4, Izh-5, Izh-14, Izh-16, Yekat-1 и Yekat-6, депонированные в GenBank (идентификационные номера CP024390-CP024407, CP024205-CP024222, CP024371-CP024389, CP024351-CP024370, CP024333-CP024350 и CP024316-CP024332 соответственно) [16, 17], дополненные анализом первичных последовательностей промоторов генов *Vmp*, выполненным в работах [14, 18].

Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование

ДНК выделяли из биологических образцов от пациентов с ИКБ-БМ (осадок лейкоцитов в 100 мкл супернатанта, т.е. плазмы крови) набором «РИБО-преп» согласно инструкции к набору реагентов «АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL» (регистраци-

онное удостоверение РЗН 2018/7316 от 03.07.2018).

Образцы от клещей, собранных в Новосибирской области и на Дальнем Востоке, были предоставлены Е.И. Бондаренко. Присутствие в них ДНК *B. miyamotoi* (участка гена *glpQ*) было установлено с помощью диагностического ПЦР-теста «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск), регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 [29]. С.Ю. Ковалевым были предоставлены содержащие ДНК *B. miyamotoi* образцы от клещей, собранных в Свердловской и Томской областях.

В ПЦР, идентифицирующей *Vmp*, реакционная смесь объемом 25 мкл содержала праймеры, зонды и dNTP (0,44 мМ) — 10 мкл; реактивы «Полимераза TaqF» — 0,5 мкл и «ОТ-ПЦР-смесь-2 FEP/FRT» — 4,5 мкл; выделенную ДНК — 10 мкл. ПЦР-РРВ проводилась в формате «мультипрайм» на приборе «RotorGeneQ» («Qiagen») по следующей программе: 95°C — 15 мин (1 цикл); 95°C — 5 с/60°C — 20 с/72°C — 10 с (45 циклов с детекцией флуорес-

Таблица 2. Олигонуклеотиды для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих экспрессируемые белки Vlp и Vsp

Table 2. Oligonucleotides for amplification of nucleotide sequences encoding expressed Vlps and Vsps

Гены Genes	Олигонуклеотид (концентрация, мкМ) Oligonucleotide (concentration, μM)	5'-3'-последовательность* 5'-3'-nucleotide sequences
Vlp, Vsp	VMP-F2 (0,2)	TTATAAAgAATTTgAAAAGTAAgATTCTTgCACTAT
Vlp-δ	VLPRi-Ri (0,28)	CCCTTTCCCTAAATTAgCTATCgAAgTT
	VLPR-IZ (0,12)	FAM-CCTTTTgTggATCTTCCCCTCCTCCATTATTACATCC-BHQ1
	VLPR-IZ-L4 (0,12)**	FAM-gg+A+TC+T+TCCCC+TCC+TCC+AT-BHQ1
Vsp	I-16-2-Ri (0,28)	AATCACTgTCCCATCAgCCTTTg
	I-16-2-IIIZ (0,12)	R6G-ggTCCCCCACTTCCACAAgATATCATTAC-BHQ1
	I-16-2-IIIZ-L2 (0,12)**	R6G-CCCCCAC+TT+CC+AC+AA+gA+TA+TC-BHQ1
Vlp-γ	I-14-2-Ri (0,28)	CTgACTTTAAAAATCTACTCTgAggACTCTCT
	I-14-2-IIIZ3 (0,12)**	Cy5-CCCgC+T+ACT+A+T+TACAgC+TCACg-BHQ2

Примечание. *FAM, R6G и Cy5 — флуорофоры; BHQ1 и BHQ2 — гасители флуоресценции. **Альтернативные зонды VLPR-IZ-L4 и I-16-2-IIIZ-L2 обладают улучшенными термодинамическими параметрами за счёт использования, как и в структуре зонда I-14-2-IIIZ3, конформационно-блокированных нуклеотидов (LNA), перед которыми стоит знак «+». В зондах VLPR-IZ и I-16-2-IIIZ подчеркиванием выделены нуклеотидные последовательности, соответствующие зондам VLPR-IZ-L4 и I-16-2-IIIZ-L2.

Note. Note. *FAM, R6G, and Cy5 — fluorophores; BHQ1 and BHQ2 — fluorescence quenchers. **Alternative probes VLPR-IZ-L4 and I-16-2-IIIZ-L2 have improved thermodynamic parameters, as their structure, like the structure of the I-14-2-IIIZ3 probe, incorporates locked nucleic acid (LNA) nucleotides preceded by the + sign. In VLPR-IZ and I-16-2-IIIZ probes, the nucleotide sequences corresponding to probes VLPR-IZ-L4 and I-16-2-IIIZ-L2 are underlined.

центного сигнала на стадии 60°C). При анализе результатов амплификации пороговая линия проводилась на уровне 10% от максимального значения флуоресцентного сигнала для каждого из 4 каналов детекции. Все реактивы для ПЦР были произведены в ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии.

Секвенирование продуктов ПЦР проводили с использованием генетического анализатора «3500xL» и соответствующих реагентов фирмы «Applied Biosystems» согласно инструкции изготовителя.

Биологический материал (источники ДНК *B. miyamotoi*)

Для проверки эффективности разрабатываемой методики использованы биологические образцы от пациентов с установленным диагнозом «ИКБ, безэритемная форма» (172 образца от 172 пациентов) [6–8, 29–31] и суспензии иксодовых клещей (109 образцов) [32, 33], собранных на территории ряда регионов России в рамках исследований эпидемиологии и клиники инфекции, вызванной *B. miyamotoi* (табл. 1). Образцы крови больных собирали, как правило, на пике лихорадки, в период максимальной спирохетемии. Все образцы содержали ДНК *B. miyamotoi*, что было подтверждено тестированием с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL».

