

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-296>

Оптимизация мультилокусного сиквенс-анализа для лабораторной идентификации возбудителей иксодового клещевого боррелиоза

Голидонова К.А.[✉], Коренберг Э.И., Гинцбург А.Л.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Наиболее широко распространённые этиологические агенты иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) в России — *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*. Для определения видовой принадлежности боррелий в современных исследованиях используют методы мультилокусного сиквенс-типирования и сиквенс-анализа (МЛСА). Ранее были продемонстрированы результаты применения схемы МЛСА для идентификации возбудителей эритемных форм ИКБ.

Цель работы — изучить возможность оптимизации МЛСА для практической лабораторной идентификации возбудителей ИКБ. **Задачи:** сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей локусов 6 консервативных генов (*rrs*, *hbb*, *fla*, *groEL*, *recA*, *ospA*) и межгенного спейсера *rrfA-rrlB*, рекомендованных протоколом МЛСА; выявление минимальной совокупности генов, сцепленные сиквенсы которых позволяют идентифицировать видовую принадлежность изолята боррелий.

Материалы и методы. Сиквенсы вышепредставленных локусов 23 «контрольных» изолятов, полученных от больных ИКБ и предварительно типированных методом МЛСА как *B. bavariensis*, использованы для сравнительного анализа с последовательностями аналогичных генов других видов боррелий, имеющимися в международных базах данных. На основе этого материала методом UPGMA построена и проанализирована серия дендрограмм.

Результаты. Сиквенсы локусов гена *ospA* контрольного вида показали наибольшее отличие (не менее 8,5%) от последовательностей этого гена у других сравниваемых видов боррелий; близкие показатели видовых отличий (не менее 6,7%) продемонстрировало сравнение сиквенсов гена *recA*. Сиквенсы выявленных вариантов двух этих генов у *B. bavariensis* отличались от последовательностей аналогичных генов у наиболее близкого вида — *B. garinii*. Дендрограмма сцепленных нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* продемонстрировала её идентичность результатам идентификации изолятов по полному протоколу МЛСА.

Заключение. Предложен оптимизированный подход к МЛСА боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato*, который сводится к выявлению их видовой принадлежности на основании специфики результата сцепленного анализа локусов только двух генов (*recA* и *ospA*) из 7 локусов, рекомендованных протоколом этого метода.

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы, МЛСА, идентификация возбудителя, лабораторная диагностика

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи (протокол № 18 от 21.02.2022).

Благодарность. Авторы выражают признательность институту и коллегам лаборатории, оказывавшим консультацию, поддержку и помощь в работе.

Источник финансирования. Исследование финансировалось за счёт средств, полученных для выполнения Государственного задания лаборатории.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Гинцбург А.Л. Оптимизация мультилокусного сиквенс-анализа для лабораторной идентификации возбудителей иксодового клещевого боррелиоза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):514–524.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-296>

Optimized multilocus sequence analysis for laboratory identification of pathogens of ixodid tick-borne borreliosis

Kristina A. Golidonova[✉], Edward I. Korenberg, Alexander L. Gintsburg

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The most common etiological agents of ixodid tick-borne borreliosis (ITBB) in Russia are *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*. Multilocus sequence typing and multilocus sequence analysis (MLSA) have been used in recent studies for *Borrelia* species identification. The results of using the MLSA scheme for identification of pathogens causing erythemic forms of ITBB have been presented earlier.

The **purpose** of the study was to explore the possibility of MLSA optimization for laboratory identification of ITBB pathogens. Objectives: comparative analysis of nucleotide sequences of 6 conserved genes (*rrs*, *hbb*, *fla*, *groEL*, *recA*, *ospA*) and the *rrfA-rrlB* intergenic spacer, which are recommended by the MLSA protocol; identification of the minimum set of genes, the concatenated sequences of which are essential for species identification of *Borrelia* isolates.

Materials and methods. The sequences of the above loci of 23 reference isolates collected from patients with ITBB and assigned, using MLSA, to *B. bavariensis* were compared with the sequences of similar genes of other *Borrelia* species available in international databases. The UPGMA method was used to build and analyze dendrograms based on the obtained data.

Results. The sequences of *ospA* gene loci of reference species demonstrated the greatest difference (not less than 8.5%) from the sequences of the above gene in other analyzed species of *Borrelia*; approximately similar species-related differences (not less than 6.7%) were demonstrated by the comparison of *recA* gene sequences. The sequences of the identified variants of these two genes in *B. bavariensis* differed from the sequences of the similar genes in the most closely related species — *B. garinii*. The dendrogram of the concatenated nucleotide sequences of *recA* and *ospA* genes demonstrated that it was totally consistent with the results of identification of the isolates based on the MLSA protocol.

Conclusion. The optimized approach to MLSA of the *B. burgdorferi* sensu lato group suggests that species identification should be based on the concatenated analysis of loci of only two genes (*recA* and *ospA*) out of 7 loci recommended by the MLSA protocol.

Keywords: ixodid tick-borne borreliosis, MLSA, identification of a pathogen, laboratory diagnostics

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (protocol No. 18, February 21, 2022).

