

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-419>



Схема мультилокусного секвенирования-типирования для характеристики *Borrelia miyamotoi* — возбудителей безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза

Миронов К.О.[✉], Титков А.В., Кулешов К.В., Платонов А.Е.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. *Borrelia miyamotoi* — возбудитель безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ-БМ) — широко распространённого в России заболевания. В настоящее время не существует общепринятых методик для внутривидовой характеристики *B. miyamotoi*. Схема мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) боррелий изначально была разработана для *B. burgdorferi* и не обладает необходимой дискриминирующей способностью для мониторинга возбудителей ИКБ-БМ.

Цель работы — разработка и апробация схемы МЛСТ *B. miyamotoi*.

Материалы и методы. Выбор фрагментов для МЛСТ основан на полногеномных последовательностях 10 референсных штаммов (GenBank). Схему МЛСТ разработали в соответствии с принципами, опубликованными авторами метода. Для апробации схемы МЛСТ использовали 81 биологический образец, содержащий ДНК *B. miyamotoi*.

Результаты. После анализа геномных данных выбрали 8 фрагментов генов, для которых провели дизайн праймеров для ПЦР и секвенирования. Фрагменты генов представлены несколькими аллелями (от 4 до 7), которые образуют 15 сиквенс-типов, на основании анализа которых охарактеризовали генетическое разнообразие возбудителей, выделенных от больных ИКБ-БМ и от переносчиков.

Обсуждение. На основании количества несовпадений в аллельных профилях сиквенс-типы могут быть классифицированы на 4 группы. Первым двум соответствуют клональные комплексы, две другие образованы однократно выявленными сиквенс-типами. Первый клональный комплекс (I) объединяет 11 сиквенс-типов (80 или 88% охарактеризованных *B. miyamotoi*), второй (II) — 2 сиквенс-типа (9 или 9,8%). Выявленные генетические отличия *B. miyamotoi* связаны с источниками штаммов и биологических образцов. Предложенная на основании МЛСТ классификация подтверждает продемонстрированную ранее генетическую гетерогенность популяций *B. miyamotoi*, обусловленную экологически не связанными переносчиками возбудителей ИКБ-БМ.

Заключение. Предложенная схема МЛСТ является удобным инструментом для мониторинга возбудителей ИКБ-БМ, выделенных из разных источников, и для характеристики эволюционных изменений в определённых клональных комплексах.

Ключевые слова: *Borrelia miyamotoi*, иксодовые клещевые боррелиозы, клональный комплекс, мультилокусное секвенирование-типирование, сиквенс-тип

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 83 от 26.06.2018).

Благодарность. Авторы признательны всем исследователям, клиницистам и эпидемиологам, участвовавшим в сборе биологических образцов, использованных в настоящей работе, в первую очередь Н.М. Колясниковой, М.Г. Топорковой, Д.С. Сарксяну, С.Ю. Ковалеву, Е.И. Красновой, В.А. Пар, В.И. Черных, Н.С. Миноранской, А.П. Кулагинной, С.А. Рудаковой, Н.В. Рудакову, Е.И. Бондаренко, Т.А. Чекановой и М. Новаковой.

Источник финансирования. В 2018–2019 гг. исследование выполнялось за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00072П). В 2020–2023 гг. исследование выполнялось в рамках темы НИОКР государственного задания «Совершенствование системы эпидемиологического мониторинга в Российской Федерации за природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями бактериальной природы (клещевые возвратные лихорадки, риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки, коксиеллез, бартоонеллез)» (рег. № АААА-А21-121011890133-8).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. В работе использовали наборы реагентов и реактивы «АмплиСенс» производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Для цитирования: Миронов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В., Платонов А.Е. Схема мультилокусного секвенирования-типирования для характеристики *Borrelia miyamotoi* — возбудителей безэритемной формы иксодового клещевого боррелиоза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(1):80–88.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-419>

EDN: <https://www.elibrary.ru/wjphcn>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-419>

Multilocus sequence-typing scheme for *Borrelia miyamotoi* — the erythema-free ixodid tick-borne borreliosis pathogens

Konstantin O. Mironov[✉], Anton V. Titkov, Konstantin V. Kuleshov, Alexander E. Platonov

Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. *Borrelia miyamotoi* is a pathogen of erythema-free ixodid tick-borne borreliosis (ITBB), a disease widespread in Russia. To date, there are no generally accepted methods for *B. miyamotoi* genotyping. The multilocus sequencing typing (MLST) scheme of *Borrelia* was originally developed for *B. burgdorferi*, and does not have the required discrimination power for monitoring the ITBB pathogens.

The objective of this study is to develop the MLST scheme for *B. miyamotoi*.

