



Опыт применения метода метагеномного секвенирования по фрагментам гена *16S rPHK* для детекции и идентификации возбудителей природно-очаговых инфекций

Васильева О.В.¹, Ульшина Д.В.^{1*}, Волынкина А.С.¹, Писаренко С.В.¹,
Сирица Ю.В.¹, Гнусарева О.А.¹, Яценко Н.А.², Куличенко А.Н.¹

¹Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

²Краевая специализированная клиническая инфекционная больница, Ставрополь, Россия

Аннотация

Введение. Метагеномное секвенирование — один из наиболее перспективных методов как для детекции и идентификации возбудителей природно-очаговых инфекций (ПОИ), так и для определения видовой структуры различных бактериальных сообществ.

Цель работы — выполнить детекцию и идентификацию возбудителей ПОИ в образцах полевого и клинического материала методом метагеномного секвенирования фрагментов гена *16S rPHK*, проанализировать таксономический состав эндосимбиотических микроорганизмов в образцах.

Материалы и методы. Исследованы образцы полевого (14 проб) и клинического (2 пробы) материала с различной нагрузкой ДНК возбудителей ПОИ, определённой методом полимеразной цепной реакции (*Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*). Амплификацию фрагментов гена, кодирующего *16S rPHK*, осуществляли с помощью праймеров, фланкирующих переменные участки гена.

Результаты. В 14 из 16 исследуемых образцов детектированы целевые возбудители ПОИ. До вида идентифицированы *R. aeschlimannii* (в 57,1% положительных образцов), *B. valaisiana* (в 16,6%), *F. tularensis* (в 75%), *C. burnetii* (в 100%), также в одном образце выявлены боррелии — возбудители возвратных лихорадок (*B. turcica*, *B. hispanica*). Исследована таксономическая структура микробиома клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus annulatus*, *Hyalomma aegyptium*, *Dermaceptor marginatus*, собранных в южных регионах России. Выявлено, что преобладающие микроорганизмы — это представители родов *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Pedobacter*, *Bradyrhizobium*, *Shingomonas*. В пулах иксодовых клещей обнаружены ДНК-маркеры микроорганизмов — эндосимбионтов клещей *Candidatus Midichloria mitochondrii*, представителей родов *Rickettsiella*, *Coxiella*, непатогенных и условно-патогенных для человека видов родов *Francisella*.

Заключение. Показана эффективность метода метагеномного секвенирования фрагментов гена *16S rPHK* для детекции и идентификации возбудителей ПОИ в пробах клинического и полевого материала. Метагеномное секвенирование по участкам гена *16S rPHK* может быть рекомендовано в качестве дополнительного метода лабораторного исследования образцов с целью детекции и идентификации возбудителей ПОИ.

Ключевые слова: метагеномное секвенирование, *16S rPHK*, природно-очаговые инфекции, детекция, идентификация, микробиом

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Ставропольского государственного медицинского университета (заключение № 112 19.05.2023).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Для цитирования: Васильева О.В., Ульшина Д.В., Волынкина А.С., Писаренко С.В., Сирица Ю.В., Гнусарева О.А., Яценко Н.А., Куличенко А.Н. Опыт применения метода метагеномного секвенирования по фрагментам гена *16S rPHK* для детекции и идентификации возбудителей природно-очаговых инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(2):201–212.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-629>

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

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-629>

Experience of applying the metagenomic sequencing method on fragments of the 16S rRNA gene for the detection and identification of natural focal infection pathogens

Oksana V. Vasilieva¹, Diana V. Ul'shina^{1✉}, Anna S. Volynkina¹, Sergey V. Pisarenko¹, Yulia V. Siritsa¹, Olga A. Gnusareva¹, Natalia A. Yatsenko², Alexandr N. Kulichenko¹

¹Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia;

²Regional Specialized Clinical Infectious Diseases Hospital, Stavropol, Russia

Abstract

Introduction. Metagenomic sequencing is one of the most promising methods for both the detection and identification of natural focal infection (NFI) pathogens and for determining the species composition of various bacterial communities.

The aim is to detect and identify the NFI pathogens in samples of field and clinical material using metagenomic sequencing of 16S rRNA gene fragments, and to analyze the taxonomic composition of endosymbiotic microorganisms in the samples.

Materials and methods. Samples of field (14 samples) and clinical (2 samples) material with varying loads of DNA from NFI pathogens, determined by PCR (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*), were investigated. Amplification of fragments of the gene encoding 16S rRNA was performed using primers flanking the variable regions of the gene.

Results. In 14 out of 16 studied samples, target NFI pathogens were detected. The species identified included *R. aeschlimannii* (in 57.1% of positive samples), *B. valaisiana* (in 16.6%), *F. tularensis* (in 75%), *C. burnetii* (in 100%), and borreliae — pathogens of relapsing fevers (*B. turcica*, *B. hispanica*) were also found in one sample. The taxonomic structure of the microbiome of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus annulatus*, *Hyalomma aegyptium*, *Dermacentor marginatus* ticks collected in the southern regions of the Russian Federation was studied. It was shown that the predominant microorganisms are representatives of the genera *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Pedobacter*, *Bradyrhizobium*, *Shingomonas*. DNA markers of microorganisms — endosymbionts of ticks *Candidatus Midichloria mitochondrii*, representatives of the genera *Rickettsiella*, *Coxiella*, non-pathogenic and conditionally pathogenic species of the genus *Francisella* were found in pools of *Ixodes* ticks.

Conclusion. The effectiveness of the method of metagenomic sequencing of fragments of the 16S rRNA gene for the detection and identification of NFI pathogens in samples of clinical and field material was demonstrated. Metagenomic sequencing of 16S rRNA gene regions can be recommended as an additional laboratory method for detecting and identifying NFI pathogens.

Keywords: metagenomic sequencing, 16S rRNA, natural focal infections, detection, identification, microbiome.

Ethical approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Stavropol State Medical University (protocol No. 112, May 5, 2023).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

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

For citation: Vasilieva O.V., Ul'shina D.V., Volynkina A.S., Pisarenko S.V., Siritsa Yu.V., Gnusareva O.A., Yatsenko N.A., Kulichenko A.N. Experience of applying the metagenomic sequencing method on fragments of the 16S rRNA gene for the detection and identification of natural focal infection pathogens. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(2):201–212.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-629>

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

Введение

Природно-очаговые инфекции (ПОИ) широко распространены в мире и представляют важную медико-социальную проблему, значение которой в последние годы неуклонно возрастает по мере выявления новых патогенов, источниками и пере-

носчиками которых являются кровососущие членистоногие, мелкие млекопитающие и птицы [1–3]. Сохранение активности и расширение территорий природных очагов, а также высокая антропогенная нагрузка на окружающую среду приводят к постоянному росту числа людей, контактирующих с возбу-

телями ПОИ и подвергающихся риску заражения [4]. Доказано, что одновременное инфицирование носителей и переносчиков различными возбудителями ПОИ — естественное и широко распространённое явление, обуславливающее, в свою очередь, возможность сочетанной патологии у человека [5–7].