Acknowledgement. The authors extend their gratitude to their Institute and laboratory associates who provided consulting, support, and assistance in their work.

Funding source. The study was supported by funds received for the Federal Task commissioned to the laboratory.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Golidonova K.A., Korenberg E.I., Gintsburg A.L. Optimized multilocus sequence analysis for laboratory identification of pathogens of ixodid tick-borne borreliosis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology* = *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):514–524.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-296>

Введение

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) — группа этиологически самостоятельных хронических или рецидивирующих спирохетозных природно-очаговых трансмиссивных инфекций, способных поражать различные системы и органы. Природные очаги ИКБ распространены в России в основном в лесной зоне. По уровню заболеваемости боррелиозы занимают одно из ведущих мест среди природно-очаговых зоонозов [1, 2].

Возбудители ИКБ — спирохеты комплекса *Borrelia burgdorferi* sensu lato, включающего более

20 видов [3], 8 из которых обнаружены в России [4]. Наиболее широко распространённые этиологические агенты ИКБ в нашей стране и большей части Евразии — *B. garinii*, *B. afzelii* и *B. bavariensis* [1, 5]. *B. garinii* чаще вызывает среднетяжёлую форму заболевания с общим инфекционным синдромом, при этом около 60% случаев составляет эритемная форма. Инфекционный процесс, вызванный *B. afzelii*, чаще протекает в лёгкой форме и обычно сопровождается развитием мигрирующей эритемы на месте укуса клеща [6, 7]. Эритемную форму ИКБ с различным спектром клинических проявлений

вызывает и *B. bavariensis* [5]. Следовательно, мигрирующая эритема, которую клиницисты считают единственным патогномичным признаком ИКБ, с большей или меньшей частотой может возникать при любом из наиболее распространённых этиологических агентов заболеваний этой группы.

Даже при наличии у пациента эритемы, степень выраженности и величина которой могут зависеть от ряда причин, включая сходные кожные проявления иной этиологии, клинический диагноз ИКБ в большинстве случаев нуждается в лабораторном подтверждении. С этой целью в настоящее время обычно применяют различные серологические методы: реакцию непрямой иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, варианты мультиплексного анализа (включая фосфоресцентный) и др. Эти методы характеризуются различными показателями специфичности и чувствительности, варьирующими в разные сроки от начала заболевания ИКБ. Они, как правило, наименее эффективны в его первые недели и совершенно безрезультативны в нередких серонегативных случаях. Возможность прямой изоляции возбудителя путём посевов проб на питательную среду сильно ограничена непродолжительностью боррелиемии, а также необязательностью его присутствия (особенно в остром периоде инфекционного процесса) в том или ином органе, тканях и биологических жидкостях пациента. Кроме того, посевы биоматериала не могут быть массовым лабораторно-диагностическим тестом ИКБ из-за продолжительности роста боррелий в положительных пробах. Однако из различных материалов, полученных от пациентов, можно амплифицировать ДНК боррелий методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Её клиническая чувствительность при исследовании ликвора пациентов не превышает 20%, при анализе плазмы крови — варьирует от 30 до 50%, при тестировании синовиальной жидкости может превышать 70%, а биоптатов кожи — 80% [1, 8].

Для определения видовой принадлежности боррелий в современных исследованиях широко используют методы мультилокусного сиквенса-типирования (МЛСТ) [9] и сиквенса-анализа (МЛСА) [1], основанные на выявлении специфики нуклеотидных последовательностей консервативных генов [10]. Применительно к видовой идентификации этиологии ИКБ каждый из этих методов имеет определённые особенности. Так, оба метода основаны на анализе нуклеотидных последовательностей локусов 7–8 разных консервативных генов (включая межгенный спейсер *rrfA-rrlB*), которые рекомендовано использовать при построении итоговых дендрограмм по сцепленным данным. При МЛСТ для построения дендрограмм используют матрицу несовпадений в аллельном профиле, игнорируя количество нуклеотидных различий между аллелями, которым

присваивают разные номера независимо от того, различаются ли нуклеотидные последовательности в одном сайте или во многих сайтах [10]. Этот метод давно и успешно используют при видовой идентификации различных групп патогенных бактерий, а для некоторых из них его считают «золотым стандартом» [11–13]. При МЛСА, наоборот, для определения филогенетических отношений тестируемых образцов используют сцепленные последовательности фрагментов их генов домашнего хозяйства [4, 10]. Схемой МЛСТ в зависимости от источника и концентрации ДНК рекомендовано проводить одноили двухраундовую ПЦР и амплифицировать более длинные фрагменты консервативных генов [14], а схема МЛСА рекомендует однораундовую ПЦР менее длинных локусов [10, 15]. Поэтому для видовой идентификации значительного числа изолятов боррелий МЛСА во всех отношениях менее затратен, чем МЛСТ. Подробнее преимущества и недостатки этих методов рассмотрены нами ранее [16].

