Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

На правах рукописи

Голидонова Кристина Андреевна

ОПТИМИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ И ХАРАКТЕРИСТИКА *BORRELIA BAVARIENSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ НА СРЕДНЕМ УРАЛЕ

1.5.11 – Микробиология (биологические науки)
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук.

Научный руководитель:
Заслуженный деятель науки Российской Федерации
д.б.н., проф. Коренберг Э. И.

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 18
1.1 Общая характеристика *Borrelia bavariensis* как одного из этиологического агента ИКБ в России 18
1.1.1 Основные черты морфологии, биологии и генетики *B. bavariensis* 18
1.1.2 История описания вида 23
1.1.3 Переносчики и резервуарные хозяева *B. bavariensis* 26
1.1.4 Распространение *B. bavariensis* и клинические проявления вызываемых заболеваний 26
1.1.5 Внутривидовая гетерогенность *B. bavariensis* 28
1.2 Ген *p66* и одноименный белок как фактор патогенности *B. bavariensis* ... 30
1.2.1 Характеристика и структура гена 30
1.2.2 Характеристика и структура белка 32
1.2.3 Вариабельность гена и белка у различных видов боррелий, в том числе и у *B. bavariensis* 38
1.3 Заключение 39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 41
2.1 Материалы 41
2.1.1 Краткая ландшафтно-географическая характеристика природного очага Среднего Урала и сочленов его паразитарной системы 41
2.1.2 Краткая клинико-эпидемиологическая характеристика ИКБ в Пермском крае 41
2.1.3 Сбор материала для изоляции боррелий и их культивирование 42
2.1.4 Депонирование изолятов в музей боррелий, а также создание электронной базы данных и ее государственная регистрация 42
2.1.5 Первичная идентификация изолятов боррелий 44
2.1.6 Выборка изолятов из музея для исследования 44
2.1.7 Дополнительные изоляты для проверки результативности оптимизированного метода мультилокусного сиквенс-анализа (МЛСА) 47

2.2 Методы 47
2.2.1 Экстракция ДНК боррелий 47
2.2.2 Мультилокусный сиквенс-анализ (МЛСА) и типирование (МЛСТ) 48
2.2.3 Амплификация участка гена *p66* 48
2.2.4 Горизонтальный электрофорез в агарозном геле и визуализация результатов 49
2.2.5 Очистка полученных ПЦР-продуктов 50
2.2.6 Секвенирование ПЦР-продуктов 50
2.2.7 Обработка нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, филогенетический и статистический анализ данных 51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 52
3.1 Оптимизация МЛСА 52
3.1.1 Сравнение современных методов видовой идентификации боррелий и обоснование возможности оптимизации МЛСА 52
3.1.2 Подтверждение идентификации изолятов боррелий установленного вида оптимизированным методом МЛСА 62
3.1.3 Контроль результатов первичной «слепой» идентификации изолятов боррелий оптимизированным методом МЛСА 68
3.2 Выбор участка гена *p66* для исследования 80
3.3 Аллельные варианты гена *p66*, кодирующего белок Р66, у изолятов *B. bavariensis* от людей, больных ИКБ 82
3.3.1 Анализ нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* 82
3.3.2 Анализ аминокислотных последовательностей фрагментов белка Р66 88
3.4 Аллельные варианты гена *p66*, кодирующего белок Р66, у изолятов *B. bavariensis* от иксодовых клещей 93
3.4.1 Анализ нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* 93
3.4.2 Анализ аминокислотных последовательностей фрагментов белка Р66 100

3.5 Аллельные варианты гена *p66*, кодирующего белок Р66, у изолятов *B. bavariensis* от мелких млекопитающих – резервуарных хозяев этого возбудителя 106
3.5.1 Анализ нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* 106
3.5.2 Анализ аминокислотных последовательностей фрагментов белка Р66 114
3.6 Анализ встречаемости последовательностей участков гена *p66*, идентифицированных у людей с ИКБ, в контексте циркуляции возбудителя в природном очаге 123
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 132
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 138
ВЫВОДЫ 140
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ 142
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 146
Приложение А Регистрационные номера депонированных и использованных в работе нуклеотидных последовательностей участков различных генов боррелий 172
Приложение Б Свидетельство о государственной регистрации электронной базы данных музея 173
Приложение В Протокол оптимизированного метода МЛСА 174
Приложение Г Дендрограмма аминокислотных последовательностей белка Р66 (93 а.о.) 238 исследованных изолятов. 179

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – группа этиологически самостоятельных хронических и рецидивирующих спирохетозных природно-очаговых трансмиссивных инфекций, способных поражать различные системы и органы [17, 20, 115]. Возбудители заболеваний – комплекс спирохет *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.). Он включает в настоящее время более 20 видов. Патогенность для человека пока установлена у 7 из них: *B. burgdorferi* sensu stricto (s. s.), *B. garinii, B. bavariensis, B. afzelii, B. spielmanii, B. lusitaniae* и *B. mayonii* [109, 196].

В России природные очаги ИКБ распространены в основном в лесной зоне от Прибалтики до Дальнего Востока, а наиболее важное эпидемическое значение имеют *B. afzelii* генетических подгрупп VS461T и NT28, *B. garinii* подгрупп 20047T и NT29. Эту последнюю подгруппу в настоящее время относят к евразийской подгруппе недавно описанного вида *B. bavariensis*. Причем в одной экосистеме обычно циркулируют возбудители разных видов и генетических подгрупп. По уровню заболеваемости на протяжении последних десятилетий ИКБ занимают первое место среди всех природно-очаговых инфекций [20]. Так, по данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2025 году», зарегистрировано 9511 случая ИКБ, что составляло 6,51 на 100 тыс. населения [207].

Для ИКБ характерна персистенция возбудителя в организме и клинический полиморфизм. Начальный этап заболевания нередко проходит в латентной форме, но во многих случаях на месте укуса клеща развивается мигрирующая эритема – единственный патогномоничный признак этого заболевания. Значение ИКБ для инфекционной патологии определяется высокой восприимчивостью человека, риском возникновения бессимптомных и тяжелых форм заболевания, склонностью к хронизации инфекции с развитием осложнений, а также возможностью реинфицирования человека. Боррелии проникают в организм

человека при укусе клеща с его слюной, несколько дней адаптируются к новым условиям существования, локализуясь в коже, внеклеточном матриксе, эндотелии сосудов, а затем они могут диссеминировать в другие ткани и органы [24].

Заболевание характеризуется медленным и слабым антителогенезом. Иммуноглобулины M и G обнаруживаются не ранее 2–3 недели от начала заболевания, что затрудняет раннюю лабораторную диагностику инфекции. Даже при наличии у пациента эритемы, степень выраженности и величина которой могут зависеть от ряда причин, включая сходные кожные проявления иной этиологии, клинический диагноз ИКБ в большинстве случаев нуждается в лабораторном подтверждении [20]. Серологические методы, применяемые с этой целью, характеризуются различными показателями специфичности и чувствительности, которые варьируют в разные сроки от начала заболевания. Так, на ранней стадии ИКБ показатели чувствительности иммуноферментных тестов варьируют от 20 до 50% для IgM и 19–87% для IgG, а специфичность до 70%. На поздней стадии показатели чувствительности и специфичности для таких тестов возрастают: 90% и 95%, соответственно. Они, как правило, наименее эффективны в его первые недели и совершенно безрезультативны в серонегативных случаях (50–70%) [20, 109]. Кроме того, из-за сходства набора у боррелий разных видов поверхностных белков–антигенов выявляемые антитела сами по себе не позволяют судить о видовой принадлежности возбудителя конкретного заболевания. Для подтверждения специфичности антител, обнаруженных простыми серологическими методами, используют иммуноблот (специфичность – до 98%, чувствительность – до 97%), который применяют в качестве дополнительного уточняющего диагностического теста [20, 109]. Но даже он имеет свои недостатки: низкая чувствительность на ранних стадиях ИКБ, вариабельность иммунодоминантных антигенов боррелий, сложная интерпретация результатов из-за наличия перекрестных реакций высокоспецифичных и ряда низкоспецифичных белков боррелий [54].

Молекулярно-биологические методы также применяются в клинико-лабораторной диагностике ИКБ. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

из различных биоматериалов, полученных от пациентов, можно амплифицировать видоспецифичную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) боррелий с последующей видовой идентификацией боррелий. Её клиническая чувствительность при исследовании плазмы крови пациентов варьирует от 30 до 50%, а биоптатов кожи — около 80% [54]. Определение видовой принадлежности боррелий, вызывающих ИКБ, необходимо для быстрой идентификации этиологического агента этого заболевания в практике лабораторной диагностики.

Исторически видовая и внутривидовая гетерогенность боррелий изучалась с помощью серологических методов, а также ДНК-ДНК гибридизации, ПЦР полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР–ПДРФ) межгенного спейсера *rrfA–rrlB* генов 5S и 23S субъединиц рибосомальной рибонуклеиновой кислоты (рРНК) боррелий и др. Данные подходы были стандартом для рутинного типирования до эпохи повсеместного внедрения методов секвенирования [199]. Анализ таких участков, как нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (*rrs*), межгенного спейсера боррелий и других, часто не позволял надёжно различать близкородственные виды из-за высокой степени гомологии [20]. Поэтому в настоящее время для таксономических и этиологических целей, а также при изучении популяционной генетики различных боррелий, используют методы мультилокусного сиквенс-анализа (МЛСА) и сиквенс-типирования (МЛСТ), основанные на анализе нуклеотидных последовательностей набора генов «домашнего хозяйства». Для построения филогенетических дендрограмм в ходе анализа образцов, полученных от клещей или из клинического материала, применяются «сцепленные» нуклеотидные последовательности участков совокупности генов [160], а также отдельные участки (и в комбинации) генов, кодирующих белки внешней поверхности боррелий: OspA, OspC, флагеллин (FlaB) и другие. Специфичность и чувствительность таких ПЦР-методов в разы отличаются в зависимости от стадии заболевания или от места сбора материала для исследования [109].

Циркуляция боррелий в природных очагах экологически связанна с несколькими видами клещей рода *Ixodes* [66, 160]. В России, как и в Евразии в

целом, основные хозяева и переносчики, имеющие решающее значение в циркуляции патогенных боррелий в природных очагах и передаче возбудителей этих заболеваний людям, – таежный (*Ixodes persulcatus* Sch. 1930) и европейский лесной (*I. ricinus* L. 1758) клещи [18, 88, 114]. Прокормителями различных фаз развития этих клещей могут быть позвоночные животные и птицы многих видов. Основные хозяева личинок и важные прокормители нимф иксодовых клещей – мелкие млекопитающие – резервуарные хозяева боррелий. Наибольшее значение в этом отношении в лесной зоне России имеют полевки рода *Myodes* и *Alexandromys*, а также лесные мыши рода *Apodemus* и др. [20].

Схема циркуляции спирохет группы ИКБ в природном очаге основана на цикле развития иксодовых клещей-переносчиков и смене их хозяев по ходу метаморфоза [2, 84]. Жизненный цикл иксодовых клещей включает четыре фазы развития: яйцо, личинка, нимфа и имаго (половозрелая особь). Кроме яйца, все эти стадии включают голодных, питающихся и напитавшихся особей. Общая продолжительность цикла развития генерации в различных условиях составляет от 3 до 6 лет, поскольку такая длительность определяется возможными перерывами в развитии (диапаузами) при переходе в следующую фазу. Активные клещи основную часть времени проводят на приземной растительности в ожидании различных прокормителей [22]. Личинки и нимфы предпочитают кормиться на мелких млекопитающих и птицах, причем нимфы имеют наиболее обширный круг хозяев, включающий более крупных позвоночных, которые прокармливают и имаго [2].

В большинстве случаев клещ заражается боррелиями в результате кормления на млекопитающих – резервуарных хозяев боррелий, у которых инфекционный процесс имеет хронический характер. Они способны длительно быть источником возбудителя для прокармливающихся на них предимагинальных фаз развития иксодовых клещей [163, 197]. Трансовариальная передача (передача возбудителя от зараженной самки потомству) не играет существенной роли в заражении личинок клещей новой генерации [146]. Однако трансфазовая передача (от личинок – нимфам и далее имаго) достаточно эффективна. Считается, что

массово возбудители ИКБ передаются личинкам при их паразитировании на резервуарных хозяевах боррелий. Нимфы, в свою очередь, так же могут инфицироваться и реинфицироваться в процессе питания на резервуарных хозяевах и обеспечивают уровень зараженности произошедших от них голодных имаго [21].

Боррелии успешно размножаются в кишечнике клеща, что позволяет считать их обычными симбионтами иксодовых клещей. В процессе генерализации боррелии проникают в слюнные железы и другие органы клеща. Люди заражаются при инокуляции возбудителя со слюной клеща. На людей нападают главным образом взрослые особи клеща *I. persulcatus*, а среди клещей *I. ricinus* — нимфы и имаго [116]. Достоверные сведения о возможности заражения людей любым другим путем, кроме трансмиссивного, отсутствуют. Однако, возможна трансплацентарная передача боррелий, которая достоверно установлена для возбудителей ИКБ на определенном этапе беременности [175, 184].

К факторам патогенности боррелий в основном относятся их мембранные белки. Они кодируются хромосомными и плазмидными генами, контролирующими три основные функции, необходимые для существования этих возбудителей в организме реципиента [73]:

1) их проникновение (вторжение) в организм потенциального хозяина,
2) выживание и распространение в нем,
3) размножение (развитие инфекционного процесса).

Один из важнейших и ключевых факторов патогенности – белок P66, который относится к первой и второй из этих групп. Он кодируется одноименным хромосомным геном и обеспечивает адгезию возбудителя к клеткам млекопитающих при их инфицировании, а также способствует проникновению боррелий через эндотелий кровеносных сосудов [80, 192]. Белок P66 связывается с антифагоцитарным рецептором SIRPα на поверхности макрофагов, что облегчает уклонение *Borrelia* от иммунного ответа млекопитающих [190]. Эти функции белка P66 облегчают диссеминацию боррелий в организме млекопитающих [122, 166].

Таким образом, существует необходимость совершенствования молекулярных методов идентификации боррелий с целью оптимизации их применения для быстрого определения этиологического агента ИКБ в клинико-лабораторной практике. Актуальность работы определяется слабой изученностью факторов патогенности и кодирующих их генов у недавно описанной *B. bavariensis*, включая исследование гетерогенности гена *p66*.

Степень разработанности проблемы

Для идентификации вида боррелий, принадлежащих к комплексу *B. burgdorferi* s. l. в настоящее время используют методы МЛСА и МЛСТ с высокой дискриминационной способностью [109], поскольку включают в анализ сцепленные нуклеотидные последовательности определенного набора 7–8 консервативных генов [128, 164]. Применительно к видовой идентификации этиологии ИКБ каждый из этих методов имеет определённые особенности. Однако, в практике клинико-лабораторной диагностики ИКБ они времяемки и затратны, что определяет необходимость оптимизации таких подходов с использованием меньшего количества мишеней.

Ранее сотрудниками ФГБУ НИЦЭМ им Н. Ф. Гамалеи был создан музей боррелий на базе Государственной коллекции микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней человека II–IV групп патогенности, который содержит множество первичных изолятов боррелий, полученных из различных источников. В период депонирования таких изолятов в музей их первичная идентификация проводилась методом ПЦР–ПДРФ межгенного спейсера *rrfA–rrlB* [29], который применялся для рутинного типирования боррелий. Так, часть музейных изолятов была отнесена к подгруппе NT29 вида *B. garinii*, таксономический статус которой в настоящее время требует уточнения.

Циркулирующим в природном очаге спирохетам комплекса *B. burgdorferi* s. l. характерна значительная внутривидовая генетическая гетерогенность, которую отражают публикации ряда отечественных и зарубежных авторов. В большинстве из них она посвящена *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* и *B. garinii* [19, 20, 28, 30, 31, 35, 37, 48, 75, 144, 148, 154, 159, 198]. Такая

гетерогенность проявляется на уровне отдельных генов и кодируемых ими соответствующих белков. Так, для белка P66 показано, что его N-концевая поверхностная петля имеет важное значение для присоединения к β1 и β3-цепям интегринов [74], что облегчает диссеминацию боррелий в организме млекопитающих [80, 122, 166]. В отличие от нее, С-концевая поверхностная петля белка P66 является иммунодоминантной [59, 150, 151] и обладает большей генетической гетерогенностью по сравнению с N-концевой. Генетический полиморфизм участка гена *p66*, кодирующего С-концевую петлю белка P66, выявлен у различных видов боррелий, вызывающих ИКБ. У *B. burgdorferi* s. s., например, обнаружено 12 аллельных вариантов [62, 69, 70]; у *B. afzelii* – 7, причем 5 из них циркулировали в одном природном очаге Пермского края [36, 37]. Описана вариабельность нуклеотидных последовательностей гена *p66* у *B. garinii* [103].

Эти данные свидетельствуют о вероятности контакта населения с переносчиком, приводящим к заражению разными вариантами возбудителя ИКБ. Некоторые из них, возможно, имеют повышенную адгезивность, что определяет повышенную инфекциозность возбудителя. Исследование вариантов гена *p66* у изолятов *B. bavariensis* от людей, больных ИКБ, в сравнении с гетерогенностью боррелий этого вида, циркулирующих среди главных компонентов паразитарной системы природного очага (иксодовыми клещами и мелкими млекопитающими) ранее не проводились.

Цель исследования – совершенствование лабораторной идентификации возбудителей ИКБ и анализ полиморфизма структуры гена, кодирующего важный фактор патогенности, на примере *B. bavariensis*, как этиологического агента заболеваний на Среднем Урале.

Задачи исследования:

1. Реидентифицировать образцы *B. garinii* NT29 из музея боррелий лаборатории переносчиков инфекций (на базе Государственной коллекции микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи») для подтверждения их принадлежности к *B. bavariensis* современными методами МЛСТ и МЛСА, а

также проанализировать возможность оптимизации способа видовой идентификации изолятов *B. burgdorferi* s. l., вызывающих заболевания группы ИКБ.

2. Изучить вариабельность участков гена *p66* у изолятов *B. bavariensis*, полученных от пациентов с ИКБ из Пермского края.

3. Изучить вариабельность участков гена *p66* у изолятов *B. bavariensis* от разных фаз развития иксодовых клещей из природного очага, расположенного в том же регионе.

4. Изучить вариабельность участков гена *p66* у изолятов *B. bavariensis* от резервуарных хозяев (мелких млекопитающих разных видов) из того же природного очага.

5. Проанализировать частоту встречаемости различных нуклеотидных последовательностей участков гена *p66*, вызвавших ИКБ у людей, в сравнении с генетической гетерогенностью возбудителя, циркулирующего в природном очаге.

Научная новизна исследования

На репрезентативном пуле первичных изолятов патогенных для человека спирохет *B. bavariensis* впервые показано ее распространение на Среднем Урале.

Впервые изучена гетерогенность гена *p66*, кодирующего одноименный белок – ключевой фактор патогенности *B. bavariensis*, который влияет на возможность адгезии возбудителя к клеткам реципиента и на начало инфекционного процесса. Показано, что частота встречаемости разных аллельных вариантов данного гена неравномерно распределена между источниками выделения. В частности, среди изолятов от людей с ИКБ доминируют аллели №1 и №2 (96,3%). Они также преобладают среди изолятов *B. bavariensis* от основных резервуарных хозяев (69,9%) и от иксодовых клещей (67,2%) – источника заражения людей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы вносят вклад в познание молекулярно-генетических механизмов патогенности возбудителей ИКБ, особенностей структуры и распространения паразитарных систем спирохет *B. bavariensis.*

Предложен оптимизированный метод МЛСА, который может быть применен для идентификации видовой принадлежности боррелий группы *B. burgdorferi* s. l. как этиологического агента заболевания группы ИКБ.

Выявленные аллельные варианты гена *p66,* кодирующие структуру одноименного белка, инфицирующие человека могут быть использованы в качестве кандидатных новых мишеней для создания диагностических и профилактических препаратов.

Нуклеотидные последовательности участков генов, полученных в ходе настоящего исследования, депонированы в международную базу данных GenBank NCBI (Приложение А).

Внедрение полученных результатов в практику

Получено государственное свидетельство (RU 2020621769, 2020 г.) о регистрации электронной базы данных музея боррелий (Приложение Б) лаборатории переносчиков инфекций на базе Государственной коллекции микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней человека II–IV групп патогенности («ГКМ – Гамалеи», Москва), которая может быть использована для дальнейших научных исследований биоразнообразия микроорганизмов рода *Borrelia*, их таксономии, распространения, особенностей биологии, внутривидовой гетерогенности и степени патогенности для человека.

Материалы диссертации включены в методическую рекомендацию: «Идентификация этиологического агента заболевания группы иксодовых клещевых боррелиозов оптимизированным методом мультилокусного сиквенс анализа» (утв. директором Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения России А. Л. Гинцбургом 4 октября 2023 г.).

Материалы диссертационной работы используются в курсах лекций на кафедре инфекционных болезней лечебного факультета ФГБОУ ВО «Пермского государственного медицинского университета имени академика Е. А. Вагнера».

Методология и методы исследования

Методологией исследования является экспериментальный анализ участка гена *p66* боррелий с использованием комплекса современных микробиологических, культуральных, молекулярно-биологических и экологических методов. Данные анализированы с помощью сервиса BLAST, компьютерных программ Chromas, UGENE, Jalview и MEGA11. Для оценки полученных результатов применены классические методы описательной статистики с применением программы GraphPad Prism 8.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Паразитарные системы возбудителя ИКБ *B. bavariensis*, наряду с *B. afzelii* и *B. garinii*, широко распространены в Евразии.

2. Практическая лабораторная видовая идентификация изолятов патогенных боррелий *B. burgdorferi* s. l. от компонентов их паразитарных систем, или вызвавших конкретное заболевание группы ИКБ, возможна оптимизированным МЛСА по специфичности результата сиквенс-анализа сцепленных нуклеотидных последовательностей двух генов (*recA* и *ospA*) из семи, рекомендованных полным протоколом этого метода.

3. В природном очаге ИКБ, вызываемого *B. bavariensis*, циркулируют несколько аллельных вариантов гена *p66*, кодирующего фактор патогенности этого возбудителя – белок P66. При передаче боррелий по эпизоотической цепи у изолятов от ее двух основных компонентов: (иксодовых клещей – переносчиков и мелких млекопитающих – резервуарных хозяев) набор разных аллельных вариантов и их количественное соотношение не изменяется. На всех этапах циркуляции возбудителя, включая зараженных клещей как единственного пути передачи инфекции человеку, существенно преобладают два (из 12) его аллельные варианта.

4. Два эти аллеля, доминирующие в паразитарной системе *B. bavariensis* и обнаруженные у изолятов от людей, больных ИКБ, имеют существенные отличия от остальных аллелей в последовательности нуклеотидов гена *p66*, которые приводят к трем аминокислотным заменам (S497A, E508G и

I513T с изменениями их полярности). Это возможно могло повлиять на конформацию белка P66, что усилило адгезивные свойства этих генетических вариантов возбудителя по сравнению с остальными.

Степень достоверности результатов

Работа была проведена с использованием современных методов, соответствующих поставленным целям и задачам. Было проведено достаточное количество экспериментов и наблюдений. Полученные в результате работы данные статистически обработаны методами, позволяющими проводить анализ данных в биологических исследованиях. Представленные в диссертации научные положения, обсуждения результатов и выводы обоснованы, подтверждены фактическим материалом.

Апробация результатов

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 1 российской (XII Съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 2022), на 5 международных (VII Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи, 2020; Международная научно-практическая конференция «Новое в диагностике, лечении и профилактике социально значимых инфекций», Уфа, 2022 г; Международная научно-практическая конференция «Актуальные природно-очаговые инфекции», Иркутск, 2023 г; X Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи, 2023; XI Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика», Москва, 2023) и на 1 зарубежной (XIVth International symposium on ticks and tick-borne diseases, Jena, Germany, 2021) научных конференциях.

В завершенном виде работа была апробирована и рекомендована к защите на научной конференции отделов природноочаговых инфекций и медицинской микробиологии (протокол № 1 от 27 февраля 2026 г.) ФГБУ «Национальный

исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Декларация личного участия автора

Разработка методологии данного исследования проводилась автором самостоятельно. Сбор биоматериалов и изоляция спирохет, хранящихся в музее боррелий, для генетических исследований осуществлен сотрудниками лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» (Гореловой Н. Б., к.б.н. Ковалевским Ю. В., д.б.н. Коренбергом Э. И., к.б.н. Нефедовой В. В.) и кафедры инфекционных болезней Пермского государственного медицинского университета им. Е.А. Вагнера (д.м.н. Воробьевой Н. Н.).

Выделение ДНК, дизайн праймеров, подбор смеси и режима реакции для ПЦР, проведение ПЦР, очистка продуктов амплификации, подготовка продуктов для секвенирования проводились автором лично и частично сотрудником лаборатории переносчиков инфекций Крупинской Е. С.

Ампликоны секвенированы сотрудниками Межинститутского Центра коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, URL: http://www.genome-centre.ru). Все последующие этапы работы, включая филогенетический анализ результатов секвенирования, проведены автором лично.

Анализ и обсуждение полученных результатов также выполнены лично автором; самостоятельно или при непосредственном участии автора подготовлены публикации по материалам исследования. Суммарное личное участие автора в выполненных работах составляет не менее девяноста процентов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности 1.5.11 – «Микробиология»

Основные научные положения диссертации соответствуют пунктам 1, 3 и 12 паспорта научной специальности 1.5.11 – «Микробиология».

Публикации

Материалы диссертации изложены автором в 9 печатных работах, из которых 5 опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК для публикации к защите, и 1 – в Scopus/WoS.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 179 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, а также заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (207 источников, из которых отечественных публикаций – 43, иностранных публикаций – 164) и 4 приложений. Работа содержит 16 таблиц и 35 рисунков.

Благодарности

Автор приносит благодарность своим коллегам – сотрудникам лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» к.б.н. Ковалевскому Ю. В., Гореловой Н. Б., Крупинской Е. С. и Сироткину М. Б. за советы и помощь в обработке материалов.

Автор благодарен заведующей кафедрой инфекционных болезней Пермского государственного медицинского университета им. академика Е. А. Вагнера д.м.н. проф. Воробьеве Н. Н., а также сотрудникам Городской Пермской клинической инфекционной больницы №1 за предоставленные клинико-диагностические данные больных ИКБ.

За помощь в секвенировании изолятов боррелий автор благодарит сотрудников ЦКП «Геном» ИМБ РАН им. В. А. Энгельгардта, особенно к.б.н. Матросову В. А.

Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю заслуженному деятелю науки РФ, проф., д.б.н. Коренбергу Эдуарду Исаевичу за неоценимую поддержку и помощь на всех этапах подготовки диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика *Borrelia bavariensis* как одного из этиологического агента ИКБ в России

1.1.1 Основные черты морфологии, биологии и генетики *B. bavariensis*

Borrelia bavariensis – один из возбудителей ИКБ не только в России, но и во всем мире [20, 30, 32, 131, 132]. По морфологическим особенностям *B. bavariensis* не отличается от других видов рода *Borrelia* (Рисунок 1). Это грамотрицательные бактерии длиной от 8 до 30 мкм и шириной 0,2–0,5 мкм, имеющие спиральную форму и периплазматические флагеллы. Они представляют собой извитую, лево- или правовращающуюся спираль, способную к активным возвратно-поступательным или вращательным движениям. Спор и капсул не образуют [112].