В настоящее время для лабораторной диагностики ПОИ широко применяются молекулярно-генетические методы исследования, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая в короткие сроки выявить присутствие ДНК/РНК возбудителей ПОИ в материале. Большинство разработанных ПЦР-тест-систем для выявления возбудителей ПОИ предназначены для детекции одного или нескольких патогенов [8]. Для обнаружения всех потенциальных возбудителей ПОИ необходимо применение комплекса тест-систем, что длительно и трудоёмко.

К современным подходам, позволяющим выполнять одновременно детекцию и идентификацию всех микроорганизмов — как известных, так и новых, содержащихся в образце, и не требующим проведения культивирования, относятся методы метагеномного секвенирования (metagenomics sequencing, MGS) [9]. Применение методов MGS для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе ПОИ, представляется особенно востребованным в случаях, когда традиционные лабораторные тесты не позволяют идентифицировать этиологический агент при атипичном течении заболевания, а также при микст-инфицировании различными возбудителями [10–12]. Кроме того, MGS образцов полевого материала (эктопаразитов, органов мелких млекопитающих, птиц и др.), собранных при эпизоотологическом обследовании территории, может быть полезно для получения новых комплексных данных о видовом составе патогенных и эндосимбиотических микроорганизмов, ассоциированных с различными видами носителей и переносчиков инфекций [13].

Существует несколько вариантов проведения MGS: таргетное секвенирование целевых участков генома, кодирующих эволюционно консервативные гены (*16S pPHK* и др.), и полногеномное MGS. Широкое распространение для анализа таксономического состава бактерий в образцах, а также обнаружения патогенных видов бактерий получил подход, основанный на таргетном секвенировании переменных участков гена *16S pPHK*. К преимуществам этого метода можно отнести возможность проведения таксономической классификации широкого круга бактерий, наличие этапа предварительного специфического обогащения целевого участка генома бактерий перед проведением секвенирования, относительную простоту биоинформационного анализа результатов по сравнению с методом секвенирования полного метагенома [14, 15].

Цель работы — выполнить детекцию и идентификацию возбудителей ПОИ в образцах полевого и клинического материала методом MGS фрагментов гена *16S pPHK*, проанализировать таксономический состав эндосимбиотических микроорганизмов в образцах.

Материалы и методы

Исследованы 16 образцов полевого (отобранного в ходе эпизоотологического обследования) и клинического материала с различной нагрузкой ДНК возбудителей ПОИ бактериальной этиологии, определённой методом ПЦР (*Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*). Образцы содержали генетический материал одного и нескольких возбудителей ПОИ (табл. 1).

Работу с клиническим материалом осуществляли при добровольном информированном согласии пациентов. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Материал от животных, использованный в работе, был получен согласно Плану проведения эпизоотологического обследования территории Ставропольского края по ПОИ и особо опасным инфекциям на 2024 г. (согласован Руководителем управления Роспотребнадзора по СК от 21.12.2023, утверждён Главным врачом ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в СК» от 21.12.2023). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Ставропольского государственного медицинского университета (заключение № 112 от 19.05.2023).

Сбор иксодовых клещей проводили с апреля по июнь с животных и растительности («на флаги»), видовую идентификацию клещей осуществляли морфологическим методом [16]. Из клещей составляли пулы по 10 экземпляров в каждом согласно Методическим рекомендациям 3.1.0322-23¹. Пробоподготовку клинического и полевого материала выполняли в соответствии с Методическими указаниями 1.3.2569-09².

Клещей обрабатывали 70% этанолом, промывали в фосфатно-солевом буфере. Параметры гомогенизации для полученных образцов выбирали, исходя из родовой принадлежности клещей. Полу-

¹ Методические рекомендации МР 3.1.0322-23 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах инфекционных болезней» (утв. Руководителем Роспотребнадзора 13.04.2023).

² Методические указания МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (утв. Руководителем Роспотребнадзора 22.12.2009).

Таблица 1. Данные об образцах, использованных для анализа методом MGS

№	Вид материала	Данные об образце, место выделения	Возбудитель, подтверждённый методом ПЦР	Ct
1		<i>Ixodes ricinus</i> , с растительности, Краснодарский край, г. Сочи	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	21,8
2		<i>I. ricinus</i> , с растительности, Краснодарский край, г. Сочи	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	22,1
3		<i>I. ricinus</i> , с растительности, Краснодарский край, г. Сочи	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	21,1
4	Суспензии клещей	<i>I. ricinus</i> , крупный рогатый скот, Республика Южная Осетия	<i>A. phagocytophilum</i>	31,4
5		<i>I. ricinus</i> , крупный рогатый скот, Республика Южная Осетия	<i>A. phagocytophilum</i>	23,4
6		<i>Dermacentor marginatus</i> , с растительности, Ставропольский край	<i>Rickettsia</i> spp.	17,2
7		<i>Rhipicephalus annulatus</i> , крупный рогатый скот, Республика Южная Осетия	<i>Rickettsia</i> spp.	23,3
8		<i>D. marginatus</i> , с растительности, Ставропольский край	<i>F. tularensis</i>	26,6
9	Смыв с грудной полости	<i>Microtus arvalis</i> , Ставропольский край	<i>F. tularensis</i>	10,1
10		Средиземноморская черепаха <i>Hyalomma aegyptium</i> , Республика Дагестан	<i>B. burgdorferi</i> s.l. <i>Rickettsia</i> spp.	20,2 16,3
11		<i>I. ricinus</i> с растительности, Краснодарский край, г. Сочи	<i>B. burgdorferi</i> s.l. <i>Rickettsia</i> spp.	25,4 17,0
12	Суспензии клещей	<i>I. ricinus</i> с растительности, Краснодарский край	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	25,7
			<i>Rickettsia</i> spp.	18,8
13		<i>Dermacentor reticulatus</i> с растительности, Ставропольский край	<i>F. tularensis</i> <i>Rickettsia</i> spp.	25,5 17,2
14		<i>D. reticulatus</i> с растительности, Ставропольский край	<i>F. tularensis</i> <i>Rickettsia</i> spp.	12,6 21,1
15	Сыворотка крови	Человек, Ставропольский край	<i>C. burnetii</i>	21,4
16	Сыворотка крови	Человек, Ставропольский край	<i>C. burnetii</i>	21,3

ченную суспензию центрифугировали в 300 мкл стерильного физиологического раствора.

Экстракцию нуклеиновых кислот из образцов сыворотки крови человека, гомогенатов пулов клещей и смыва с грудной полости полёвки обыкновенной проводили с помощью набора реагентов «РИБО-преп» («ИнтерЛабСервис»).

Наличие ДНК возбудителей ПОИ в образцах определяли методом ПЦР с использованием наборов реагентов: «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL», «АмплиСенс *TBEV*, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), «Ген *Francisella tularensis*-РГФ» (Российский противочумный институт «Микроб»). ДНК риккетсий в образцах полевого материала выявляли по протоколу, описанному О. Mediannikov и соавт. [17].