Результаты применения схемы МЛСА для идентификации этиологического агента эритемных форм ИКБ продемонстрированы нами на клиническом материале (более 20 изолятов, полученных из биоптатов кожи и плазмы крови пациентов). Было установлено, что все изоляты относятся к *B. bavariensis*, выявлена вариабельность нуклеотидных последовательностей локусов анализируемых консервативных генов [5]. Это определило **цель** нашего исследования: изучить возможность оптимизации МЛСА для практической лабораторной идентификации возбудителей ИКБ.

Поставлены следующие задачи: сравнительный количественный анализ внутривидовой гетерогенности нуклеотидных последовательностей локусов 6 консервативных хромосомных генов (*rrs*, *hbb*, *fla*, *groEL*, *recA*, *ospA*) и межгенного спейсера (*rrfA-rrlB*), рекомендованных для МЛСА; выявление минимальной совокупности генов, сцепленных нуклеотидные последовательности которых позволяют идентифицировать видовую принадлежность изолята боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato*.

Материалы и методы

У 23 изолятов, хранящихся в музейной коллекции боррелий лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ НИЦЭМ имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, исследованы нуклеотидные последовательности локусов каждого из 6 генов (перечислены выше) и спейсера *rrfA-rrlB*, рекомендованных для МЛСА [15]. Изоляты получены от больных людей путём посева на среду BSK кожных биоптатов из периферической части эритем (17 изолятов) или из плазмы крови (6 изолятов) пациентов Краевой инфекционной больницы г. Пермь (восток Восточной Европы;

58°00' с.ш.; 56°15' в.д.) с локализованной стадией манифестной формы ИКБ с мигрующей эритемой. Количество исследованных изолятов составляет не менее 30–40% среднего числа всех пациентов с ИКБ, ежегодно поступающих в этот клинический стационар [6]. Культивирование и типирование изолятов методом ПЦР-полиморфизма длин рестриционных фрагментов спейсерного участка *rrfA-rrlB* позволило ранее отнести их к *B. garinii* NT29 [17, 18]. По результатам наших исследований методом МЛСА эти изоляты идентифицированы как *B. bavariensis*. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров, режим ПЦР и условия последующего секвенирования ампликонов описаны ранее [5, 15, 19].

Все полученные нуклеотидные последовательности сравнивали между собой (с использованием платформы BLAST) и с нуклеотидными последовательностями локусов аналогичных генов у типовых или референсных штаммов других видов спирохет *B. burgdorferi sensu lato*, представленными в базах данных GenBank INSDC и PubMLST *Borrelia* spp. Для этого методом невзвешенного парного среднего (UPGMA) была построена серия дендрограмм с использованием пакета программ «MEGA-X v. 10.2.4» при величине bootstrap 1000 повторов. Значительная часть этих дендрограмм проанализирована ранее [5, 19]. В данной статье приведены лишь те, которые необходимы для обоснования заключения данной статьи и ранее не публиковались.

Нуклеотидные последовательности 10 локусов исследованных генов депонированы в базу данных Genbank (номера доступа MW981426, MZ005315-

MZ005321, OM310938–OM310939) и 4 более коротких сиквенса — в базу данных European Nucleotide Archive (номера доступа OD916881–OD916884).

Результаты

Сравнительный анализ данных нуклеотидных последовательностей локусов генов, рекомендованных для МЛСА

В табл. 1 представлены показатели сходства нуклеотидных последовательностей локусов каждого гена у всех изученных нами изолятов, идентифицированных по результатам МЛСА как *B. bavariensis*, включая опубликованные ранее данные по генам *rrs*, *fla*, *hbb* и *recA* [5, 19]. Сходство оказалось значительным (до 99,5–100%) у изолятов из кожных биоптатов и из плазмы крови пациентов. С локусами других генов минимальное сходство (95,3%) имели некоторые последовательности гена *ospA*. Однако сиквенсы этого гена на 9,5–10,9% отличались от сиквенсов того же гена *B. garinii* 20047T (наиболее близкий вид по общей структуре генома [20]), а также на 8,5% (т.е. больше, чем у всех других генов) от совокупности сиквенсов широко распространённых боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato*. Аналогичные показатели для сиквенсов гена *recA* оказались несколько меньше, чем у гена *ospA*, но больше, чем у остальных исследованных генов (табл. 1). Отличия нуклеотидных последовательностей секвенированных нами локусов двух этих генов от последовательности аналогичного участка генома референсного штамма РВи европейской подгруппы *B. bavariensis* были существенными (до 8,1%). Эти результаты стиму-

Таблица 1. Вариабельность нуклеотидных последовательностей совокупности локусов (по результатам 23 исследованных изолятов *B. bavariensis*) каждого гена

Table 1. Variability of the nucleotide sequences of the set of loci (according to the results of 23 studied isolates of *B. bavariensis*) of each gene