От всех пациентов было получено информированное согласие. Исследование образцов проведено в соответствии с разрешением этических комитетов ЦНИИ Эпидемиологии (протокол № 83 от 26.06.2018) и Ижевской государственной медицинской академии (протокол № 17 of 24.12.2012).

Статистические методы

Нижнюю и верхнюю границы доверительного интервала для доли проб определённого типа вычисляли по методу Уилсона [34] при доверительной вероятности («уровне доверия») 0,95¹. Для оценки значимости различий распределений качественных переменных в группах с помощью программы «SPSS Statistics v.19» («IBM») использовали точный критерий Фишера [35].

Результаты

ПЦР-PPV методика для антигенной характеристики *B. miyamotoi*

В геноме *B. miyamotoi* представлено значительное количество последовательностей, гомологичных генам белков Vlp и Vsp; последовательности находятся на плазмиде экспрессии либо на плазмидах хранения. Для детекции тех последовательностей, которым предположительно соответствуют белковые продукты, место отжига прямого праймера находилось в промоторной области, определённой по последовательности плазмиды IpB [14]. Места отжига обратных праймеров и зондов находились на последовательностях, соответствующих генам белков Vlp и Vsp. Выбранные олигонуклеотиды представлены в табл. 2.

Область отжига общего праймера VMP-F2 находится в промоторной области. Место отжига других праймеров и зондов, детектируемых по ка-

¹ Sergeant E.S.G. Epitools Epidemiological Calculators. Canberra: Ausvet; 2018. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>. В частности, <https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion>

налам Green, Yellow и Red, находятся в областях, соответствующих белкам *Vip-δ*, *Vsp* и *Vip-γ*. Реакционная смесь содержала положительный внутренний контроль для детекции ДНК *B. miyamotoi* по каналу Orange — диагностические праймеры и зонд,

используемые в наборе реагентов «АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL».

Для валидации методики были использованы образцы ДНК российских изолятов *B. miyamotoi*. Во всех случаях были идентифицированы те и толь-

Таблица 3. Распределение генотипов экспрессируемых *Vmp B. miyamotoi*, определённых в биологических образцах
Table 3. Distribution of *Vmp* genotypes expressed by *B. miyamotoi* *Vmp* and detected in the biological samples

№ No	Тип гена <i>Vmp</i> в сайте экспрессии The type of <i>Vmp</i> gene at the expression site	Число образцов от больных Number of samples from patients	Доля проб определённого типа, % Percentage of samples of a specific genotype	Нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала* Lower and upper 95% confidence limits*	Число образцов от клещей Number of samples from ticks	Доля проб определённого типа, % Percentage of samples of a specific genotype	Нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала* Lower and upper 95% confidence limits*
1	Только <i>Vip-δ</i> <i>Vip-δ</i> only	63	36,6		38	34,9	
2	Только <i>Vsp</i> <i>Vsp</i> only	42	24,4		28	25,7	
3	Только <i>Vip-γ</i> <i>Vip-γ</i> only	12	7,0		5	4,6	
4	<i>Vip-δ</i> + <i>Vsp</i>	30	17,4		2	1,8	
5	<i>Vip-δ</i> + <i>Vip-γ</i>	1	0,6		1	0,9	
6	<i>Vsp</i> + <i>Vip-γ</i>	5	2,9		3	2,8	
7	Не определен ** Not identified	19	11,1	7,2–16,6	32	29,4	21,6–38,5
8	Всего образцов Total number of samples	172	100		109	100	
9	Всего положительных образцов (из 172 или 109) Total number of positive samples (from 172 or 109 samples)	153	89,0	83,4–92,8	77	70,6	61,5–78,4
10	Из них выявлен один тип <i>Vmp</i> [#] Among them — only one <i>Vmp</i> type is identified	117	68,0	60,7–74,5	71	65,1	55,8–73,4
11	Из них выявлены 2 типа <i>Vmp</i> ^{##} Among them — two <i>Vmp</i> types are identified ^{##}	36	20,9	15,5–27,6	6	5,5	2,6–11,5
12	<i>Vip-δ</i> , всего ^{&} <i>Vip-δ</i> , total ^{&}	94	49,7	42,7–56,8	41	49,4	38,9–59,9
13	<i>Vsp</i> , всего ^{&} <i>Vsp</i> , total ^{&}	77	40,7	34,0–47,9	33	39,8	29,9–50,5
14	<i>Vip-γ</i> , всего ^{&} <i>Vip-γ</i> , total ^{&}	18	9,5	6,1–14,6	9	10,8	5,8–19,3
15	Получено положительных сигналов, всего ^{&} Positive signals received, total ^{&}	189	100		83	100	

Примечание. *При доверительной вероятности («уровне доверия») 0,95; **положительный сигнал только по каналу детекции Orange: детекция присутствия в образце ДНК *B. miyamotoi*; #положительный сигнал по одному из каналов Green, Yellow или Red и по каналу детекции Orange: детекция присутствия в образце ДНК, кодирующей *Vmp*; ##положительный сигнал по 2 каналам из 3 (Green, Yellow или Red) и по каналу детекции Orange; &по одиночке или совместно с другим типом *Vmp*.

Note. *At a confidence level 0.95; **the positive signal only in the orange detection channel: the detection of *B. miyamotoi* DNA in the sample; #the positive signal in one of the green, yellow or red channel, and in the orange detection channel: The detection of the DNA encoding *Vmps* in the sample; ##the positive signal in 2 channels out of 3 (green, yellow, or red) and in the orange detection channel; &singly or together with another type of *Vmp*.