Materials and Methods. The whole genome sequences of 10 reference strains (GenBank) were analyzed for the selection of the house-keeping loci. The MLST scheme development was based on principles published by the authors of the method. For this experiment, 81 *B. miyamotoi* strains and positive clinical samples were used to test the MLST scheme.

Results. After analyzing the genomic data, 8 house-keeping loci were chosen for MLST, for which the PCR and sequencing primers were designed. Each MLST loci was represented by several alleles (from 4 to 7) which form 15 sequence types. The genetic diversity of pathogens isolated from ITBB patients and ticks were characterized.

Discussion. Based on pairwise distances between allelic profiles, the sequence types can be classified into four groups. The first two groups are clonal complexes; the other two groups are formed by once identified sequence types. The first clonal complex unites 11 sequence types (80 or 88% of the characterized *B. miyamotoi*), the second consists of 2 sequence types (9 or 9.8%). The genetic differences between *B. miyamotoi* are associated with the sources of strains and biological isolates. The MLST based classification confirms the previously described genetic heterogeneity of *B. miyamotoi* populations associated with ecologically unrelated vectors of ITBB pathogens.

Conclusion. The proposed MLST scheme is an appropriate tool for ITBB pathogen classification and evolutionary change characterization within clonal complexes.

Keywords: *Ixodes tick-borne borreliosis*, *Borrelia miyamotoi*, clonal complex, multilocus sequence typing, sequence type

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 No. 83, 26.06.2018).

Acknowledgements. Our gratitude extends to all researchers, clinicians and epidemiologists who participated in the collection of biological samples used in this study, primarily to N.M. Kolyasnikova, M.G. Toporkova, D.S. Sarksyian, S.Yu. Kovalev, E.I. Krasnova, V.A. Rahr, V.I. Chernykh, N.S. Minoranskaya, A.P. Kulagina, S.A. Rudakova, N.V. Rudakov, E.I. Bondarenko, T.A. Chekanova and M. Novakova.

Funding source. In 2018–2019 the study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 15-15-00072П). In 2020–2023 the research was supported by the state assignment topic «Improvement of the epidemiological monitoring system in the Russian Federation for natural focal vector-borne infections of bacterial nature» (Reg. No.: AAAA-A21-121011890133-8).

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» kit were produced at the Central Research Institute for Epidemiology.

For citation: Mironov K.O., Titkov A.V., Kuleshov K.V., Platonov A.E. Multilocus sequencing-typing scheme for characterization of *Borrelia miyamotoi* — the erythema-free ixodid tick-borreliosis pathogens. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(1):80–88.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-419>

EDN: <https://www.elibrary.ru/wjphcn>

Введение

Borrelia miyamotoi — возбудитель безэри-темной формы иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ-БМ), принадлежащий к группе возбудителей возвратных лихорадок, но передающийся клещами рода *Ixodes*. История открытия, таксономия, биологические свойства возбудителей, аспекты патогенеза, клиники и эпидемиологии ИКБ-БМ опубликованы в монографии А.Е. Платонова в 2017 г. [1]. Актуальным направлением исследований *B. miyamotoi* является разработка способов внутривидовой классификации возбудителей. Это обусловлено как необходимостью изучения клинических особенностей ИКБ-БМ, вызванных различными генетическими вариантами возбудителя, в том числе связанными с феноменом «иммунного избегания» [1], так и необходимостью решения классических эпидемиологических задач, направленных на мониторинг возбудителей. В связи с сильно ограниченным использованием массового параллельного секвенирования, которое связано в первую очередь со сложностью культивирования *B. miyamotoi*, а также с низкой концентрацией возбудителей в образцах биологического материала, возникает необходимость в разработке доступных, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) и фрагментном секвенировании методик антигенной и генетической характеристики возбудителей ИКБ-БМ.

Для характеристики антигенного разнообразия *B. miyamotoi* нами предложена методика определения основных поверхностных белков [2, 3], которая позволяет проводить одновременную детекцию нескольких антигенных вариантов и определять наиболее клинически и эпидемиологически значимые варианты возбудителей ИКБ-БМ, циркулирующие на территории России. В то же время определение антигенов не может быть использовано для изучения эволюционных процессов, происходящих в бактериальной популяции, для выявления возбудителей с повышенными вирулентными или патогенными свойствами.

Предложенная ранее отечественными исследователями трёхлокусная схема типирования на основании секвенирования фрагментов генов *rbb*, *glpQ* и *I6S* [4] может быть использована для характеристики представителей рода *Borrelia*, однако данная схема не обладает необходимой дискриминирующей способностью для *B. miyamotoi*.