Ген (мишень) Gene (target)	Сходство нуклеотидных последовательностей между изолятами из кожных биоптатов и из плазмы, % Nucleotide sequence similarity between skin biopsy and plasma isolates, %	Отличие от (в %) Difference from (in %)		
		<i>B. bavariensis</i> РВи	<i>B. garinii</i> 20047T	других видов боррелий <i>B. burgdorferi</i> s. l, не менее other <i>Borrelia</i> species <i>B. burgdorferi</i> s. l, not less than
<i>rrs</i>	100	0,4	0,2	0,8
<i>hbb</i>	98,5–100	1,2–1,5	1,2–1,5	4,3
<i>fla</i>	99,5–100	0,6–1,2	1,2–1,8	5,8
<i>groEL</i>	98,7–100	2,2–2,7	2,2–2,7	3,6
<i>recA</i>	97,3–100	0,7–2	2–3,4	6,7
<i>ospA</i>	95,3–100	4,7–8,1	9,5–10,9	8,5
Спейсер <i>rrfA-rrlB</i> Spacer <i>rrfA-rrlB</i>	98,8–100	1,7–2,3	1,7–2,3	4,8
Сцепленные последовательности локусов генов <i>recA</i> и <i>ospA</i> Concatenated sequences of <i>recA</i> and <i>ospA</i> gene loci	96,1–100	3,6–5,6	6,4–7,8	8,3

лировали проведение более детального анализа внутривидовой гетерогенности нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* на материале наших изолятов *B. bavariensis*, а также их отличий от сиквенсов аналогичных генов у боррелий других видов комплекса *B. burgdorferi sensu lato*.

Детальный анализ дендрограмм последовательностей локусов генов recA и ospA и сравнение этих данных с результатами полного МЛСА

Сиквенсы генов *recA* анализированных нами изолятов показали, что все они попадают в большой кластер с тремя различными аллельными вариантами евразийской генетической подгруппы *B. bavariensis*: нуклеотидные последовательности большинства изолятов (19 из 23) идентичны варианту SZ, 3 — варианту Prm7504-11 и 1 — варианту Hiratsuka (номера доступа GenBank; **рис. 1**). Это объясняет некоторое несходство нуклеотидных последователей локусов этого гена у разных изолятов (табл. 1). Тем не менее все сиквенсы этого гена чёт-

ко отличаются от такового у *B. garinii* и референсных штаммов наиболее распространённых видов *B. burgdorferi sensu lato*, а также от последовательности этого гена у широко распространённой патогенной *B. miyamotoi*, таксономический статус которой остаётся дискуссионным [1]. Аналогичная дендрограмма, построенная по результатам секвенирования локусов гена *ospA* (**рис. 2**), в целом принципиально не отличается от предыдущей.

Результаты МЛСА 6 отобранных изолятов, которые представляют все выявленные нами аллельные варианты генов *recA* и *ospA* *B. bavariensis* (**рис. 1, 2**), показали, что они на 98,5–100,0% сходны с сиквенсами различных изолятов евразийской генетической подгруппы боррелий этого вида (SZ, Prm7564-11, Prm7569-11, Hiratsuka) и несколько менее — с европейскими изолятами, например, с референсным штаммом PVi — на 97,8–98,4%. Вместе с тем все генетические варианты *B. bavariensis*, включая штамм PVi, имеют существенные отличия (т.е. сходство не более 94,9%), позволяющие четко дифференцировать их по данным МЛСА от борре-

Таблица 2. Сходство (в %) некоторых «контрольных» изолятов с боррелиями различных видов, нуклеотидные последовательности которых имеются в базах данных GenBank и PubMLST

Table 2. Similarity (in %) of some “control” isolates with *Borrelia* of various species, the nucleotide sequences of which are available in the GenBank and PubMLST databases

	Hs-7	Hs-10	Hs-55	Hs-104	Hs-128	Hs-139	<i>B. garinii</i> 20047T	<i>B. bavariensis</i>				<i>B. spielmanii</i> A14S	<i>B. burgdorferi</i> s. s. B31T	<i>B. lusitaniae</i> PotiB2T	<i>B. valaisiana</i> VS116T	<i>B. afzelii</i> VS461T
								PVi	NT 29	Prm7564-11	Hiratsuka					
Hs-7	100															
Hs-10	98,9	100														
Hs-55	98,9	100	100													
Hs-104	98,9	100	100	100												
Hs-128	100	98,9	98,8	98,9	100											
Hs-139	99,6	98,9	98,8	98,9	99,7	100										
<i>B. garinii</i> 20047T	97,8	97,6	97,5	97,6	97,7	97,3	100									
<i>B. bavariensis</i> PVi	98,2	98,4	98,3	98,4	98,1	97,8	98,1	100								
<i>B. bavariensis</i> NT29	98,8	100	99,9	100	98,8	98,8	97,6	98,4	100							
<i>B. bavariensis</i> Prm7564-11	100	98,9	98,8	98,9	100	99,7	97,7	98,1	98,8	100						
<i>B. bavariensis</i> Hiratsuka	100	98,9	98,9	98,9	100	99,6	97,8	98,2	98,8	100	100					
<i>B. spielmanii</i> A14S	94,5	94,5	94,5	94,5	94,4	94,4	94,3	94,0	94,5	94,4	94,5	100				
<i>B. burgdorferi</i> s. s. B31T	93,6	93,5	93,4	93,5	93,5	93,5	93,3	93,2	93,5	93,5	93,6	93,6	100			
<i>B. lusitaniae</i> PotiB2T	93,8	93,9	93,9	93,9	93,7	93,9	93,6	93,5	93,9	93,7	93,8	94	93,3	100		
<i>B. valaisiana</i> VS116T	94,5	94,9	94,9	94,9	94,5	94,4	94,2	94,4	94,6	94,5	94,5	94,3	93,8	94,3	100	
<i>B. afzelii</i> VS461T	93,9	93,9	93,8	93,9	93,9	94,0	94,2	94,0	93,9	93,9	93,9	94,5	94,1	93,1	94,2	100