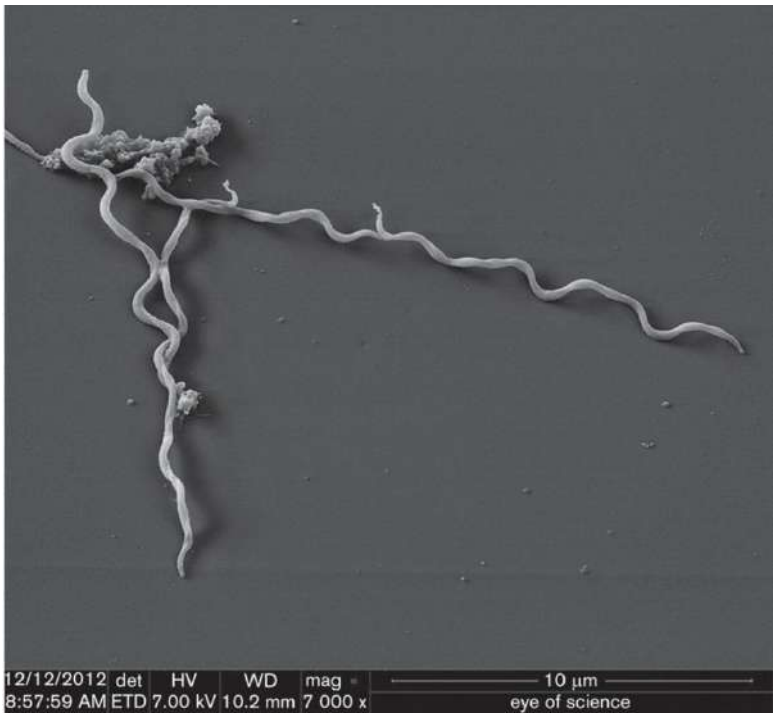


Рисунок 1 – Морфология типового штамма PBi *B. bavariensis* (RefSeq GCA_000196215) (электронная микроскопия) [131].

Для поверхностной структуры боррелий характерна внешняя мембрана вокруг протоплазматического цилиндра, который включает слой пептидогликана, цитоплазматическую (внутреннюю) мембрану и периплазматическое

пространство (Рисунок 2). Внешняя клеточная мембрана состоит из белков, липидов и углеводов. Во внешней мембране практически нет липополисахарида, в основном присутствуют гликолипиды. В периплазматическом пространстве боррелий разных видов находятся 7–11 биполярных флагелл, которые одним концом прикреплены к микробной клетке и завернуты вокруг клеточного цилиндра. Их сокращение обеспечивает вращательные движения боррелий [169]. Активная подвижность способствует проникновению боррелий в организм хозяина и их дальнейшему распространению по органам и тканям, т. е. играет важную роль в патогенезе заболевания [24].

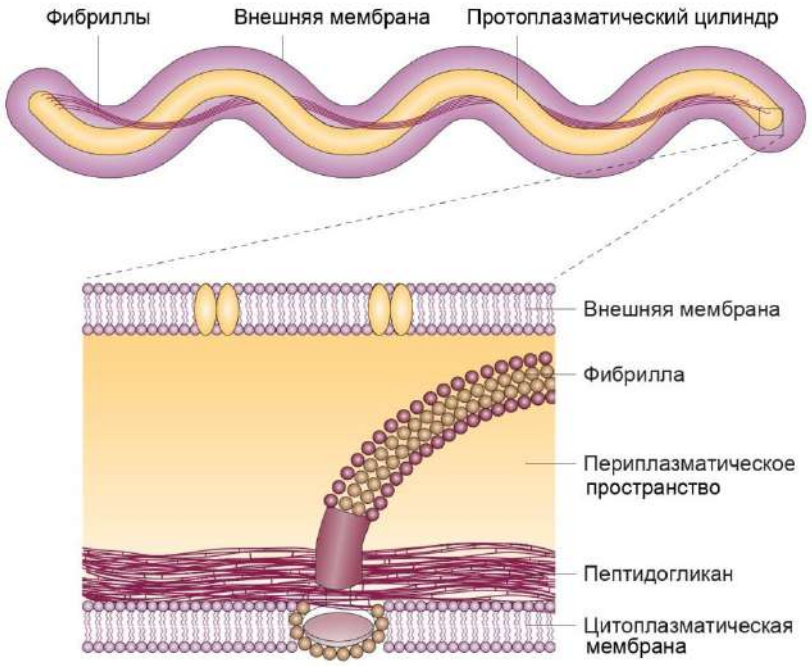


Рисунок 2 – Морфология поверхностной структуры боррелий [169].

Для поддержания нормальной жизнедеятельности боррелиям, в том числе *B. bavariensis*, необходим организм хозяина [24]. Они испытывают недостаток ферментов, необходимых для цикла трикарбоновых кислот и фосфорилирования. Поэтому боррелии не обладают способностью синтезировать аминокислоты, жирные кислоты, кофакторы ферментов и нуклеотиды. Для клеточной стенки им необходим N-ацетилглюкозамин, который может также выступать в качестве источника энергии [20]. Для культивирования боррелий обычно используют

жидкие среды, обогащенные аминокислотами, питательными веществами и витаминами [47]. Эти бактерии относятся к числу микроаэрофилов, а время их максимального роста при культивировании составляет около 4-х недель [45]. Выделенные изоляты боррелий замораживают и хранят в глицероле при температуре –70°С, поскольку при многочисленных пересевах они могут потерять свою вирулентность [20]. Известны эксперименты культивирования боррелий на клеточных линиях клещей и на лабораторных животных: белоногих *Peromyscus leucopus* Rafinesque 1818 и золотистых *Mesocricetus auratus* Waterhouse 1839 хомячках; монгольских песчанках *Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867; беспородных или линейных мышах; морских свинках и кроликах) [24].

Генетическая организация боррелий уникальна. Например, у типового штамма B31T *B. burgdorferi* s. s. (номер доступа в GenBank NCBI RefSeq GCF_000008685) обнаружены относительно небольшая линейная хромосома размером около 910725 пар нуклеотидов (п.н.), а также до 12 линейных и 9 кольцевидных плазмид (суммарно около 610700 п.н.) [90]. Внехромосомный (плазмидный) феномен геномного кодирования, а также большое количество линейных и кольцевых плазмид выделяют боррелий среди других прокариот. Число плазмид, их молекулярные размеры и состав генов значительно различаются у разных видов и даже штаммов при их длительном пассаже.

У *B. bavariensis* в настоящий момент доступен полностью расшифрованный геном 17 штаммов (в том числе и у эталонного штамма PBi – номер доступа в GenBank NCBI RefSeq GCA_000196215), а также реконструкции геномов 30 штаммов этого вида. По этим данным, *B. bavariensis* содержит линейную хромосому размером от 891700 до 1318000 п.н., а также 7–9 линейных и 3–9 кольцевидных плазмид. Геном хромосомы *B. bavariensis* демонстрирует высокую консервативность, но, в то же время характеризуется большим разнообразием среди штаммов по содержанию плазмид [53, 92].

Структура генов рРНК боррелий группы ИКБ, локализованных в центральной части хромосомы, уникальна. У *B. bavariensis* (как и у других видов *B. burgdorferi* s. l.) она содержит две копии 5S рРНК (*rrf*) и 23S рРНК (*rrl*) генов,

которые представлены короткими тандемными повторами, и единственную копию 16S рРНК (*rrs*) гена [91, 153].

Как упоминалось ранее, все боррелии морфологически идентичны, что потребовало разработки методов их дифференциации. Изначально для этого применяли серотипирование по поверхностным белкам OspA и OspC, а также мультилокусный ферментный электрофорез. Затем на смену пришли новые методы, такие как ДНК-ДНК гибридизация, риботипирование (анализ рестрикционных фрагментов генов рРНК), гель-электрофорез хромосомной ДНК в пульсирующем поле, анализ плазмидного профиля боррелий и др. С внедрением ПЦР в исследовательскую практику появились новые подходы, такие как ПЦР-ПДРФ межгенных спейсеров *rrs–rrlA* или *rrfA–rrlB* рРНК генов боррелий. Эти методы долгое время служили (и служат до сих пор) стандартом для рутинного типирования боррелий вплоть до наступления эпохи массового секвенирования, которая открыла возможность прямого исследования нуклеотидных последовательностей — спейсеров, генов *rrs, fla, ospA, ospC* и других [198, 199]. Нуклеотидные последовательности межгенного спейсера *rrfA–rrlB* (длиной от 222 до 266 п.н.), а также гена *rrs* отличаются высокой вариабельностью, что сделало их одним из ключевых признаков при изучении видовой и внутривидовой таксономии комплекса *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Впрочем, у близкородственных видов эти последовательности могут демонстрировать значительное сходство [20]. С появлением современных высокоточных технологий основными инструментами стали методы мультилокусного сиквенс-анализа и типирования (МЛСА и МЛСТ), полногеномное секвенирование и др. Их высокая дискриминационная способность лежит в основе современных таксономических исследований боррелий [109, 199].

Для идентификации вида боррелий, принадлежащих к комплексу *B. burgdorferi* s. l. в настоящее время используют методы МЛСА и МЛСТ, основанные на анализе сцепленных нуклеотидных последовательностей некоторого количества генов «домашнего хозяйства» [160]. На основе этих данных для интерпретации результатов строят дендрограммы с помощью

различных программ или платформ. Применительно к видовой идентификации этиологии ИКБ каждый из этих методов имеет определённые особенности. Так, метод МЛСА включает анализ сцепленных нуклеотидных последовательностей коротких участков (от 156 до 522 п.н.) 6 консервативных генов (*rrs, hbb, groEL, recA, fla, ospA*) и участка межгенного спейсера *rrfA–rrlB* боррелий. Их общая сцепленная длина составляет не более 2100 п.н. Для амплификации ДНК рекомендована обычная однораундовая ПЦР [164].

Методом МЛСТ рекомендован анализ последовательностей нуклеотидов участков (от 564 до 651 п.н.) иного набора 8 консервативных генов (*clpA, clpX, nifS, pepX, pyrG, recG, rplB* и *uvrA*). В зависимости от источника и концентрации ДНК для амплификации продукта используют однораундовую или двухраундовую ПЦР. При высокой начальной концентрации ДНК в амплифицируемом материале (например, в культуре боррелий) ограничиваются однораундовой ПЦР, а при низкой (например, у клещей) – прибегают к двухраундовой. Поскольку метод учитывает различия в точечных мутациях последовательностей, их необходимо секвенировать для сравнения в прямом и обратном направлениях. Для анализа используют сцепленные нуклеотидные последовательности общей длиной почти 4800 п.н. [128]. Обе описанные методические схемы применяются исследователями [30, 104, 129], но для таксономических целей рекомендована схема МЛСТ, поскольку она включает более длинные фрагменты большего числа консервативных генов [109].

Для боррелий характерна значительная генетическая гетерогенность, проявляющаяся как между разными видами, так и на внутривидовом уровне [130, 155]. Так, база данных PubMLST (URL: https://pubmlst.org) содержит около 1143 сиквенс-типов (ST), относящихся к комплексу *B. burgdorferi* s. l. Идентификация сиквенс-типа осуществляется по результатам МЛСТ генов «домашнего хозяйства» [129]. Их исследование демонстрирует высокий уровень аллельного полиморфизма (URL: https://pubmlst.org на декабрь 2025 г.), например: *clpA* (343 аллеля), *clpX* (307), *nifS* (268), *pepX* (301), *pyrG* (309), *recG* (340), *rplB* (296) и *uvrA* (307). У различных видов боррелий и их сиквенс-типами встречаются случаи

сходства нуклеотидных последовательностей аллелей этих генов. Например, идентичные аллели гена *clpA* обнаружены у следующих пар видов: *B. afzelii* и *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* и *B. lusitaniae*, а также *B. garinii* и *B. valaisiana*.

Как и другие виды боррелий, *B. bavariensis* имеет ряд поверхностных белков, участвующих в развитии инфекционного процесса (поверхностный мембранный протеин OspC и порин P66, декорин-, ламинин-, фибронектин-связывающие белки DbpA, BmpA, BBK32, VlsE липопротеины, белки BGA66 и BGA71, связывающие факторы комплемента C-белки, а также другие) [20, 55, 73, 100, 109, 120, 174]. Кроме белков, необходимых для инфицирования млекопитающих, у боррелий имеются белки, необходимые для их существования в организме клеща: OspA, связывающий белок TROSPA кишечника клещей, что позволяет этим бактериям колонизироваться в нем; OspB, OspD, и BptA, способствующие их адаптации к условиям внутренней среды клещей, а также выживанию и персистенции в таких членистоногих – переносчиках [20, 109, 110, 160, 174].

1.1.2 История описания вида

В начале 80-х гг. XX века R. Johnson с соавторами методом ДНК–ДНК гибридизации впервые описали новый вид *B. burgdorferi*, вызывающий болезнь Лайма [112]. Долгое время считалось, что в Северной Америке и Европе подобные клинически сходные заболевания вызываются только этим этиологическим агентом. Однако в 1992 году G. Baranton с коллегами описали 2 новых вида патогенных боррелий, близких к *B. burgdorferi*: *B. garinii* и генетическую группу VS461, позднее названную *B. afzelii* [44, 67]. Затем было показано, что *B. garinii,* широко распространенная только в Евразии, имеет две генетические подгруппы: 20047T и NT29 [135, 154].

По результатам анализа ПЦР полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и по степени сходства нуклеотидных последовательностей спейсера *rrfA–rrlB* 227 первичных изолятов и 71 ампликонов базы данных GenBank NCBI

B. garinii Нефедова с соавторами выявили значительную внутривидовую гетерогенность этих боррелий [29]. Установлено, что внутри двух описанных ранее генетических подгрупп (20047 и NT29) этот вид имеет не менее 16 генетических вариантов, из которых только 3 принадлежали подгруппе NT29: № 1, 2 и 3 (Рисунок 3). Показано широкое распространение обоих генетических подгрупп *B. garinii* как в России, так и в ближайших странах СНГ [29].

Помимо генетических методов типирования *B. garinii*, использовали также серологические. Так, в 1993 году у *B. garinii* обнаружили 5 различных серотипов поверхностного белка OspA [201, 203], причем обнаружено, что боррелии, подобные штамму PBi от клещей *I. ricinus* из Западной Европы, содержали только OspA 4-го типа [203], а боррелии, сходные со штаммами 20047T и NT29 от клещей *I. persulcatus* из Восточной Европы и Азии, содержали иные варианты белка OspA [119, 135, 139]. Раньше считалось, что резервуарными хозяевами восточно-европейских вариантов являются птицы [89, 193, 203], а другого варианта – грызуны [106, 107]. Боррелии *B. garinii* генетической подгруппы NT29 выделяли только от клещей *I. persulcatus*, но не от клещей *I. ricinus*. Но, у обоих этих видов клещей были обнаружены *B. garinii* подгруппы 20047T. На этом основании был сделан вывод, что *B. garinii* NT29 связана только с *I. persulcatus* [119, 155].

В 2009 году G. Margos с соавторами мультилокусным сиквенс-типированием (МЛСТ) изолятов по их восьми консервативным хромосомным генам “домашнего хозяйства” показали, что боррелии *B. garinii* 4-го серотипа белка OspA [203] генетически отличаются от остальных серотипов [129]. Резервуарными хозяевами для этой внутривидовой подгруппы боррелий являются грызуны [105, 107], в то время как циркуляция других подгрупп связана с птицами [82, 101, 193]. На этом основании, авторы предложили *B. garinii* 4 серотипа OspA выделить в отдельный вид *B. bavariensis* с типовым штаммом PBi, изолированным в 1984 году из спинномозговой жидкости пациента с нейроборрелиозом в Баварии, Германия [128, 129]. Исследования изолятов, подобных штаммам PBi и NT29, подтвердили статус *B. bavariensis* как нового

вида комплекса *B. burgdorferi* s. l., а в 2013 году она получила официальное признание с возможным разделением на «азиатскую и европейскую субпопуляции» (по терминологии авторов) [131].

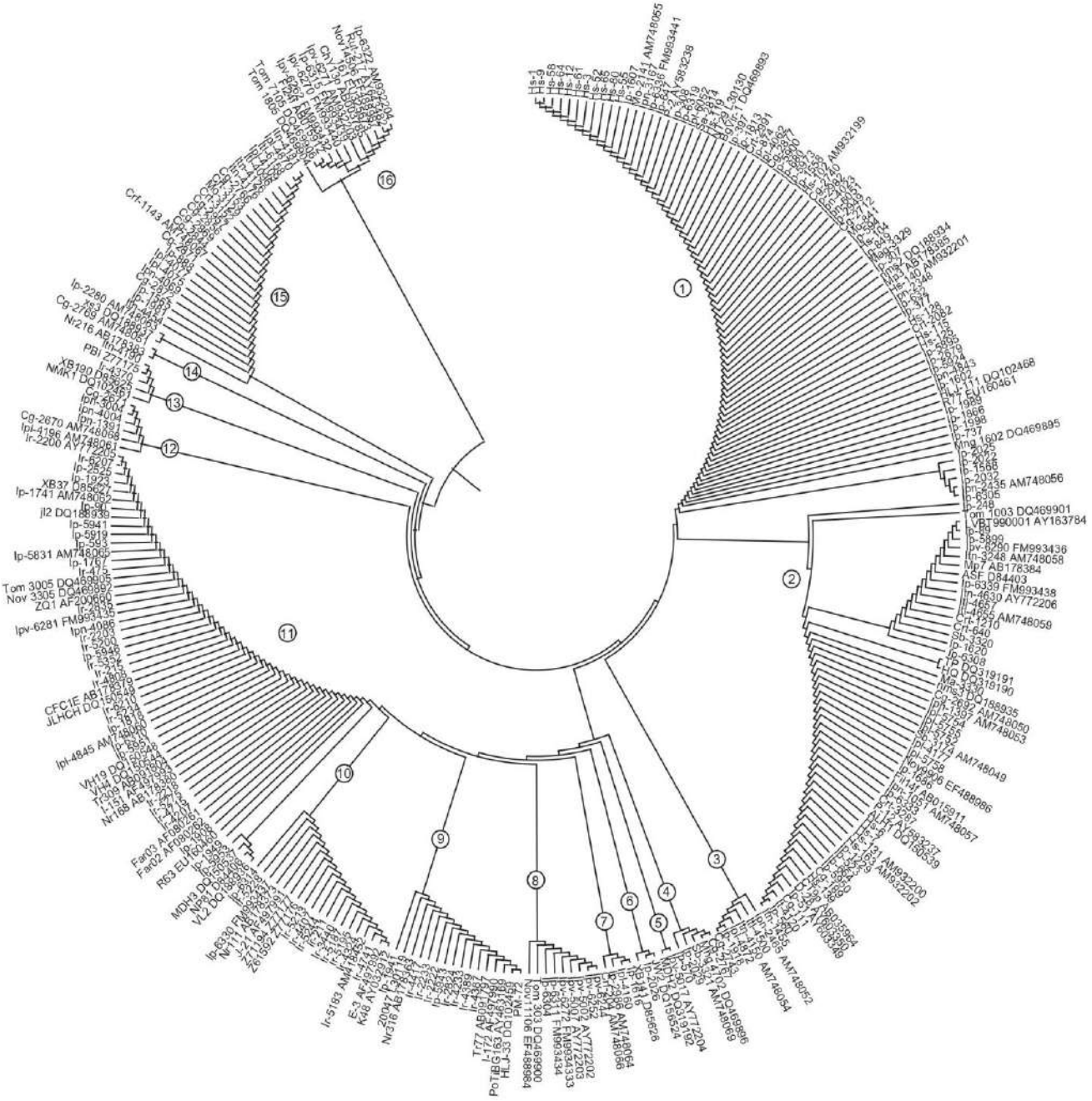


Рисунок 3 – Дендрограмма UPGMA 298 исследованных изолятов и штаммов *B. garinii* из базы данных GenBank NCBI, построенная на основании сходства нуклеотидных последовательностей участка *rrfA–rrlB*. Указаны маркировка, номера изолятов и номера доступа GenBank NCBI. Цифры в кружках – порядковые номера кластеров (геновариантов). Номера кластеров подгруппы NT29: 1–3 [29].

1.1.3 Переносчики и резервуарные хозяева *B. bavariensis*

Как было отмечено выше, для обеих генетических подгрупп *B. bavariensis* определены следующие переносчики: *I. ricinus* и *I. persulcatus* [30, 119, 129, 131, 132, 136, 155, 172, 176, 189]. Помимо них, *B. bavariensis* обнаружена у клещей *I. trianguliceps* Birula 1895 [118, 119]. ДНК боррелий этого вида выявлена у клещей *I. pavlovskyi* Pomerantsev 1946 [161], *I. uriae* White 1852 [143], а также у гибридов клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* [162].

Резервуарные хозяева европейской и евразийской генетических подгрупп *B. bavariensis* – мелкие млекопитающие, в основном грызуны [106, 107, 119, 123, 129, 131, 132, 189]. Среди них *B. bavariensis* обнаружена у рыжей полевки *Myodes glareolus* Schreber 1780 [96, 155], европейской лесной *Sylvaemus sylvaticus* Linnaeus 1758 и желтогорлой мышей *S. flavicollis* Melchior 1834 [193], красно-серой полевки *Craseomys rufocanus* Sundevall 1846 [134], лесной мышовки *Sicista betulina* Pallas 1779 [30]. ДНК *B. bavariensis* обнаружена в Европе [111, 183, 194] у ежей двух видов (*Erinaceus roumanicus* Barrett-Hamilton 1900 и *E. europaeus* Linnaeus 1758). В лабораторных условиях клещи *I. ricinus* передавали *B. bavariensis* мышам линии BALB/c [106].

1.1.4 Распространение *B. bavariensis* и клинические проявления вызываемых заболеваний

Боррелии группы ИКБ экологически и коэволюционно наиболее тесно связаны с ограниченной группой видов иксодовых клещей рода *Ixodes* [88, 114], и распространены в умеренных зонах Северного полушария (Рисунок 4) [130].

B. bavariensis распространена в лесных зонах Европы [92, 130, 131] и Азии [30, 141, 176, 189]. Также этот вид был обнаружен в Канаде [143]. Природные очаги ИКБ широко распространены в лесной зоне России, где находится значительная или даже большая часть мирового ареала ИКБ [115]. Его границы и основные черты распределения природных очагов в Евразии, определяются

границами распространения и особенностями размещения основных переносчиков *B. bavariensis* клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Лесной клещ предпочитает преимущественно умеренно-гигрофильные и мезофильные биотопы в равнинных, горных широколиственных и смешанных лесах. Таежный клещ распространен главным образом в различных вариантах тайги, в широколиственно-хвойных, широколиственных и некоторых лесостепных лесах [20].

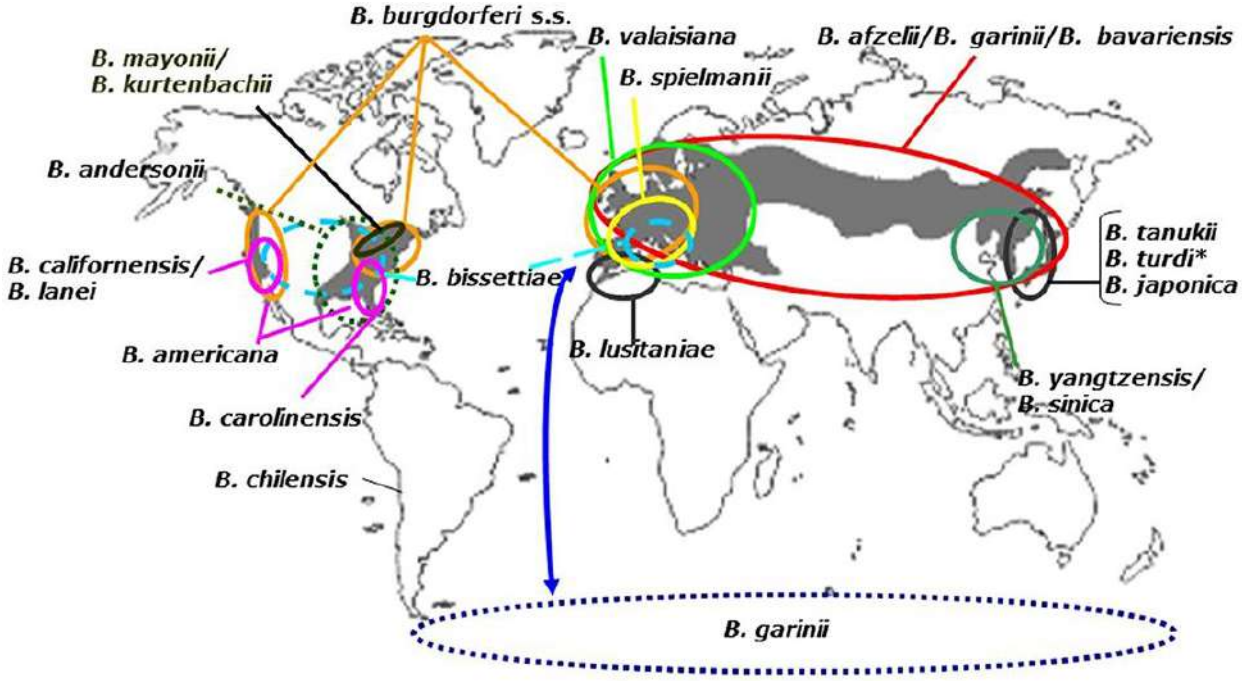


Рисунок 4 – Распространение боррелий группы *B. burgdorferi* s. l. [132].

По данным Федерального центра Роспотребнадзора, к настоящему времени случаи заболеваний этими инфекциями регистрируют в 69 субъектах Российской Федерации от Прибалтики до Дальнего Востока и Южного Сахалина (URL: https://www.rospotrebnadzor.ru).

ИКБ, возбудителями которых являются патогенные виды *B. burgdorferi* s. l., имеют ряд клинико-патогенетических особенностей: способность возбудителя длительно персистировать в организме, поражение различных систем и органов (сердечно-сосудистую, нервную системы, кожу, опорно-двигательный аппарат), формирование хронических и бессимптомных форм заболевания, а также

стадийность инфекционного процесса [20]. По мнению некоторых исследователей, ревматические поражения связаны с *B. burgdorferi* s. s., кожные — вызывает *B. afzelii*, а нарушения нервной системы — *B. garinii* и *B. bavariensis* [1, 13, 26, 40, 51, 68, 76, 111, 186, 187, 202]. В действительности все этиологически различные заболевания группы ИКБ имеют сходные списки клинических проявлений, которые отличаются частотой их встречаемости [20].