Амплификацию фрагментов гена *16S pPHK* микроорганизмов, содержащихся в образцах, для проведения MGS осуществляли с использованием праймеров, описанных I. Abellan-Schneyder и соавт. [18] (табл. 2). Для амплификации каждого варибельного фрагмента гена *16S pPHK* (V1–V2, V1–V3, V3–V4, V4, V4–V5, V6–V8, V7–V9) готовили отдельную реакционную смесь. Состав реакционной смеси: праймер F (C = 7,2 пмоль/мкл) — 1,25 мкл, праймер R

(C = 7,2 пмоль/мкл) — 1,25 мкл, ПЦР-смесь «Био-Мастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)» («Биолабмикс») — 12,5 мкл, ДНК образца — 10 мкл. Амплификацию продуктов ПЦР осуществляли по программе термоденатурации: 95°C — 5 мин; 95–20 с, Ta — 30 с, 72°C — 40 с (40 циклов); 72°C — 5 мин; 4 — ∞.

Оценку размера и чистоты полученных продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле. Процедуру очистки продуктов ПЦР от избытка праймеров и компонентов реакционной смеси выполняли с использованием набора «CleanMag DNA» («Евроген»). Для подготовки библиотек брали эквивалентные количества продуктов амплификации фрагментов гена *16S pPHK* V1–V9. Измерение итоговой концентрации целевой ДНК проводили на флуориметре «Qubit» с помощью набора «Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (HS)» («Invitrogen»).

Библиотеки фрагментов ДНК готовили по протоколу Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation (Revision K.0) с использованием набора «Ion Plus Fragment Library Kit» («Thermo Fisher Scientific Inc.»). Секвенирование библиотек, приготовленных из смесей ампликонов, выполняли на платформе GeneStudio S5 Plus («Thermo Fisher Scientific Inc.»).

Таблица 2. Последовательности праймеров для амплификации фрагментов гена, кодирующего *16S pPHK*

№	Маркировка фрагмента	Длина фрагмента, п. н.	Температура отжига, °C	Праймер	Последовательность 5'–3'
1	V1–V2	311	57	27F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG
				338R	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
2	V1–V3	507	57	27F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG
				534R	ATTACCGCGGCTGCTGG
3	V3–V4	404	54	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG
				785R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
4	V4	293	54	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
				806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
5	V4–V5	429	54	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
				944R	GAATTAACACATGCTC
6	V6–V8	439	57	939F	GAATTGACGGGGGCCCGACAAG
				1378R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG
7	V7–V9	377	51	1115F	CAACGAGCGCAACCTT
				1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT

Для биоинформатического анализа данных MGS по участкам гена *16S pPHK* использовали программы Fastp Qc³, Kallisto⁴, STAR [19], Bowtie2⁵. Качество fastq-файлов оценивали с использованием программ Fastp Qc и Kallisto, прочтения со значением показателя качества Q < 20 были исключены из анализа. Выравнивание и фильтрацию последовательностей проводили с помощью программного обеспечения STAR и Bowtie2.

Сборку коротких прочтённых последовательностей *de novo* в более длинные последовательности (контиги) проводили с помощью ассемблера SPAdes. Таксономическую принадлежность геномных последовательностей определяли в результате их сравнения с базой данных NCBI (RefSeq и GenBank с помощью Rapsearch2⁶).

Результаты видовой идентификации микроорганизмов (боррелий, риккетсий), полученные при проведении MGS по участкам гена *16S pPHK*, подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты

Выполнено MGS по участкам гена *16S pPHK* 16 образцов клинического и полевого материала, содержащих ДНК возбудителей ПОИ бактериальной природы (табл. 3). Нуклеотидные последовательности, полученные с помощью MGS, депонировали в базу данных GenBank (BioProject PRJNA1227530; SAMN46987881–SAMN46987896).

Количество прочтений, удовлетворяющих параметру Q20, для исследуемых образцов составило 1127–40 969. Величина GC для всех образцов варьировала в диапазоне 49,7–52,4%, что соответствует экзомным участкам фрагментов гена *16S pPHK*, используемого для анализа методом MGS. В ходе обработки полученных данных установили, что наибольшее количество ридов после фильтрации получено для образца № 13 (93 789 000 К). Для образцов № 9, 14 наблюдалось сокращение количества чтений (29 314 000 К и 28 704 000 К). Общее количество ридов после этапа фильтрации для 4 образцов (№ 2, 5, 7, 10) варьировало в интервале 9 172 000–16 651 000 К. Количество отфильтрованных данных для остальных образцов находилось в диапазоне 488–7 633 000 К. Наименьшее количество отфильтрованных данных (Q < 20) после биоинформационной обработки было отмечено для образцов № 4, 8 и 11. Наибольшее количество данных неудовлетворительного качества (Q < 20) было получено для образцов № 9, 13 и 14. Результат оценки качества данных представлен на рис. 1.

Возбудители ПОИ, выявленные методом MGS по переменным областям гена *16S pPHK*

При исследовании образцов суспензий иксодовых клещей (№ 1–8, табл. 3) с подтверждённым по результатам исследования методом ПЦР моноинфицированием боррелиями генокомплекса *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, риккетсиями и *F. tularensis* методом MGS гена *16S pPHK* детектированы представители родов *Borrelia* (образцы № 1–3), *Francisella* (образец № 8) (микроорганизмы идентифицированы до рода), а также *R. aeschlimannii* (образцы № 6, 7, микроорганизм

³ URL: <https://github.com/OpenGene/fastp>

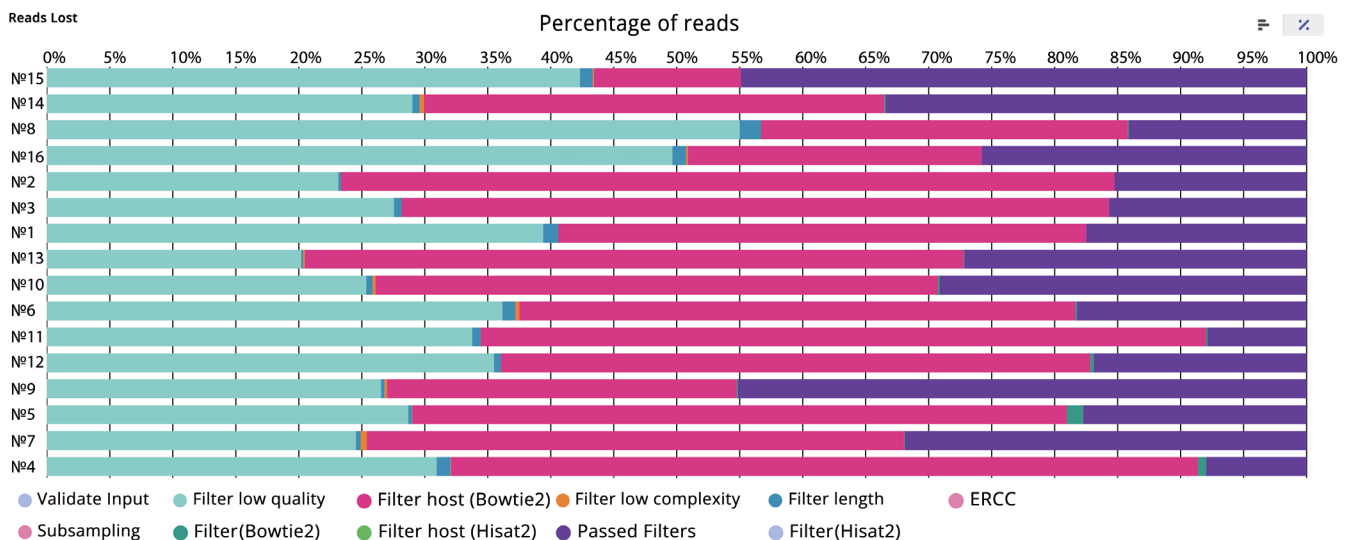
⁴ URL: <https://github.com/Roslin-Aquaculture/RNA-Seq-kallisto>