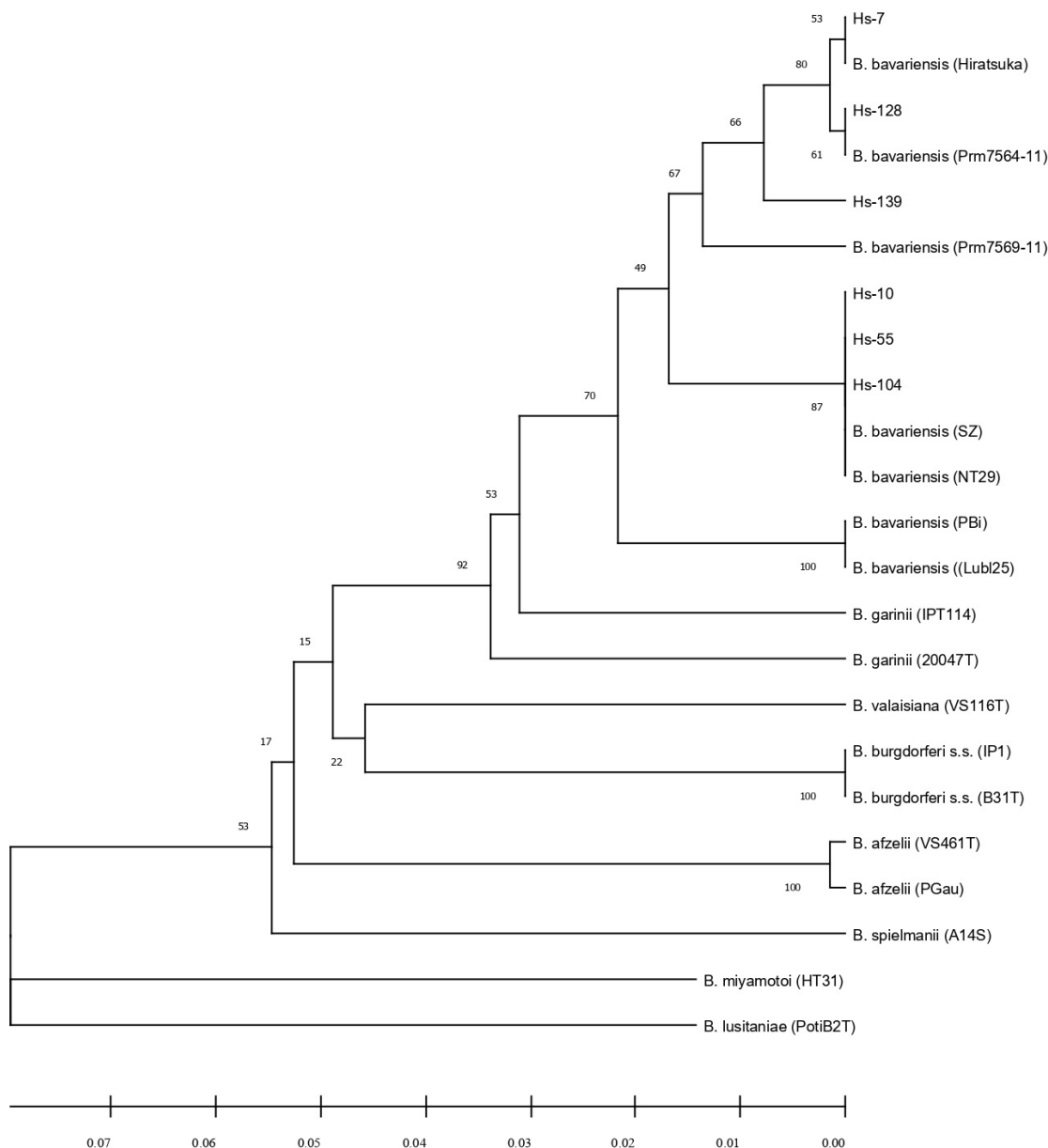


Рис. 3. Дендрограмма сцепленных нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA*.

Тест Мантеля — $R = 0,860$ (сцепленные/*recA*), $R = 0,965$ (сцепленные/*ospA*).

Fig. 3. Dendrogram of concatenated nucleotide sequences of *recA* and *ospA* genes.

Mantel test — $R = 0.860$ (concatenated/*recA*), $R = 0.965$ (concatenated/*ospA*).

лий других видов (табл. 2). Дендрограмма сцепленных нуклеотидных последовательностей двух генов (*recA* и *ospA*) тех же наших изолятов демонстрирует наличие двух генетических подгрупп *B. bavariensis* (евразийской и европейской) и их чёткие отличия от соответствующих сцепленных сиквенсов боррелий других видов из баз данных (рис. 3).