Удобным инструментом изучения генетических свойств возбудителей, не находящихся под давлением иммунной системы, позволяющим идентифицировать отдельные штаммы и проводить характеристику их генетических взаимоотношений, является метод мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ), успешно применяющийся в эпидемиологической практике с 1998 г. [5, 6]. Помимо неоднократно продемонстрированных ранее

преимуществ использования нескольких генетических локусов в анализе генетических взаимоотношений патогенов, важным преимуществом МЛСТ является абсолютная межлабораторная воспроизводимость результатов, что позволяет объединять генетическую и эпидемиологическую информацию в единой базе данных [7]. В настоящее время Интернет-ресурс PubMLST содержит информацию о схемах МЛСТ для более чем 130 видов микроорганизмов; для многих видов опубликованные схемы МЛСТ являются «золотым стандартом» их внутривидовой характеристики. В то же время разработанная схема МЛСТ для бактерий рода *Borrelia* и её модификации¹ не обладают достаточной дискриминирующей способностью, необходимой для дифференциации *B. miyamotoi*. Это связано с тем, что схема МЛСТ изначально была разработана для *B. burgdorferi* [8], что не позволяет использовать её для мониторинга российских возбудителей ИКБ-БМ. Поскольку геном *B. miyamotoi* имеет значительные отличия от бактерий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*, возникает необходимость в проведении дополнительного анализа имеющихся полногеномных последовательностей с целью создания и апробации методики МЛСТ *B. miyamotoi*.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности

При выборе последовательностей для проведения МЛСТ использовали полногеномные последовательности 6 российских штаммов — Izh-4 (идентификационный номер в GenBank CP024390.2, номер в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболеск» В-8324), Izh-5 (CP024205.2, В-8325), Izh-14 (CP024371.2, В-8326), Izh-16 (CP024351.2, В-8327), Yekat-1 (CP024333.2, В-8328), Yekat-6 (CP024316.2, В-8329) [1, 9] и 4 зарубежных штаммов — FR64b (CP004217.2), HT-31 (CP114703.1), LB-2001 (CP114690.1) и CA17-2241 (CP021872.1) [1, 10, 11], известных на момент начала исследования.

Штаммы и образцы биологического материала

При разработке схему МЛСТ апробировали на 7 штаммах: NL-IR-1 (CP044783.1), Yekat-18 (CP037471.1, В-8810), Yekat-76 (CP037058.1, В-8814), Yekat-19 (CP036557.1, В-8811), Yekat-17 (CP037215.2, В-8330), Yekat-21 (CP036914.2, В-8812), Yekat-31 (CP036726.1, В-8813) и 81 образцах ДНК *B. miyamotoi*, выделенных в 2012–2022 гг. из 50 клещевых суспензий и крови 31 больного ИКБ-БМ. Клещевые суспензии получили из клещей-переносчиков рода *Ixodes*, собранных в странах Западной Европы и европейских регионах Рос-

¹ URL: <https://pubmlst.org/organisms/borrelia-spp>

сии (*I. ricinus*), а также центральных и восточных регионах России (*I. persulcatus*). Большую часть биологических образцов получили и охарактеризовали при разработке методики для определения антигенных свойств основных поверхностных белков *B. miyamotoi* [2]. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим ко-

митетом ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол № 83 от 26.06.2018).

Дополнительно провели исследование 9 штаммов, полногеномные последовательности которых были использованы для выбора МЛСТ-локусов. Характеристика 10 референсных штаммов и 81 образца биологического материала приведена в **табл. 1**.

Таблица 1. Источники ДНК *B. miyamotoi* и их генетическая характеристика (сиквенс-тип и клональный комплекс)
Table 1. The *B. miyamotoi* DNA samples sources and their genetic characteristics (sequence types and clonal complex)