Как уже описано выше, *B. bavariensis* получила статус вида с типовым штаммом PBi, который был выделен от пациента с нейроборрелиозом в 1984 году [129, 131]. Исследования большинства европейских изолятов, выделенных из ликвора, показали поразительную корреляцию между нейроборрелиозом и инфицированием *B. garinii* штаммами OspA серотипа 4 (сейчас *B. bavariensis*) [203]. Однако затем подобные PBi штаммы были также получены из кожных биоптатов, плазмы крови и синовиальной жидкости пациентов [4, 31, 40, 129, 131, 189, 195]. Отмечено, что при инфекции, вызванной *B. bavariensis*, у людей проявляются различные симптомы, включая мигрирующую эритему или более тяжелые состояния, такие как артрит или нейроборрелиоз [92, 133]. Поэтому, как и другие патогенные боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l., *B. bavariensis* может вызывать ИКБ с различными клиническими проявлениями.

1.1.5 Внутривидовая гетерогенность *B. bavariensis*

В настоящее время вид *B. bavariensis* включает по терминологии авторов европейскую и азиатскую подгруппы [131, 132, 176, 189]. К европейской подгруппе относятся в основном боррелии, близкие к типовому штамму PBi, распространенные в Европе и циркулирующие в природных очагах возможно только с основным переносчиком – клещом *I. ricinus* [89, 93, 182]. К азиатской подгруппе отнесены боррелии, считавшиеся ранее генетической подгруппой NT29 *B. garinii*. По особенностям распространения ранее она была названа евразийской [30], что позволяет нам придерживаться этой терминологии. Евразийская подгруппа *B. bavariensis* широко распространена в Евразии и пока

обнаружена только в природных очагах с основным переносчиком – клещом *I. persulcatus* [30, 93, 119, 132, 136, 189]. На территории России также была обнаружена европейская геномная подгруппа *B. bavariensis* у клеща *I. ricinus* [30]. Тем не менее, важно отметить, что до сих пор нет прямых доказательств о специфичности связи клещей разных видов с различными генетическими подгруппами *B. bavariensis*. Однако в Эстонии в зоне симпатрии таежного и лесного клещей *B. bavariensis* евразийской подгруппы обнаружена только у *I. persulcatus* [93].

У *B. bavariensis* евразийская и европейская генетические подгруппы различаются качественным и количественным составом плазмид, причем европейская считается менее разнообразной [53, 92, 141, 176]. Хотя хромосомы двух подгрупп консервативны, качественный состав их плазмид сильно варьирует. Так, количество плазмид было значительно выше у изолятов евразийской подгруппы (от 10 до 18) по сравнению с европейской (от 8 до 13). Кроме того, нуклеотидные последовательности генов плазмиды cp32, кодирующие OspA, OspB и OspC, демонстрировали более высокое разнообразие у изолятов евразийской подгруппы, что, вероятно, указывает на азиатское происхождение *B. bavariensis* [53, 176].

Филогеографический анализ генетических и геномных данных ареала *B. bavariensis* показал, что недавно произошло его расширение и вторжение вида в Европу из области своего вероятного первоначального распространения в Азии. Разделение между *B. garinii* и *B. bavariensis*, по оценкам исследователей, произошло около 137 000 генераций назад, а между двумя генетическими подгруппами *B. bavariensis* – 92 000 [52]. Предполагают, что расширение ареала боррелий этого вида совпало с его адаптацией к новому переносчику в Европе – клещу *I. ricinus* и переходом от азиатского переносчика – клеща *I. persulcatus* [52, 92, 132]. Данная гипотеза подтверждается результатами исследований по гену *ospA*. Так, европейские штаммы этого вида экспрессируют белок OspA 4 серотипа, который не обнаружен у евразийских штаммов [92]. Помимо

последовательностей гена *ospA*, кодирующих серотипы 1–8 OspA, у *B. bavariensis* обнаружены 2 дополнительных варианта структуры гена *ospA* [126].

В соответствии с современной таксономией боррелий, использующей МЛСТ, среди *B. bavariensis* обнаружен 61 сиквенс-тип (STs). К европейской подгруппе этого вида относятся только 3 из них (ST84, ST85 и ST974), а остальные 58 – к евразийской (база данных «Borrelia spp. PubMLST», URL: https://pubmlst.org на декабрь 2025 г.). Результаты исследований набора генов «домашнего хозяйства», рекомендованных методом МЛСТ, демонстрируют высокий уровень аллельного полиморфизма, например: *clpA* (31 аллель), *clpX* (34), *nifS* (26), *pepX* (26), *pyrG* (29), *recG* (31), *rplB* (28) и *uvrA* (33). У различных штаммов *B. bavariensis* и их сиквенс-типами встречаются случаи сходства нуклеотидных последовательностей аллелей этих генов. Так, например, 41-ая аллель гена *clpA* обнаружена у 50 штаммов боррелий этого вида.

Таким образом, на сегодняшний день внутрипопуляционная гетерогенность *B. bavariensis* остается недостаточно изученной и требует дальнейших исследований.

1.2 Ген *p66* и одноименный белок как фактор патогенности *B. bavariensis*

1.2.1 Характеристика и структура гена

Белок P66 молекулярной массой около 66 кДа выявлен в 80-е годы XX века. Исследования показали, что он связан с бактериальной внешней мембраной и участвует в процессах формирования иммунитета к возбудителю инфекции [45, 77]. Изучение гена *p66* началось с работ под руководством J. Bunikis в 1995 году. Существенных различий в длине нуклеотидных последовательностей гена *p66*, аминокислотных последовательностей экспрессируемого белка P66, а также его молекулярной массе и уровне экспрессии у *B. burgdorferi* s. s. типового штамма B31, *B. afzelii* ACAI и российского (дальневосточного) штамма *B. garinii* Ip-90 не обнаружено [65].

Исследования показали, что ген *p66* локализован в линейной хромосоме боррелий, а его длина у *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* и *B. garinii* варьирует от 1854 до 1863 п.н. Нуклеотидные последовательности гена *p66* этих боррелий сходны на 90–100% [65]. По данным базы GenBank NCBI, длина гена *p66* у *B. burgdorferi* s. l. варьирует от 1854 до 1999 п.н. Длина кодирующей последовательности гена (cds) *p66* типового штамма PBi *B. bavariensis* (RefSeq GCA_000196215) составляет 1866 п.н. У других штаммов этого вида боррелий длина гена идентична, но есть 2 исключения: у штаммов европейской подгруппы *B. bavariensis* A104S (CP058812) и N346 (JACGTR010000001) длина составила 1865 и 1869 соответственно.

Для гена *p66* принято обозначение «BG_RS03000» (GenBank NCBI), а также «BB0603» (Институт геномных исследований, США (TIGR)). Он локализован между геном, кодирующим J-домен белка-шаперона, и геном, кодирующим L-лактат пермеазу (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Схематичное расположение гена *p66* (оранжевая стрелка) у референсного штамма PBi *B. bavariensis* по данным базы GenBank NCBI (RefSeq GCA_000196215). Красными треугольниками показано направление транскрипции генов на линейной хромосоме боррелий.

Рамка считывания гена *p66* начинается со старт кодона ATG, перед которым в 7 п.н. находился консенсусный рибосомный сайт связывания GGAAGG, который присутствовал у *B. burgdorferi* s. s. B31, *B. afzelii* ACAI и *B. garinii* Ip-90 [65]. Анализ удлинения праймеров матричной РНК *B. burgdorferi* B31 выявил сайт начала транскрипции на остатке G в 116 п.н. выше от стартового кодона ATG. За

стоп-кодоном TAA следовала rho-независимая терминаторная последовательность. Консенсус – 35 (TTGAAT) и – 10 (TAATAT) σ^{70}-подобные промоторные области расположены в 30 и 9 п.н. выше от транскрипционного старт-сайта. Это картирование сайта запуска транскрипции показало, что экспрессия *p66*, по-видимому, находится под контролем σ^{70}-зависимого промотора [65]. Также обнаружено, что белок Hbb связывается с промоторной областью гена *p66*, и это связывание приводило к снижению экспрессии белка P66 [138].

Различия в структуре гена *p66* учитывают при видовой идентификации боррелий, а также при изучении их внутривидовой гетерогенности [36, 62, 70, 147, 170, 171], включая исследования клинических образцов [140, 156, 178].

1.2.2 Характеристика и структура белка

Исследования J. Bunikis с соавторами показали, что аминокислотные последовательности белка P66 у *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* и *B. garinii* содержали в своем составе 597 до 600 аминокислот [65]. По базе данных UniProt (URL: https://www.uniprot.org) аминокислотные последовательности белка P66 спирохет рода *Borrelia* содержат от 528 до 621 аминокислотных остатков (а.о.). Количество аминокислот в последовательностях белка P66 типового штамма PBi *B. bavariensis* (AAU07452) составляет 621. У других штаммов этого вида боррелий длина аминокислотной последовательности одинакова, но есть 2 исключения: у европейской подгруппы *B. bavariensis* штамма N346 (WP215540514) длина составила 622 а.о., за счет вставки аланина после позиции 502, а у штамма A104S произошел сдвиг рамки считывания, что привело к стоп-кодонам, поэтому такая аминокислотная последовательность отсутствует.

Компьютерное моделирование выявило потенциальный сайт расщепления лидерной пептидазы I, находящийся между аминокислотными остатками в положении 21 и 22, и лидерный пептид, имеющий гидрофобное ядро. Кроме того, выявлена одиночная трансмембранная спираль в районе от 492 до 517 а.о. Этот

фрагмент соединяет N- и С-концевые внутримембранные домены белка. Компьютерным моделированием также показано, что большая часть белка не находится на поверхности бактерии, однако два внутримембранных фрагмента соединяются между собой петлевой структурой (492–517 а.о. по последовательности штамма B31T *B. burgdorferi* s.s.), экспонированной на поверхности клетки [65]. Исследования расщепления белка P66 протеиназой K также подтвердили его частичное экспонирование на поверхности клетки [157]. Этот очищенный белок имеет среднюю одноканальную проводимость 9,62±0,37 нСм в 1 M KCl при отсутствии селективности между проводимыми катионами и анионами, что свидетельствует о том, что P66 – порин, вероятно состоящий из 3-х субъединиц [200]. Диаметр канала P66 составляет около 2,6 нм [181], но более поздние исследования уточнили этот показатель: ≤1,9 нм с центральным сужением канала до 0,8 нм [50].

Высококонсервативные домены P66, присутствующие почти у всех видов боррелий, могут быть важными детерминантами, ответственными за структуру канала и формирование 20 или более трансмембранных β-листов, образующих β-цилиндры, как и многие другие порины наружной мембраны бактерий [98]. Подобно другим бактериальным поринам, P66 представляет собой β-бочкообразный белок с 22 или 24 трансмембранными цепями, самоолигомеризующийся в комплекс более высокого порядка внешней мембраны бактерий [113]. В отличие от других бактериальных поринов P66 олигомеризуется в гептамер или октамер [50, 58, 113]. Однако в настоящее время не существует модель кристаллической структуры белка P66 боррелий и его гомологов у бактерий других родов, которые могли бы помочь исследованию третичной структуры этого белка [80]. Поэтому представления о структуре P66 в основном построены на ее компьютерном моделировании и физико-химических исследованиях.

Изначально предполагалось, что существует одна поверхностная петля вблизи С-конца у белка P66 [59, 65]. Затем, в дополнение к ней обнаружены еще 11–12 внеклеточных петель (Рисунок 6), которые могут взаимодействовать с

белками хозяина во время инфекции [80, 113], а также с собственными белками боррелий. Предположено, что белки OspA и OspB боррелий ограничивают доступ антител и трипсина их реципиента к основной поверхностной петле P66 [61, 64, 113, 125, 204].

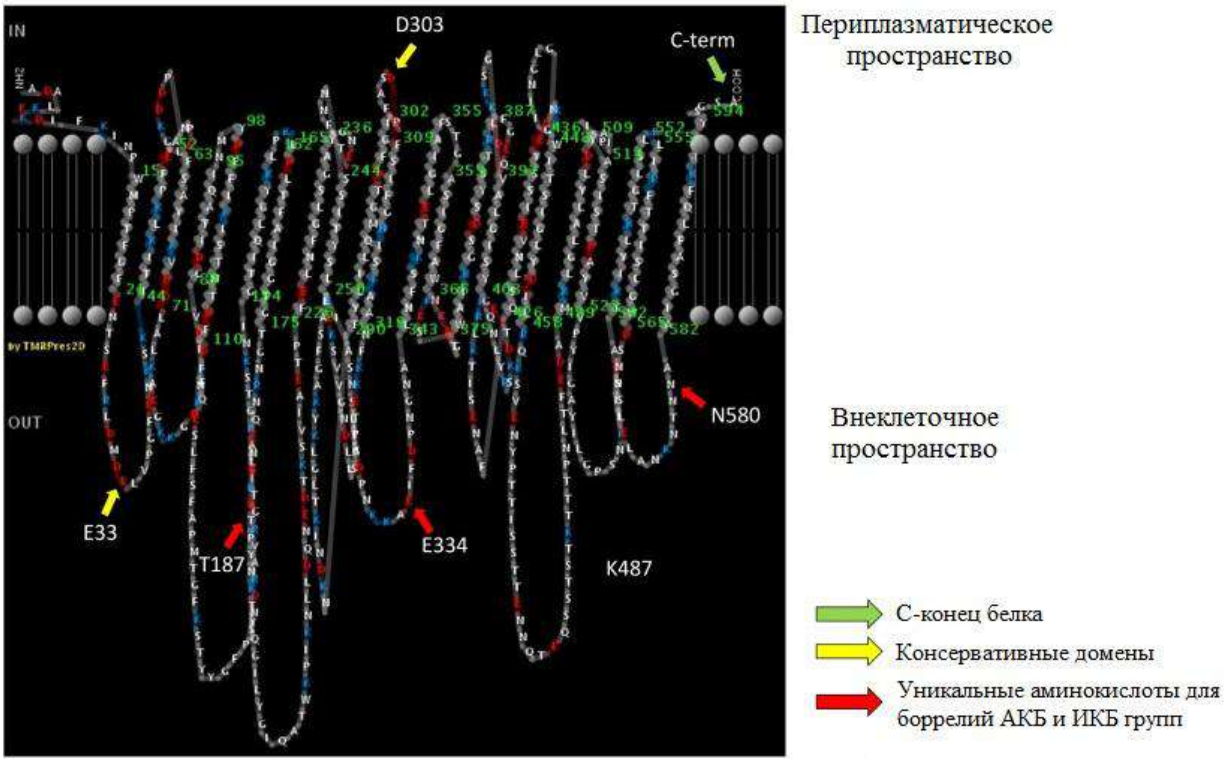


Рисунок 6 – Компьютерная модель периплазматических, трансмембранных и внеклеточных доменов белка P66 *B. burgdorferi* s. s.; адаптировано из [80].

По результатам компьютерного моделирования, выполненного исследователями в 2025 году, белок P66 формирует трансмембранную β-бочкообразную структуру, характеризующуюся наличием 10 внеклеточных петель и 22 антипараллельных β-листов (Рисунок 7) [87].

У боррелий, находящихся в организме млекопитающих-хозяевах, а также в напитавшихся клещах *I. scapularis* (по сравнению с голодными клещами), наблюдается повышение уровня экспрессии белка P66 [56, 79, 150]. На экспрессию гена *p66* в культуре также влияют температура, pH и фаза роста боррелий, но, в отличие от экспрессии OspA и OspC [97, 177], эти факторы не влияют на уровень на уровень белка P66 так же интенсивно, как у боррелий в

напитавшихся клещах [78, 79]. Показано, что белок OspA ограничивает доступ антител или трипсина к поверхностной структуре белка P66 [64]. Однако этот белок, необходимый для колонизации кишечника иксодовых клещей [177], не экспрессируется у инфицированных млекопитающих. Делеция гена *p66* у патогенных *B. burgdorferi* (мутантные штаммы Δ*p66*) приводит к потере способности вызывать инфекцию таких штаммов у лабораторных мышей [165, 166]. Нативный белок P66 может обеспечивать защитный иммунитет против боррелий, адаптированных к млекопитающему-хозяину [85].

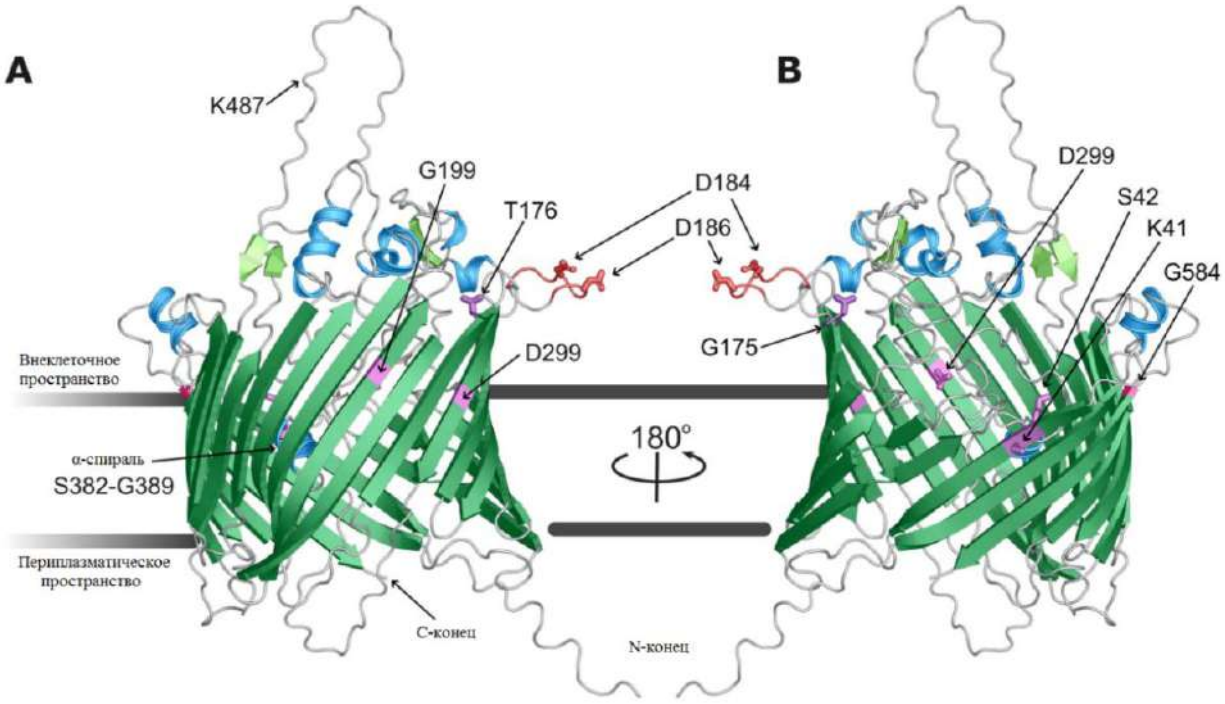


Рисунок 7 – Структурная модель белка P66 (адаптировано из [87]) в двух проекциях (A, B). Модель окрашена в соответствии с предсказанной вторичной структурой: β-слои — зеленым, альфа-спирали — синим, петли — серебряным. Кроме того, аминокислотные остатки K41, S42, G175, T176, G199, D299, K487 и G584 (по референсному штамму B31T *B. burgdorferi* s. s., RefSeq GCF_000008685) обозначены фиолетовым цветом, а домен связывания интегрина — оранжевым с выделенными D184 и D186.

Белок P66 боррелий *B. burgdorferi*, *B. garinii* и *B. afzelii* связывается с интегринами $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_5\beta_1$ [71] и функционирует как бактериальный лиганд [72, 73]. Это может способствовать инвазии возбудителя в эпителиальные и эндотелиальные ткани человека, что показано с использованием мутантных

штаммов Δ*p66* и *p66*+ (экспрессирующие P66) [124]. Продемонстрирована необходимость белка P66 для трансмиграции боррелий через эндотелий кровеносных сосудов млекопитающих [122, 166, 192]. Таким образом, белок P66 участвует в адгезии возбудителя к клеткам млекопитающих и к эндотелию их сосудов [42, 72, 79, 81]. Он связывается с антифагоцитарным рецептором SIRPα на поверхности макрофагов, что облегчает уклонение *Borrelia* от иммунного ответа млекопитающих [190].

Структура белка P66 боррелий имеет две наиболее изученные поверхностные петли [42, 59, 60, 65, 72, 74, 80, 81, 87, 122, 151, 166]. Одна из петель P66 расположена в близости к N-концу белка (176–194 а.о., Рисунок 7). Так, аминокислоты в позициях 142 по 384 (согласно последовательности референс-штамма B31T *B. burgdorferi* s. s., RefSeq GCF_000008685) важны для способности этого белка присоединяться к β_3-цепям интегринов [74, 81]. Интегрин-связывающая функция P66 способствует диссеминации и проникновению боррелий через эндотелий кровеносных сосудов млекопитающих [122, 166, 192], но не является необходимой для развития инфекционного процесса [78]. Однако, при делеции аминокислотных позиций 33, 202–208 и 303 в белке P66 боррелий наблюдается задержка колонизации такими мутантами клеток млекопитающих и их распространения в организме этих животных [80, 166].

Другая поверхностная петля P66 боррелий расположена вблизи C-конца этого белка: 462–496 а.о. (Рисунок 7). Она играет важную роль в обеспечении инфекционности *Borrelia* для мышей и последующей диссеминации патогена в организме хозяина. Установлено, что данная петля, наряду с N-концевой петлей, опосредует связывание белка с интегрином αvβ3 [80], причем белок OspA связывается именно с этой петлевой структурой белка P66 [64]. Как упомянуто ранее, OspA не играет существенной роли в инфекционном процессе у теплокровных животных, но необходим для выживания боррелий в иксодовых клещах [177]. Это дополнительно свидетельствует о значении P66 для паразитарной системы боррелий. C-концевая поверхностная петля белка P66

обладает большей генетической гетерогенностью по сравнению с N-концевой (см. далее, раздел 1.2.3).

Изложенные фактические данные свидетельствуют о том, что экспрессия P66 способствует прикреплению боррелий к клеткам млекопитающих и их диссеминации в организме реципиента. Утрата гена *p66* в лабораторных условиях увеличивала фагоцитоз боррелий макрофагами человека. Это свидетельствует о том, что P66 способствует уклонению *B. burgdorferi* от фагоцитов [190]. Поэтому P66, выполняющий различные функции, относится к одному из ключевых факторов патогенности боррелий [73].

P66 – иммуногенный белок с молекулярным весом ~ 66 кДа [46, 65]. При естественном инфицировании иммунный ответ на P66 формируется к гипервариабельному антигенному участку, состоящему из аминокислот в положениях с 396 по 618 (включая петлю у С-конца белка) [150, 151]. Он включает эпитоп, к которому происходит наработка соответствующих антител у человека [60, 65, 151], а также присоединяются моноклональные антитела H1337 [59, 60, 65]. Именно эта петлевая структура P66 имеет большое значение в иммуногенности [27, 59, 62, 113, 151]. Сохранение нативной конформации P66 необходимо для выработки протективных антител млекопитающими, а иммунизация белком P66 лабораторных мышей обеспечивает защиту от заражения боррелиями [85]. Полноразмерный белок P66 используют в качестве антигена для серологического подтверждения диагноза ИКБ, причем у большинства больных обнаруживаются специфические IgM и/или IgG [59, 109, 149, 150]. Однако, среди эпитопов этого белка, характерных для *B. burgdorferi* s. l., обнаружено наличие перекрестно-реактивных [43], что затрудняет их использование в серодиагностике как специфических антигенных мишеней.

1.2.3 Вариабельность гена и белка у различных видов боррелий, в том числе и у *B. bavariensis*

Одновременно с описанием гена *p66* и одноименного белка, было обнаружено, что они отличаются у разных видов боррелий группы ИКБ. Хотя ген *p66* у *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* и *B. garinii* был почти одинаковой длины, различия в последовательностях нуклеотидов доходят до 10% [65]. Ген *p66* выявлен у спирохет, относящихся к группе аргасовых клещевых боррелиозов (АКБ): *B. hermsii, B. turicatae, B. parkeri, B. coriaceae*, и *B. anserina*, а также у *B. miyamotoi* sensu lato, которую относят к этой же группе боррелий, но передающейся теми же иксодовыми клещами, как и *B. burgdorferi* s. l. [39, 60, 62, 65]. У этих боррелий нуклеотидные последовательности гена *p66* оказались сходными на 75–100%, но при этом отличающимися от *B. burgdorferi* s. l. на 33–37% [60, 63, 65]. Большое разнообразие нуклеотидных последовательностей гена *p66* различных видов *Borrelia* было наиболее выражено в области предполагаемой поверхностной петли (1476–1551 п.н., 492 – 517 а.о. по последовательностям штамма B31T *B. burgdorferi* s.s.) [60, 65]. Однако, для видов боррелий группы АКБ последовательность гена *p66* более консервативна, чем для боррелий группы ИКБ, т.е. комплекса *B. burgdorferi* s. l. [60, 63]. Сходство между последовательностями аминокислот P66 боррелий группы ИКБ и АКБ составило 41% [49]. Таким образом, показано, что специфичность нуклеотидных последовательностей гена *p66* боррелий может быть использована для их идентификации.

Внутривидовая гетерогенность гена *p66* выявлена у боррелий некоторых видов, вызывающих заболевания, сходные с АКБ. Так, у *B. miyamotoi* s. l., *B. lonestari* и *B. hermsii* выявлено по 3 аллельных вариантов этого гена [63]. Однако в России у *B. miyamotoi* обнаружен только 1 такой вариант [38, 39, 158]. Внутривидовой полиморфизм гена *p66* в позициях 147–462 п.н., выявлен у боррелий группы ИКБ различных видов: у *B. burgdorferi* s. s. и *B. bissettii* [69, 70]. При этом у *B. burgdorferi* s. s. разными исследователями описаны 7 и 12

аллельных вариантов гена *p66*, кодирующего С-концевую петлю белка [62, 147]. У *B. afzelii* обнаружены 7 аллельных вариантов гена *p66* (1446–1713 п.н. по референсной последовательности *B. afzelii* PKo RefSeq GCF_000222835), причем все встречаются в обеих генетических подгруппах (VS461T и NT28) этого возбудителя [36]. Результат изучения аминокислотной структуры одноименного белка, кодируемого такими аллельными вариантами *B. afzelii*, показал, что среди них имеются 6 вариантов, различающихся фенотипически. Из них два отличаются аминокислотными заменами в области поверхностно-экспонированной С-концевой петли белка P66 и мутациями в локусе предполагаемого места прикрепления моноклональных антител H1337 [27]. В одном природном очаге, расположенном на Среднем Урале, выявлена одновременная циркуляция 5 аллельных вариантов *p66 B. afzelii*. При этом переносчики и резервуарные хозяева определенного вида могут иметь несколько различных аллельных вариантов, что способствует поддержанию генетической гетерогенности популяции возбудителя в природном очаге [19, 37]. У *B. garinii* обнаружены 3 варианта нуклеотидных последовательностей гена *p66* (235–1674 п.н. по референсной последовательности *B. burgdorferi* s.s. B31T RefSeq GCF_000008685), кодирующие поверхностную С-концевую петлю белка P66 [103]. Два из этих вариантов содержали последовательности штаммов *B. garinii* BgVir и NMJW1, которые по современным представлениям относятся к евразийской подгруппе *B. bavariensis* [30]. Эти данные – единственная сейчас информация о гетерогенности гена *p66* у *B. bavariensis*.