ко те типы экспрессированных *Vmp*, которые были присущи этим штаммам по данным полногеномного секвенирования [16, 17], а именно *Vlp-δ* у штаммов Izh-4 и Izh-5, *Vlp-γ* — у Izh-14, *Vsp* — у Yekat-1 и Yekat-6, а также одновременно *Vlp-δ* и *Vsp* — у Izh-16.

Определение экспрессируемых *Vmp* *B. miyamotoi* в образцах биологического материала

Результаты определения типов *Vmp* *B. miyamotoi* в биологических образцах, полученных от больных ИКБ-БМ и клещей представлены в табл. 3. Из протестированного 281 образца у 51 (18%) не удалось идентифицировать потенциально экспрессируемый ген *Vmp*: сигнал детектировался только по каналу Orange. В остальных 230 образцах детектировался положительный сигнал, при этом медианные значения пороговых циклов и их разброс составляли для каналов Green — 31 и 19–42, Yellow — 30 и 21–42, Red — 30 и 21–41. Эти значения соответствовали параметрам амплификации положительного внутреннего контроля — диагностической мишени в геноме *B. miyamotoi*, детектируемой по каналу Orange: медиана значений пороговых циклов — 28, разброс — 18–37.

Отрицательные результаты (табл. 3, строка 7) значимо реже наблюдаются среди проб от больных, чем среди проб клещей ($p = 0,0002$, двусторонний точный тест Фишера). При этом доля проб, в которых детектируется *Vmp* только одного типа (строка 10), практически одинакова среди клинических образцов и клещей ($p = 0,7$), а вот доля проб, в которых детектируются одновременно два типа *Vmp* (строка 11), значимо выше среди клинических образцов ($p = 0,0003$), и именно это приводит к снижению числа отрицательных проб. При более детальном рассмотрении типов гена *Vmp* и их комбинаций, обнаруживаемых в сайте экспрессии (строки 1–6), обращает на себя внимание комбинация *Vlp-δ* и *Vsp* (строка 4), часто выявляемая в образцах от пациентов ($p = 0,00003$). Остальные различия по встречаемости генотипов *Vmp* в образцах от больных ИКБ-БМ и клещей не значимы.

Из строк 1–6 табл. 3 очевидно, что встречаемость типов *Vmp* ранжируется от большей к меньшей: *Vlp-δ* → *Vsp* → *Vlp-γ*. Но нагляднее и правильнее оценить частоту встречаемости положительных сигналов по каждому из каналов детекции (строки 12–15), при этом сигнал, характерный для типа *Vmp*, учитывается вне зависимости от того, обнаружен он по одиночке или совместно с сигналом от другого типа *Vmp*. Такой анализ подтверждает ранжирование *Vlp-δ* → *Vsp* → *Vlp-γ* и подчёркивает тот факт, что встречаемость наиболее распространённых типов *Vmp* одинакова как при острой инфекции ИКБ-БМ, так и в клещах-переносчиках (вероятность верности нулевой гипотезы об отсутствии различий 0,94).

Региональные различия по экспрессии разных типов *Vmp*, как правило, не достигают статистической значимости, поскольку из многих регионов пока изучены лишь 10–20 образцов (табл. 1). Тем не менее можно отметить, что пробы от больных ИКБ-БМ из Свердловской области реже были отрицательными (у 2,4%), чем из Новосибирской области (у 15,9%), $p = 0,008$. При этом среди положительных образцов от больных ИКБ-БМ из Свердловской и Новосибирской областей относительные доли *Vlp-δ*, *Vsp* и *Vlp-γ* не различаются ($p = 0,71$) и близки к значениям, представленным в строках 12–14 табл. 3. С другой стороны, доля отрицательных проб клещей из Свердловской области (39%) и из Новосибирской области (29%) и относительные доли *Vlp-δ*, *Vsp* и *Vlp-γ* в клещах значимо не отличаются ($p > 0,45$).

Подтверждение верности идентификации экспрессируемых *Vmp* *B. miyamotoi*

У части проб нуклеотидные последовательности фрагментов генов *Vmp*, находящихся в сайте экспрессии, были установлены также путём секвенирования соответствующих фрагментов генома. По данным ПЦР-РПВ, в 19 из секвенированных проб экспрессировался ген *Vsp*, в 23 — *Vlp-δ* и в 11 — *Vlp-γ*.

Во всех случаях секвенированием подтверждена правильность результатов ПЦР-РПВ на образцах ДНК из клещей и крови больных и соответствие мест посадки в нуклеотидных последовательностях-мишенях последовательностям праймеров и зондов, которые первоначально были выбраны исходя из данных полногеномного секвенирования 6 российских изолятов.

Обсуждение

Разработанная методика показала достаточную эффективность при анализе биологических образцов, содержащих ДНК *B. miyamotoi*, и может далее широко применяться в существующем виде, а также усовершенствоваться. Основных путей развития два: добиться такой же эффективности при анализе других распространённых генотипов *B. miyamotoi* — «американских» и «европейского», и предусмотреть возможность определения экспрессии более редких генов *Vmp* — *Vlp-α* и *Vlp-β*. Работы в этом направлении ведутся.