Источник ДНК DNA source	Сиквенс-тип Sequence type	Клональный комплекс Clonal complex	Территория Territory	Годы Years	Количество образцов Number of samples
Кровь больных ИКБ-БМ (<i>n</i> = 37) Blood of patients with ixodid tick-borne borreliosis caused by <i>B. miyamotoi</i> (<i>n</i> = 37)	ST-1*	I	Свердловская область Sverdlovsk Region	2016–2018	19
			Удмуртская Республика Udmurt Republic	2016	1
	ST-2*	I	Свердловская область Sverdlovsk Region	2017	2
			Удмуртская Республика Udmurt Republic	2016	1
	ST-3	I	Удмуртская Республика Udmurt Republic	2016	1
	ST-4	I	Свердловская область Sverdlovsk Region	2016	1
	ST-5*	I	Удмуртская Республика Udmurt Republic	2016	1
	ST-12*	I	Свердловская область Sverdlovsk Region	2017	1
			Красноярский край Krasnoyarsk Territory	2017	1
	ST-13	I	Свердловская область Sverdlovsk region	2017	1
ST-14*	I	Новосибирская область Novosibirsk Region	2012	1	
		Хабаровский край Khabarovsk Territory	2012	2	
		Свердловская область Sverdlovsk Region	2017	2	
		Красноярский край Krasnoyarsk Territory	2017, 2019	3	
Суспензии клещей рода <i>Ixodes</i> (<i>n</i> = 54) Suspensions of ticks of <i>Ixodes</i> genus (<i>n</i> = 54)	ST-1*	I	Новосибирская область Novosibirsk Region	2014, 2017	4
			Свердловская область Sverdlovsk Region	2013–2014	3
			Самарская область Samara Region	2019	1
			Омская область Omsk Region	2022	5
			Республика Алтай Altai Republic	2016	1
	ST-2*	I	Самарская область Samara Region	2019	1
			Омская область Omsk Region	2022	1
	ST-5*	I	Омская область Omsk Region	2022	1
	ST-6	I	Япония Japan	1992	1
	ST-7	I	Япония Japan	1990	1
	ST-8	–	Коннектикут, США Connecticut, USA	2001	1
	ST-9	–	Калифорния, США California, USA	2015	1
	ST-10	II	Нидерланды Netherlands	2018	1
			Чехия Czech Republic	2019	6
			Кабардино-Балкарская Республика Kabardino-Balkarian Republic	2021	1
ST-11	II	Кабардино-Балкарская Республика Kabardino-Balkarian Republic	2021	1	
ST-12*	I	Новосибирская область Novosibirsk Region	2017	4	
		Омская область Omsk Region	2022	3	
ST-14*	I	Республика Алтай Altai Republic	2016	6	
		Амурская область Amur Region	2016	1	
		Новосибирская область Novosibirsk Region	2017	9	
		Омская область Omsk Region	2022	1	
ST-15	I	Томская область Tomsk Region	2014	1	

Примечание. *ST найдены как в образцах от пациентов, так и в клещах.

Note. *Sequence types found both in patient samples and ticks.

ПЦР и секвенирование

Выделение ДНК, постановку ПЦР проводили с использованием реагентов производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Амплификацию и секвенирование фрагментов генов выполняли с праймерами (табл. 2) по программе: 95°C — 15 мин (1 цикл), 95°C — 10 с, 60°C — 20 с, 72°C — 20 с (40 циклов). Методики постановки ПЦР и секвенирования, проведённого с помощью оборудования и реагентов компании «Applied Biosystems», были аналогичны методикам, использованным ранее [2, 12].

Анализ данных МЛСТ

Обработку результатов секвенирования с обозначением аллелей и сиквенса-типов (sequence type, ST) проводили в соответствии с требованиями разработчиков метода [5–7]. Анализ ST с использованием алгоритмов BURST и UPGMA, а также построение генетического дерева выполнены с помощью программы «START2 v. 1.0.5» [13].

Результаты

В соответствии с принципами МЛСТ выбор фрагментов ДНК для обозначения аллелей

(МЛСТ-локусов) был подчинён следующим условиям: фрагменты должны находиться в несцепленных генах, расположенных на хромосоме, и должны быть представлены несколькими аллелями, при этом комбинации аллелей должны обеспечивать возможность проведения внутривидовой классификации возбудителей [5, 6]. Анализ полногеномных последовательностей 6 штаммов позволил выделить несколько десятков групп несцепленных генетических локусов, из которых последовательно были выбраны 8 (табл. 2), позволяющие дифференцировать эпидемиологически не связанные, т.е. выделенные в разное время, на разных территориях и от разных источников штаммы. В табл. 3 представлены предложенные нами обозначения аллелей и аллельные профили, которые определяют ST штаммов и ДНК *B. Miyamotoi* в биологических образцах. Для обозначения аллелей приведены координаты МЛСТ-локусов в полногеномных нуклеотидных последовательностях референсных штаммов, за исключением аллелей *nusB-6* и *lysM-7*, для которых приведены идентификационные номера в базе данных GenBank. Отличия в МЛСТ-локусах представлены однонуклеотидными заменами, за исключением фрагмента *nusB*, для которого выявили 2 ал-