⁵ URL: <https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>

⁶ URL: <https://github.com/zhaoyanswill/RAPSearch2>

Таблица 3. Сопоставление результатов, полученных с помощью методов ПЦР и MGS фрагментов гена *16S rPHK*

№ образца	Метод ПЦР		Метод MGS фрагментов гена <i>16S rPHK</i>	
	выявленные патогены	Ct	Q20, % (количество прочтений)	выявленные патогены (количество родов, соответствующих целевому патогену, %)
Моно-инфицированные образцы				
1	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	21,80	91,50 (5822)	<i>Borrelia</i> spp. (2,90)
2	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	22,10	91,90 (20 236)	<i>Borrelia</i> spp. (3,10)
3	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	21,10	92,20 (10 627)	<i>Borrelia</i> spp. (3,20)
4	<i>A. phagocytophilum</i>	31,40	87,50 (12 922)	Не обнаружено
5	<i>A. phagocytophilum</i>	23,40	91,80 (6618)	Не обнаружено
6	<i>Rickettsia</i> spp.	17,20	91,60 (8239)	<i>R. aeschlimannii</i> (8,90)
7	<i>Rickettsia</i> spp.	23,30	92,10 (22 324)	<i>R. aeschlimannii</i> (0,80)
8	<i>F. tularensis</i>	26,60	91,00 (1127)	<i>Francisella</i> spp. (2,60)
9	<i>F. tularensis</i>	10,10	91,60 (40 161)	<i>F. tularensis</i> (9,90)
Микст-инфицированные образцы				
10	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	20,20	90,60 (163 336)	<i>B. turcica</i> (27,00)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>B. hispanica</i> (7,60)
11	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	25,40	91,90 (11 506)	<i>R. aeschlimannii</i> (9,50)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>Borrelia</i> spp. (2,40)
12	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	25,70	92,40 (5952)	<i>Rickettsia</i> spp. (2,60)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>B. valaisiana</i> (7,60)
13	<i>F. tularensis</i>	25,50	91,00 (11 506)	<i>F. tularensis</i> (9,90)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>R. aeschlimannii</i> (11,30)
14	<i>F. tularensis</i>	12,60	91,70 (40 696)	<i>F. tularensis</i> (9,90)
	<i>Rickettsia</i> spp.			<i>Rickettsia</i> spp. (4,10)
Клинический материал				
15	<i>C. burnetii</i>	21,40	90,60 (8926)	<i>C. burnetii</i> (5,30)
16	<i>C. burnetii</i>	21,30	90,00 (7223)	<i>C. burnetii</i> (5,00)

**Рис. 1.** Гистограмма, отражающая результат оценки качества данных MGS по участкам гена *16S rPHK*.

Цвет секторов на гистограмме отражает количество родов для каждого образца, прошедших фильтрацию по качеству (в %, вверху). Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

идентифицирован до вида). Возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека методом MGS обнаружить не удалось (образцы № 4, 5). Результаты видовой идентификации *R. aeschlimannii* в образцах № 6, 7 подтверждены методом секвенирования фрагмента генома по Сэнгеру.

Исследованы микст-инфицированные образцы иксодовых клещей (образцы № 10–14, табл. 3) с комбинацией двух возбудителей клещевых инфекций (*B. burgdorferi* s.l и *Rickettsia* spp.; *F. tularensis* и *Rickettsia* spp.). Методом MGS в образцах были детектированы все целевые микроорганизмы. До вида идентифицированы *R. aeschlimannii* (образцы № 10, 13), *B. valaisiana* (образец № 12), *F. tularensis* (образцы № 13, 14), также в образцах выявлены микроорганизмы родов *Rickettsia* (образцы № 11, 12, 14) и *Borrelia* (образцы № 11, 12, 14), вид которых идентифицировать не удалось. В образце № 10 методом MGS детектировали генетические маркеры (ДНК): боррелий, возбудителей возвратных лихорадок (*B. turcica*, *B. hispanica*). Подтвердить результаты видовой идентификации боррелий, содержащихся в образце № 10, с помощью секвенирования нуклеиновых кислот по Сэнгеру не удалось, что обусловлено микст-инфицированием образца суспензии клещей *H. aegyptium*. Результаты видовой идентификации остальных микроорганизмов, выявленных в образцах, подтверждены секвенированием фрагментов генома возбудителей.

Методом MGS в 3 образцах, содержащих ДНК возбудителя туляремии (Ct 10,1; 12,6; 25,5), *F. tularensis* идентифицирована до вида, в 1 образце (Ct 26,6) установлено наличие микроорганизмов рода *Francisella* spp., видовую идентификацию выполнить не удалось.

C. burnetii по результатам MGS по участку гена *16S pPHK* идентифицирована в 2 заведомо положительных пробах плазмы крови от больных лихорадкой Ку (значения Ct 21,3–21,4). В образцах клинического материала № 15, 16 от больных лихорадкой Ку методом MGS выявили наличие ДНК *C. burnetii*, доля целевых прочтений составила 5,0–5,3%. Кроме того, в клинических образцах обнаружены нуклеотидные последовательности бактерий *Methylophilus medardicus*, а также представителей родов *Acinetobacter* и *Shingomonas*, что может свидетельствовать о возможной контаминации образцов на этапах отбора, хранения и лабораторного исследования [20].

Проведено сравнение результатов исследования образцов полевого и клинического материала с различной нагрузкой ДНК возбудителей ПОИ, полученных методами MGS по участкам гена *16S pPHK* и ПЦР. Показано, что в результате MGS 6 образцов, положительных на наличие ДНК боррелий генокомплекса *B. burgdorferi* s.l., в 4 образцах проведена идентификация боррелий до рода (*Borrelia* spp.

Ct 21,8; 22,1; 21,1; 25,4), в 2 — до вида (*B. valaisiana* Ct 25,7, *B. turcica*, *B. hispanica* Ct 20,2).