Исследование принципиально новых аспектов генетики и эпидемиологии *B. miyamotoi* поставило и ряд новых вопросов, ответы на которые на данном этапе могут быть только гипотетическими. Во-первых, почему некоторые пробы ДНК *B. miyamotoi* из крови больных (11%) остаются отрицательными? Предварительные результаты показывают, что включение в систему идентификации дополнительных генов *Vlp-α* и *Vlp-β* снижает долю отрицательных

результатов лишь на несколько процентов. Поэтому они могут определяться ограничениями чувствительности ПЦР-РПВ либо вследствие низкой бактериальной нагрузки в образцах крови, либо из-за наличия ещё неизвестных мутаций в области посадки праймеров и зондов. Первый вариант представляется более вероятным, поскольку при тщательном проспективном исследовании больных ИКБ-БМ в Екатеринбурге [7, 11], своевременном отборе, хранении и транспортировке проб крови и/или ДНК в условиях холодной цепи долю отрицательных проб удаётся снизить до 3%. Второй вопрос: почему доля отрицательных проб ДНК *B. miyamotoi* из клещей (29%) значимо выше? Возможно, *B. miyamotoi*, находясь в клещах, не нуждаются в экспрессии *Vmp*, по крайней мере, *Vmp* наиболее распространённых типов: *Vlp-δ*, *Vsp* или *Vlp-γ*. Подобное явление известно для *B. burgdorferi sensu lato*, которые начинают экспрессировать OspC (outer surface protein C) только в крови человека, где OspC боррелий выполняет защитные функции, в частности препятствует активации системы комплемента на их поверхности [36]. Недавно было показано, что *Vlp-δ* и *Vlp-α* *B. miyamotoi* также ингибируют активацию системы комплемента по альтернативному пути [37].

Наконец, наиболее интригующий вопрос: почему в пробах крови больных ИКБ-БМ (строки 11 и 4 в табл. 3) наша методика ПЦР-РПВ нередко идентифицирует экспрессию двух типов *Vmp* (в 21%), чаще всего одновременно *Vlp-δ* и *Vsp* (в 17%)? Если мы исходим из постулата «единичная боррелия экспрессирует только один ген *Vmp*, находящийся в сайте экспрессии», то необходимо допустить, что в организме больного человека одновременно присутствует несколько субпопуляций *B. miyamotoi*. Это не двойная инфекция (микст-инфекция) двумя разными штаммами боррелий, но следствие образования «квазивидов» из одного «предка», находившегося в инфицирующем клеще. Квазивиды могут образовываться в результате фазовых вариаций, т.е. переключения синтеза белков, у части популяции патогена, колонизирующего организм хозяина. Фазовые вариации обычно имеют приспособительное значение. В случае обладающих антигенными свойствами поверхностных белков, в частности *Vmp*, изменение антигенного профиля предположительно делает боррелии менее чувствительными к бактерицидным антителам, выработавшимся к исходным вариантам антигенов. Такой феномен, называемый «иммунным избеганием» (immune escape), позволяет патогену продлить свое существование в организме хозяина как минимум до выработки антител к новым вариантам антигенов. Генетические механизмы фазовых вариаций детально изучаются на примере белка *VlsE B. burgdorferi sensu lato* [38]. В опытах на лабораторных животных и/или культуре бор-

релий показана принципиальная возможность переключения синтеза *Vmp* для *B. hermsii* [39, 40] и *B. miyamotoi* [18]. При остром заболевании ИКБ-БМ более половины пациентов продуцируют антитела к нескольким типам *Vmp* [7, 24], что является косвенным свидетельством наличия феномена «иммунного избегания» *in vivo*, равно как и обнаруженное в этой работе присутствие нескольких генотипов *Vmp*, экспрессирующихся в образцах от больных. При лабораторном заражении мелких грызунов российскими штаммами *B. miyamotoi* проявления «иммунного избегания» были документированы нами прямыми генетическими и серологическими методами [41]. Предположительно, именно из-за «иммунного избегания» у больных ИКБ-БМ в отсутствие адекватной антибиотикотерапии может наблюдаться несколько рецидивов лихорадки [42]. Рецидивирующее течение характерно для клещевых возвратных лихорадок и других возвратных лихорадок, например, для такого жизнеугрожающего заболевания, как боррелиозный вшивый возвратный тиф [2].

Заключение

По мере накопления клинических и полевых биологических образцов, содержащих ДНК возбудителя, в ходе дальнейших эпидемиологических исследований в регионах России и мира с помощью разработанной методики можно будет полнее изучить антигенный спектр штаммов *B. miyamotoi*, циркулирующих на различных территориях, в сопоставлении с характеристикой более консервативных участков их генома, например, методом мультилокусного секвенирования типирования [27]. Это позволит прояснить этапы эволюции и распространения боррелий *B. miyamotoi sensu lato* — возбудителей иксодового клещевого боррелиоза, практически не отличающегося по своей эпидемиологической значимости от хорошо известной болезни Лайма.

Второе направление исследования — анализ связи комплекса клинических проявлений и осложнений ИКБ-БМ с типом *Vmp*, экспрессированного в начале заболевания, и возможного переключения экспрессии («иммунного избегания») в течение инфекционного процесса.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D., McClelland M., et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45(4): 804–10. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-804>
2. Платонов А.Е., Малеев В.В., Карань Л.С. Боррелиозные возвратные лихорадки: забытые и новые. *Терапевтический архив.* 2010; 82(11): 74–80.
3. Cutler S., Vayssier-Taussat M., Estrada-Peña A., Potkonjak A., Mihalca A.D., Zeller H. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia*