1.3 Заключение

Таким образом, в свете реклассификации подгруппы NT29 *B. garinii* в самостоятельный вид *B. bavariensis*, необходимы исследования для подтверждения или опровержения принадлежности соответствующих изолятов к данному виду. Установлено, что *B. bavariensis* наряду с другими патогенными видами *B. burgdorferi* s. l. представляет собой этиологический агент ИКБ и

широко распространена в Евразии среди иксодовых клещей и различных резервуарных хозяев, однако остается сравнительно малоизученной, особенно на территории России.

С внедрением ПЦР в исследовательскую практику появился и до сих пор используется стандартный подход для рутинной видовой идентификации боррелий (ПЦР-ПДРФ межгенных спейсеров *rrs–rrlA* или *rrfA–rrlB* рРНК генов). С приходом современных высокоточных технологий основными инструментами стали методы мультилокусного сиквенс-анализа и типирования (МЛСА и МЛСТ), полногеномное секвенирование и др. В лабораторной диагностике для идентификации видовой принадлежности боррелий такие методы относятся к затратным и времяемким. Поэтому представляется возможным оптимизации какого-либо метода для быстрых скрининговых исследований и повседневного применения в условиях практических клинико-диагностических лабораторий.

Один из ключевых факторов патогенности комплекса спирохет *B. burgdorferi* s. l. – белок P66, кодируемый одноименным геном и необходимый для начала инфекционного процесса у реципиента. Этот белок уникален для спирохет рода *Borrelia*, а его гомологи отсутствуют за пределами данного рода. P66 практически не изучен у вида *B. bavariensis*, как и генетическая гетерогенность гена, кодирующая данный белок. По данным, приведенным выше, С-концевая петля белка P66 необходима для развития инфекционного процесса у млекопитающих и представляется более гетерогенной, чем N-концевая.

В связи с вышеизложенным, совершенствование лабораторной идентификации возбудителей ИКБ и изучение гена *p66* у *B. bavariensis* представляют собой важные и актуальные научные задачи.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Краткая ландшафтно-географическая характеристика природного очага Среднего Урала и сочленов его паразитарной системы

Изоляты для исследования выделены от пациентов Краевой инфекционной больницы города Перми (58°00’50″ северной широты (с.ш.); 56°15’56″ восточной долготы (в.д.)), а также накоплены в итоге комплексных многолетних полевых и лабораторных исследований на постоянном станционаре площадью около 30 м^2 в Чусовском районе Пермского края (58.32° с.ш., 57.43° в.д.).

Пермский край расположен на востоке Восточной Европы. Значительная его часть занята низкогорьями Среднего Урала, которые покрыты южнотаежными лесами. Единственный источник боррелиозной инфекции для человека на этой территории – таежный клещ (*Ixodes persulcatus*), а круг естественных резервуарных хозяев возбудителя включает несколько видов мелких млекопитающих [12, 119].

2.1.2 Краткая клинико-эпидемиологическая характеристика ИКБ в Пермском крае

Пермский край относится к числу крупных административных территорий России с ежегодным наиболее высоким уровнем заболеваемости населения ИКБ [15]. Так, в 2025 году показатель заболеваемости боррелиозами составил 14,7 на 100 тыс. населения [207]. Региональные особенности клинических проявлений ИКБ описаны ранее [15, 31].

2.1.3 Сбор материала для изоляции боррелий и их культивирование

Изоляты боррелий получены в 1992–2006 гг. от больных людей с локализованной стадией манифестной формы ИКБ, сопровождающейся мигрирующей эритемой [4, 31].

Голодные имаго и нимфы таежных клещей, от которых получены изоляты, собраны в 1993–2003 гг. на флаг с наземной растительности на постоянном станционаре, описанном выше. Нимфы клещей *I. trianguliceps* собраны в 1994–1999 гг. с мелких млекопитающих в том же природном очаге [16, 155].

Материалы от диких мелких млекопитающих для изоляции боррелий (биоптаты кожи ушей и ткани мочевых пузырей) [179] получены в 1992–2003 гг. в соответствии с нормативными документами времени отлова зверьков [206]. Отлов живых зверьков проводили с помощью живоловок Шермана [12, 96], а их возраст определяли по критериям Н. В. Тупиковой с соавторами [34].

Культивирование боррелий осуществляли при температуре 33°С путем посева этого материала на среду BSK с периодическим контролем роста в течение 1 месяца [96].

2.1.4 Депонирование изолятов в музей боррелий, а также создание электронной базы данных и ее государственная регистрация

Первичные изоляты, полученные от людей, больных ИКБ, клещей и мелких млекопитающих, длительно хранили в морозильных камерах при –70°С в музее боррелий лаборатории переносчиков инфекций на базе лаборатории Государственной коллекции микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней человека II–IV групп патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России («ГКМ – Гамалеи», Москва).

В соответствии с системой, принятой в лаборатории, маркировка любого первичного изолята включала его журнальный номер, перед которым указаны первые буквы латинского названия источника изоляции: Hs – *Homo sapiens*; Ip – *Ixodes persulcatus*, Ipn – нимфа *I. persulcatus*, Itn – нимфа *I. trianguliceps*,

Ir – *I. ricinus*; Au – *Apodemus uralensis*, Cg – *Clethrionomys glareolus*, Crf – *C. rufocanus*, Crt – *C. rutilus*, Ma – *Microtus agrestis*, Mo – *M. oeconomus*, Sa – *Sorex araneus*, Sb – *Sicista betulina*. При выделении изолята для его номенклатуры были использованы первые буквы родового латинского названия животного-источника по [10], сохраняющиеся в музее боррелий и депонированные в международную базу GenBank NCBI. Здесь и далее в тексте диссертации изменившиеся русские и латинские, а также английские названия мелких млекопитающих приведены в скобках по [25].

Для изучения таксономии и внутривидовой гетерогенности боррелий, этиологии ИКБ, их лабораторной диагностики и профилактики в лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» по инициативе и под руководством Э. И. Коренберга в 1983 г. был создан и начал регулярно пополняться музей боррелий [14, 23]. Музей состоит из хранилища и электронной базы данных с алгоритмом ее компьютерного формирования и пополнения [23]. В настоящее время музей содержит около 1269 изолятов и примерно 7204 единиц хранения (аликвот). Электронная база данных (БД) этого единственного в РФ музея боррелий (бактерий рода *Borrelia*) создана в 2017-2018 гг., прошла процедуру Государственной регистрации (Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020621769 Российская Федерация; Приложение Б). База данных развернута в системе управления базы данных MySQL. Для управления БД, а также реализации пользовательского интерфейса использован язык PHP. Часть функционала (например, редактирование данных) реализована с помощью языка Javascript. По каждому изоляту в БД вносится полная характеристика, полученная при его дальнейших исследованиях разными методами. Клиентская часть, такая как выбор, просмотр и редактирование данных БД реализована в виде автоматически генерируемых посредством PHP и Javascript HTML-страниц. Экспорт-импорт базы осуществляется в формате SQL.

БД предназначена для быстрого поиска по унифицированным заданным паспортным данным первичных и типовых изолятов боррелий, необходимых для цели конкретного исследования и принадлежащих к резервуарным хозяевам и

переносчикам различных видов из регионов Евразии. БД дает возможность учитывать наличие изолятов боррелий разных видов и следить за использованием их аликвот из него. Информация, хранящаяся в БД, необходима для дальнейших научных исследований биоразнообразия микроорганизмов рода *Borrelia*, их таксономии, распространения, особенностей биологии, внутривидовой гетерогенности и степени патогенности для человека.

2.1.5 Первичная идентификация изолятов боррелий

В период депонирования изолятов *B. garinii* в музей боррелий их первичная идентификация была проведена методом ПЦР полиморфизма длин рестрикционных фрагментов межгенного спейсера *rrfA–rrlB* [28, 29]. Этот метод применялся для рутинного типирования боррелий до повсеместного внедрения методов секвенирования и предшествовал более продвинутым подходам, таким как секвенирование отдельных генов, мультилокусные сиквенс-анализ и типирование (глава 1).

2.1.6 Выборка изолятов из музея для исследования

Для данного исследования по базе данных музея боррелий (раздел 2.1.4) отобраны 238 изолятов, первично идентифицированных как *B. garinii* NT29, из одного природного очага Пермского края. Количество и характеристика изолятов представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Количество и характеристика исследованных изолятов

Источник получения изолятов	**Биоматериал**	**Год изоляции**	**Количество изолятов**
Люди, больные ИКБ *Homo sapiens*	Биоптат кожи	1992	10
		1997	3
		1998	3
		1999	1
	Плазма крови	2006	10
Итого			27

Таблица 1 – (продолжение)

Источник получения изолятов	**Биоматериал**	**Год изоляции**	**Количество изолятов**
Имаго клеща *I. persulcatus*	Комплекс внутренних органов	1993	10
		1994	12
		1995	14
		1996	9
		1997	6
		1998	1
		2003	6
Итого			58
Нимфы клеща *I. persulcatus*	Комплекс внутренних органов	1993	3
		1994	7
		1996	21
		1997	7
		1998	2
Итого			40
Нимфы клеща *I. trianguliceps*	Комплекс внутренних органов	1994	1
		1995	2
		1997	5
		1998	3
		1999	14
Итого			25
Рыжая полевка *C. glareolus* *(Myodes glareolus)*	Мочевой пузырь	1992	8
		1993	2
		1994	2
		1995	4
		1997	1
		2000	8
	Биоптат уха	2000	34
Итого			59

Таблица 1 – (продолжение)

Источник получения изолятов	**Биоматериал**	**Год изоляции**	**Количество изолятов**
Полевка-экономка *M. oeconomus* *(Alexandromys oeconomus)*	Мочевой пузырь	1993	1
		1995	8
		1997	1
		1998	4
Итого			14
Малая лесная мышь *A. uralensis* *(Sylvaemus uralensis)*	Мочевой пузырь	1993	1
Красно-серая полевка *C. rufocanus* *(Craseomys rufocanus)*	Мочевой пузырь	1993	1
		1995	1
Итого			2
Красная полевка *C. rutilus* *(Myodes rutilus)*	Мочевой пузырь	1995	1
		1998	1
	Биоптат уха	2000	2
		2001	1
		2003	2
Итого			7
Темная полевка *M. agrestis* *(Agricola agrestis)*	Биоптат уха	2003	1
Обыкновенная бурозубка *(Sorex araneus)*	Биоптат уха	2000	2
Лесная мышовка *(Sicista betulina)*	Биоптат уха	2002	1
		2003	1
Итого			2
Всего исследованных изолятов			**238**

2.1.7 Дополнительные изоляты для проверки результативности оптимизированного метода мультилокусного сиквенс-анализа (МЛСА)

Для проверки предложенного оптимизированного метода МЛСА исследованы 25 изолятов *B. burgdorferi* s. l. неизвестной ранее видовой принадлежности (Таблица 2). Они были получены путем посева на среду BSK комплекса внутренних органов голодных имаго европейского лесного клеща *I. ricinus*. Большая часть клещей собрана весной 2021 года на флаг с наземной растительности экосистем лесостепной части Воронежской области: в Вернехавском районе (51°53′54″ с.ш., 39°45′07″ в.д.) и Центральном районе города Воронеж (51°74′59″ с.ш., 39°22′78″ в.д.). Несколько культур изолированы ранее от клещей этого вида с территории Воронежского заповедника им. В. М. Пескова.

Таблица 2 – Характеристика изолятов от клещей *I. ricinus,* исследованных дополнительно.

Место сбора клещей	Год изоляции	Количество изолятов
Воронежский Государственный природный биосферный заповедник им. В. М. Пескова	2017	4
г. Нововоронеж	2017	1
Вернехавский район	2021	4
Верхнехавский район, село Большая Приваловка	2021	12
г. Воронеж, поселок Рыбачий	2021	4

2.2 Методы

2.2.1 Экстракция ДНК боррелий

Выделение ДНК проводили коммерческим набором “ПРОБА-НК” (ДНК-технология, Москва) согласно инструкции производителя. ДНК хранили в морозильниках при –20°С.

2.2.2 Мультилокусный сиквенс-анализ (МЛСА) и типирование (МЛСТ)

Для реидентификации изолятов боррелий использовали протокол метода МЛСА, включающего исследования 7 коротких участков (от 156 до 522 п.н.) шести консервативных генов (*rrs*, *hbb*, *groEL*, *recA*, *fla*, *ospA*) и 1 некодирующего участка межгенного спейсера *rrfA*-*rrlB* боррелий. Праймеры, условия и режим ПЦР соответствовали протоколу метода [164].

Кроме МЛСА, использовали метод МЛСТ, включающий 8 участков иного набора восьми консервативных генов (*clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB* и *uvrA*), нуклеотидные последовательности которых содержат от 564 до 651 п.н. Применяли праймеры, режим ПЦР, соответствующие протоколу метода [128].

Для сравнения результатов, полученных методами МЛСА и МЛСТ, проводили филогенетический анализ дендрограмм по объединенным сцепленным нуклеотидным последовательностям изолятов боррелий, содержащие 2026 п.н. и 4785 п.н., соответственно.

2.2.3 Амплификация участка гена *p66*

В начале исследования для амплификации участка гена *p66* длиной 280 п.н. использовали рекомендованные праймеры [151]. Однако из-за отрицательных результатов ПЦР с большим количеством изолятов, нами было принято решение изменить дизайн праймеров применительно к штаммам *B. bavariensis* с помощью сервиса Primer-BLAST (Таблица 3).

Таблица 3 – Праймеры, использованные для амплификации участка гена *p66*

Название	Последовательность
p66-orn прямой	GAAATTTCAAGCTATGAAGAC
p66-orn обратный	CTACATATGCTTCTGTTGAAATGG
p66-gol прямой	GAAATCTCAAGCTATGAAGAC
p66-gol обратный	CTACATATGCTTCTGTTGAAATGG

Состав реакционной смеси в расчете на 1 реакцию в объеме 30 мкл:

- 1 единица фермента Taq-полимеразы (“Хеликон”, Москва)
- 1х ПЦР-буфер с 2,5 мкМ $MgCl_2$ (“Евроген”, Москва)
- 0,2 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (“Евроген”, Москва)
- 0,2 мкМ каждого праймера (“Евроген”, Москва)
- 3 мкл ДНК-матрицы (5–10 нг/мкл)
- деионизированная вода (“Хеликон”, Москва).

ПЦР проведена в амплификаторе “Eppendorf” (Германия). Реакционная смесь нагревалась до 94°С в течение 1 мин, далее подвергалась 30 циклам амплификации, включающим денатурацию в течение 30 сек при 94°С, отжиг в течение 30 сек при 52°С (для праймеров p66-orn) или 53°С (для праймеров p66-gol), элонгацию в течение 30 сек при 72°С. Финальная элонгация проведена при той же температуре в течение 5 мин.

2.2.4 Горизонтальный электрофорез в агарозном геле и визуализация результатов

Оценку качества амплифицированных фрагментов ДНК проводили с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем 0,4 мкг/мл бромистого этидия. Для приготовления геля использовали однократный трис-боратный буфер (ТВЕ) (0,1М Трис-HCl, 0,09М H_3BO_3, 1 мкМ ЭДТА, pH 8.3). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 120В в течение 50 мин. Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли с применением гель-документирующей системы “Взгляд” (Хеликон, Москва) и трансиллюминатора (“Vilber Lourmat”, Франция) в проходящем ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм. Размер ПЦР-продуктов определяли визуально с помощью маркера длин ДНК (DNA Ladder 100+ bp, “Евроген”, Москва).

2.2.5 Очистка полученных ПЦР-продуктов

Очистку ПЦР-продуктов проводили с помощью коммерческого набора “HiPure Gel DNA Mini Kit” (“Magen”, Китай) согласно инструкции производителя. Полученные очищенные ампликоны хранили в морозильниках при –20°C.

Для проверки результатов очистки 5 мкл полученного продукта смешивали с красителем и осуществляли горизонтальный электрофорез. Затем визуально сравнивали электрофореграмму с результатами, полученными в предыдущем пункте, и оценивали качество очистки по содержанию и интенсивности полос с помощью маркеров длин (DNA Ladder 100+ bp, “Евроген”, Москва). Концентрацию очищенного продукта определяли флуориметрическим методом с использованием флуориметра Qubit (“Invitrogen”, США) и набора реагентов Pico488 (“Lumiprobe Life Science Solutions”, Германия).

2.2.6 Секвенирование ПЦР-продуктов

Очищенные ампликоны готовили для секвенирования по Сэнгеру согласно инструкциям Межинститутского Центра коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской Академии Наук, Москва, URL: http://www.genome-centre.ru). Их секвенирование проведено в том же Центре с использованием набора реактивов ABI PRISM Big Dye Terminator v.3.1 и последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI 3500xL DNA Analyser “Applied Biosystems” (США) с использованием необходимых праймеров (разделы 2.2.2 и 2.2.3).

2.2.7 Обработка нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, филогенетический и статистический анализ данных

ABI-файлы, полученные секвенатором, анализировали и редактировали с помощью программ Sequence Scanner, Chromas и UGENE. Для нуклеотидных и аминокислотных выравниваний применяли алгоритм Muscle в программе MEGA11, а их визуализация – в Jalview. Все дендрограммы созданы и визуализированы в программе MEGA11. Анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей проводили в программах DnaSP6 и MEGA11.

Для построения дендрограмм результатов МЛСА и МЛСТ использованы сцепленные нуклеотидные последовательности (раздел 2.2.2). Для построения дендрограмм по итогам МЛСА использовали метод невзвешенного попарного среднего (UPGMA) при величине bootstrap 1000 повторов с поправкой Джукса-Кантора (JC). Дендрограммы по итогам МЛСТ построены методом присоединения соседей (Neighbor-joining) при величине bootstrap 1000 повторов с 2-параметрической поправкой Кимуры (K2). Для построения дендрограмм нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* использовали 3-параметровую эволюционную модель Тамура (T92), а для аминокислотных – модель Джонс-Тейлор-Торнтона (JTT). Дендрограммы построены методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) при величине bootstrap 1000 повторов.

Статистическую обработку данных выполняли в программе GraphPad Prism 8. Статистический анализ полученных данных проводили путем расчета критерия хи-квадрат (χ^2). Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Оптимизация МЛСА

3.1.1 Сравнение современных методов видовой идентификации боррелий и обоснование возможности оптимизации МЛСА

Для идентификации вида боррелий, принадлежащих к комплексу *B. burgdorferi* s. l. в настоящее время используют методы МЛСА и МЛСТ, основанные на анализе сцепленных нуклеотидных последовательностей разного набора и длины генов «домашнего хозяйства». Обе описанные методические схемы применяются, но для таксономических целей рекомендована схема МЛСТ, поскольку она включает более длинные фрагменты большего числа консервативных генов (глава 1).

Для реидентификации изолятов *B. garinii* методом МЛСА из музея боррелий отобраны аликвоты 23 изолятов, которые ранее по результатам изучения межгенного спейсера *rrfA–rrlB* отнесены к геномной подгруппе NT29 *B. garinii* [28, 29]. Изоляты получены путём посева на среду BSK кожных биоптатов из периферической части эритем (17 изолятов) или из плазмы крови (6 изолятов) больных с локализованной стадией манифестной формы ИКБ. У гена *rrs* и межгенного спейсера *rrfA–rrlB* исследованных изолятов не обнаружен полиморфизм (выявлено по 1 аллелю). У генов *fla и groEL* выявлены по 2 аллеля, а у более гетерогенных генов *hbb*, *ospA* и *recA* – по 3 аллеля (Таблица 4).

По результатам МЛСА сцепленные нуклеотидные последовательности (2026 п.н.) у всех исследованных изолятов боррелий от больных с ИКБ отличались не менее чем на 2,2–2,7% от нуклеотидных последовательностей штамма *B. garinii* 20047T. С типовым штаммом *B. bavariensis* PBi они оказались схожи на 98,3–98,4% и отличались не менее чем на 5,4% от нуклеотидных последовательностей других видов боррелий, представленных в GenBank NCBI. В Таблице 5 представлена информация о 8 изолятах, отобранных для лучшего восприятия их сходства.

Таблица 4 – Полиморфизм нуклеотидных последовательностей различных генов у изолятов боррелий, исследованных по протоколу МЛСА и полученных от пациентов. В скобках указана позиция в последовательности референсного штамма B31T *B. burgdorferi* s. s., RefSeq GCF_000008685.

Ген	**Длина последо-ватель-ности, п.н.**	**Индекс вариабель-ности, d**	**Нуклеотидные замены**							**Аминокислот-ные замены**	**Примечание**
			SNP[1]	**Уни-каль-ные**	**Неуни-каль-ные**	**Встав-ки**	**Деле-ции**	**Синони-мичные**	**Несино-нимичные**		
rrs	501	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
rrfA–rrlB	175	0,003	2	2	0	0	0	0	0	0	Некодирующий спейсер.
fla	437	0,003	2	1	1	0	0	1	1 (c.616A>G)	1 (p.206A>T)	
groEL	224	0,005	3	0	3	0	0	3	0	0	
hbb	327	0,008	5	0	5	0	0	5	0	0	У одного излята не амплифици-ровалась последова-тельность этого гена.

[1] – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism).

Таблица 4 – (продолжение)

Ген	Длина последовательности, п.н.	Индекс вариабельности, d	Нуклеотидные замены							Аминокислотные замены	Примечание
			SNP	Уникальные	Неуникальные	Вставки	Делеции	Синонимичные	Несинонимичные		
ospA	211	0,015	13	7	6	1 (c.183_184insC)	0	6	6 (c.209A>G c.223G>A c.224T>C c.236T>A c.242C>A c.301G>C)	5 (p.70N>S p.75V>T p.79V>E p.81T>N p.101V>L)	У 3 изолятов вставка в последовательности привела к 8 стоп-кодонам.
recA	150	0,006	4	3	1	0	0	1	3 (c.241G>A c.272C>T c.307G>T)	3 (p.81G>S p.91T>I p.103G>C)	

Таблица 5 – Сходство (в %) результатов МЛСА изолятов, полученных от больных ИКБ (Hs), с результатами аналогичного анализа боррелий различных видов в базах данных GenBank NCBI и PubMLST

	Hs-1	Hs-6	Hs-7	Hs-55	Hs-58	Hs-80	Hs-128	Hs-139	PBi	NT29	SZ	Prm7564-11	Prm7569-11	Hiratsuka	20047T
Hs-1	100														
Hs-6	98,9	100													
Hs-7	98,9	99,9	100												
Hs-55	99,9	98,9	98,9	100											
Hs-58	99,9	98,8	98,9	99,9	100										
Hs-80	100	98,9	98,9	99,9	99,9	100									
Hs-128	98,9	100	99,9	98,8	98,8	98,9	100								
Hs-139	98,9	99,7	99,7	98,8	98,8	98,9	99,7	100							
PBi	98,4	98,1	98,2	98,3	98,3	98,4	98,1	97,8	100						
NT29	100	98,8	98,8	99,9	99,9	100	98,8	98,8	98,4	100					
SZ	99,9	99,2	99,3	99,9	99,9	99,9	99,2	99,3	98,7	99,9	100				
Prm7564-11	98,9	100	99,9	98,8	98,8	98,8	100	99,7	98,1	98,8	99,2	100			
Prm7569-11	98,6	99	99,1	98,5	98,5	98,6	99	98,6	98,2	98,5	98,9	99,1	100		
Hiratsuka	98,9	99,9	100	98,9	98,9	98,9	99,5	99,7	98,2	98,8	99,3	99,5	99,1	100	
20047T	97,6	97,7	97,8	97,5	97,5	97,6	97,7	97,3	98,1	97,6	98,5	97,7	97,8	97,8	100

На дендрограмме, построенной по результатам МЛСА, все изоляты от людей образуют общий кластер с *B. bavariensis* и чётко отделяются от сестринского кластера с *B. garinii* 20047T (Рисунок 8). Это позволяет отнести изученные изоляты к виду *B. bavariensis.* Таким образом, впервые установлено, что этот вид боррелий может вызывать в России эритемную форму ИКБ.

Все изоляты «Hs» оказались практически идентичными (сходство нуклеотидных последовательностей от 98,5 до 100%) штаммам NT29 ST131 [132], SZ ST131, Prm7564-11 ST433, Prm7569-11 ST374 и Hiratsuka ST128 [53] евразийской геномной подгруппы *B. bavariensis* и группировались с ними на дендрограмме (Рисунок 8). Таким образом, показано, что боррелии этой геномной подгруппы могут вызывать эритемную форму ИКБ у людей, заразившихся на территории восточной части Восточной Европы.

Среди изолятов евразийской геномной подгруппы *B. bavariensis* выявлены два варианта, нуклеотидные последовательности которых отличались друг от друга более чем на 1% (Таблица 5), а индекс их вариабельности составил 0,004. Сходство между последовательностями нуклеотидов каждого варианта составляло от 99,7 до 100%. Большинство клинических изолятов (15 из биоптатов кожи и 4 из плазмы крови пациентов) одного из вариантов образовывали на дендрограмме (Рисунок 8) общий кластер вместе с японским NT29 и китайским SZ штаммами евразийской геномной подгруппы *B. bavariensis* (ST131). Четыре изолята (по два из биоптатов кожи и из плазмы крови пациентов) представляли другой геновариант, группируясь вместе с двумя пермскими Prm7564-11 (ST433), Prm7569-11 (ST374) и японским Hiratsuka (ST128) штаммами *B. bavariensis* (Рисунок 8). На территории России сиквенс-тип ST128 у иксодовых клещей не обнаружен [141, 172]. Тем не менее, в Японии боррелии этого ST вызывают ИКБ у людей и обнаружены у грызунов [189].