Таблица 2. Фрагменты генов для МЛСТ и праймеры для ПЦР и секвенирования

Table 2. Fragments of genes for MLST, PCR and sequencing primers

Фрагмент гена Fragment name	Белок Protein*	5'–3' последовательности праймеров 5'-3' primer sequences	Длина ПЦР-продукта, п.о. The length of the PCR products, bp	Длина МЛСТ-локуса**, п.о. The length of the MLST loci, bp
<i>acpS</i>	АЦП-синтаза holo-ACP synthase	gACgAAATCAATAgATgTgATATAATAAAgT CTATTACAAATgCAATAgAgTACTCCCTTTCA	365	192
<i>nusB</i>	Фактор антитерминации транскрипции Transcription antitermination factor NusB	ggATTTAAgACATAAggCTAgAgTTTTAgCTTTTC gAgCTCTCCATATTTTTTAACAAAgCATCAAg	417	380
<i>motB</i>	Моторный белок Flagellar motor protein MotB	CCTgAATATATgTTgACATATggAgACATggTT CCTgCAAATCCAgATACCTCAAATTTACTC	623	413
<i>dnaX</i>	ДНК-полимераза III DNA polymerase III subunit gamma/tau	CTgCTATTAAGAAgCgTCCCAgAgAT CTgATCAAAAAGAgTATAAgCATCCCTTACAC	653	560
<i>rplP</i>	50S-рибосомальный белок 50S ribosomal protein L16	gTATAgAAAgAAgCAAAGAggAAgACTgTCA CACCTCAAATCTCgCCTTATCACAAATATAg	393	269
<i>cdd</i>	Цитидиндезаминаза Cytidine deaminase	GAAGCTGCAAGAAATAATGCATATTCACCAT GCTGCATAATCCTATTATTTGTAAGATAGC	620	233
<i>lysM</i>	Пептидогликансвязывающий домен LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	gACTTgATCCTggTgCTATTgTTAAAgCTAg CCCgATCTCTAAgCTTAAGAgATCTAATTgC	624	522
<i>miaA</i>	Изопентилпирофосфат-трансфераза tRNA (adenosine(37)-N6)-dimethylallyltransferase MiaA	TCCTACgggTgTAAGTAAAgTgACATT CCTCTTCAAAGCAATCCACAATCAATC	626	555

Примечание. *Приведено обозначение продукта гена из базы данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). **Нуклеотидные позиции фрагментов МЛСТ-локусов референсных штаммов указаны в табл. 3.

Note. *The designation of the protein from NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). **The nucleotide positions of MLST loci in the reference strains were presented in the Table 3.

Таблица 3. Обозначения аллелей и ST
Table 3. Designations of alleles and sequence types

Источник ДНК DNA source	Фрагменты (длина, п.о.)*** Fragments (length, bp)***								ST Sequence type	
	<i>acpS</i> (192)	<i>nusB</i> (380, 386)	<i>motB</i> (413)	<i>dnaX</i> (560)	<i>rplP</i> (269)	<i>cdd</i> (233)	<i>lysM</i> (522)	<i>miaA</i> (555)		
Штаммы** Strains**	Yekat-1*	1 896361– 896170	1 800974– 801353	1 613232– 613644	1 423437– 423996	1 404829– 405097	1 265228– 265460	1 253627– 254148	1 37083– 37637	ST-1
	Izh-14	1	1	1	1	2 404724– 404992	1	1	1	ST-2
	Izh-4	1	1	1	1	1	1	2 253612– 254133	2 37068– 37622	ST-3
	Yekat-6	1	2 800953– 801332	2 613211– 613623	1	1	1	1	1	ST-4
	Izh-5	2 896194– 896385	1	1	2 423437– 423996	1	2 265228– 265460	1	1	ST-5
	FR64b	2	1	1	2	1	1	3 650921– 651442	1	ST-6
	HT31	2	1	1	2	1	1	1	3 37098– 37652	ST-7
	LB-2001	3 897013– 897204	3 801812– 802191	3 613265– 613677	3 423552– 424111	3 404960– 405228	3 265566– 265798	4 253956– 254477	4 37153– 37707	ST-8
	CA17-2241	5 10054– 10245	5 105075– 105454	5 292933– 293345	6 482530– 483089	5 501393– 501661	5 640132– 640364	6 651447– 651968	6 868175– 868729	ST-9
	NL-IR-1	4 893710– 893901	4 798494– 798879	4 611883– 612295	4 422636– 423195	4 404082– 404350	4 265475– 265707	5 253875– 254396	5 37104– 37658	ST-10
Образцы ДНК DNA samples	136_KBR21	4	6	4	4	4	4	5	5	ST-11
	Bal_Y17	2	1	1	1	1	1	1	1	ST-12
	Sha_Y17	1	1	1	1	1	1	1	2	ST-13
	4426_Y17	2	1	1	2	1	1	1	1	ST-14
	2154_T14	2	1	1	1	1	1	7	1	ST-15