- miyamotoi* — a human health risk? *Euro Surveill.* 2019; 24(18): 1800170.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.18.1800170>
4. Карань Л.С., Колясников Н.М., Махнева Н.А., Топоркова М.Г., Надеждина М.В., Есаулкова А.Ю. и др. Применение ПЦР в режиме реального времени для диагностики различных клещевых инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2010; 87(3): 72–7.
 5. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(10): 1816–23.
<https://doi.org/10.3201/eid1710.101474>
 6. Сарксян Д.С. *Иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный Borrelia miyamotoi, — клинико-эпидемиологическая характеристика, диагностика, лечение:* Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2016.
 7. Платонов А.Е., Топоркова М.Г., Колясников Н.М., Стуколова О.А., Долгова А.С., Бродовикова А.В. и др. Клиника иксодового клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, в контексте иммунного ответа на возбудитель. *Терапевтический архив.* 2017; 89(11): 34–42.
 8. Титков А.В., Платонов А.Е., Стуколова О.А., Миронов К.О., Дмитриева Г.М., Кострыкина Т.В. и др. Эпидемиологические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в Красноярском крае в контексте изучения распространенности инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 95(3): 10–8. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-3-10-18>
 9. Kingry L.C., Anacker M., Pritt B., Bjork J., Respcio-Kingry L., Liu G., et al. Surveillance for and discovery of borrelia species in US patients suspected of tick-borne illness. *Clin. Infect. Dis.* 2018; 66(12): 1864–71. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1107>
 10. Marcos L.A., Smith K., Reardon K., Weinbaum F., Spitzer E.D. Presence of *Borrelia miyamotoi* infection in a highly endemic area of Lyme disease. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2020; 19(1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00364-0>
 11. Платонов А.Е., Коетсвелд Ж., Колясников Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Шипулин Г.А. и др. Микробиологическое подтверждение этиологии «иксодового клещевого боррелиоза в безэритемной форме» — инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2017; 16(1): 29–35.
 12. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Toporkova M.G., Sarksyas D.S., Oei A., et al. Development and optimization of an *in vitro* cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017; 23(7): 480–4.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.009>
 13. Replogle A.J., Sexton C., Young J., Kingry L.C., Schriefer M.E., Dolan M., et al. Isolation of *Borrelia miyamotoi* and other *Borreliae* using a modified BSK medium. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 1926. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81252-1>
 14. Barbour A.G. Multiple and diverse vsp and vlp sequences in *Borrelia miyamotoi*, a hard tick-borne zoonotic pathogen. *PLoS One.* 2016; 11(1): e0146283.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146283>
 15. Kingry L.C., Replogle A., Batra D., Rowe L.A., Sexton C., Dolan M., et al. Toward a complete North American *Borrelia miyamotoi* genome. *Genome Announc.* 2017; 5(5).
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01557-16>
 16. Kuleshov K.V., Koetsveld J., Goptar I.A., Markelov M.L., Kolyasnikova N.M., Sarksyas D.S., et al. Whole-genome sequencing of six *Borrelia miyamotoi* clinical strains isolated in Russia. *Genome Announc.* 2018; 6(1): e01424–17.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01424-17>
 17. Kuleshov K.V., Margos G., Fingerle V., Koetsveld J., Goptar I.A., Markelov M.L., et al. Whole genome sequencing of *Borrelia miyamotoi* isolate Izh-4: reference for a complex bacterial genome. *BMC Genomics.* 2020; 21(1): 16.
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6388-4>
 18. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S., Wickel M., Deponte K., Bleijlevens B., et al. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J. Immunol.* 2016; 196(10): 4185–95.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600014>
 19. Koetsveld J., Platonov A.E., Kuleshov K., Wagemakers A., Hoonstra D., Ang W., et al. *Borrelia miyamotoi* infection leads to cross-reactive antibodies to the C6 peptide in mice and men. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(4): 513.e1–513.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.07.026>
 20. Harris E.K., Harton M.R., de Mello Marques M.A., Belisle J.T., Molins C.R., Breuner N., et al. Immunoproteomic analysis of *Borrelia miyamotoi* for the identification of serodiagnostic antigens. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 16808.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53248-5>
 21. Tokarz R., Tagliafierro T., Caciula A., Mishra N., Thakkar R., Chauhan L.V., et al. Identification of immunoreactive linear epitopes of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 2020; 11(1): 101314.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101314>
 22. Jahfari S., Herremans T., Platonov A.E., Kuiper H., Karan L.S., Vasilieva O., et al. High seroprevalence of *Borrelia miyamotoi* antibodies in forestry workers and individuals suspected of human granulocytic anaplasmosis in the Netherlands. *New Microbes New Infect.* 2014; 2(5): 144–9.
<https://doi.org/10.1002/nmi2.59>
 23. Jahfari S., Sarksyas D.S., Kolyasnikova N.M., Hovius J.W., Sprong H., Platonov A.E. Evaluation of a serological test for the diagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease in Europe. *J. Microbiol. Methods.* 2017; 136: 11–6.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.013>
 24. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Stukolova O.A., Hoonstra D., Sarksyas D.S., et al. Serodiagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease by measuring antibodies against GlpQ and variable major proteins. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24(12): 1338.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.009>
 25. Krause P.J., Carroll M., Fedorova N., Brancato J., Dumouchel C., Akosa F., et al. Human *Borrelia miyamotoi* infection in California: serodiagnosis is complicated by multiple endemic *Borrelia* species. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0191725.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191725>
 26. Stukolova O., Koetsveld J., Kolyasnikova N., Sarksyas D., Toporkova M., Karan L., et al. Antibody response in *Borrelia miyamotoi* infection studied by protein microarray. *Int. J. Infect. Dis.* 2019; 79: 18.
 27. Миронов К.О. *Молекулярно-биологический мониторинг в эпидемиологическом надзоре за гнойными бактериальными менингитами:* Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2017. Available at: <http://www.crie.ru/pdf/disser1%28mironov%29.pdf>
 28. Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н. и др. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(2): 113–8.
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>
 29. Бондаренко Е.И., Позднякова Л.Л., Сибирцева С.Г., Тимофеев Д.И., Фоменко Н.В., Иванов М.К. Набор реагентов для выявления *Borrelia miyamotoi* — возбудителя клещевой возвратной лихорадки методом ПЦР в режиме реального времени. *Новости «Вектор-Бест».* 2013; 1(67): 2–8.
 30. Краснова Е.И., Савельева М.В., Хохлова Н.И., Проворова В.В., Пар В.А., Мельникова О.В. и др. Особенности клинических проявлений и лабораторной диагностики возвратной клещевой лихорадки, вызванной *Borrelia miyamotoi*, в