По результатам MGS фрагменты генома *Rickettsia* spp. выявлены во всех заведомо положительных пробах, в 4 образцах (значения Ct 16,2; 17,2; 17,2 и 23,3) идентифицирован вид риккетсий (*R. aeschlimannii*), в 3 образцах (значения Ct 17,0; 18,8 и 21,1) видовую идентификацию риккетсий выполнить не удалось. Представленные результаты идентификации боррелий и риккетсий в исследованном материале (табл. 3) подтверждаются данными литературы о сложности определения видовой принадлежности методом MGS представителей рода *Rickettsia* и *Borrelia* [8, 15]. Осуществление точной видовой идентификации риккетсий и боррелий с помощью MGS затруднено из-за высокой гомологии нуклеотидных последовательностей гена *16S pPHK* для указанных бактериальных патогенов [12, 13]. В случае детекции микроорганизмов родов *Rickettsia* и *Borrelia* методом MGS гена *16S pPHK* может понадобиться дальнейшая их идентификация до вида с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Единственный патоген, наличие которого не удалось подтвердить в результате MGS, — *A. phagocytophilum*.

Таксономический состав микробиома иксодовых клещей

Исследование таксономической структуры микробиома клещей проводили в соответствии с их видовой принадлежностью, местом и территорией сбора (рис. 2).

Основные таксономические группы микробиома клещей:

- для представителей *I. ricinus* (образцы № 1–3): *Flavobacterium* spp. (57–81%), *Pseudomonas* spp. (7–27%), *Serratia* spp. (2–4%), *Pedobacter* spp. (2–4%);
- для представителей *I. ricinus* (образцы № 4, 5): *Candidatus Midichloria mitochondrii* (31–87%), *Clostridium* spp. (6–61%), *Sphingomonas* spp. (3%), *Staphylococcus* spp. (1–10%), *Bradyrhizobium* spp. (1%);
- для представителей *I. ricinus* (образцы № 11, 12): *Pseudomonas* spp. (7–49%), *Serratia* spp. (4–12%), *Rickettsiella endosymbiont of Pandinus imperator* (3–19%), *Rhodobacterales* spp. (3%);
- для представителей *D. reticulatus* (образцы № 13, 14): *Flavobacterium* sp. Nj (25–53%), *Cardinium endosymbiont of Bemisia tabaci* (19%), *Clostridium* spp. (15%), *Francisella-like endosymbiont of Dermacentor reticulatus* (9–21%), *Francisella persica* (2%), uncultured *Francisella* spp. (1–6%), *Bradyrhizobium* spp. (1–3%), *Dyadobacter* spp. (1–3%);

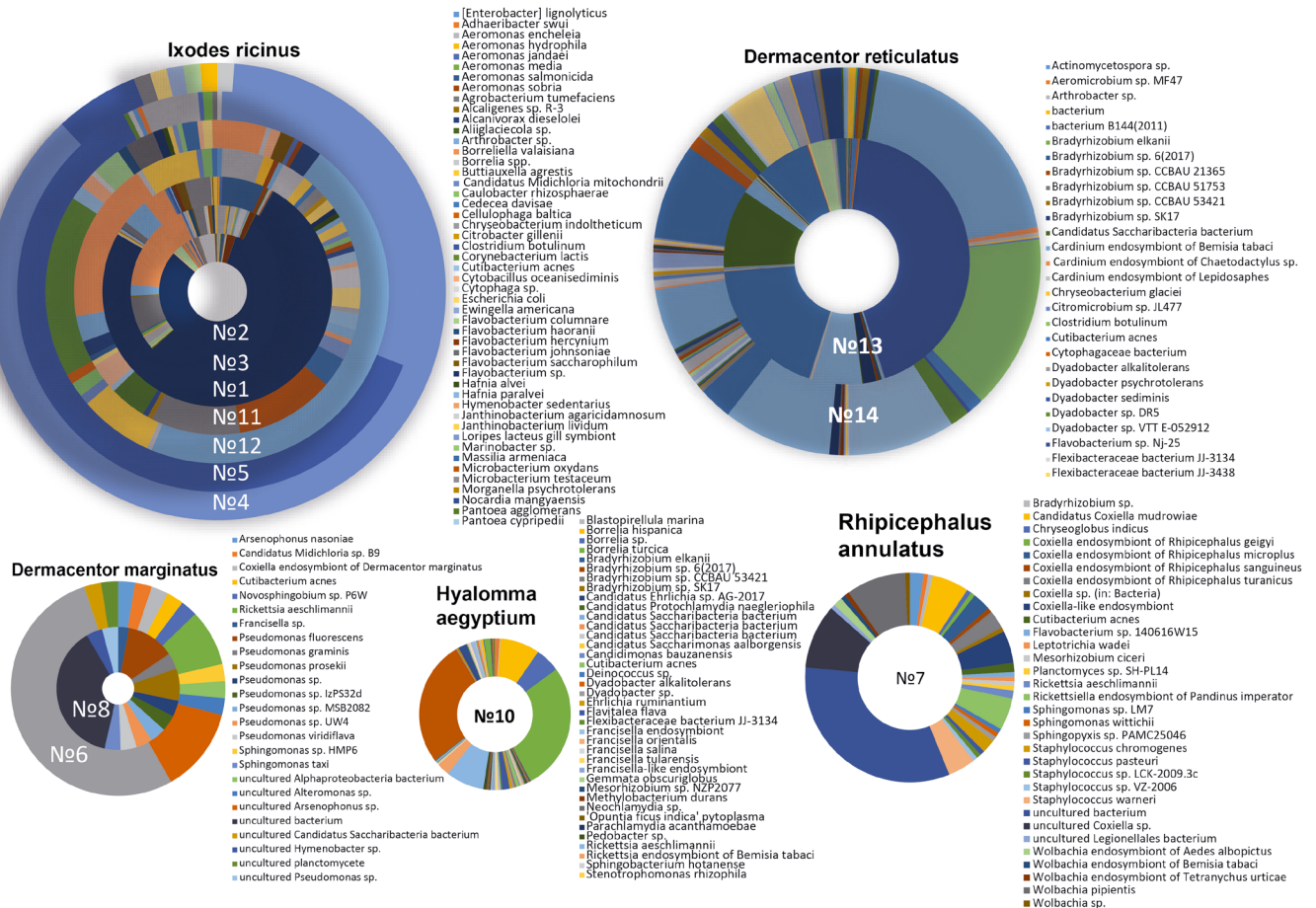


Рис. 2. Таксономический состав микробиомов иксодовых клещей (номера образцов указаны цифрами).

В связи с наличием большого количества данных, цветовыми маркерами отмечены только наиболее представленные таксоны. Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

- для представителей *R. annulatus* (образец № 7): *Rickettsiella endosymbiont of Pandinus imperator* (5%), uncultured *Coxiella* spp. (10%), *Wolbachia pipientis* (9%), *Candidatus Coxiella mudrowiae* (6%), *Coxiella endosymbiont of Rhipicephalus microplus* (3%), *Coxiella endosymbiont of Rhipicephalus geigy* (1%), *Coxiella endosymbiont of Rhipicephalus turanicus* (3%), *Shingomonas* spp. (5%), *Staphylococcus* spp. (5%), *Bradyrhizobium* spp. (3%), *Flavobacterium* spp. (2%), *Leptotrichia wadei* (2%);
- для представителей *H. aegyptium* (образец № 10): *Rickettsia endosymbiont of Bemisia tabaci* (3%), *Flavitalea flava* (1%), uncultured *Borrelia* spp. (9%), *Blastopirellula marina* (4%), *Dyadobacter alkalitolerans* (2%), *Bradyrhizobium* (1%);
- для представителей *D. marginatus* (образцы № 6, 8): *Pseudomonas* spp. (9–33%), uncultured *Arsenophonus* spp. (11%), uncultured *Alteromonas* spp. (2%), *Alphaproteobacteria bacterium* (2%), *Coxiella endosymbiont of Dermacentor marginatus* (2%).