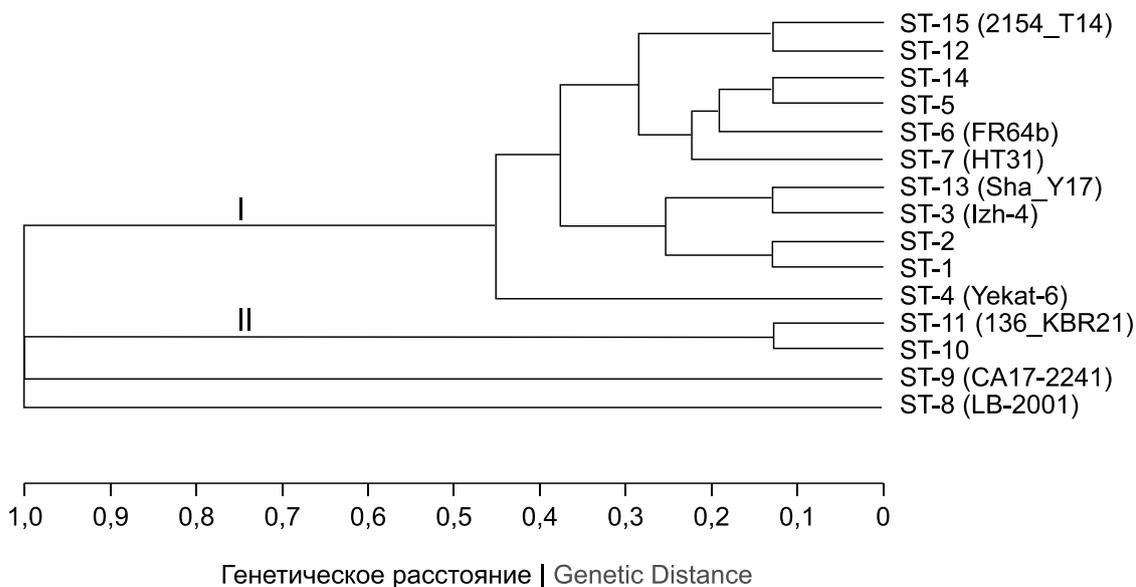
Примечание. *Штамм Izh-16 отнесен к ST-1. **Аллели и ST первых 9 штаммов обозначены на основании анализа полногеномных последовательностей при выборе МЛСТ-локусов, аллельные профили штамма NL-IR-1 и образцов ДНК получены при апробации схемы МЛСТ. ***Для уникальных аллелей обозначены нуклеотидные позиции МЛСТ-локусов относительно референсных последовательностей штаммов, указанных в разделе «Материалы и методы». Аллели *nusB-6* и *lysM-7* имеют идентификационные номера в базе данных GenBank OR192576 и OR134830 соответственно.

Note. *The Izh-16 strain is assigned to ST-1. **Alleles and sequence types of the first nine strains were designated based on the whole genome sequences, allelic profiles of the NL-IR-1 strain and isolates were obtained by testing the MLST scheme. ***For the unique alleles the nucleotide positions of MLST loci in the reference strains sequences described in Material and Methods section are indicated. The alleles *nusB-6* and *lysM-7* have identification numbers in the GenBank database OR192576 and OR134830, respectively.

лея (*nusB-4* и *nusB-6* в аллельных профилях ST-10 и ST-11), содержащие инсерцию 6 нуклеотидов.

При разработке схемы МЛСТ *in silico* были найдены 9 ST у 10 штаммов. Для 9 штаммов провели секвенирование фрагментов генов, вошедших в схему МЛСТ, при этом дискордантных результатов при сравнении с данными полногеномного секвенирования, представленными в GenBank, не выявлено. При последующем анализе нуклеотидных

последовательностей образцов ДНК найдены ещё 6 ST, из которых 2 образованы двумя новыми аллелями и 4 — новыми сочетаниями ранее выявленных аллелей. Наиболее часто в изученной выборке встречались ST-1 (33; 36%) и ST-14 (25; 27,4%), реже — ST-12 (9; 10%), ST-10 (8; 9%), ST-2 (5; 5,5%) и ST-5 (2; 2,2%). ST-3, ST-4, ST-6, ST-7, ST-8, ST-9, ST-11, ST-13 и ST-15 встречались однократно (по 1,1%).



Генетические взаимоотношения ST, найденные внутри вида *B. miyamotoi*, определённые на основании количества несовпадений в аллельных профилях (алгоритм UPGMA).

В скобках приведено обозначение источников ДНК для ST, найденных однократно. Римская цифра — обозначение клональных комплексов.

Genetic relationships of sequence types within the *B. miyamotoi* species based on allelic profiles differences (the UPGMA algorithm).

The number in parentheses is the strain or isolates name for the sequence types found once. The Roman numeral is the designation of clonal complexes.

На рисунке представлена дендрограмма, иллюстрирующая генетические взаимоотношения ST. Дендрограмма и результаты, представленные в табл. 1, объединяют данные о 91 представителе вида *B. miyamotoi* из разных источников.