- Новосибирской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2017; (2): 10–5.
31. Конькова-Рейдман А.Б., Барсукова Д.Н., Бондаренко Е.И., Швалов А.Н., Лучинина С.В. Клинико-эпидемиологические особенности инфекций, экологически связанных с клещами, в Челябинской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2019; 24(4): 178–87. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2019-24-4-178-187>
 32. Бондаренко Е.И., Леонова Г.Н., Щучинова Л.Д., Щучинов Л.В., Суховеркова А.В., Иванов Л.И. и др. Распространенность *Borrelia miyamotoi* – возбудителя клещевой возвратной лихорадки — в семи регионах Сибири и Дальнего Востока. В кн.: *Молекулярная диагностика 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. М.; 2017: 168–70.
 33. Mukhacheva T.A., Salikhova I.I., Kovalev S.Y. Multilocus spacer analysis revealed highly homogeneous genetic background of Asian type of *Borrelia miyamotoi*. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 31: 257–62. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.009>
 34. Brown L.D., Cai T.T., DasGupta A. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*. 2001; 16(2): 101–33. <https://doi.org/10.1214/ss/1009213286>
 35. Платонов А.Е. *Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы*. М.: РАМН; 2000.
 36. Tufts D.M., Hart T.M., Chen G.F., Kolokotronis S.O., Diuk-Wasser M.A., Lin Y.P. Outer surface protein polymorphisms linked to host-spirochete association in Lyme borreliosis. *Mol. Microbiol.* 2019; 111(4): 868–82. <https://doi.org/10.1111/mmi.14209>
 37. Schmidt F.L., Sürth V., Berg T.K., Lin Y.P., Hovius J.W., Kraiczky P. Interaction between *Borrelia miyamotoi* variable major proteins Vlp15/16 and Vlp18 with plasminogen and complement. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 4964. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84533-x>
 38. Chaconas G., Castellanos M., Verhey T.B. Changing of the guard: how the Lyme disease spirochete subverts the host immune response. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(2): 301–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008583>
 39. Barbour A.G., Dai Q., Restrepo B.I., Stoenner H.G., Frank S.A. Pathogen escape from host immunity by a genome program for antigenic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(48): 18290–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605302103>
 40. Crowder C.D., Ghalyanchi Langeroudi A., Shojaee Estabragh A., Lewis E.R.G., Marcisin R.A., Barbour A.G. Pathogen and host response dynamics in a mouse model of *Borrelia hermsii* relapsing fever. *Vet. Sci.* 2016; 3(3): 19. <https://doi.org/10.3390/vetsci3030019>
 41. Платонов А.Е., Якименко В.В., Миронов К.О., Стуколова О.А., Титков А.В., Колясникова Н.М. и др. «Иммунное избегание» — один из механизмов патогенеза бактериальных инфекций (на примере иксодового клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi*). В кн.: Покровский В.И., ред. *Инфекционные болезни в современном мире: эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика. Сборник трудов XII Ежегодного Всероссийского интернет-конгресса по инфекционным болезням с международным участием*. М.; 2020.
 42. Сарксян Д.С., Малеев В.В., Платонов А.Е., Платонова О.В., Карань Л.С. Рецидивирующее (возвратное) течение заболевания, вызванного *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2015; 87(11): 18–25. <https://doi.org/10.17116/terarkh2015871118-25>
 43. *relia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45(4): 804–10. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-804>
 44. Platonov A.E., Maleev V.V., Karan' L.S. Relapsing fever borreliosis: forgotten and new ones. *Terapevticheskii arkhiv*. 2010; 82(11): 74–80. (in Russian)
 45. Cutler S., Vayssier-Taussat M., Estrada-Peña A., Potkonjak A., Mihalca A.D., Zeller H. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* — a human health risk? *Euro Surveill.* 2019; 24(18): 1800170. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.18.1800170>
 46. Karan' L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Nadezhkina M.V., Esaulkova A.Yu., et al. Usage of real time polymerase chain reaction for diagnostics of different tick-borne infections. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2010; 87(3): 72–7. (in Russian)
 47. Platonov A.E., Karan' L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(10): 1816–23. <https://doi.org/10.3201/eid1710.101474>
 48. Sarksyian D.S. *Ixodic tick-borne borreliosis caused by Borrelia miyamotoi-clinical and epidemiological characteristics, diagnosis, treatment*: Diss. Moscow; 2016. (in Russian)
 49. Platonov A.E., Toporkova M.G., Kolyasnikova N.M., Stukolova O.A., Dolgova A.S., Brodovikova A.V., et al. Clinical presentation of ixodes tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi* in the context of an immune response to the pathogen. *Terapevticheskii arkhiv*. 2017; 89 (11): 34–42. (in Russian)
 50. Titkov A.V., Platonov A.E., Stukolova O.A., Mironov K.O., Dmitrieva G.M., Kostyriyina T.V., et al. Epidemiological features of ixodes tick-borne borreliosis in the Krasnoyarsk territory in the context of searching for the cases of infection caused by *Borrelia miyamotoi*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; 95(3): 10–8. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-3-10-18> (in Russian)
 51. Kingry L.C., Anacker M., Pritt B., Bjork J., Respicio-Kingry L., Liu G., et al. Surveillance for and discovery of *Borrelia* species in US patients suspected of tick-borne illness. *Clin. Infect. Dis.* 2018; 66(12): 1864–71. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1107>
 52. Marcos L.A., Smith K., Reardon K., Weinbaum F., Spitzer E.D. Presence of *Borrelia miyamotoi* infection in a highly endemic area of Lyme disease. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2020; 19(1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00364-0>
 53. Platonov A.E., Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Sarksyian D.S., Toporkova M.G., Shipulin G.A., et al. Microbiological evidence of etiology «ixodes tick-borne borreliosis without erythema migrans» — infection caused by *Borrelia miyamotoi*. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2017; 16(1): 29–35. (in Russian)
 54. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Toporkova M.G., Sarksyian D.S., Oei A., et al. Development and optimization of an *in vitro* cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017; 23(7): 480–4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.009>
 55. Replogle A.J., Sexton C., Young J., Kingry L.C., Schrieffer M.E., Dolan M., et al. Isolation of *Borrelia miyamotoi* and other *Borreliae* using a modified BSK medium. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 1926. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81252-1>
 56. Barbour A.G. Multiple and diverse vsp and vlp sequences in *Borrelia miyamotoi*, a hard tick-borne zoonotic pathogen. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0146283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146283>
 57. Kingry L.C., Replogle A., Batra D., Rowe L.A., Sexton C., Dolan M., et al. Toward a complete North American *Borrelia miyamotoi* genome. *Genome Announc.* 2017; 5(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01557-16>