Обсуждение

В работе применён метод MGS по участкам гена *16S pPHK* для детекции и идентификации известных возбудителей ПОИ бактериальной этиологии в образцах клинического и полевого материала, исследована возможность его использования при одновременном выявлении различных видов патогенных микроорганизмов. Определена микст-инфицированность двумя возбудителями ПОИ (боррелиоз, клещевой риккетсиоз, туляремия) нескольких пулов иксодовых клещей. Отрицательный результат при детекции *A. phagocytophilum* может быть обусловлен низкой концентрацией бактериального патогена в исследуемом материале, а также недостаточным качеством и количеством данных, полученных после биоинформационной обработки.

Результаты использования метода таргетного MGS по участкам гена *16S pPHK* для выявления возбудителей ПОИ в образцах клинического и полевого материала представлены в ряде публикаций. Так, L. Kingy и соавт. при MGS по участку гена *16S pPHK* в образцах клинического материала от лихорадящих больных, обнаружили возбудителей инфекций, переносимых клещами: *B. burgdorferi* s.l., *B. mayonii*,

B. miyamotoi, *B. hermsii*, *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. muris* subsp. *eaucularinsis*, *E. ewingii*, *F. tularensis* [8]. R. Takhampunya и соавт. при исследовании крови пациентов с лихорадкой неясного генеза выявили микроорганизмы родов *Anaplasma*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Leptospira*, *Orientia* [15]. Кроме того, другими авторами получены результаты исследования с использованием метода *16S pPHK* MGS проб иксодовых клещей на весь спектр возбудителей клещевых инфекций [20–22].

Одна из востребованных областей применения метода MGS по участку гена *16S pPHK* — исследование клинических образцов от больных с лихорадками неясного генеза в случаях, когда традиционные методы исследования (ПЦР, иммуноферментный анализ, серологические методы и др.) не позволили идентифицировать возбудителя. Обнаружение в материале от лихорадящих больных микроорганизмов, принадлежащих к родам, включающим возбудители ПОИ, позволит в дальнейшем провести углублённый молекулярно-генетический анализ для подтверждения наличия ДНК выявленных патогенных микроорганизмов в образце.

В литературе имеются многочисленные сообщения о случаях заболеваний людей сочетанными формами ПОИ, вызванных ассоциациями микроорганизмов, клиническое течение которых по сравнению с моноинфекциями существенно тяжелее, а лабораторное подтверждение диагноза затруднено [23, 24]. При этиологической расшифровке подобных случаев метагеномный подход приобретает особую актуальность и наглядно демонстрирует своё преимущество.

В результате биоинформатической обработки данных MGS по варибельным фрагментам гена *16S pPHK* определён таксономический состав микробиома, ассоциированного с клещами *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *R. annulatus*, *H. aegyptium*, *D. marginatus*, собранных в южных регионах России (рис. 2). В составе микробиома всех клещей преобладали микроорганизмы: *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Aeromonas* spp., *Pedobacter* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Shingomonas* spp. Возможно, часть этих бактерий попала в организм клещей в процессе их жизнедеятельности или населяет их хитиновый экзоскелет и пищеварительную систему, при этом не являясь симбионтами членистоногих [25].

Кроме того, в пулах иксодовых клещей обнаружены ДНК-маркеры микроорганизмов — эндосимбионтов клещей, в том числе *Candidatus Midichloria mitochondrii* (образцы № 4, 5), представителей родов *Rickettsiella*, *Coxiella*, *Candidatus Coxiella mudrowiae* (образец № 7), непатогенных и условно-патогенных для человека видов *Francisella* spp. (*F. frigiditurris*, *F. philomiragia*, *F. persica*) (образец № 13).

Представляется интересным, что состав бактериального сообщества пула иксодовых клещей

образца № 10 на основе данных MGS участков гена *16S pPHK* существенно отличался от остальных образцов, что может быть связано с особенностями прокормителя клещей и видом переносчика клещевых инфекций — средиземноморской черепахи. В небольших количествах выявлены бактерии рода *Bradyrhizobium* — симбиотические микроорганизмы растений, *Blastopirellula marina* и *Dyadobacter alkalitolerans* — естественные обитатели солёных водоёмов и песчаных почв. Полученные результаты, представленные в табл. 3 и на рис. 2, согласуются с данными литературы о бактериальных патогенах, переносимых клещами *H. aegyptium* и встречающихся в крови пресмыкающихся (питоны, ящерицы и черепахи) [26, 27]. Опубликована информация о выявлении маркеров возбудителей ПОИ (боррелиоз, клещевой риккетсиоз) в ходе исследования биологического материала от рептилий и клещей, снятых с рептилий: *R. aeschlimannii* [28], *B. turcica* [29, 30], *B. hermsii* [31], *B. crociduræ* [32] и *B. hispanica* [33]. Указанные данные о высокой встречаемости боррелий — возбудителей возвратных лихорадок у животных подтверждают широкое распространение этих бактериальных патогенов в ряде регионов и имеют почти убиквитарный характер.

Использование MGS при исследовании иксодовых клещей, очевидно, может быть эффективно для получения комплексной информации о видовом спектре возбудителей ПОИ, а также эндосимбионтах, ассоциированных с различными видами иксодовых клещей, обитающих в разных регионах. Как следствие — открытие новых перспектив в изучении видового спектра возбудителей ПОИ, а также подборе микроорганизмов для оценки специфичности существующих и разрабатываемых ПЦР-тест-систем, предназначенных для исследования образцов полевого материала [34]. Полученная в данной работе информация о видах эндосимбиотических микроорганизмов, выявленных в пулах иксодовых клещей, согласуется с ранее опубликованными данными [34].

Необходимо учитывать ограничения метода при определении видовой принадлежности близкородственных микроорганизмов, в том числе для ряда видов боррелий, риккетсий на основании данных MGS [35, 36]. Показано, что результаты таксономической классификации могут отличаться в зависимости от используемых варибельных регионов [37–39]. В этом случае повышению дискриминирующей способности метода способствует использование смеси праймеров, нацеленных на различные гиперварибельные области гена *16S pPHK* [40–42], что и было применено в настоящем исследовании.