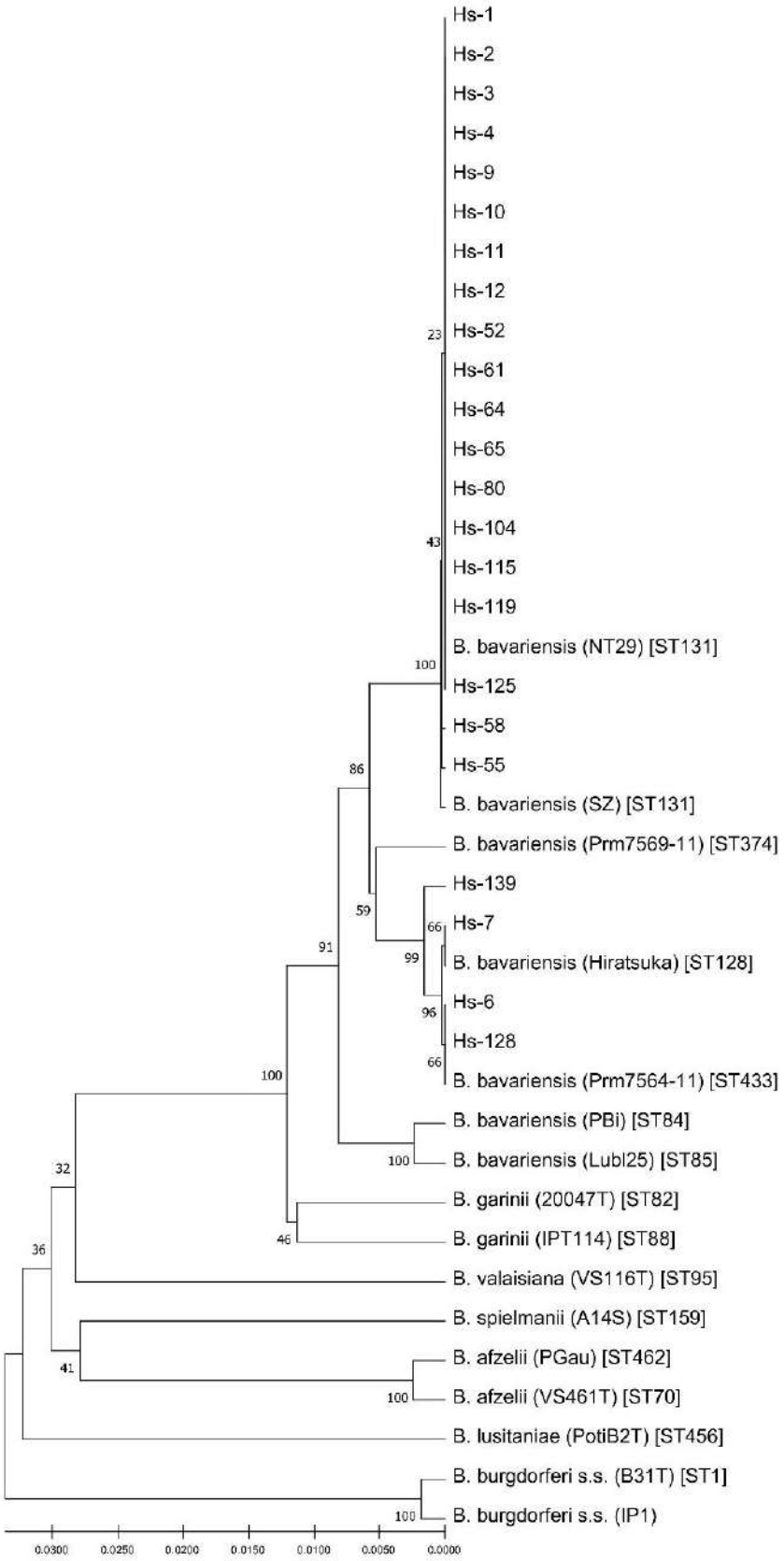


Рисунок 8 – Результаты МЛСА (2026 п.н.) изолятов от людей, больных ИКБ. Обозначения: в круглых скобках – название штамма, в квадратных – его сиквенс-типа [ST] по базе данных «Borrelia spp. MLST» (URL: https://pubmlst.org/organisms/borrelia-spp). Номера доступа нуклеотидных последовательностей в GenBank NCBI указаны в Приложении А.

Для таксономических целей рекомендована схема МЛСТ [109]. Поэтому для проверки правильности реидентификации изолятов *B. garinii* NT29, исследованных методом МЛСА, отобраны 5 изолятов *B. bavariensis* (Hs-10, Hs-55, Hs-58, Hs-128, Hs-139) для исследования методом МЛСТ. Результаты показали, что все 5 исследованных изолятов относятся к *B. bavariensis*. Среди нуклеотидных последовательностей их генов, рекомендованных протоколом МЛСТ, обнаружено по 2 аллеля. Более гетерогенными оказались гены *clpA, clpX, pyrG* и *rplB* (Таблица 6). Длина сцепленных последовательностей генов протокола МЛСТ составила 4785 п.н., а индекс их вариабельности – 0,004. На дендрограмме исследованные изоляты группировались в один большой кластер со штаммами *B. bavariensis*: NT29, SZ, Konnai 17 и NMJW1(ST131); Tom2806 (ST328); Arh923 (ST594); FujiP2 и J-14 (ST371); Prm7564-11 (ST433); Prm7569-11 (ST374); Prm7019-12 (ST1070); Arh913, Tom3506 и Hiratsuka (ST128) евразийской геномной подгруппы. Штаммы PBi (ST84) и Lubl25 (ST85) европейской подгруппы *B. bavariensis* группировались в соседний кластер (Рисунок 9).

Последовательности участков всех генов, рекомендованных для исследования методами МЛСА и МЛСТ, изолятов Hs-10, Hs-55, Hs-58 были сходы между собой на 99,9–100%. Последовательности нуклеотидов изолятов Hs-128 и Hs-139, полученные методом МЛСА, оказались сходными между собой на 99,7%, а полученные МЛСТ – на 100%. Сцепленные нуклеотидные последовательности всех участков изолятов Hs-10, Hs-55, Hs-58 по результатам МЛСА и МЛСТ оказались сходны на 99,9–100% со штаммами *B. bavariensis* NT29 и SZ. Нуклеотидные последовательности изолятов, полученные методом МЛСА, отличались от последовательностей типового штамма B31T *B. burgdorferi* s. s. на 6,5%, что немного меньше, чем выявлено по результатам МЛСТ (7,2%). Результаты анализа нуклеотидных последовательностей исследованных изолятов и типового штамма *B. garinii* 20047T, полученные методом МЛСА и МЛСТ, показали, что отличие составило всего 2,3–2,7% и 2,0–2,2% соответственно. Сходство исследованных нами изолятов с типовым штаммом *B. bavariensis* PBi по результатам МЛСТ составило 98,5–98,7%, а по данным МЛСА – от 97,8 до 98,4%.

Таблица 6 – Полиморфизм нуклеотидных последовательностей генов, рекомендованных протоколом МЛСТ, у изолятов от больных ИКБ. В скобках указана позиция в последовательности референсного штамма B31T *B. burgdorferi* s. s., RefSeq GCF_000008685)

Ген	**Длина последо-вательности, п.н.**	**Номера аллелей генов по базе данных PubMLST**	**Индекс вариа-бельности, d**	**Нуклеотидные замены**							**Аминокис-лотные замены**
				SNP	**Уни-кальные**	**Неуни-кальные**	**Встав-ки**	**Деле-ции**	**Синони-мичные**	**Несино-нимичные**	
clpA	579	56, 60	0,017	8	4	4	0	0	4	4 (c.1473A>G c.1879G>A c.1925C>G c.1945T>C)	4 (p.491I>M p.627A>T p.627T>R p.649F>L)
clpX	624	42, 45	0,016	7	2	5	0	0	5	2 (c.830A>G c.1027G>T)	2 (p.277E>G p.343V>L)
nifS	564	41, 44	0,006	3	0	3	0	0	3	0	0
pepX	570	51, 54	0,008	4	0	4	0	0	4	0	0
pyrG	603	47, 50	0,012	6	0	6	0	0	6	0	0

Таблица 6 – (продолжение)

Ген	Длина последовательности, п.н.	Номера аллелей генов по базе данных PubMLST	Индекс вариабельности, d	Нуклеотидные замены							Аминокислотные замены
				SNP	Уникальные	Неуникальные	Вставки	Делеции	Синонимичные	Несинонимичные	
recG	651	46, 173	0,001	1	1	0	0	0	0	1 (c.1015A>G)	1 (p.339N>D)
rplB	624	38, 41	0,01	5	1	4	0	0	4	1 (c.194T>C)	1 (p.65L>S)
uvrA	570	42,45	0,006	2	1	1	0	0	1	1 (c.2026G>A)	1 (p.676D>N)

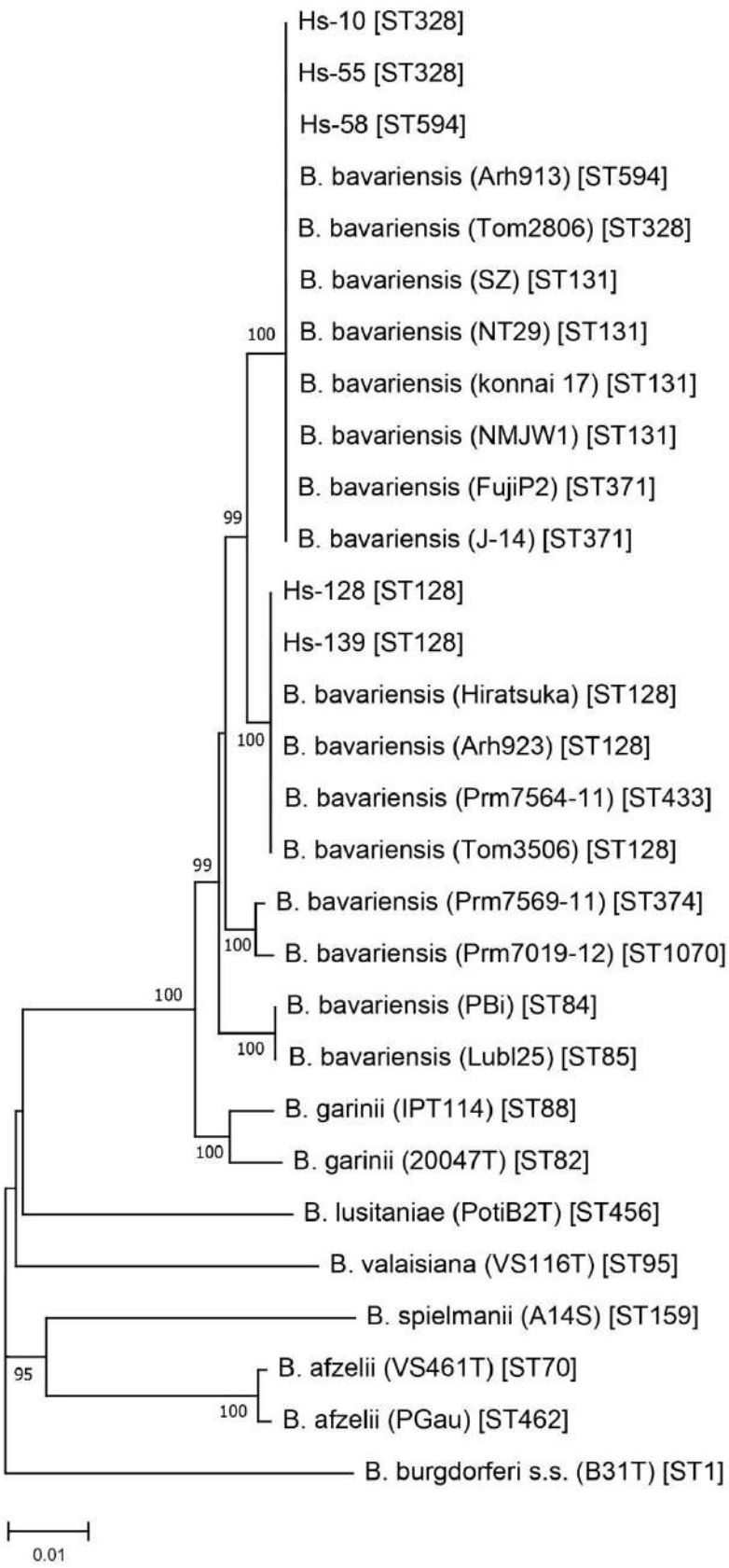


Рисунок 9 – Дендрограмма результатов МЛСТ (4785 п.н.) изолятов, исследованных для сравнения с их типированием по МЛСА. В круглых скобках – обозначение штамма, в квадратных – его сиквенс-тип [ST] по базе данных «Borrelia spp. MLST» (URL: https://pubmlst.org/organisms/borrelia-spp).

Оба метода генотипирования боррелий показали, что все изученные изоляты относятся к *B. bavariensis,* несмотря на то, что протоколы сравниваемых методов рекомендуют различные наборы участков генов для исследования. Обе схемы позволили разграничить европейскую и евразийскую геномные подгруппы *B. bavariensis*. Мы не обнаружили принципиальных различий между результатами идентификации первичных изолятов боррелий, полученными по методу МЛСА и МЛСТ. Однако выбор метода исследования может определяться конкретными целями и задачами исследования. В этой связи, мы полагаем, что МЛСА дает вполне приемлемые результаты для видовой идентификации этиологического агента ИКБ.

В клинической диагностике для идентификации видовой принадлежности проб боррелиозной ДНК МЛСА представляется более рациональным, чем МЛСТ: его протокол предусматривает исследование меньшего числа генов. Однако он остается затратным и времяемким, особенно для повседневного применения в условиях практических клинико-диагностических лабораторий. В связи с этим мы предприняли попытку оптимизации метода МЛСА.

3.1.2 Подтверждение идентификации изолятов боррелий установленного вида оптимизированным методом МЛСА

Прежде всего, был проведен детальный сравнительный количественный анализ сходства нуклеотидных последовательностей фрагментов генома всех изолятов, полученных от пациентов с ИКБ, а также степени их отличий от последовательностей аналогичных участков генома других патогенных видов боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. По результатам данного анализа было обнаружено, что наибольшими отличиями в этом отношении обладают последовательности генов *recA* и *ospA* (Таблица 7).

Таблица 7 – Вариабельность нуклеотидных последовательностей участков всех генов у 23 изолятов *B. bavariensis* от людей с ИКБ, исследованных по протоколу МЛСА.

Ген и длина его последовательности	**Индекс вариабельности, d**	**Сходство (в %) нуклеотидных последовательностей исследованных участков с евразийской подгруппой *B. bavariensis***	**Их отличие (в %) от последовательностей аналогичных фрагментов генома у**		
			***B. bavariensis* PBi**	***B. garinii* 20047T**	**других видов *B. burgdorferi* s. l., не менее**
rrs, 501 п.н.	0	100	0,4	0,2	0,8
fla, 437 п.н.	0,003	99,5–100	0,6–1,2	1,2–1,8	5,8
Спейсер *rrfA-rrlB*, 175 п.н.	0,003	98,8–100	1,7–2,3	1,7–2,3	4,8
groEL, 224 п.н.	0,005	98,7–100	2,2–2,7	2,2–2,7	3,6
hbb, 327 п.н.	0,008	98,5–100	1,2–1,5	1,2–1,5	4,3
recA, 150 п.н.	0,006	97,3–100	0,7–2	2–3,4	6,7
ospA, 211 п.н.	0,015	95,3–100	4,7–8,1	9,5–10,9	8,5
Сцепленные последовательности участков генов *recA* и *ospA*, 361 п.н.	0,014	96,1–100	3,6–5,6	6,4–7,8	8,3

По данным, обобщенным в этой таблице, структура участков обоих генов в целом представлялась видоспецифичной. Вместе с тем, максимальные значения отличий полученных последовательностей гена *recA B. bavariensis* были равны их минимальным значениям у наиболее близкого вида – *B. garinii*. Следовательно, среди пула исследованных изолятов *B. bavariensis* встречались аллельные варианты участка их гена *recA*, структура которых идентична (или почти идентична) таковой у некоторых изолятов *B. garinii*. На практике такое сходство

может затруднить идентификацию этих генетически близких видов. В этом отношении, несмотря на значительный диапазон показателей гетерогенности последовательностей гена *ospA* у исследованных изолятов *B. bavariensis*, они более четко характеризуют их видовую специфичность, чем *recA* (Таблица 7). Изложенное выше подтвердили дендрограммы, построенные нами отдельно по результатам секвенирования генов *recA* и *ospA* (Рисунки 10 и 11).

Поскольку всем боррелиям свойственна большая внутривидовая и внутрипопуляционная гетерогенность [24] (это показали и результаты секвенированного пула изолятов *B. bavariensis* – Рисунки 10 и 11), изолят, который необходимо идентифицировать, может иметь непредсказуемое сочетание аллелей генов *recA* и *ospA*. Исходя из этого, были отобраны 6 изолятов, которые представляют все выявленные нами аллельные варианты генов *recA* и *ospA* *B. bavariensis*: они на 98,5–100% сходны с нуклеотидными последовательностями различных изолятов евразийской генетической подгруппы боррелий этого вида (SZ, Prm7564-11, Prm7569-11, Hiratsuka) и несколько менее – с европейскими изолятами, например, с референсным штаммом PBi – на 97,8–98,4%. Вместе с тем, все генетические варианты *B. bavariensis*, включая штамм PBi, имеют существенные отличия (т. е. сходство не более 94,9%), позволяющие четко дифференцировать их по данным МЛСА от боррелий других видов (Таблица 7).

Путем построения соответствующей дендрограммы апробирована возможность использования сцепленных нуклеотидных последовательностей этих двух генов для подтверждения уже известной видовой принадлежности изолятов (Рисунок 12). Она демонстрирует наличие двух генетических подгрупп *B. bavariensis* (евразийской и европейской) и их чёткие отличия от соответствующих сцепленных последовательностей фрагментов генома боррелий других видов из баз данных (Рисунок 12). Это свидетельствует о полной идентичности результатов идентификации боррелий группы *B. burgdorferi* s. l. путём анализа сцепленных нуклеотидных последовательностей участков генов *recA, ospA* с их исследованием по полному протоколу МЛСА.



Рисунок 10 – Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена *recA* (150 п.н.) изолятов от людей, больных ИКБ. В круглых скобках – наименование штаммов по базе данных PubMLST Borrelia spp.; в квадратных скобках — номера доступа в GenBank NCBI.

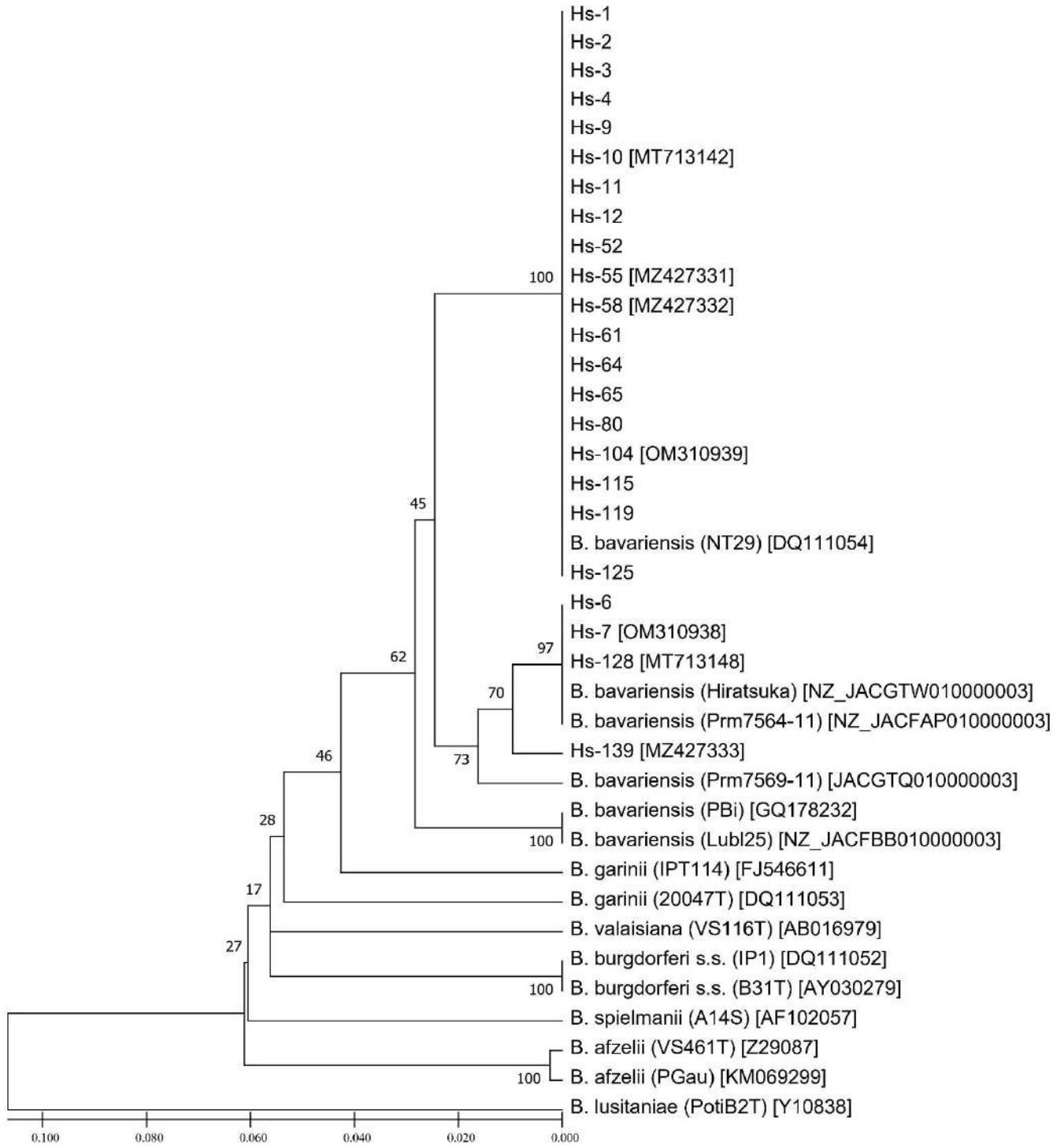


Рисунок 11 – Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена *ospA* (211 п.н.) изолятов от людей, больных ИКБ. В круглых скобках – наименование штаммов по базе данных PubMLST Borrelia spp.; в квадратных скобках — номера доступа в GenBank NCBI.

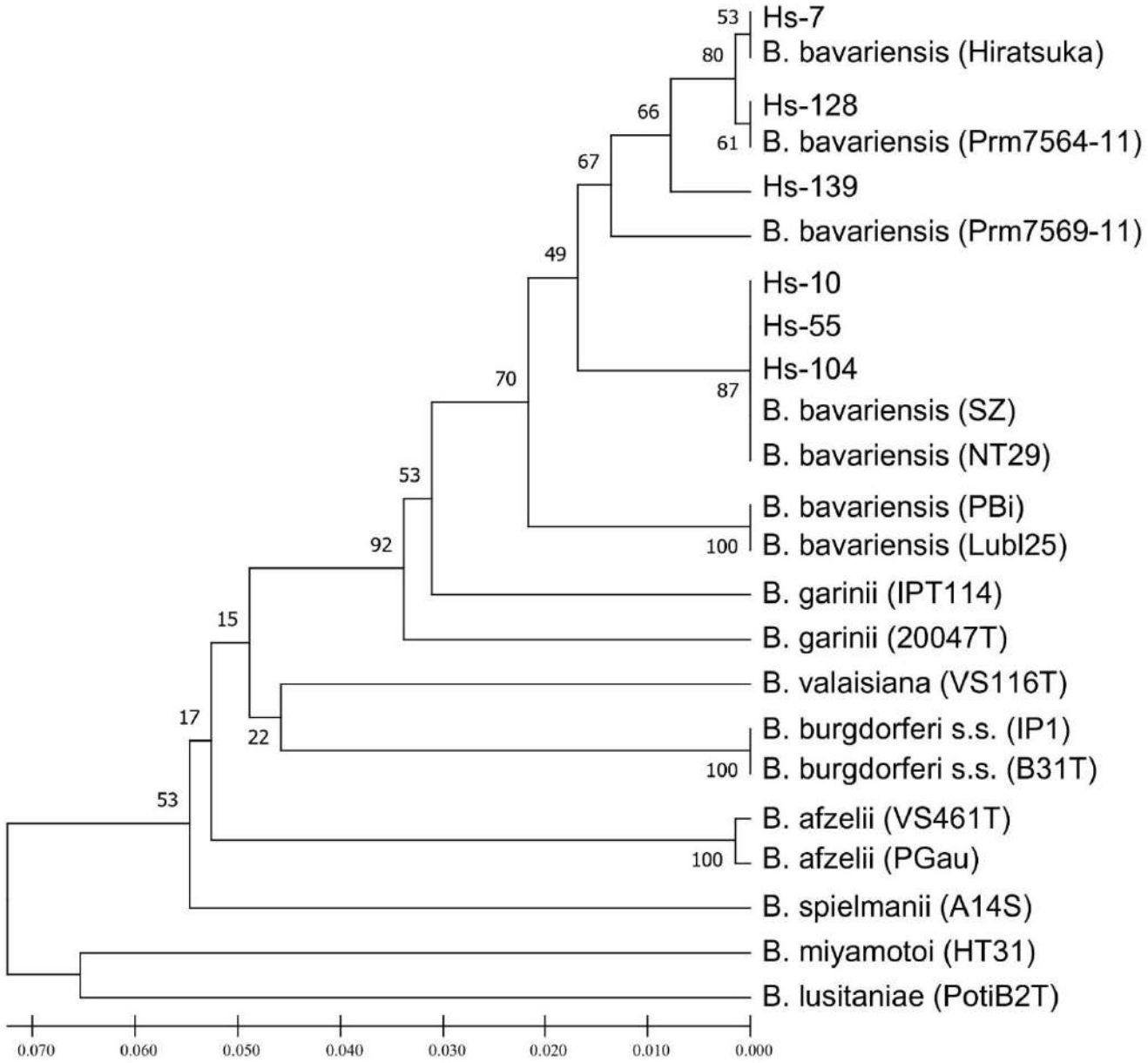


Рисунок 12 – Дендрограмма сцепленных нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* (361 п.н.). В круглых скобках – наименование штаммов по базе данных GenBank NCBI и PubMLST Borrelia spp.

Сцепленные нуклеотидные последовательности участков гена *recA* и *ospA*, принадлежащие референсным штаммам каждого из наиболее распространённых видов группы *B. burgdorferi* s. l. (Рисунок 12), четко отличаются друг от друга. Поэтому видовая принадлежность вновь исследуемого образца может быть выявлена путём расчёта максимального сходства сцепленных последовательностей этих двух его генов с аналогичными последовательностями определенного вида боррелий данной группы, включая *B. bavariensis*, или

построением аналогичной дендрограммы. Для оптимизации регулярных лабораторных исследований её неизменный «шаблон» по типу Рисунка 12, может храниться в виде файла (например, в программе MEGA или любой другой, Приложение В).

В данном разделе диссертации для выяснения возможности оптимизации МЛСА представлены соответствующие исследования изолятов *B. bavariensis*, видовая принадлежность и гетерогенность которых были предварительно установлены по полному протоколу этого метода (раздел 3.1). Для подтверждения возможности практической реализации такого подхода необходимо было провести его испытание на изолятах боррелий неизвестной видовой принадлежности.

3.1.3 Контроль результатов первичной «слепой» идентификации изолятов боррелий оптимизированным методом МЛСА

Апробация предложенного оптимизированного МЛСА проведена путем идентификации 25 изолятов *B. burgdorferi* s. l. неизвестной ранее видовой принадлежности (раздел 2.1.7).