Обсуждение

Представленные на рисунке генетические взаимоотношения *B. miyamotoi*, определённые на основании анализа количества несовпадений в аллельных профилях, позволяют классифицировать обозначенные ST на 4 группы. Первым 2 группам соответствуют клональные комплексы, обозначенные на рисунке как I и II, 2 другие группы образуют ST-8 и ST-9, которые имеют отличия по всем 8 локусам друг от друга и от остальных ST.

Первый клональный комплекс (I) объединяет 11 ST, которым соответствуют 80 (88%) охарактеризованных штаммов и образцов ДНК. ST-14 может быть обозначен как центральный, поскольку соответствующий ему аллельный профиль имеет максимальное количество несовпадений по 1 МЛСТ-локусу от аллельных профилей других ST этого клонального комплекса, равное 4. Второй клональный комплекс (II) образован ST-10 и ST-11, найденными у 8 (8,7%) образцов ДНК и 1 (1,1%) штамма. Аллельные профили ST-10 и ST-11 имеют несовпадения по 1 МЛСТ-локусу и отличаются от аллельных профилей ST I клонального комплекса по всем 8 МЛСТ-локусам.

В табл. 1 представлены ST и характеристика источников ДНК *B. miyamotoi*. Большинство охарактеризованных образцов ДНК имеют ST, найденные как в выборках образцов от пациентов ИКБ-БМ, так и в суспензиях клещей. Однократно найденные у возбудителей ИКБ-БМ ST-3, ST-4 и ST-13 и обнаруженные в суспензиях клещей ST-6, ST-7, ST-11 и ST-15 не позволяют делать вывод об особенностях генотипов, ассоциированных со случаями заболевания ИКБ-БМ. Предположительно все представители I клонального комплекса, найденные в переносчиках, могут вызывать ИКБ-БМ.

Выраженные генетические отличия охарактеризованных *B. miyamotoi* связаны с источниками ДНК *B. miyamotoi*. Все входящие в I клональный комплекс возбудители выделены из суспензий клещей вида *I. persulcatus*, полученных на территории России. Также в I клональный комплекс входят штаммы FR64b и HT31, выделенные на территории Японии из того же вида переносчиков. Входящие во II клональный комплекс ST были найдены в суспензиях клещей вида *I. ricinus*, полученных из европейских стран и в Кабардино-Балкарской Республике. *B. miyamotoi* ST-8 и ST-9 выделены из клещей видов *I. scapularis* и *I. pacificus* соответственно, распространенных в Северной Америке.

Таким образом, предложенная на основании МЛСТ классификация подтверждает продемонстрированную ранее генетическую гетерогенность популяций *B. miyamotoi*, соответствующих ази-

атскому (клональный комплекс I), европейскому (клональный комплекс II) и американскому (ST, не входящие в клональные комплексы I и II) генотипам [1, 14, 15], циркулирующим на разных континентах, что связано с экологически не связанными переносчиками возбудителей.

Заключение

В данном исследовании на основании имеющихся полногеномных данных разработана схема МЛСТ, позволяющая дифференцировать возбудителей ИКБ-БМ, собранных на разных территориях. На примере распределения ST I клонального комплекса можно сделать вывод о наиболее распространённых вариантах *B. miyamotoi*, циркулирующих на территории России и некоторых зарубежных стран. Данный подход может стать удобным инструментом для мониторинга возбудителей ИКБ-БМ и характеристики эволюционных изменений в описанных клональных комплексах. Применение МЛСТ предполагает исследование образцов биологического материала после качественного обнаружения ДНК *B. miyamotoi* или получения культуры возбудителя. В связи со сложностью культивирования *B. miyamotoi* основная масса возбудителей ИКБ-БМ может быть охарактеризована с использованием МЛСТ и только незначительная часть — с использованием полногеномного секвенирования, которое на современном этапе необходимо для исчерпывающего анализа эволюционных изменений, происходящих в бактериальных популяциях.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на расширение выборки охарактеризованных изолятов, в том числе валидацию разработанной схемы МЛСТ *in silico* с использованием информации о нуклеотидных последовательностях, опубликованных в GenBank, а также на поиск возможных связей описанных ST и антигенных вариантов *B. miyamotoi*, определяемых на основе данных типирования основных поверхностных белков [2]. После расширенной апробации предлагаемой схемы МЛСТ может быть рассмотрена возможность объединения всех полученных данных в общую базу данных, аналогично существующим стандартам для внутривидовой характеристики других патогенов [7].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Платонов А.Е. «Новая» инфекция, вызываемая *Borrelia miyamotoi*: микробиология, эпидемиология, диагностика, клиника и патогенез. М.;2017. Platonov A.E. A «New» Infection Caused by *Borrelia miyamotoi*: Microbiology, Epidemiology, Diagnostics, Clinic and Pathogenesis. Moscow;2017. EDN: <https://elibrary.ru/yabrqr>
2. Миронов К.О., Титков А.В., Кулешов К.В. и др. Разработка и практическое применение методики для идентификации поверхностных антигенов *Borrelia miyamotoi*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021;98(3):339–50. Mironov K.O., Titkov A.V., Kuleshov K.V., et al. Development