Заключение

Нами проведён анализ таксономического состава микроорганизмов, а также детекция и иден-

тификация возбудителей ПОИ в образцах методом MGS по участкам гена *16S rPHK*, экспериментально подтверждена эффективность применения данного метода для выявления возбудителей ПОИ в пробах клинического и полевого материала. Проведена детекция микроорганизмов, относящихся к родам *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp., *Francisella* spp., содержащих в том числе патогенные для человека виды, а также видовая идентификация возбудителей ПОИ с различной нагрузкой ДНК в исследуемом материале, в частности, *R. aeschlimannii* (Ct при исследовании методом ПЦР до 23,3), *C. burnetii* (Ct < 21,4), *F. tularensis* (Ct < 26,6), боррелий группы *B. burgdorferi* s.l. (*B. valaisiana*, Ct < 25,7), боррелий возбудителей возвратных лихорадок (*B. turcica*, *B. hispanica* Ct < 20,2). Исследована таксономическая структура микробиома клещей *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *R. annulatus*, *H. aegyptium*, *D. marginatus*, собранных в южных регионах России. Показано, что преобладают микроорганизмы — представители родов *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Pedobacter*, *Bradyrhizobium*, *Shingomonas*. В пулах иксодовых клещей обнаружены ДНК-маркеры микроорганизмов — эндосимбионтов клещей *Candidatus Midichloria mitochondrii*, представителей родов *Rickettsiella*, *Coxiella*, непатогенных и условно-патогенных для человека видов рода *Francisella*.

Продолжение работы в данном направлении позволит более точно оценить разрешающую способность метода для детекции и идентификации возбудителей ПОИ. Изучение закономерностей существования возбудителей ПОИ в структуре микробиома клещей является перспективным направлением для дальнейших исследований.

Основное преимущество метода MGS по участку гена *16S rPHK* при исследовании образцов полевого и клинического материала заключается в возможности осуществлять одновременную детекцию и идентификацию всех бактерий в пробе, в том числе известных возбудителей ПОИ, без необходимости проведения нескольких диагностических тестов. Таргетное MGS может применяться для этиологической расшифровки при атипичном течении и стёртой клинической картине заболевания, при микст-инфицировании несколькими возбудителями ПОИ бактериальной этиологии, когда имеется сложность с постановкой диагноза с использованием традиционных лабораторных методов исследования. MGS также может использоваться для получения информации о таксономическом составе бактериального микробиома в организме различных видов носителей и переносчиков возбудителей ПОИ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Рудаков Н.В., Ястребов В.К. Эволюция учения о природной очаговости болезней человека. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014;(4):4–8. Rudakov N.V., Yastrebov V.K. Evolution of teaching of the natural nidality of human diseases. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2014;(4):4–8. EDN: <https://elibrary.ru/swnymz>
2. Ястребов В.К. Клещевой энцефалит в Сибири: эпидемиология, сочетанность природных очагов. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2007;27(4):89–93. Yastrebov V.K. Tick-borne encephalitis in Siberia: epidemiology, combined natural foci. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2007;27(4):89–93. EDN: <https://elibrary.ru/pjdxjp>
3. Смелянский В.П., Жуков К.В., Бородай Н.В. и др. Современное состояние проблемы природно-очаговых инфекций на территории Волгоградской области. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО*. 2021;29(11):83–93. Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Borodai N.V., et al. The problem of natural focal infectious diseases in the Volgograd region: a state-of-the-art review. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2021;29(11):83–93. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-29-11-83-93> EDN: <https://elibrary.ru/qrtwmi>
4. Истомин А.В. Региональный мониторинг природно-очаговых инфекций. *Псковский региональный журнал*. 2006;(1):122–35. Istomin A.V. Regional monitoring over natural-focal infections. *Pskov Regionology Journal*. 2006;(1):122–35. EDN: <https://elibrary.ru/nuhqfd>
5. Демидова Т.Н., Шарапова Н.Е., Горшенко В.В. и др. Эпидемиологическое проявление сочетанных природных очагов туляремии, лептоспирозов и геморрагической лихорадки с почечным синдромом: микстинфекции. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022;21(2):38–45. Demidova T.N., Sharapova N.E., Gorshenko V.V., et al. Epidemiological manifestation of combined natural foci of tularemia, leptospirosis and hemorrhagic fever with renal syndrome: mixed infections. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(2):38–45. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-2-38-45> EDN: <https://elibrary.ru/fsnrdiv>
6. Коренберг Э.И. Изучение и профилактика микст-инфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2001;(11):41–5. Korenberg E.I. The study and prevention of mixed infections transmitted by ticks. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2001;(11):41–5.
7. Шкарин В.В., Благодравова А.С., Чумаков М.Э. Эпидемиологические особенности сочетанных природно-очаговых инфекций. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017;16(5):43–52. Shkarin V.V., Blagonravova A.S., Chumakov E.M. Epidemiological features of combined natural-focal infections. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017;16(5):43–52. EDN: <https://elibrary.ru/zqolrv>
8. Kingry L., Sheldon S., Oatman S., et al. Targeted metagenomics for clinical detection and discovery of bacterial tick-borne pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 2020;58(11):e00147–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00147-20>
9. Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 1998;5(10):R245–9. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(98)90108-9)
10. Thoendel M. Targeted metagenomics offers insights into potential tick-borne pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 2020;58(11):e01893–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01893-20>
11. Ghosh A., Mehta A., Khan A.M. Metagenomic analysis and its applications. In: *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. Volume 3*. Elsevier; 2019:184–93. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20178-7>
12. Rodino K.G., Wolf M.J., Sheldon S., et al. Detection of tick-borne bacteria from whole blood using 16S ribosomal RNA