По сцепленным последовательностям участков генов *recA* и *ospA* каждого из 25 изолятов, а также всех боррелий патогенных видов, была построена дендрограмма описанным выше способом (раздел 3.2). Она показала, что 12 изолятов кластеризуются с *B. afzelii*, 5 – с *B. garinii*, 4 – с *B. bavariensis*, 3 – с *B. valaisiana* и 1 – с *B. burgdorferi* s. s. (Рисунок 13). Полученные результаты свидетельствовали о циркуляции в природном очаге Воронежской области не менее 5 различных видов боррелий: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. valaisiana* и *B. burgdorferi* s. s.

Результаты дальнейшего анализа показали, что между сцепленными последовательностями участков генов *recA* и *ospA* каждого из выявленных видов существует большое сходство, наряду с их значительным отличием от патогенных боррелий других видов группы *B. burgdorferi* s. l. (Таблица 8).

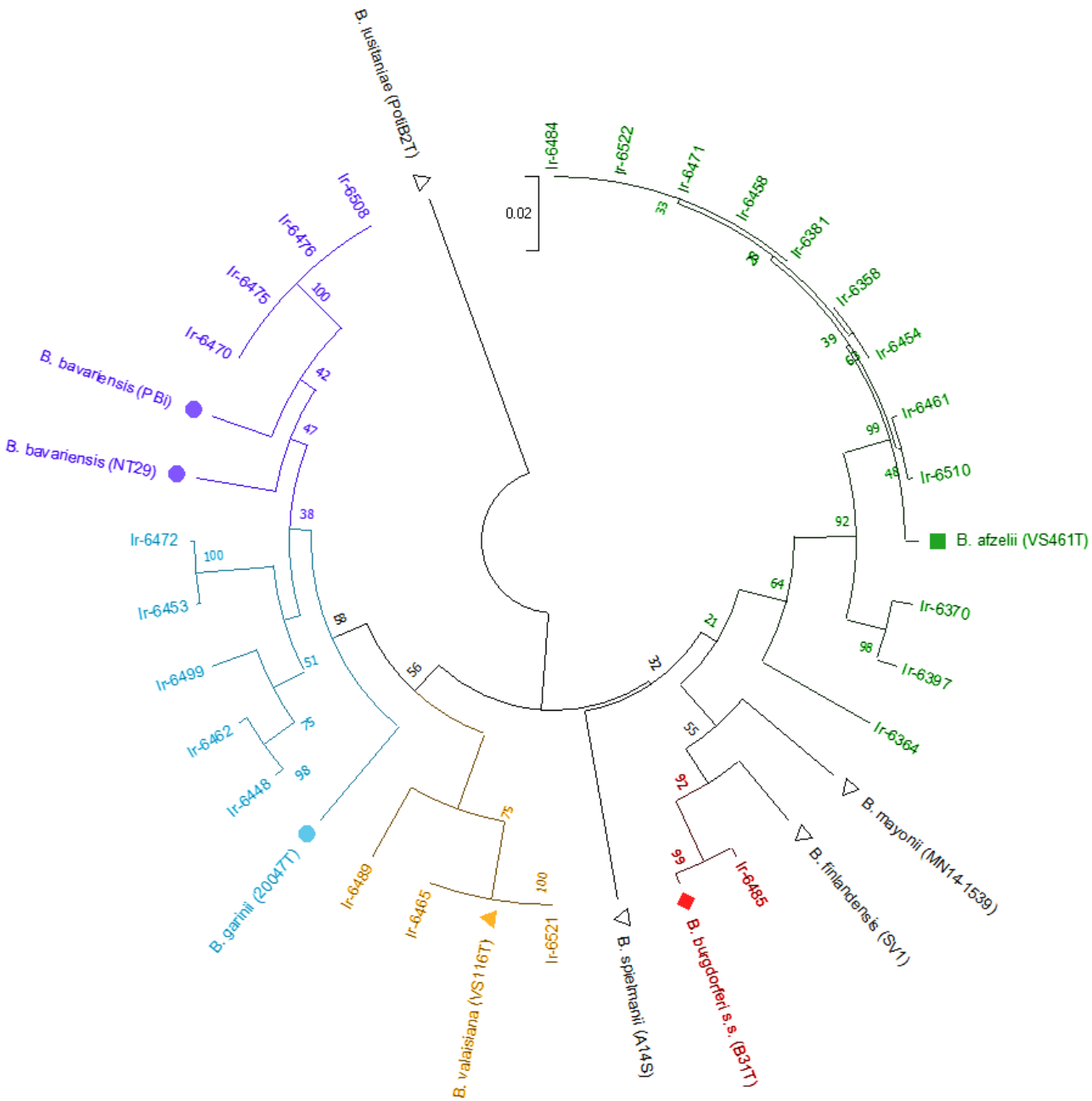


Рисунок 13 – Дендрограмма результата первичной («слепой») идентификации 25 изолятов «Ir» *B. burgdorferi* s. l. от клеща *I. ricinus* по сцепленным нуклеотидным последовательностям их генов *recA* и *ospA* (360 п.н.). В круглых скобках – номера типовых штаммов патогенных боррелий группы *B. burgdorferi* s. l.

Таблица 8 – Сходства (в %) сцепленных нуклеотидных последовательностей участков генов *recA* и *ospA* у изолятов разных видов, идентифицированных оптимизированным МЛСА.

Вид боррелий; в скобках – типовой штамм	**Сходство выявленных изолятов**	**Их сходство с аналогичными последовательностями типового штамма**	**Отличие от других видов патогенных боррелий группы *B. burgdorferi* s. l.**
B. afzelii (VS461T)	93,6–100	94,2–99,4	6,7–16,0
B. bavariensis (PBi; NT29)	99,7–100	96,4–96,7	5,6–14,3
B. burgdorferi s. s. (B31T)	Выявлен 1 изолят	99,4	6,4–11,2
B. garinii (20047T)	94,2–99,7	91,1–98,9	5,3–14,8
B. valaisiana (VS116T)	95,8–100	95,8–100	5,0–12,6

Это позволило провести случайный выборочный контроль достоверности проведенной идентификации изолятов по полному протоколу метода МЛСА (раздел 3.2). Из выявленных одновидовых групп для исследования было отобрано по одному изоляту (Ir-6448, -6470, -6485, -6521, -6522). Полученные результаты (Рисунок 14) подтвердили принадлежность большинства перечисленных изолятов к различным видам боррелий, выявленным первичным экспериментальным «слепым» определением. Однако обнаружилось несоответствие итогов опытной и контрольной идентификации изолята Ir-6470: сцепленные последовательности секвенированных участков генов *recA* и *ospA* оказались идентичными таковым у *B. bavariensis*, а по определению видовой принадлежности этого изолята полным методом МЛСА он кластеризовался с *B. garinii* (Рисунок 14). Эти боррелии генетически чрезвычайно близки: их считали одним видом до придания одному из генотипов *B. garinii* ранга самостоятельного вида – *B. bavariensis* [131].

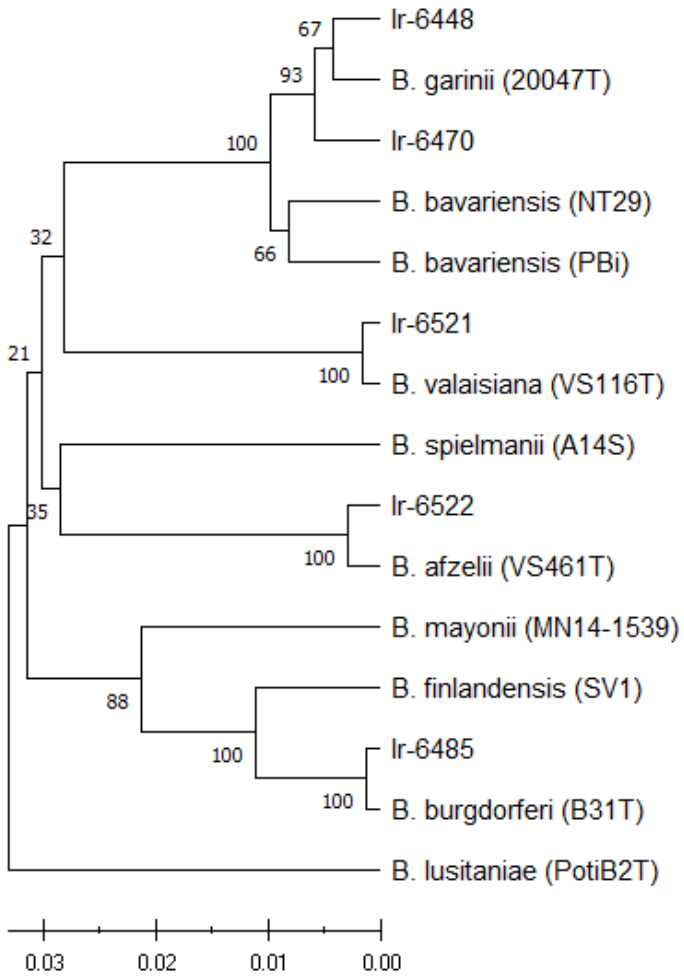


Рисунок 14 – Дендрограмма результатов контрольной идентификации 5 изолятов по полному протоколу метода МЛСА (1187 п.н.). В круглых скобках – наименование типовых штаммов по базе данных GenBank NCBI.

Как отмечено в разделе 3.2, впервые тестируемым изолятом *B. bavariensis* может быть образец, у которого структура сцепленных участков генов *recA* и *ospA* отличается от таковой у *B. garinii* незначительно. Хотя сходство этого показателя у изолята Ir-6470 с типовыми штаммами боррелий двух близких видов оказалось больше с *B. bavariensis* PBi (96,4%), чем с *B. garinii* 20047T (94,2%), дендрограмма, кластеризующая результаты их контрольной идентификации полным МЛСА, относит данный изолят к *B. garinii* (Рисунок 14). Если дендрограмма относит испытываемый изолят к *B. garinii*, но помещает его между кладами типовых изолятов этих видов (см. изолят Ir-6470 на Рисунке 14), более вероятно, что такой изолят относится к тому из них, с которым имеет бóльшее

сходство по показателю сцепленных нуклеотидных последовательностей участков *recA* и *ospA*.

Возможность оптимизации МЛСА представлена на примере изолятов от людей с ИКБ, предварительно идентифицированных по полному протоколу этого метода как *B. bavariensis*, и неидентифицированных изолятов от клещей *I. ricinus*. Кроме того, она проверена на последовательностях боррелий различных видов, которые содержит база данных GenBank NCBI. Поскольку ген *ospA* находится на линейной плазмиде боррелии lp54, поиск и отбор изолятов из этой базы проведен при наличии сведений об этом гене с выборкой «core nucleotide database» и «whole-genome shotgun contigs» у патогенных видов. Затем из полученного набора данных проведен аналогичный поиск и отбор по гену *recA*. В итоге отобран 631 изолят, характеризующийся наличием генов *recA* и *ospA* с более 80% покрытием их последовательностей. Построены дендрограммы, отражающие в отдельности гетерогенность этих генов у боррелий разных видов (Рисунки 15 и 16), а также их сцепленных последовательностей (Рисунок 17). Наименования штаммов даны по базе данных GenBank NCBI.

Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена *recA* показала четкую видовую кластеризацию для *B. lusitaniae, B. spielmanii, B. afzelii* и *B. mayonii* (Рисунок 15). Последовательности *B. burgdorferi* s. s. группировались в 2 отдельных кластера, разграниченных в других ветвях дендрограммы. База данных GenBank NCBI содержит значительное количество не переименованных изолятов, которые депонированы до выделения *B. bavariensis* в самостоятельный вид. Такие изоляты (*B. burgdorferi* Y6A, JL3, JL13, JC2-10, JC1-15, JN8, JJ2, JC1-11, IM11, JC1-7, ASF, HS2, HT19 и *B. garinii* NT29, BgVir, T2929, T2916, T3221, IBS20, IBS3, BG13, BG10 в работах других авторов [86, 95, 102, 126] кластеризовались с изолятами, относящимися в настоящее время к *B. bavariensis*, а изолят *B. burgdorferi* JN15 – к *B. garinii* [102, 205]. Несмотря на кластеризацию большинства видов в отдельные 13 кластеров (Рисунки 15 – 17), наблюдается группировка изолятов *B. garinii* и *B. bavariensis* в 3 кластера. Это не позволяет

четко дифференцировать эти очень близкие виды боррелий и подчеркивает необходимость дополнительных маркеров для дифференциальной диагностики.

Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена *ospA* показала их аналогичную кластеризацию с геном *recA* у боррелий *B. lusitaniae, B. spielmanii, B. afzelii* и *B. mayonii* (Рисунок 16). Но она демонстрирует более четкие различия боррелий патогенных видов, чем дендрограмма гена *recA*. Последовательности *B. burgdorferi* s. s. группировалась в 2 отдельных кластера, разграниченные другими ветвях дендрограммы. Изоляты *B. bavariensis* A104S и NT24, *B. garinii* IPT105 и IPT144, *B. afzelii* IPT109 кластеризуются отдельно от всех других. Это, видимо, объясняется тем, что нуклеотидные последовательности немногих названных изолятов отличались от остальных, выбранных из GenBank NCBI, покрытием не более 80% общей длины последовательностей нуклеотидов данного гена, т. е. условия, ограничивавшего их выборку (см. выше). Нуклеотидные последовательности гена *ospA* видов *B. garinii* и *B. bavariensis* группируются по отдельности в 8 кластеров. Однако один кластер *B. bavariensis* содержал последовательность гена *ospA* PBr *B. garinii*. Таким образом, последовательности участка гена *ospA* в отдельности обладает невысокой видовой дифференцирующей специфичностью, но лучшей, чем ген *recA*.

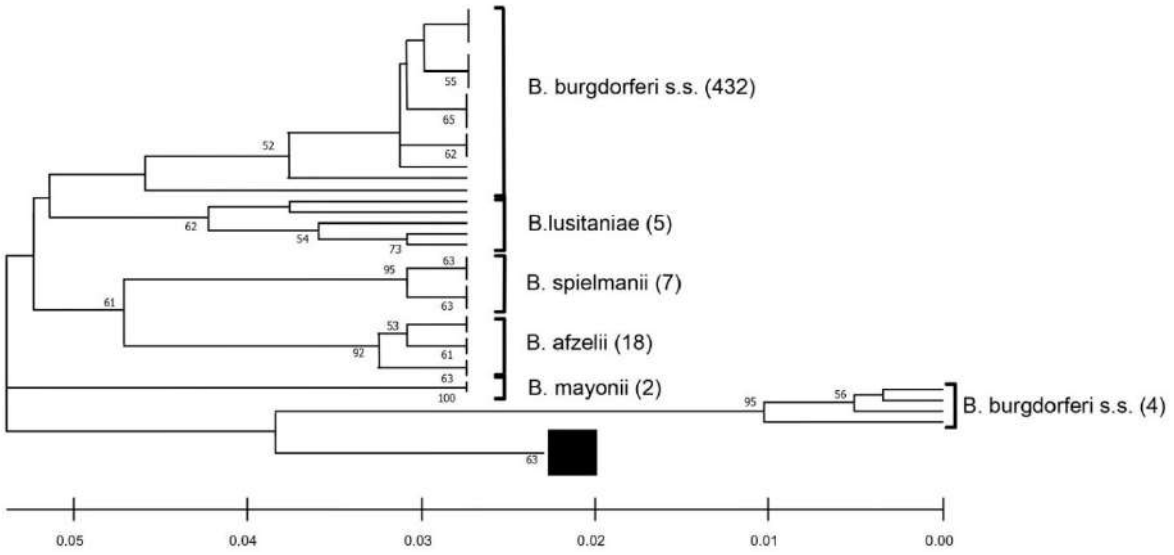


Рисунок 15 – Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена *recA* (150 п.н.) 631 изолята патогенных боррелий (7 видов) в базе данных GenBank NCBI. В скобках указано количество изолятов, принадлежащих одному виду боррелий и попадающих в данный кластер. Черным квадратом обозначен разрыв дендрограммы. Индекс вариабельности составил 0,038.



Рисунок 15 – (продолжение).

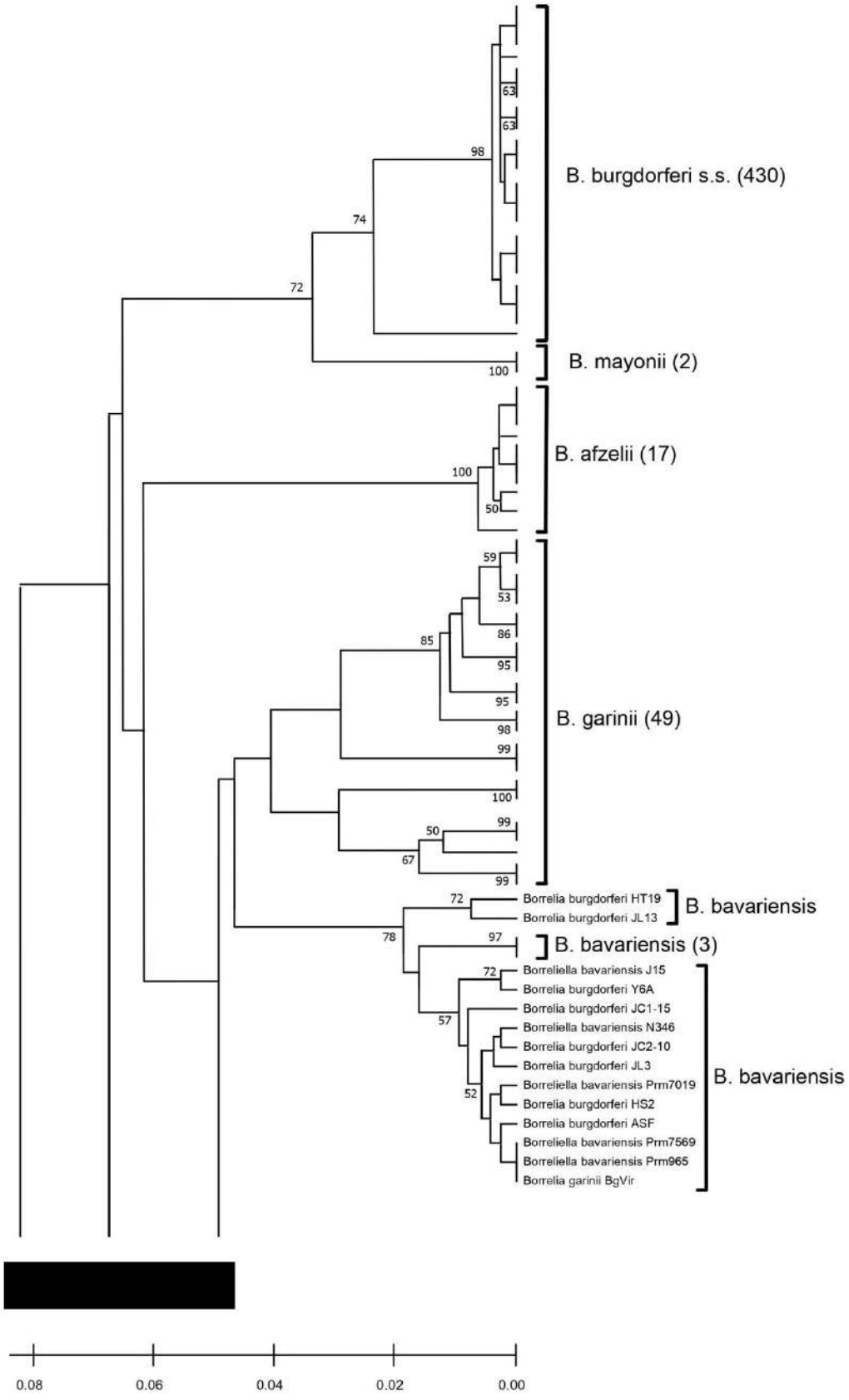


Рисунок 16 – Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена *ospA* (211 п.н.) 631 изолята патогенных боррелий (7 видов) в базе данных GenBank NCBI. Индекс вариабельности составил 0,071. Обозначения в подписи к Рисунку 15.



Рисунок 16 – (продолжение).

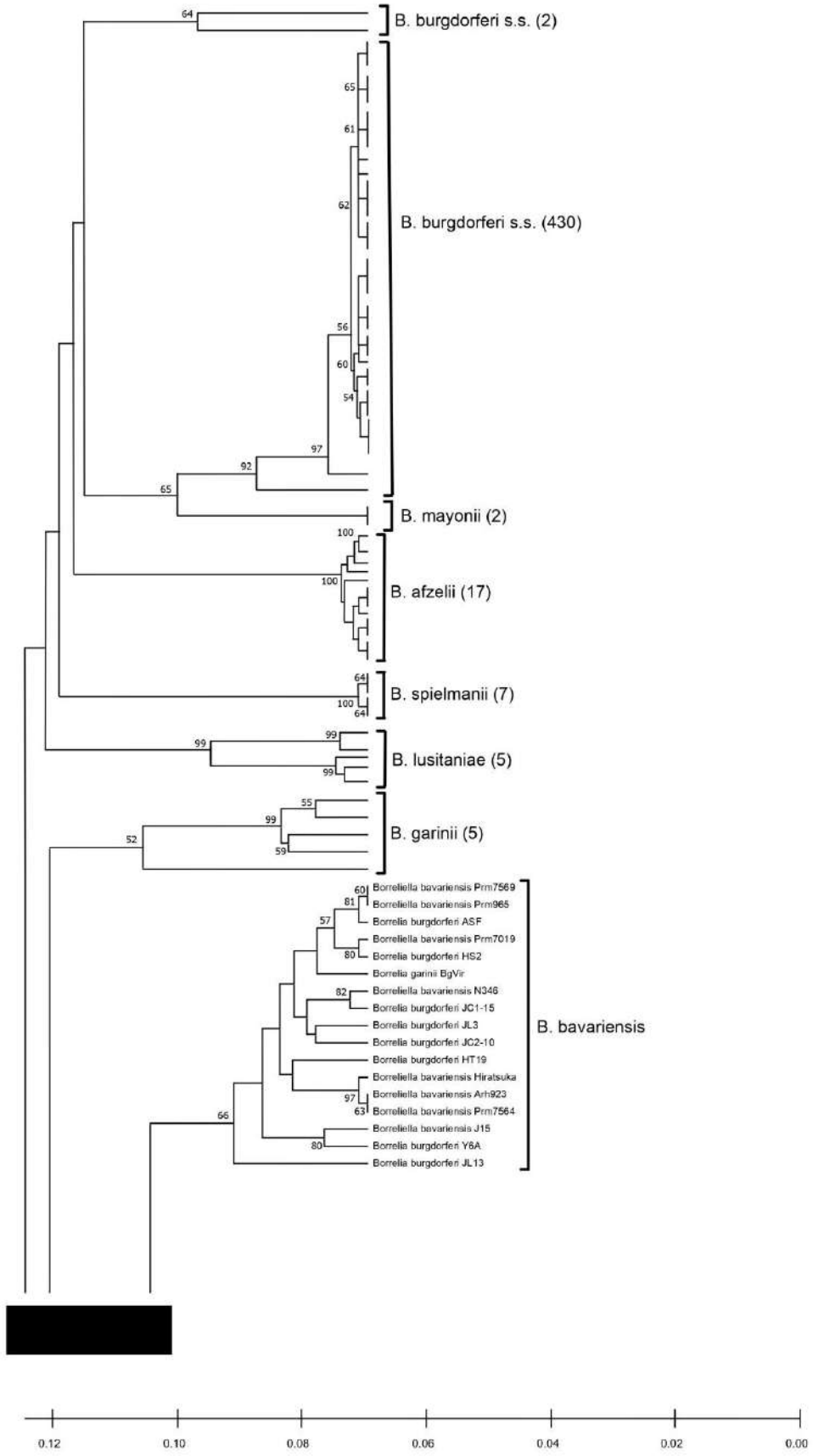


Рисунок 17 – Дендрограмма сцепленных нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* (361 п.н.) 631 изолята патогенных боррелий (7 видов) в базе данных GenBank NCBI. Индекс вариабельности составил 0,056. Обозначения в подписи к Рисунку 15.

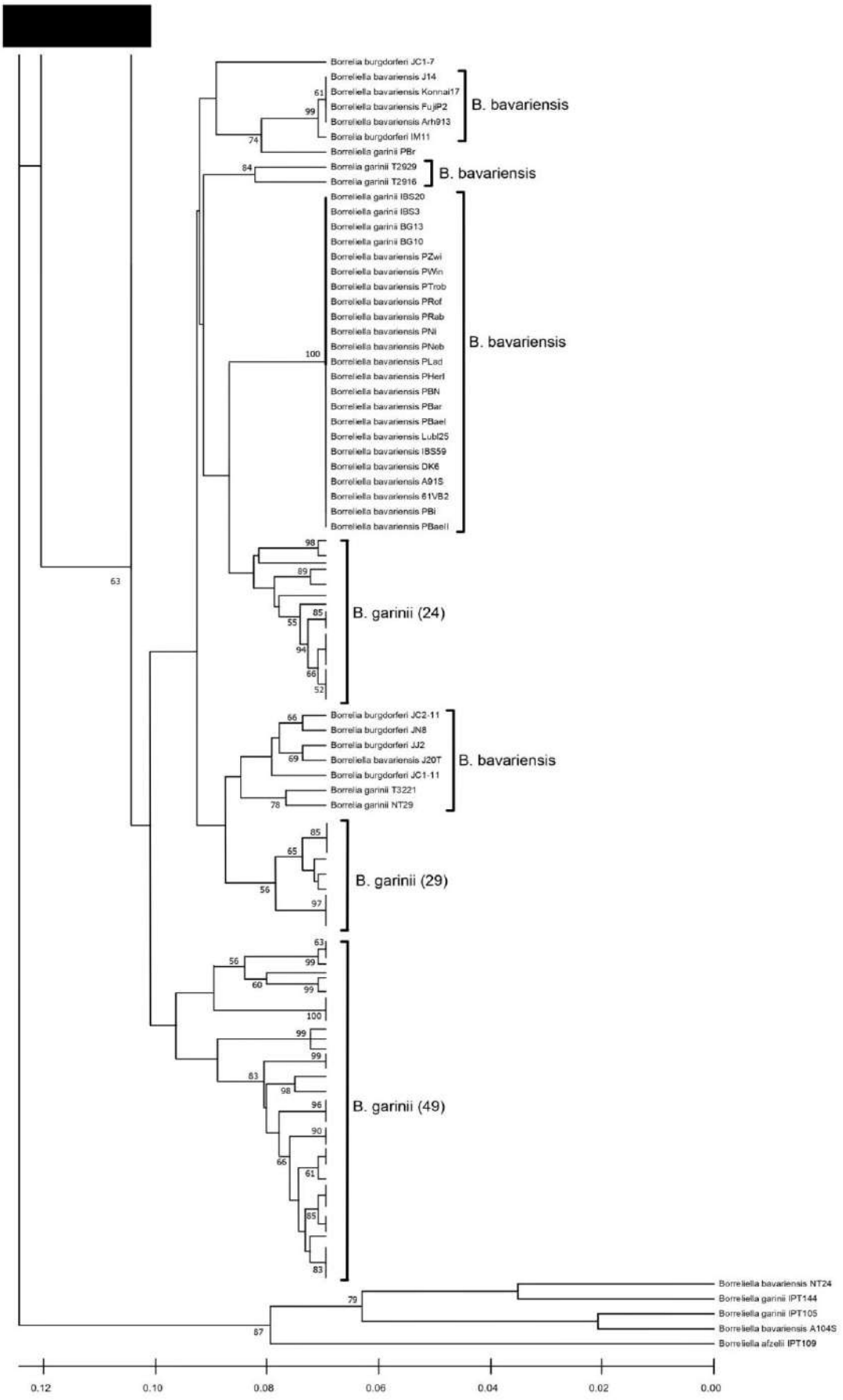


Рисунок 17 – (продолжение).