Это свидетельствует о полной идентичности результатов идентификации боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato* путём анализа сцепленных нуклеотидных последовательностей локусов генов *recA*, *ospA* и по протоколу МЛСА.

Обсуждение

Определение видовой принадлежности боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato*, циркулирующих в природных очагах и (или) вызвавших заболевание ИКБ, как было отмечено выше, в настоящее время в основном проводится молекулярно-биологическими методами. При этом использование в качестве мишени какого-либо одного консервативного гена или спейсера обычно не позволяет точно идентифицировать изучаемый образец [10, 20]. Методы МЛСА и МЛСТ, протоколами которых предусмотрено секвенирование локусов несколь-

ких (6–8) генов, затратны, времяёмки и затруднительны [5, 10, 14–16], особенно при необходимости быстрой индикации этиологического агента ИКБ в условиях диагностических лабораторий лечебных учреждений.

Представленный в этой статье детальный анализ данных, полученных ранее и характеризующих генетическую структуру пула изолятов *B. bavariensis* [5, 19], привёл к выводу, что нуклеотидные последовательности локусов генов *recA* и *ospA* в наибольшей степени отличаются от последовательностей других генов, рекомендованных протоколом МЛСА для индикации распространённых видов комплекса *B. burgdorferi sensu lato*. Ранее были предприняты попытки достижения этой цели на основе разнообразия структуры отдельно каждого из генов *recA* и *ospA* [21, 22]. Сравнение таких наших данных (рис. 1 и 2) показывает, что они дают близкие, но не идентичные результаты генотипической принадлежности некоторых изолятов. Однако дендрограмма сцепленных нуклеотидных последовательностей локусов генов *recA* и *ospA* (рис. 3) демонстрирует точно такую же видовую и геновариантную принадлежность изолятов, как и ранее полученные результаты их типирования в соответствии с полным протоколом МЛСА.

Для проведения «контрольного» исследования, соответствующего задаче статьи, нами использован репрезентативный пул изолятов *B. bavariensis*, видовой принадлежности и гетерогенность которых были предварительно изучены этим методом и известны [5]. Сцепленные нуклеотидные последовательности локусов генов *recA* и *ospA*, принадлежащие референсным штаммам каждого из наиболее распространённых видов группы *B. burgdorferi sensu lato* (рис. 3), чётко различаются. Поэтому видовой принадлежности вновь исследуемого образца может быть выявлена путём расчёта максимального сходства сцепленных последовательностей этих двух его генов с аналогичными последовательностями определённых видов боррелий данной группы, включая *B. bavariensis*, или построением аналогичной дендрограммы. Для оптимизации регулярных лабораторных исследований её неизменный «шаблон» по типу рис. 3 может храниться в виде файла (например, в программе MEGA или другой). Простое сопоставление числа генов, рекомендованных протоколами МЛСА и МЛСТ, с их числом, которое по представленным нами данным необходимо и достаточно секвенировать для определения уже известного науке вида возбудителя ИКБ, показывает, что трудовые и финансовые затраты могут быть при этом сокращены примерно в 3–4 раза.

Специального дальнейшего изучения заслуживает возможность дифференциации боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato* от *B. miyamotoi* по их нуклеотидным последовательностям гена *recA*, су-

щественные отличия которых подтверждают наши данные (рис. 1). Это может иметь важное значение для совершенствования генодиагностики этиологии ИКБ, тем более что известен прецедент использования этого гена в совокупности с двумя другими для лабораторного подтверждения заболевания, вызванного *B. miyamotoi* [23].

Заключение

На основании исследований, приведённых выше, мы предлагаем оптимизированный подход к МЛСА боррелий группы *B. burgdorferi sensu lato*. Он сводится к выявлению их видовой принадлежности на основании специфики результата сцепленного анализа локусов только 2 генов (*recA* и *ospA*) из 6, а также спейсера *rrfA-rrlB*, рекомендованных протоколом данного метода. Это значительно сокращает затраты и ускоряет лабораторное исследование идентифицируемых образцов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. *Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами*. М.: Комментарии; 2013.
2. Рудакова С.А., Пеньевская Н.А., Блох А.И., Рудаков Н.В., Транквиловский Д.В., Савельев Д.А. и др. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2010–2020 гг. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; (2): 52–61. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-52-61>
3. Margos G., Castillo-Ramirez S., Cutler S., Dessau R.B., Eikeland R., Estrada-Peña A., et al. Rejection of the name *Borrelia* and all proposed species comb. nov. placed therein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020; 70(5): 3577–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004149>
4. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б. Мультилокусный сиквентс-анализ "нетипичных" *Borrelia burgdorferi sensu lato*, изолированных в России. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 35(4): 145–50. <https://doi.org/10.3103/S0891416817040073>
5. Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Гинцбург А.Л. Мультилокусный сиквентс-анализ изолятов от больных эритемной формой иксодового клещевого боррелиоза. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021; 39(4): 14–20. <https://doi.org/10.3103/S089141682104008X>
6. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Воробьева Н.Н., Фризен В.И., Помелова В.Г. и др. Клинико-лабораторная диагностика инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в Пермском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; (4): 11–5.
7. Фоменко Н.В., Романова Е.В., Караваева Ю.Ю., Панов В.В., Черноусова Н.Я., Ливанова Н.Н. Разнообразие *Borrelia burgdorferi sensu lato* в природных очагах Новосибирской области. *Бюллетень Сибирской медицины*. 2006; 5(S1): 93–8. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2006-5-S1-93-98>
8. Branda J.A., Steere A.C. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2021; 34(2): e00018-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00018-19>
9. Платонов А.Е., Шипулин Г.А., Платонова О.В. Мультилокусное секвенирование – новый метод генотипирования бактерий и первые результаты его применения. *Генетика*. 2000; 36(5): 597–605.