REFERENCES

1. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D., McClelland M., et al. Genetic and phenotypic analysis of *Bor-*

16. Kuleshov K.V., Koetsveld J., Goptar I.A., Markelov M.L., Kolyasnikova N.M., Sarksyas D.S., et al. Whole-genome sequencing of six *Borrelia miyamotoi* clinical strains isolated in Russia. *Genome Announc.* 2018; 6(1): e01424–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01424-17>
17. Kuleshov K.V., Margos G., Fingerle V., Koetsveld J., Goptar I.A., Markelov M.L., et al. Whole genome sequencing of *Borrelia miyamotoi* isolate Izh-4: reference for a complex bacterial genome. *BMC Genomics.* 2020; 21(1): 16. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6388-4>
18. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S., Wickel M., De-ponte K., Bleijlevens B., et al. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J. Immunol.* 2016; 196(10): 4185–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600014>
19. Koetsveld J., Platonov A.E., Kuleshov K., Wagemakers A., Hoornstra D., Ang W., et al. *Borrelia miyamotoi* infection leads to cross-reactive antibodies to the C6 peptide in mice and men. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(4): 513.e1–513.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.07.026>
20. Harris E.K., Harton M.R., de Mello Marques M.A., Belisle J.T., Molins C.R., Breuner N., et al. Immunoproteomic analysis of *Borrelia miyamotoi* for the identification of serodiagnostic antigens. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 16808. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53248-5>
21. Tokarz R., Tagliaferro T., Caciula A., Mishra N., Thakkar R., Chauhan L.V., et al. Identification of immunoreactive linear epitopes of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks Tick Borne. Dis.* 2020; 11(1): 101314. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101314>
22. Jahfari S., Herremans T., Platonov A.E., Kuiper H., Karan L.S., Vasilieva O., et al. High seroprevalence of *Borrelia miyamotoi* antibodies in forestry workers and individuals suspected of human granulocytic anaplasmosis in the Netherlands. *New Microbes New Infect.* 2014; 2(5): 144–9. <https://doi.org/10.1002/nmi2.59>
23. Jahfari S., Sarksyas D.S., Kolyasnikova N.M., Hovius J.W., Sprong H., Platonov A.E. Evaluation of a serological test for the diagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease in Europe. *J. Microbiol. Methods.* 2017; 136: 11–6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.013>
24. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Stukolova O.A., Hoornstra D., Sarksyas D.S., et al. Serodiagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease by measuring antibodies against GlpQ and variable major proteins. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24(12): 1338. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.009>
25. Krause P.J., Carroll M., Fedorova N., Brancato J., Dumouchel C., Akosa F., et al. Human *Borrelia miyamotoi* infection in California: serodiagnosis is complicated by multiple endemic *Borrelia* species. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0191725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191725>
26. Stukolova O., Koetsveld J., Kolyasnikova N., Sarksyas D., Toporkova M., Karan L., et al. Antibody response in *Borrelia miyamotoi* infection studied by protein microarray. *Int. J. Infect. Dis.* 2019; 79: 18.
27. Mironov K.O. *Molecular biological monitoring in the epidemiological surveillance of purulent bacterial meningitis*: Diss. Moscow; 2017. Available at: <http://www.crie.ru/pdf/disser1%28mironov%29.pdf> (in Russian)
28. Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhaylova Yu.V., Yanushevich Yu.G., Shelentov A.A., Chagaryan A.N., et al. Characterization of streptococcus pneumoniae strains causing invasive infections using whole-genome sequencing. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(2): 113–8. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118> (in Russian)
29. Bondarenko E.I., Pozdnyakova L.L., Sibirtseva C.G., Timofeev D.I., Fomenko N.V., Ivanov M.K. A comprehensive approach to revealing the infection causative agents transmitted by ticks using real-time PCR. *Novosti «Vektor-Best».* 2013; 1(67): 2–8. (in Russian)
30. Krasnova E.I., Savel'eva M.V., Khokhlova N.I., Provorova V.V., Rar V.A., Mel'nikova O.V., et al. Features of clinical manifestations and laboratory diagnosis of tick-borne relapsing fever caused by *Borrelia miyamotoi* in the novosibirsk region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2017; (2): 10–5. (in Russian)
31. Kon'kova-Reydmann A.B., Barsukova D.N., Bondarenko E.I., Shvalov A.N., Luchinina S.V. Clinical and epidemiological features of infections ecologically related to ticks in the Chelyabinsk region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2019; 24(4): 178–87. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2019-24-4-178-187> (in Russian)
32. Bondarenko E.I., Leonova G.N., Shchuchinova L.D., Shchuchinov L.V., Sukhoverkova A.V., Ivanov L.I., et al. The prevalence of *Borrelia miyamotoi* — the causative agent of tick-borne recurrent fever-in seven regions of Siberia and the Far East. In: *Molecular Diagnostics 2017. Proceedings of the IV All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation [Molekulyarnaya Diagnostika 2017. Sbornik trudov IX Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]*. Moscow; 2017: 168–70. (in Russian)
33. Mukhacheva T.A., Salikhova I.I., Kovalev S.Y. Multilocus spacer analysis revealed highly homogeneous genetic background of Asian type of *Borrelia miyamotoi*. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 31: 257–62. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.009>
34. Brown L.D., Cai T.T., DasGupta A. Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science.* 2001; 16(2): 101–33. <https://doi.org/10.1214/ss/1009213286>
35. Platonov A.E. *Statistical Analysis in Medicine and Biology: Problems, Terminology, Logic, Computer Methods [Statisticheskii analiz v meditsine i biologii: zadachi, terminologiya, logika, komp'yuternye metody]*. Moscow: RAMN; 2000. (in Russian)
36. Tufts D.M., Hart T.M., Chen G.F., Kolokotronis S.O., Diuk-Wasser M.A., Lin Y.P. Outer surface protein polymorphisms linked to host-spirochete association in Lyme borreliae. *Mol. Microbiol.* 2019; 111(4): 868–82. <https://doi.org/10.1111/mmi.14209>
37. Schmidt F.L., Sürth V., Berg T.K., Lin Y.P., Hovius J.W., Kraiczky P. Interaction between *Borrelia miyamotoi* variable major proteins Vlp15/16 and Vlp18 with plasminogen and complement. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 4964. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84533-x>
38. Chaconas G., Castellanos M., Verhey T.B. Changing of the guard: how the Lyme disease spirochete subverts the host immune response. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(2): 301–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008583>
39. Barbour A.G., Dai Q., Restrepo B.I., Stoenner H.G., Frank S.A. Pathogen escape from host immunity by a genome program for antigenic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(48): 18290–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605302103>
40. Crowder C.D., Ghalyanchi Langeroudi A., Shojaee Estabragh A., Lewis E.R.G., Marcisisin R.A., Barbour A.G. Pathogen and host response dynamics in a mouse model of *Borrelia hermsii* relapsing fever. *Vet. Sci.* 2016; 3(3): 19. <https://doi.org/10.3390/vetsci3030019>
41. Platonov A.E., Yakimenko V.V., Mironov K.O., Stukolova O.A., Titkov A.V., Kolyasnikova N.M., et al. "Immune avoidance" is one of the mechanisms of pathogenesis of bacterial infections (for example, ixodic tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi*). In: Porkovskiy V.I., ed. *Infectious Diseases in the Modern World: Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. Proceedings of the XII Annual All-Russian Internet Congress on Infectious Diseases with International Participation [Infeksion-*