- gene PCR followed by next-generation sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2021;59(5):e03129-20.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.03129-20>
13. Carpi G., Cagnacci F., Wittekindt N.E., et al. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One.* 2011;6(10):e25604.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025604>
14. Kumar P.S., Brooker M.R., Dowd S.E., Camerlengo T. Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PLoS One.* 2011;6(6):e20956.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020956>
15. Takhampunya R., Korkusol A., Pongpichit C., et al. Metagenomic approach to characterizing disease epidemiology in a disease-endemic environment in Northern Thailand. *Front. Microbiol.* 2019;10:319.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00319>
16. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. *Amblyomminae*. В кн.: *Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные*. СПб.;1997. Filippova N.A. Ixodidae ticks of Amblyomminae subfamily. In: *Fauna of Russia and Bordering Countries. Arachnids*. St. Petersburg;1997.
17. Mediannikov O., Diatta G., Fenollar F., et al. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010;4(9):e821.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000821>
18. Abellan-Schneyder I., Matchado M.S., Reitmeier S., et al. Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. *mSphere* 2021;6(1):e01202-20.
DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.01202-20>
19. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
20. Salter S.J., Cox M.J., Turek E.M., et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014;12:87.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
21. Keller A., Graefen A., Ball M., et al. New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nat. Commun.* 2012;3:698.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms1701>
22. Mayne P.J. Emerging incidence of Lyme borreliosis, babesiosis, bartonellosis, and granulocytic ehrlichiosis in Australia. *Int. J. Gen. Med.* 2011;4:845-52.
DOI: <https://doi.org/10.2147/IJGM.S27336>
23. Krause P.J., Telford S.R., Spielman A., et al. Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA.* 1996;275(21):1657-60.
24. Belongia E.A. Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2002;2(4):265-73. DOI: <https://doi.org/10.1089/153036602321653851>
25. Курильщиков А.М., Ливанова Н.Н., Фоменко Н.В., Тикунова Н.В. Метагеномный анализ бактериального сообщества, ассоциированного с клещами *Ixodes persulcatus*. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.* 2013;11(4):13-21. Kurilchshikov A.M., Livanova N.N., Fomenko N.V., Tikunova N.V. Metagenomic analysis of bacterial community associated with *Ixodes persulcatus* ticks. *Vestnik NSU. Series: Biology and Clinical Medicine.* 2013;11(4):13-21. EDN: <https://elibrary.ru/rtukux>
26. Norte A. C., Harris D. J., Silveira D., et al. Diversity of microorganisms in *Hyalomma aegyptium* collected from spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) in North Africa and Anatolia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2022;69(4):1951-62.
DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.14188>
27. Akveran G.A., Karasartova D., Keskin A., et al. Bacterial and protozoan agents found in *Hyalomma aegyptium* (L., 1758) (*Ixodida*: Ixodidae) collected from *Testudo graeca* L., 1758 (Reptilia: Testudines) in Corum Province of Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020;11(5):101458.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101458>
28. Benyahia H., Diarra A.Z., Gherissi D.E., et al. Molecular and MALDI-TOF MS characterisation of *Hyalomma aegyptium* ticks collected from turtles and their associated microorganisms in Algeria. *Ticks Tick Borne Dis.* 2022;13(1):101858.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101858>
29. Kalmár Z., Cozma V., Sprong H., et al. Transstadial transmission of *Borrelia turcica* in *Hyalomma aegyptium* ticks. *PLoS One.* 2015;10(2):e0115520.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115520>
30. Hepner S., Fingerle V., Duscher G.G., et al. Population structure of *Borrelia turcica* from Greece and Turkey. *Infect. Genet. Evol.* 2020;77:104050. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104050>
31. Barbour A.G., Gupta R.S. The family *Borreliaceae* (*Spirochaetales*), a diverse group in two genera of tick-borne spirochetes of mammals, birds, and reptiles. *J. Med. Entomol.* 2021;58(4):1513-24. DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjab055>
32. Abdelbaset A.E., Nonaka N., Nakao R. Tick-borne diseases in Egypt: a one health perspective. *One Health.* 2022;15:100443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100443>
33. Moraga-Fernández A., Muñoz-Hernández C., Sánchez-Sánchez M., et al. Exploring the diversity of tick-borne pathogens: the case of bacteria (*Anaplasma*, *Rickettsia*, *Coxiella* and *Borrelia*) protozoa (*Babesia* and *Theileria*) and viruses (*Orthonairovirus*, tick-borne encephalitis virus and louping ill virus) in the European continent. *Vet. Microbiol.* 2023;286:109892. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109892>
34. Carpi G., Cagnacci F., Wittekindt N.E., et al. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One.* 2011;6(10):e25604.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025604>
35. Plummer E., Twin J., Bulach D.M., et al. A comparison of three bioinformatics pipelines for the analysis of preterm gut microbiota using 16S rRNA gene sequencing data. *J. Proteomics Bioinform.* 2015;8(12):283-91.
DOI: <https://doi.org/10.4172/jpb.1000381>
36. Pinna N.K., Dutta A., Monzoorul Haque M., Mande S.S. Can targeting non-contiguous V-regions with paired-end sequencing improve 16S rRNA-based taxonomic resolution of microbiomes?: an *in silico* evaluation. *Front. Genet.* 2019;10:653.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00653>
37. Bukin Y.S., Galachyants Y.P., Morozov I.V., et al. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci. Data.* 2019;6:190007.
DOI: <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
38. Martinez-Porchas M., Villalpando-Canchola E., Ortiz Suarez L.E., Vargas-Albores F. How conserved are the conserved 16S-rRNA regions? *PeerJ.* 2017;5:e3036.
DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.3036>
39. Barb J.J., Oler A.J., Kim H.S., et al. Development of an analysis pipeline characterizing multiple hypervariable regions of 16S rRNA using mock samples. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148047.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148047>
40. Hiergeist A., Reischl U., Gessner A. Multicenter quality assessment of 16S ribosomal DNA-sequencing for microbiome analyses reveals high inter-center variability. *Int. J. Med. Microbiol.* 2016;306(5):334-42.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.03.005>
41. Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., et al. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS One.* 2014;9(8):e105592.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>
42. Yang B., Wang Y., Qian P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics.* 2016;17:135.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>

Информация об авторах

Васильева Оксана Васильевна — канд. мед. наук, зав. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, vasileva_ov@snipchi.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Ульшина Диана Васильевна[✉] — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, vladidiana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Волынкина Анна Сергеевна — канд. биол. наук, зав. лаб. диагностики вирусных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, volyn444@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>

Писаренко Сергей Владимирович — канд. хим. наук, в. н. с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, pisarenko_sv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Сирица Юлия Владимировна — н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, merendera@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Гнусарева Ольга Александровна — н. с. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, gnusarevao@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9044-1808>

Яценко Наталья Александровна — главный врач Краевой специализированной клинической инфекционной больницы, Ставрополь, Россия, natali.yanet@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4353-4777>

Куличенко Александр Николаевич — д-р мед. наук, проф., академик РАН, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Участие авторов: *Васильева О.В.* — концепция исследования, написание текста; *Ульшина Д.В.* — анализ данных, написание текста; *Волынкина А.С.* — научное редактирование статьи; *Писаренко С.В.* — геномные исследования; *Сирица Ю.В.*, *Гнусарева О.А.*, *Яценко Н.А.* — лабораторные исследования; *Куличенко А.Н.* — концепция исследования, научное редактирование статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 20.01.2025;
принята к публикации 29.03.2025;
опубликована 28.04.2025

Information about the authors

Oksana V. Vasileva — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, vasileva_ov@snipchi.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Diana V. Ul'shina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, vladidiana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Anna S. Volynkina — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory for diagnostics of viral infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, volyn444@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>

Sergey V. Pisarenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, pisarenko_sv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Yulia V. Siritsa — researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, merendera@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Olga A. Gnusareva — researcher, Laboratory for diagnostics of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, gnusarevao@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9044-1808>

Natalia A. Yatsenko — Chief Physician, Regional Specialized Clinical Infectious Diseases Hospital, Stavropol, Russia, natali.yanet@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4353-4777>

Alexandr N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Director, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Authors' contribution: *Vasileva O.V.* — research concept, writing the text; *Ulshina D.V.* — data analysis, writing the text; *Volynkina A.S.* — science editing the article; *Pisarenko S.V.* — genomic research; *Siritsa Yu.V.*, *Gnusareva O.A.*, *Yatsenko N.A.* — laboratory research; *Kulichenko A.N.* — research concept, article science editing. All authors confirm that their authorship meets the criteria of the International Committee of Medical Journal Editors, have made a significant contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

The article was submitted 20.01.2025;
accepted for publication 29.03.2025;
published 28.04.2025