10. Radolf J., Samuels S. *Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes: Genomics, Molecular Biology, Host Interactions and Disease Pathogenesis*. Caister Academic Press Limited; 2021. <https://doi.org/10.21775/9781913652616>
11. Платонов А.Е., Миронов К.О., Яцышина С.Б., Королева И.С., Платонова О.В., Гуцин А.Е. и др. Характеристика московских штаммов *Haemophilus influenzae* типа b методом мультилокусного секвенирования-типирования. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2003; (2): 21–5.
12. Мухачева Т.А., Ковалев С.Ю. Мультилокусное сиквенс-типирование боррелий на территории России: промежуточные итоги и перспективы. *Национальные приоритеты России*. 2014; (3): 110–3.
13. Слукин П.В., Асташкин Е.И., Асланын Е.М., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д., Светоч Э.А. и др. Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(6): 671–84. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-134>
14. Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S.A., et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105(25): 8730–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800323105>
15. Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt. 4): 873–81. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64050-0>
16. Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Крупинская Е.С. Сравнительный анализ результатов исследования изолятов боррелий методами мультилокусного сиквенс-анализа (MLSA) и типирования (MLST). *Национальные приоритеты России*. 2021; (3): 141–5.
17. Нефедова В.В., Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Воробьева Н.Н., Фризен В.И. Изоляция возбудителя иксодового клещевого боррелиоза из крови больных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009; (1): 63–6.
18. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б. Генетические варианты *Borrelia garinii* — широко распространенного евразийского возбудителя заболеваний группы иксодовых клещевых боррелиозов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010; (3): 7–12.
19. Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б. Генетический анализ структуры некоторых генов домашнего хозяйства боррелий, вызывающих эритемную форму иксодового клещевого боррелиоза. В кн.: *Сборник материалов VII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания»*. Сочи; 2020: 49–50.
20. Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(7): 1545–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.022>
21. Casati S., Bernasconi M.V., Gern L., Piffaretti J.C. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 238(1): 115–23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09745.x>
22. Will G., Jauris-Heipke S., Schwab E., Busch U., Rossler D., Soutschek E., et al. Sequence analysis of *ospA* genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. *Med. Microbiol. Immunol.* 1995; 184(2): 73–80. <https://doi.org/10.1007/BF00221390>
23. Александров Г.О., Карпова М.Р., Потоцкая Ю.А., Бондаренко Е.И., Стронин О.В., Лукашова Л.В. Определение *Borrelia miyamotoi* — возбудителя клещевой возвратной лихорадки в клещах и крови пациента в Томской области. В кн.: *Молекулярная диагностика – 2017: сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. М.; 2017: 338–9.
24. Mantel N., Valand R.S. A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics*. 1970; 26(3): 547–58.

REFERENCES

1. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. *Infections with Natural Focality Transmitted by Ixodid Ticks [Prirodnoochagovye infektsii, peredayushchiesya iksodovymi kleshchami]*. Moscow: Kommentariy; 2013. (in Russian)
2. Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Rudakov N.V., Trankvilevskiy D.V., Savel'ev D.A., et al. Review of the epidemiological situation on ixodid tick-borne borreliosis in the Russian Federation in 2010–2020 and prognosis for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (2): 52–61. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-52-61> (in Russian)
3. Margos G., Castillo-Ramirez S., Cutler S., Dessau R.B., Eikeland R., Estrada-Peña A., et al. Rejection of the name *Borreliella* and all proposed species comb. nov. placed therein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020; 70(5): 3577–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004149>
4. Nefedova V.V., Korenberg E.I., Gorelova N.B. Multilocus sequence analysis of “atypical” *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Russia. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 32(4): 196–203. <https://doi.org/10.3103/S0891416817040073>
5. Golidonova K.A., Korenberg E.I., Gorelova N.B., Gintsburg A.L. Multilocus sequence analysis of isolates from patients with the erythemic form of ixodid tick-borne borreliosis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2021; 39(4): 14–20. <https://doi.org/10.3103/S089141682104008X> (in Russian)
6. Teterin V.Yu., Korenberg E.I., Nefedova V.V., Vorob'eva N.N., Frizen V.I., Pomelova V.G., et al. Clinical and laboratory diagnosis of infections transmitted by ixodes ticks in the Perm Krai. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2013; (4): 11–5. (in Russian)
7. Fomenko N.V., Romanova E.V., Karavaeva Yu. Yu., Panov V.V., Chernousova N.Ya., Livanova N.N. Diversity *Borrelia burgdorferi* sensu lato in natural foci of Novosibirsk region. *Byulleten' Sibirskoy meditsiny*. 2006; 5(S1): 93–8. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2006-5-S1-93-98> (in Russian)
8. Branda J.A., Steere A.C. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2021; 34(2): e00018-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00018-19>
9. Platonov A.E., Shipulin G.A., Platonova O.V. Multilocus sequencing — a new method of genotyping bacteria and first results of its use. *Genetika*. 2000; 36(5): 597–605. (in Russian)
10. Radolf J., Samuels S. *Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes: Genomics, Molecular Biology, Host Interactions and Disease Pathogenesis*. Caister Academic Press Limited; 2021. <https://doi.org/10.21775/9781913652616>
11. Platonov A.E., Mironov K.O., Yatsyshina S.B., Koroleva I.S., Platonova O.V., Gushchin A.E., et al. Multilocus sequence-typing for characterization of Moscow strains of *Haemophilus influenzae* type B. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2003; (2): 21–5. (in Russian)
12. Mukhacheva T.A., Kovalev S.Yu. Multilocus sequence typing of *Borrelia* species in Russia: interim results and perspectives. *Natsional'nye priority Rossii*. 2014; (3): 110–3. (in Russian)
13. Slukin P.V., Astashkin E.I., Aslanyan E.M., Ershova M.G., Poletaeva E.D., Svetoch E.A., et al. Characterization of virulent