nye bolezni v sovremennom mire: epidemiologiya, diagnostika, lechenie i profilaktika. Sbornik trudov XII Ezhegodnogo Vserossiyskogo internet-kongressa po infektsionnym boleznyam s mezhdunarodnym uchastiem. Moscow; 2020. (in Russian)

42. Sarkisyan D.S., Maleev V.V., Platonov A.E., Platonova O.V., Karan' L.S. Relapsing (recurrent) disease caused by *Borrelia miyamotoi*. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2015; 87(11): 18–25. <https://doi.org/10.17116/terarkh2015871118-25> (in Russian)

Информация об авторах

Миронов Константин Олегович[✉] — д.м.н., рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4481-2249>

Титков Антон Владимирович — н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-9267>

Кулешов Константин Валерьевич — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Колясникова Надежда Михайловна — к.м.н., зав. лаб. клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия; н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9934-2582>

Бондаренко Евгений Иванович — к.м.н., н.с. лаб. ПЦР АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4699-9548>

Платонов Александр Евгеньевич — д.б.н., проф., г.н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7450-0081>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 18.03.2021;
принята к публикации 15.04.2021;
опубликована 01.06.2021

Information about the authors

Konstantin O. Mironov[✉] — D. Sci. (Med.), Head, Scientific group of developing new genetic polymorphisms detection methods, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Anton V. Titkov — researcher, Laboratory of zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-9267>

Konstantin V. Kuleshov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular diagnostics and epidemiology of intestinal infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

Nadezhda M. Kolyasnikova — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of tick-borne encephalitis and other viral encephalitis, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune- and Biological Products of RAS; researcher, Laboratory of zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9934-2582>

Evgeniy I. Bondarenko — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of PCR, JSC «Vector-Best», Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4699-9548>

Alexander E. Platonov — D. Sci. (Biol.), Prof., chief researcher, Laboratory of zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7450-0081>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 18.03.2021;
accepted for publication 15.04.2021;
published 01.06.2021