Дендрограмма (Рисунок 17) сцепленных нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* демонстрирует их четкую группировку кластеров по различным видам *B. burgdorferi* s. s., *B. lusitaniae, B. spielmanii, B. afzelii* и *B. mayonii*. Сцепленные нуклеотидные последовательности этих генов у *B. garinii* и *B. bavariensis* не разделились на две четкие видовые ветви, но последовательности различных изолятов каждого из них формируют отдельные кластеры (9), в которых сгруппированы изоляты, принадлежащие либо *B. garinii,* либо *B. bavariensis*. Таким образом, проведенные исследования в целом подтвердили возможность применения оптимизированного МЛСА для определения видовой идентификации боррелий группы ИКБ при лабораторной диагностике этих заболеваний (Приложение В).

3.2 Выбор участка гена *p66* для исследования

Белок P66 боррелий имеет две наиболее изученные поверхностные петли (глава 1). По литературным данным N-концевая петля представилась менее гетерогенной, чем С-концевая, которая была выбрана для исследований ее структуры у большого числа музейных изолятов. Проанализированы in silico сведения о нуклеотидных последовательностях гена *p66*, имеющиеся в GenBank NCBI и кодирующих структуру этой петли белка. Из их общего количества для сравнения с генетической структурой музейных изолятов отобраны последовательности, которые покрывают более 90% обоих участков гена *p66*. Кроме того были «отбракованы» последовательности безымянных и одинаковых штаммов боррелий. Так из 957 последовательностей, которые включают участок, кодирующий N-концевую петлю белка P66 *B. burgdorferi* s. l. (522–678 п.н. по референсу кодирующей последовательности гена *p66* B31T *B. burgdorferi* s. s., RefSeq GCF_000008685), отобраны 918; а из последовательностей, которые включают участок, кодирующий С-концевую петлю белка P66 (1362–1629 п.н. этого гена у того же штамма; RefSeq GCF_000008685) – 886 из 931.

Анализ данных выявил 76 различных аллельных вариантов, кодирующих N-концевую петлю белка P66 и отличающихся как минимум одним нуклеотидом. При этом 63 из этих вариантов содержали несинонимичные замены, приводящие к вариабельности аминокислотной последовательности N-концевой петли. Внутри вида *B. bavariensis* обнаружено 8 аллельных вариантов, из которых 5 оказались с несинонимичными нуклеотидными заменами.

Среди последовательностей, кодирующих С-концевую петлю белка P66, обнаружены 163 различные аллельные варианты, отличающиеся как минимум одним нуклеотидом. Причем 121 из этих вариантов содержали несинонимичные замены, приводящие к вариабельности аминокислотной последовательности в этой области белка P66. Внутри вида *B. bavariensis* обнаружено 13 аллельных вариантов, из которых 12 оказались с несинонимичными нуклеотидными заменами.

Для комплекса *B. burgdorferi* s. l. и отдельного вида *B. bavariensis* с помощью программы MEGA11 вычислили индексы вариабельности нуклеотидных последовательностей гена *p66* (d, Таблица 9), включая регионы, ответственные за кодирование N-концевой и С-концевой петель белка Р66.

Таблица 9 – Индекс вариабельности участков гена *p66* боррелий

Вид боррелий	**Участок гена *p66* по референсу кодирующей последовательности B31T *B. burgdorferi* s. s. (RefSeq GCF_000008685)**	**Индекс вариабельности, d (количество замен оснований на участке)**
Комплекс B. burgdorferi s. l.	522–678 п.н. (у N-конца белка Р66)	0,81
	1362–1629 п.н. (у С-конца белка Р66)	**2,92**
B. bavariensis	522–678 п.н. (у N-конца белка Р66)	0,39
	1362–1629 п.н. (у С-конца белка Р66)	**7,49**

Исходя из совокупности представленных выше данных, для дальнейшего исследования был выбран участок гена *p66*, кодирующий С-концевую поверхностную петлю белка Р66.

3.3 Аллельные варианты гена *p66*, кодирующего белок P66, у изолятов *B. bavariensis* от людей, больных ИКБ

3.3.1 Анализ нуклеотидных последовательностей участков гена *p66*

Один из факторов патогенности боррелий – поверхностный мембранный белок-порин P66 с множеством функций [72, 74, 122, 165, 181]. Он кодируется одноименным геном [65] и относится к иммуногенным белкам [59, 109, 150, 151]. Ранее (глава 1) описана вариабельность нуклеотидных последовательностей гена *p66* у спирохет рода *Borrelia* [36, 37, 62, 63, 69, 70, 158]. В отношении *B. bavariensis* такие исследования не проводились. С целью изучения вариабельности участка гена *p66* и его возможного влияния на патогенные свойства разных штаммов боррелий, проведено исследование идентифицированных изолятов *B. bavariensis*, полученных от людей, больных ИКБ.

Анализ нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* (280 п.н., Рисунок 18) всех 27 изолятов, полученных нами от больных ИКБ (раздел 3.1), показал, что большинство последовательностей (20 изолятов) были идентичны на 100%. Остальные 7 нуклеотидных последовательностей имели разное сходство друг с другом. Так, последовательности нуклеотидов участка гена *p66* 3-х изолятов (Hs-6, Hs-7, Hs-128 и Hs-163) были сходны между собой на 100%, но отличались от большинства последовательностей (от 20) на 1,8%, а от изолятов Hs-10 и Hs-80 – на 2,1%.

Кроме того, значительные особенности последовательности анализированного участка имел изолят Hs-139. Его сходство с изолятами Hs-10 и Hs-80 составило 96,8%; а с изолятами Hs-6, Hs-7, Hs-128 и Hs-163 аналогичный показатель не превышал 98,9%, а с остальными 20-ю изолятами составил всего 97,1%. Эти результаты свидетельствовали о том, что среди исследованных изолятов есть различные аллельные варианты нуклеотидных последовательностей участков анализируемого гена.

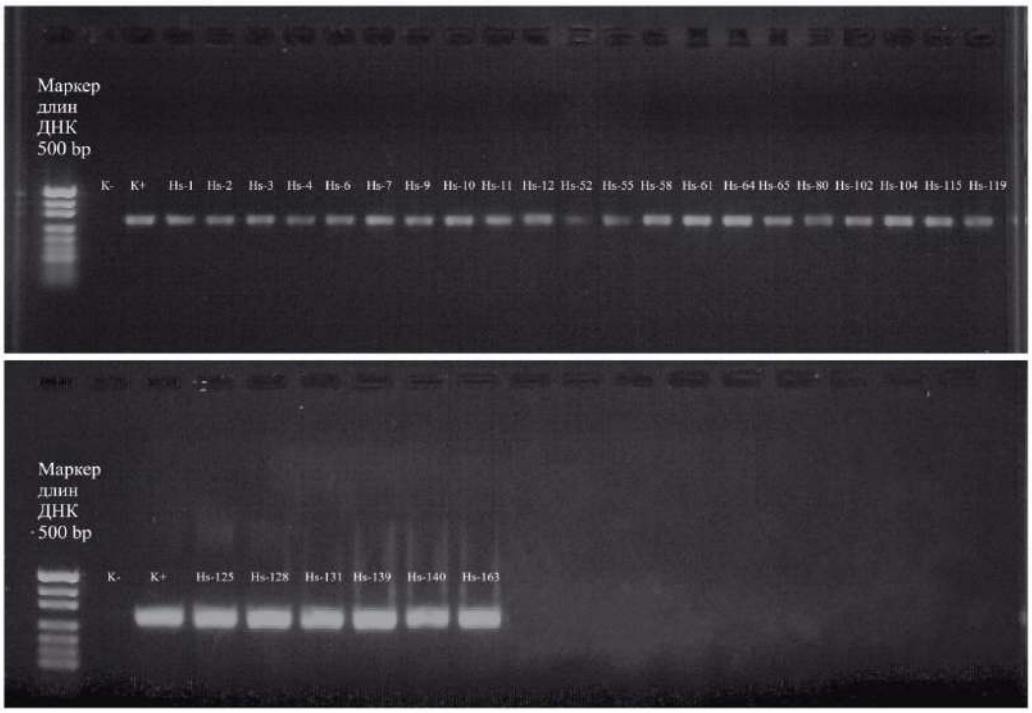


Рисунок 18 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов амплификации участка гена *p66* изолятов боррелий от людей, больных ИКБ.

Построенная дендрограмма (Рисунок 19) подтвердила данные об их сходстве и различии, а также предположение о вероятном существовании минимум 2-х таких аллельных вариантов.

Один из них представлен большинством исследованных изолятов (20 из 27), выделенных из биоптатов кожи или плазмы крови пациентов. Из этой группы на дендрограмме (Рисунок 19) несколько отстоят последовательности изолятов Hs-10 и Hs-80, которые отличались от остальных всего одной нуклеотидной заменой в разных позициях (Рисунок 20). Другой вариант (Рисунок 19) представляют 4 изолята (Hs-6, Hs-7, Hs-128, Hs-163), из которых 2 получены из биоптатов кожи и 2 из плазмы крови пациентов. По сравнению с первым вариантом последовательности участков этих изолятов имеют по 5 нуклеотидных замен в одинаковых позициях (1489, 1523, 1538, 1572, 1575; референс кодирующей последовательности – *B. bavariensis* PBi, RefSeq GCA_000196215). Кроме них, у участка изолята Hs-139 выравнивание выявило еще 3 нуклеотидные замены в позициях 1389, 1392 и 1393 (Рисунок 20, Таблица 10). Это позволило предположить наличие среди исследованных изолятов еще одного (третьего) аллельного варианта гена *p66*.

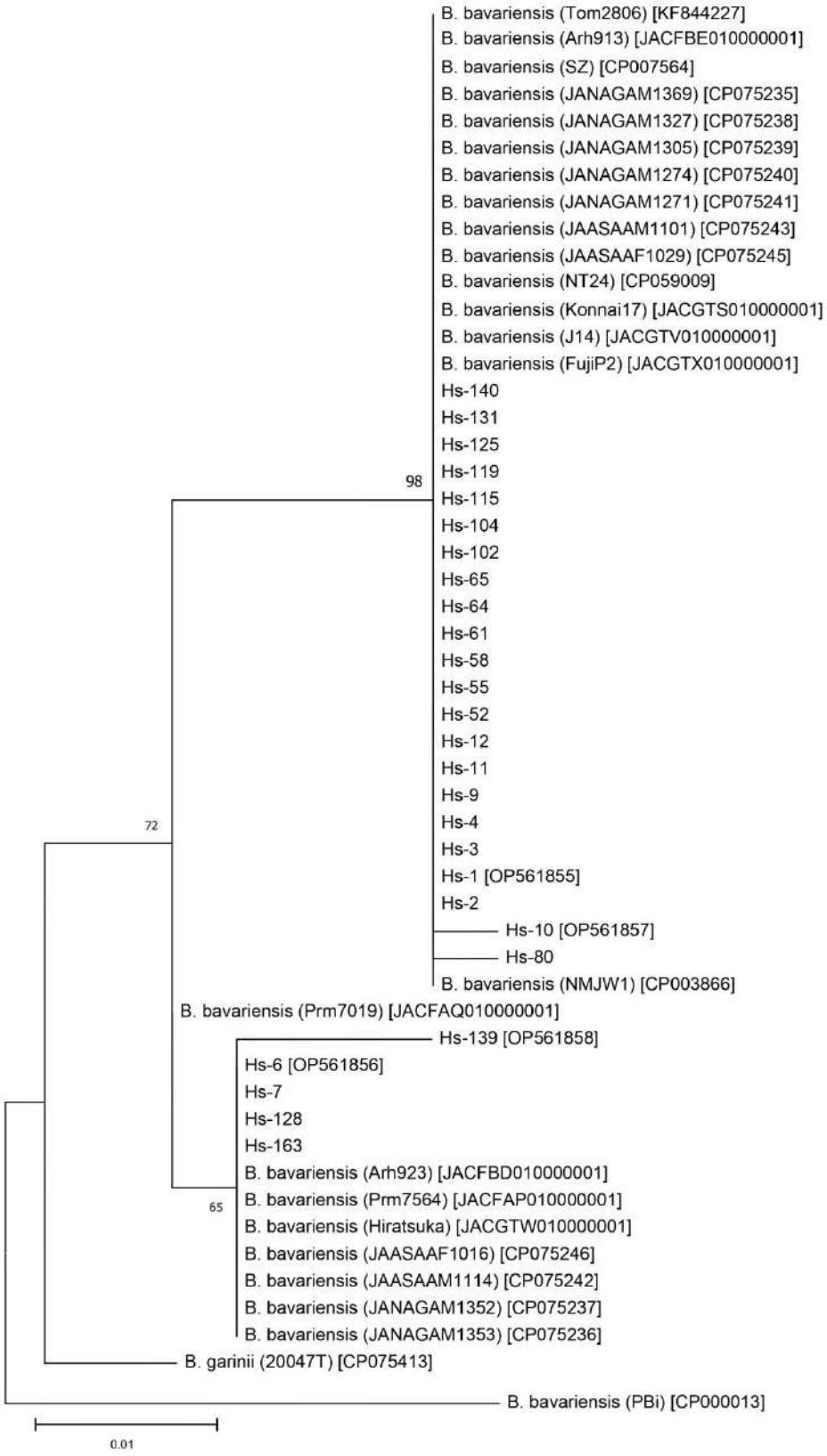


Рисунок 19 – Дендрограмма нуклеотидных последовательностей участка гена *p66* (280 п.н.) исследованных изолятов *B. bavariensis* от людей с ИКБ. Способ построения описан в главе 2. В круглых скобках – наименование штаммов боррелий; в квадратных скобках — номера доступа в GenBank NCBI. В соответствии с публикациями [132, 172] видовые названия изолятов Tom2806, SZ, NMJW1 изменены на *B. bavariensis*.

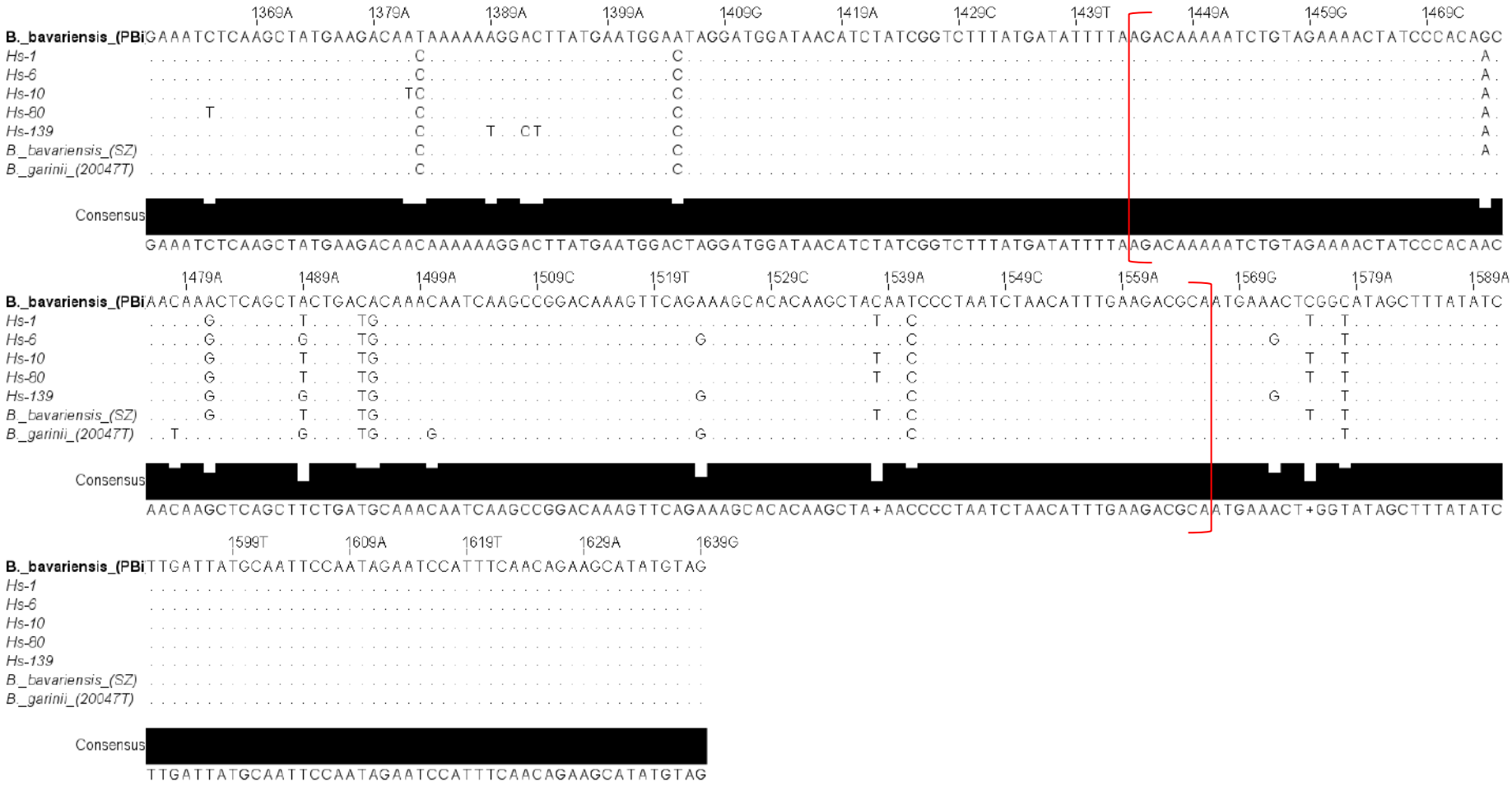


Рисунок 20 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* (280 п.н.) у изолятов *B. bavariensis*, представляющих его вероятные аллельные варианты, в сравнении с последовательностями этого гена штаммов PBi и SZ *B. bavariensis*, а также 20047T *B. garinii* из базы данных GenBank NCBI. Нумерация дана по cds референсного штамма PBi (RefSeq GCA_000196215). Область, кодирующая поверхностную С-петлю белка P66 выделена красным. Consensus – консенсусная последовательность.

Таблица 10 – Нуклеотидные замены гена *p66* (280 п.н.) у изолятов *B. bavariensis* от людей (в сравнении с референсным штаммом PBi; RefSeq GCA_000196215).

Возможные аллельные варианты *p66* по Рисунку 19	**Индекс вариабельности, d**	**Нуклеотидные замены (не обнаружены вставки или делеции нуклеотидов в последовательностях)**				
		Неуникальные (одинаковые для всех по референсу)		**Уникальные**		
		Синонимичные	**Несинонимичные**	**SNP**	**Синонимичные**	**Несинонимичные**
Hs-1 и др.	0,009	3 (c.1383T>C c.1494C>T c.1578C>T)	5 (c.1405A>C c.1474G>A c.1481A>G c.1495A>G c.1541T>C)	3	1 (c.1575C>T)	2 (c.1489A>T c.1538C>T)
Hs-10				4	1 (c. 1575C>T)	3 (c.1382A>T c.1489A>T c.1538C>T
Hs-80				4	2 (c.1365C>T c. 1575C>T)	2 (c.1489A>T c.179C>T)
Hs-6 и др.				3	1 (c.1572A>G)	2 (c.1489A>G c.1523A>G)
Hs-139				6	2 (c.1392A>C c. 1572A>G)	4 (c.1389A>T c. 1393C>T c.1489A>G c.1523A>G)

Для всех обнаруженных последовательностей гена *p66* частота нуклеотидов составляет 39,83% (A), 24,85% (T/U), 19,40% (C) и 15,91% (G), а оценка смещения транзиций/трансверсий (R) составила 2,66, т. е. преобладают транзиции (пурин–пурин, пиримидин–пиримидин). Такие показатели частот нуклеотидов с преобладанием A и T, а также преобладание транзиций приблизительно одинаковы у всех видов комплекса *B. burgdorferi* s. l.

Последовательности участка гена *p66*, которые сходны с таковыми у большой группы наших изолятов аллельного варианта №1 (Hs-1), содержит база данных GenBank NCBI. Они выявлены у штаммов *B. bavariensis*, полученных от иксодовых клещей *I. persulcatus* в России – Arh913 (ST594, JACFBE010000001)[2] и Tom2806 (ST328, KF844227); Китае – NMJW1 (ST131, CP003866) и Японии – NT24 (ST371, CP059009), FujiP2 (ST371, JACGTX010000001), Konnai17 (ST131, JACGTS010000001), JAASAAF1029 (ST131, CP075245), JAASAAM1101 (ST371, CP075243), JANAGAM1271 (ST371, CP075241), JANAGAM1274 (ST371, CP075240), JANAGAM1305 (ST371, CP075239), JANAGAM1327 (ST371, CP075238), JANAGAM1369 (ST371, CP075235). Нуклеотидные последовательности изолятов аллельного варианта №1 оказались сходными на 100% также со штаммами SZ (ST131, CP007564) от *Dermacentor* sp. в Китае и J14 (ST371, JACGTV010000001), выделенному из кожного биоптата человека в Японии.

Идентичными изоляту Hs-6, представляющему аллельный вариант №2, оказались российские штаммы Arh923 (ST128, JACFBD010000001), Prm7564 (ST433, JACFAP010000001) и Tom3506 (ST128, KF844226) от иксодовых клещей *I. persulcatus*, а также японский штамм Hiratsuka (ST128, JACGTW010000001), полученный из кожного биоптата пациента. Нуклеотидные последовательности изолятов варианта №2 оказались тождественными с японскими штаммами от клещей *I. persulcatus* JANAGAM1352 (ST128, CP075237), JANAGAM1353 (ST128, CP075236), JAASAAF1016 (ST128, CP075246), JAASAAM1114 (ST128, CP075242), и сходными на 99,6% с российским штаммом Prm7019 (ST1070, JACFAQ010000001) от клещей этого вида.

Изоляты с нуклеотидными заменами, которые аналогичны выявленному аллельному варианту №3 (изолят Hs-139), в базе данных не обнаружены и депонированы нами в GenBank NCBI. Это относится и к оригинальному изоляту Hs-10.

[2] Здесь и далее наименования изолятов с номерами доступа в GenBank NCBI.

Таким образом, среди исследованных изолятов *B. bavariensis* по отличиям в последовательностях участка гена *p66* с разной частотой обнаружены как минимум 3 аллельных варианта, представленные образцами, которые идентичны изолятам Hs-1 (ST328), Hs-6 (ST128) и Hs-139 (ST128), соответственно (Рисунки 19 и 20).

3.3.2 Анализ аминокислотных последовательностей фрагментов белка P66

Замены нуклеотидов в последовательностях участка гена *p66*, описанные в разделе 3.3.1, могли быть несинонимичными, т. е. приводящими к аминокислотным заменам. Это проанализировано построением дендрограммы соответствующих аминокислотных последовательностей изолятов, составивших по 93 а.о. (Рисунок 21). Она оказалась почти идентичной Рисунку 14, что подтверждает наличие среди изолятов от больных ИКБ не менее 3-х вариантов аминокислотной последовательности выбранного фрагмента белка P66 *B. bavariensis*. Один из них выявляется значительно чаще остальных и включает 22 изолята; другой вариант представляют изоляты Hs-6, Hs-7, Hs-128, Hs-163, а третий – только Hs-139. Положение изолята Hs-10 на дендрограмме (Рисунок 21) отличает его даже от максимально сходного с ним изолята Hs-80 (Рисунок 22).

Существование трех аллельных вариантов гена *p66* также подтверждают различия их конкретных аминокислотных выражений кодируемого ими белка (Рисунок 22). Его громоздкий рабочий вариант включает во многом тождественные данные об аминокислотных последовательностях петли белка P66 всех проанализированных изолятов. Он содержит также соответствующую информацию о разных видах *B. burgdorferi* s. l., обнаруженную в базах данных GenBank NCBI при поиске с выборкой «core nucleotide database» и «whole-genome shotgun contigs». Из этой обобщенной схемы для построения более наглядного выравнивания отобраны конкретные результаты одного из изолятов (Hs-1, Hs-6, Hs-139) каждого описываемого выше аллельного варианта, оригинального

изолята Hs-10, а также аналогичных структур *B. bavariensis*, обнаруженных в GenBank NCBI. Данные по другим видам *B. burgdorferi* s. l., доступные в этой базе, имели менее 98% сходства структуры петли белка P66 с исследованными изолятами *B. bavariensis* и поэтому не отражены в рисунках данного раздела.

От референсного штамма PBi *B. bavariensis* (RefSeq GCA_000196215) изоляты от больных ИКБ отличались некоторыми аминокислотными заменами: в позиции 469 изолейцина на лейцин, в позиции 492 аланина на треонин, в позиции 494 аспарагина на серин, в позиции 499 треонина на аланин и в позиции 514 изолецина на треонин, причем 3 замены произошли со сменой полярности аминокислот (Рисунок 22).

Аллельный вариант, представленный изолятом Hs-6, отличается от большой группы изолятов, идентичных изоляту Hs-1, заменами аминокислот серина на аланин (в позиции 497), глутаминовой кислоты на глицин (в позиции 508) и изолейцина на треонин (в позиции 513). Эти замены (Рисунок 22) могут привести к изменению конфигурации петли белка P66, поскольку две полярные аминокислоты сменились на неполярные, а одна наоборот.

У аллельного варианта, представленного изолятом Hs-139, помимо аналогичных замен обнаружены еще две: лизина на аспарагин и лейцина на фенилаланин, т. е. полярной положительно заряженной аминокислоты на полярную, но не заряженную, и неполярной алифатической аминокислоты на неполярную ароматическую (соответственно в позициях 463 и 465 а.о.).

У изолята Hs-10, аминокислотная последовательность которого почти идентична таковой с Hs-1, есть специфичная замена в позиции 461 а.о.: аспарагин на изолейцин (полярная на неполярную аминокислоту). Это позволяет предполагать, что *B. bavariensis*, помимо трех описанных аллельных вариантов P66, возможно имеет еще один.