- Escherichia coli* strains isolated from patients with urological infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021; 98(6): 671–84. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-134> (in Russian)
14. Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S.A., et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105(25): 8730–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800323105>
 15. Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt. 4): 873–81. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64050-0>
 16. Golidonova K.A., Korenberg E.I., Krupinskaya E.S. Comparative analysis of the results of studying *Borrelia* isolates by multilocus sequence analysis (MLSA) and typing (MLST). *Natsional'nye priority Rossii*. 2021; (3): 141–5. (in Russian)
 17. Nefedova V.V., Teterin V.Yu., Korenberg E.I., Gorelova N.B., Vorob'eva N.N., Frizen V.I. Isolation of tick-borne borreliosis agent from blood of patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2009; (1): 63–6. (in Russian)
 18. Nefedova V.V., Korenberg E.I., Gorelova N.B. Genetic variants of *Borrelia garinii*, a widespread Eurasian pathogen of ixodid tick borreliosis. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2010; 25(3): 95–100.
 19. Golidonova K.A., Korenberg E.I., Gorelova N.B. Genetic analysis of the structure of some genes of the household of borrelia causing the erythemic form of ixodic tick-borne borreliosis. In: *Collection of Materials of the VII All-Russian Interdisciplinary Scientific and Practical Conference with International Participation «Socially Significant and Especially Dangerous Infectious Diseases» [Sbornik materialov VII Vserossiyskoy mezhdistsiplinarnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Sotsial'no-znachimye i osobo opasnye infektsionnye zabolevaniya»]*. Sochi; 2020: 49–50. (in Russian)
 20. Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(7): 1545–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.022>
 21. Casati S., Bernasconi M.V., Gern L., Piffaretti J.C. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by recA gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 238(1): 115–23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09745.x>
 22. Will G., Jauris-Heipke S., Schwab E., Busch U., Rossler D., Soutschek E., et al. Sequence analysis of ospA genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. *Med. Microbiol. Immunol.* 1995; 184(2): 73–80. <https://doi.org/10.1007/BF00221390>
 23. Aleksandrov G.O., Karpova M.R., Pototskaya Yu.A., Bondarenko E.I., Stronin O.V., Lukashova L.V. Determination of *Borrelia miyamotoi* — the causative agent of tick-borne recurrent fever in ticks and blood of a patient in the Tomsk region. In: *Molecular Diagnostics – 2017: Proceedings of the IX All-Russian Scientific and Practical Conference with International participation [Molekulyarnaya diagnostika – 2017: sbornik trudov IKh Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]*. Moscow; 2017: 338–9. (in Russian)
 24. Mantel N., Valand R.S. A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics*. 1970; 26(3): 547–58.

Информация об авторах

Голидонова Кристина Андреевна[✉] — н.с. ФГБУ НИЦЭМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, kristi.dekor@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4832-6248>

Коренберг Эдуард Исаевич — д.б.н.; профессор, зав. лаб. переносчиков инфекций; ФГБУ НИЦЭМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4452-4231>

Гинцбург Александр Леонидович — д.б.н.; профессор, академик РАН; директор ФГБУ НИЦЭМ им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

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 21.06.2022;
принята к публикации 13.09.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Kristina A. Golidonova[✉] — researcher, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, kristi.dekor@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4832-6248>

Edward I. Korenberg — Cand. Sci. (Biol.), Professor, Head, Laboratory of Vectors of Infections, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4452-4231>

Alexander L. Gintsburg — Cand. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Director, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

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 21.06.2022;
accepted for publication 13.09.2022;
published 30.10.2022