- and application of the technique for identification of *Borrelia miyamotoi* surface antigens. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(3):339–50. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-142> EDN: <https://elibrary.ru/kmeswh>
3. Миронов К.О., Титков А.В., Платонов А.Е. Комплекс молекулярно-биологических методик для внутривидовой характеристики бактерий вида *Borrelia miyamotoi*. Национальные приоритеты России. 2021;42(3):208–11. Mironov K.O., Titkov A.V., Platonov A.E. Complex of molecular biological techniques for *Borrelia miyamotoi* typing. *National Priorities of Russia*. 2021;42(3):208–11. EDN: <https://elibrary.ru/kmeswh>
 4. Фоменко Н.В., Боргояков В.Ю., Панов В.В. Генетические особенности ДНК боррелий вида *Borrelia miyamotoi*, выявляемых в таежных клещах. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011;(2):12–7. Fomenko N.V., Borgoyakov V.Yu., Panov V.V. Genetic features of DNA of *Borrelia miyamotoi* transmitted by *Ixodes persulcatus*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2011;(2):12–7. EDN: <https://elibrary.ru/nwewlr>
 5. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998;95(6):3140–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
 6. 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. Platonov A.E., Shipulin G.A., Platonova O.V. Multilocus sequence typing: a new method and the first results in the genotyping of bacteria. *Genetika*. 2000;36(5):597–605. EDN: <https://elibrary.ru/mpfxxb>
 7. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018;3:124. DOI: <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
 8. Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., 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. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0800323105>
 9. Kuleshov K.V., Koetsveld J., Goptar I.A., et al. Whole-genome sequencing of six *Borrelia miyamotoi* clinical strains isolated in Russia. *Genome Announc*. 2018;6(1):e01424-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01424-17>
 10. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., 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. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-804>
 11. Kingry L.C., Replogle A., Dolan M., et al. Chromosome and large linear plasmid sequences of a *Borrelia miyamotoi* strain isolated from *Ixodes pacificus* ticks from California. *Genome Announc*. 2017;5(37):e00960-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00960-17>
 12. Миронов К.О., Платонов А.Е., Королева И.С., Шипулин Г.А. Анализ московской популяции штаммов *Neisseria meningitidis* методом мультилокусного секвенирования-типирования. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006;93(2):31–6. Mironov K.O., Platonov A.E., Koroleva I.S., Shipulin G.A. Analysis of the Moscow population of *Neisseria meningitidis* strains by the method of multilocus sequencing-typing. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2006;93(2):31–6. EDN: <https://elibrary.ru/htqatx>
 13. Jolley K.A., Feil E.J., Chan M.S., Maiden M.C. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics*. 2001;17(12):1230–1. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.12.1230>

14. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011;17(10):1816–23. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1710.101474> EDN: <https://elibrary.ru/pbdedx>
15. Crowder C.D., Carolan H.E., Rounds M.A., et al. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes* ticks in Europe and the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(10):1678–82. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2010.131583>

Информация об авторах

Миронов Константин Олегович[✉] — д.м.н., зав. лаб. молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, mironov@pcr.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Титков Антон Владимирович — н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-9267>

Кулешов Константин Валерьевич — к.б.н., зав. лаб. молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5238-7900>

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

Участие авторов: *Миронов К.О.* — создание лабораторной методики для схемы МЛСТ, дизайн экспериментов и анализ данных, написание текста; *Титков А.В.* — сбор биологического материала, постановка экспериментов, анализ данных, редактирование текста; *Кулешов К.В.* — анализ результатов секвенирования, выбор фрагментов для МЛСТ; *Платонов А.Е.* — разработка схемы МЛСТ, концепция и дизайн исследования. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 15.11.2023;
принята к публикации 28.12.2023;
опубликована 28.02.2024

Information about the authors

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

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

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

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

Author contribution: *Mironov K.O.* — laboratory methods and experiments design for MLST, data analysis, writing the text; *Titkov A.V.* — collection and processing of samples, experiments performing, data analysis, editing; *Kuleshov K.V.* — sequences analysis and MLST loci selection; *Platonov A.E.* — MLST scheme development, concept and design of the study. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, 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 15.11.2023;
accepted for publication 28.12.2023;
published 28.02.2024