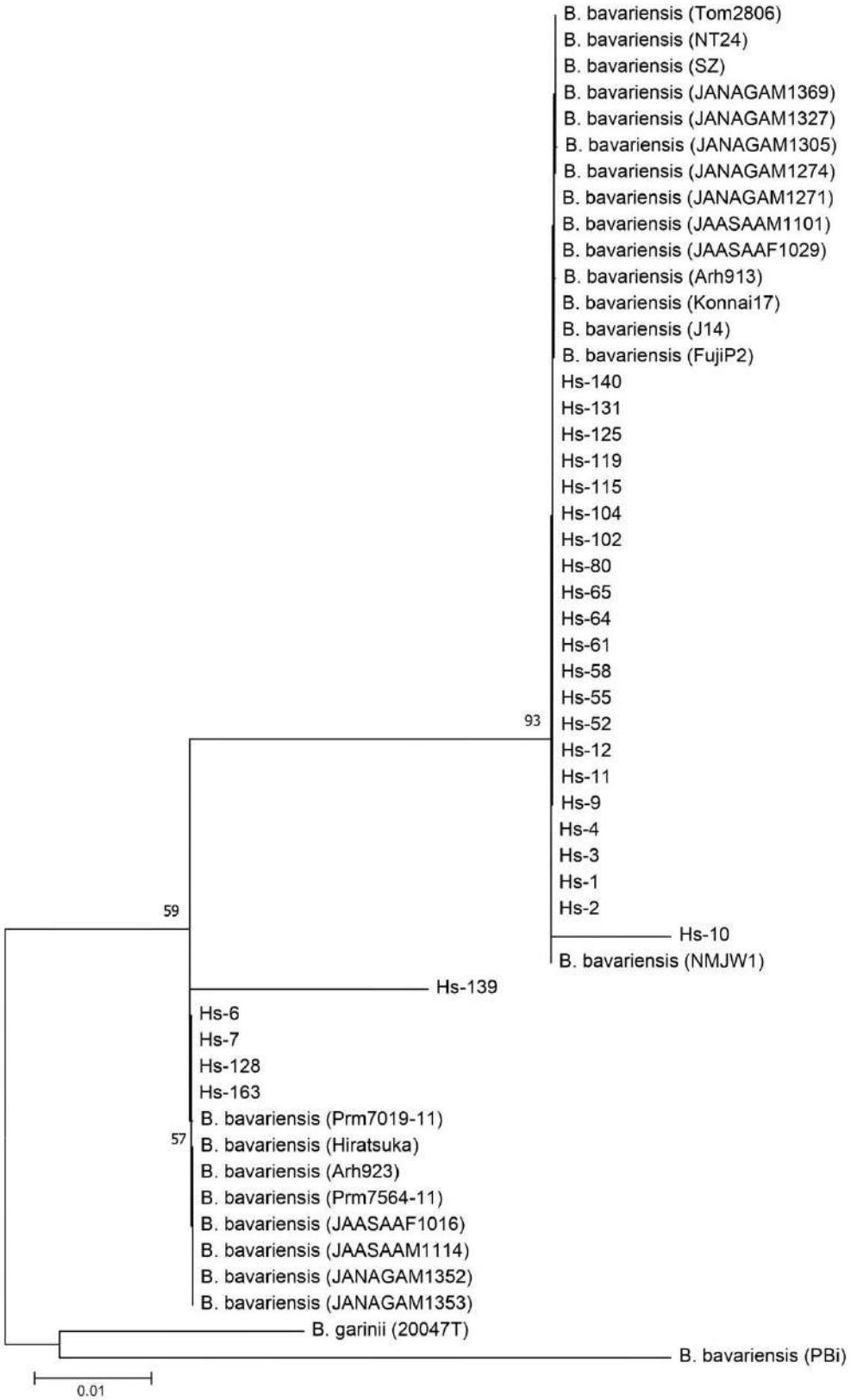


Рисунок 21 – Дендрограмма аминокислотных последовательностей (а.п.) фрагментов белка P66 (93 а.о.) у исследованных Hs изолятов *B. bavariensis*. Способ построения описан в главе 2. В качестве аутгруппы взяты а.п. штаммов *B. bavariensis* из GenBank NCBI. В круглых скобках – наименование штаммов боррелий; в квадратных скобках — номера их доступа в базе данных.

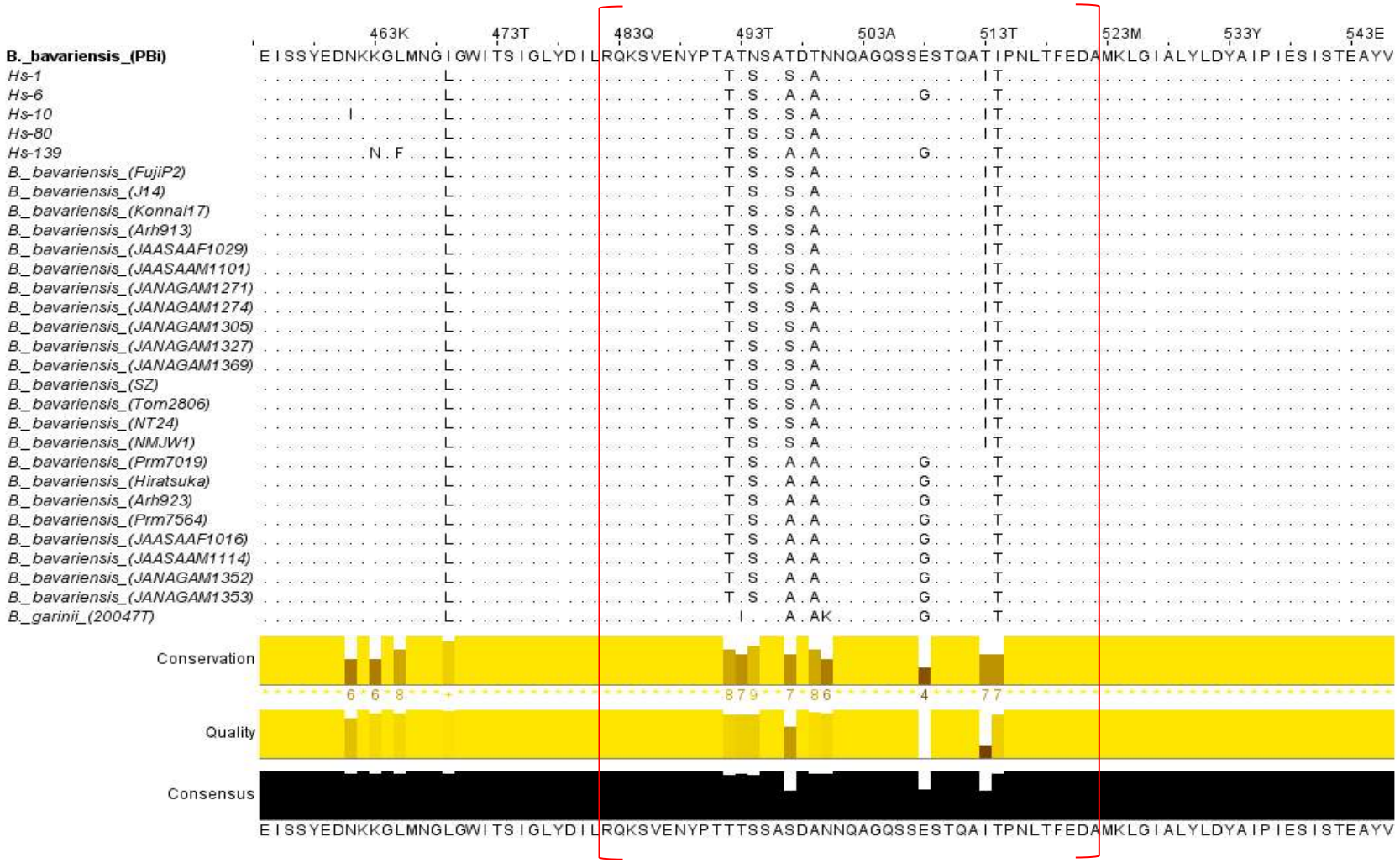


Рисунок 22 – Сравнение аминокислотных последовательностей петли белка P66 (93 а.о.) различных изолятов *B. bavariensis*. Нумерация дана по последовательности референсного штамма PBi (RefSeq GCA_000196215). Область, кодирующая поверхностную С-петлю белка P66 выделена красным. Conservation (метод AMAS) – количественная оценка сохранения физико-химических свойств аминокислот; символы «*» и «+» обозначают высокую степень консервативности и сохранение свойств при мутациях, соответственно; снижение баллов отражает изменения свойств. Quality (матрица BLOSUM62) – качество выравнивания. Consensus – консенсусная последовательность.

Таким образом, среди исследованных изолятов *B. bavariensis* по отличиям в аминокислотных последовательностях фрагмента P66 с разной частотой выявлены 3 аллельные варианта, которые представлены идентичными образцами, соответственные изолятам Hs-1, Hs-6 и Hs-139 (Рисунки 21 и 22). Обнаруженные аминокислотные замены предположительно могут влиять на конформацию петли белка P66, и, следовательно, на его функции, включая степень адгезивности боррелий к клеткам человека, что требует отдельного специального изучения.

3.4 Аллельные варианты гена *p66,* кодирующего белок P66, у изолятов *B. bavariensis* от иксодовых клещей

3.4.1 Анализ нуклеотидных последовательностей участков гена *p66*

В природных очагах Среднего Урала таежный клещ (*I. persulcatus*) – единственный источник заражения людей боррелиями, патогенными для человека [12, 119]. Клещ *I. trianguliceps*, который также обитает в данном регионе, не нападает на людей, но паразитирует на мелких млекопитающих тех же видов, что и предимагинальные фазы клещей *I. persulcatus,* и является сочленом паразитарной системы боррелий группы ИКБ [118]. В данном разделе представлены результаты исследования гетерогенности участков гена *p66* у изолятов *B. bavariensis* от голодных нимф и имаго таежных клещей, отловленных с растительности, а также от нимф *I. trianguliceps*, снятых с мелких млекопитающих в изученном природном очаге.

Дендрограмма нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* 123 изолятов *B. bavariensis* от нимф и имаго таежного клеща, а также от нимф *I. trianguliceps,* продемонстрировала их группировку в 9 кластеров (Рисунок 23). Последовательности участков гена *p66* у изолятов от клещей двух видов внутри каждого кластера были сходными на 99,6–100%, а различия между ними достигали 2,9% (индекс вариабельности 0,018).

Нуклеотидные последовательности изолятов от Itn-2083 до Ip-1236, а также изолятов от людей Hs-1 и Hs-10, представляющих вариант №1, оказались сходными более чем на 99,5%. На выравнивании они оказались идентичными (Рисунок 24), как и их нуклеотидные замены (Таблица 11), что позволило отнести данные изоляты к аллельному варианту №1 (ST328).

Сходство нуклеотидных последовательностей изолятов от Itn-1455 до Ip-1502 и от Ip-2295 до Ip-1217, образующие 2 кластера (Рисунок 23), а также изолята Hs-6 (вариант №2), составило 99,6–100%. Последовательности этих изолятов отличались заменой нуклеотида в 1572 п.н. (Рисунок 24, Таблица 11), поэтому они отнесены к аллельному варианту №2 (ST128).

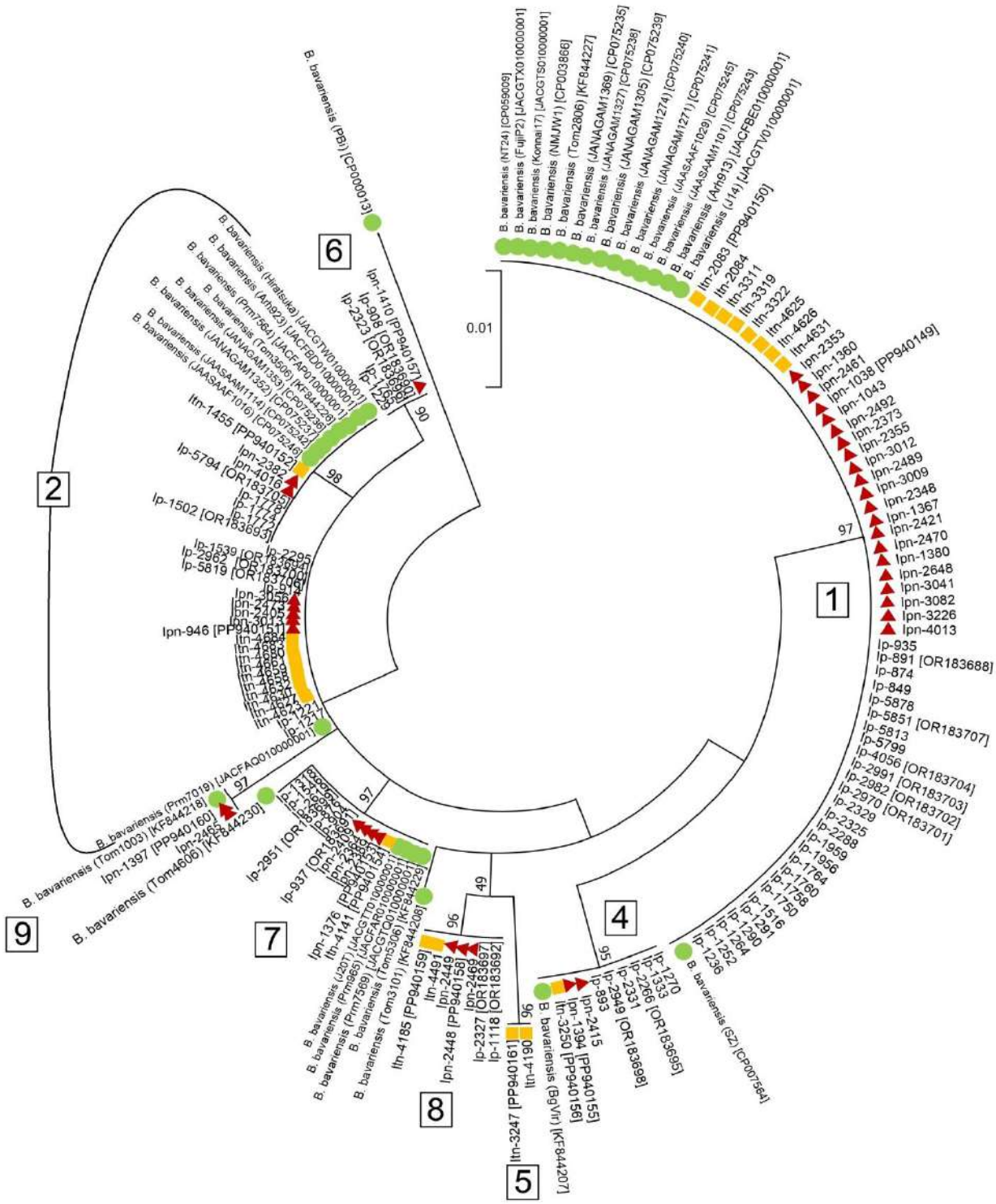


Рисунок 23 – Дендрограмма нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* (280 п.н.) у изолятов от голодных нимф и имаго *I. persulcatus*, а также от нимф *I. trianguliceps*. Изоляты от нимф таежного клеща обозначены красными треугольниками; от нимф *I. trianguliceps* – желтыми квадратами; штаммы *B. bavariensis* – зелеными кружками. В круглых скобках – наименование штаммов боррелий; в квадратных скобках — номера доступа в GenBank NCBI. Номера аллельных вариантов отмечены цифрами в квадратах. В соответствии с публикациями [110, 132, 172] видовые названия изолятов NMJW1, Tom2806, SZ, BgVir, Tom5306, Tom4606, Tom 1003 изменены на *B. bavariensis*.

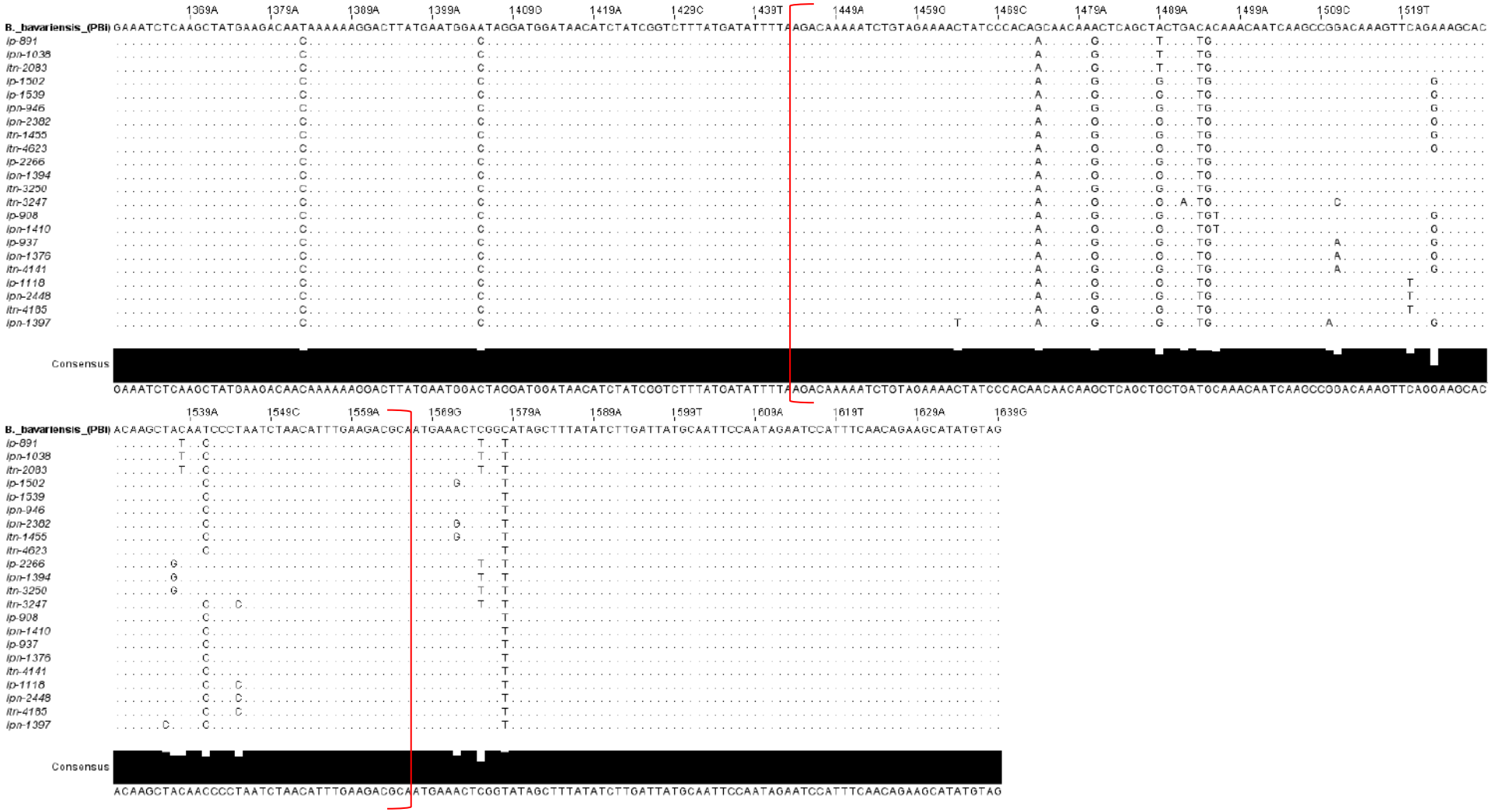


Рисунок 24 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей участка гена *p66* (280 п.н.) у изолятов от клещей 2-х видов, представляющих их вероятные аллельные варианты. Нумерация дана по cds референсного штамма PBi (RefSeq GCA_000196215). Область, кодирующая поверхностную С-петлю белка Р66 выделена красным. Consensus – консенсусная последовательность.

Таблица 11 – Нуклеотидные замены гена *p66* (280 п.н.) изолятов от клещей (в сравнении с референсным штаммом PBi; RefSeq GCA_000196215).

Возможные аллельные варианты *p66* по Рисунку 23	**Индекс вариа-бельности, d**	**Нуклеотидные замены (не обнаружены вставки или делеции нуклеотидов в последовательностях)**				
		Неуникальные (одинаковые для всех по референсу)		**Уникальные**		
		Синонимичные	**Несинонимичные**	**SNP**	**Синонимичные**	**Несиноимичные**
Ip-891 и др.	0,018	3 (c.1383T>C c.1494C>T c.1578C>T)	4 (c.1395A>C c.1474G>A c.1481A>G c.1495A>G)	4	1 (c.1575C>T)	3 (c.1489A>T, c.1538C>T, c.1541T>C)
Ip-1502 и др.				4	1 (c.1572A>G)	3 (c.1489A>T, c.1523A>G, c.1541T>C)
Ip-1539 и др.				3	0	3 (c.1489A>T, c.1523A>G, c.1541T>C)
Ip-2266 и др.				3	1 (c.1575C>T)	2 (c.1489A>G, c.1537A>G)
Itn-3247 и др.				6	2 (c.1545T>C, c.1575C>T)	4 (c.1489A>G, c.1492G>A, c.152G>C, c.1541T>C)

Таблица 11 – (продолжение).

Возможные аллельные варианты *p66* по Рисунку 23	**Индекс вариа-бельности, d**	**Нуклеотидные замены (не обнаружены вставки или делеции нуклеотидов в последовательностях)**				
		Неуникальные (одинаковые для всех по референсу)		**Уникальные**		
		Синонимичные	**Несинонимичные**	**SNP**	**Синонимичные**	**Несиноимичные**
Ip-908 и др.	0,018	3 (c.1383T>C c.1494C>T c.1578C>T)	4 (c.1395A>C c.1474G>A c.1481A>G c.1495A>G)	4	0	4 (c.1489A>G, c.1496C>T, c.1523A>G, c.1541T>C)
Ip-937 и др.				4	0	4 (c.1489A>G, 1511G>A, c.1523A>G, c.1541T>C)
Ip-1118 и др.				4	1 (c.1545T>C)	3 (c.1489A>G, c.1520C>T, c.1541T>C)
Ip-1397 и др.				6	2 (c.1464C>T, c.1536T>C)	4 (c.1489A>G, c.1510G>A, c.1523A>G, c.1541T>C)

Последовательности изолята Hs-139 (ST128), полученного от пациента с ИКБ, отличаются от всех на 1,4–3,2%. Этот изолят принадлежит единичному аллельному варианту №3 (раздел 3.3), и не обнаружен у клещей.

Таким образом, из 9 кластеров только 8 мы рассматриваем как четко выраженные аллельные варианты участков гена *p66 B. bavariensis*, обнаруженные у иксодовых клещей двух видов (Рисунок 23). Порядковые номера этих вариантов даны в соответствии с их нуклеотидным сходством более 99%, кроме первых трех, обнаруженных ранее у изолятов от людей с ИКБ (раздел 3.3).

Для всех обнаруженных последовательностей гена *p66* частота нуклеотидов составляет 39,85% (A), 24,48% (T/U), 19,61% (C) и 16,05% (G), а оценка смещения транзиций/трансверсий (R) составила 4,79, т. е. преобладают приблизительно одинаковые транзиции (пурин–пурин, пиримидин–пиримидин) у всех видов комплекса *B. burgdorferi* s. l. Однако у изолятов от клещей показатель коэффициента R оказался почти в 2 раза больше, чем от больных людей (раздел 3.3.1).

Нуклеотидные последовательности вариантов №1 и №2 были идентичны изолятам *B. bavariensis* из базы данных GenBank NCBI (раздел 3.3.1; Рисунок 19). Так, последовательности изолятов с аллельным вариантом №1 оказались идентичными таковым у штаммов *B. bavariensis*, полученных от иксодовых клещей *I. persulcatus* из России Архангельской и Томской областей – Arh913 (ST594, JACFBE010000001) и Tom2806 (ST328, KF844227); Китае – NMJW1 (ST131, CP003866) и Японии – NT24 (ST371, CP059009), FujiP2 (ST371, JACGTX010000001), Konnai17 (ST131, JACGTS010000001), JAASAAF1029 (ST131, CP075245), JAASAAM1101 (ST371, CP075243), JANAGAM1271 (ST371, CP075241), JANAGAM1274 (ST371, CP075240), JANAGAM1305 (ST371, CP075239), JANAGAM1327 (ST371, CP075238), JANAGAM1369 (ST371, CP075235). Они также оказались сходными на 100% со штаммами SZ (ST131, CP007564) от клещей *Dermacentor* sp. из Китая, а также J14 (ST371, JACGTV010000001), который выделен из кожного биоптата человека в Японии.

Идентичными последовательности, представляющие аллельный вариант №2, оказались у российских изолятов Arh923 (ST128, JACFBD010000001), Prm7564 (ST433, JACFAP010000001), и Tom3506 (ST128, KF844226) от *I. persulcatus* из Архангельской и Томской областей и Пермского края, а также японский изолят Hiratsuka (ST128, JACGTW010000001) из кожного биоптата человека. Нуклеотидные последовательности изолятов варианта №2 оказались тождественными с японскими штаммами от клещей *I. persulcatus* JANAGAM1352 (ST128, CP075237), JANAGAM1353 (ST128, CP075236), JAASAAF1016 (ST128, CP075246), JAASAAM1114 (ST128, CP075242), и сходными на 99,6% с российским штаммом Prm7019 (ST1070, JACFAQ010000001) от клещей этого вида.

Последовательности участка гена *p66* других аллельных вариантов у изолятов от иксодовых клещей из Пермского края оказались в разной степени сходными с последовательностями у изолятов, имеющимися в базе данных GenBank NCBI. Так, вариант №4 содержал последовательности участка гена *p66*, идентичные таковым у изолята BgVir (ST125, CP003151) *B. bavariensis* от клещей *I. persulcatus* из Томской области (Рисунок 23).

Нуклеотидные последовательности изолятов варианта №6 оказались сходными на 99,6% с последовательностями нуклеотидов гена *p66* пермского штамма Prm7019 (ST1070, JACFAQ010000001) от *I. persulcatus.*

Вариант №7 содержал последовательности участка гена *p66*, идентичные таковым у изолятов *B. bavariensis* Tom5306 (ST374, KF844229), Prm7569 (ST374, JACGTQ010000001), Prm965 (ST374, JACFAR010000001) от таежных клещей из Томской области и Пермского края, а также японскому изоляту J20T (ST383, JACGTT010000001), выделенному из кожного биоптата человека. Нуклеотидные последовательности варианта №7 оказались сходными на 99,6% с Tom4606 (ST661, KF844230) от томских таежных клещей.

Последовательности участков гена *p66* изолятов, принадлежащих варианту №9, оказались идентичными таковому томского изолята Tom1003 (ST660, KF844218) от клещей *I. persulcatus.*

Нуклеотидные последовательности вариантов №3, №5, №8 различались более чем на 1% с таковыми изолятов, имеющихся в базе данных GenBank NCBI, имели уникальные нуклеотидные замены (Таблица 11) и депонированы нами в эту систему.

Таким образом, выявленные нами различные аллельные варианты участка гена *p66* у изолятов *B. bavariensis* от таежных клещей и *I. trianguliceps* распространены не только на территории Пермского края, но и в других частях ареала боррелий этого вида.

Почти все обнаруженные варианты нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* принадлежали изолятам от нимф, или от имаго членистоногих этих 2-х видов, за двумя исключениями. Так, последовательности изолятов Itn-3247 и Itn-4190 варианта №5 выявлены только от нимф *I. trianguliceps*, а изолятов Ipn-1397 и Ipn-2465, группирующиеся в вариант №9, – от нимф *I. persulcatus*. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что клещи этих двух видов и фаз их развития сохраняют и поддерживают циркуляцию сходного набора различных аллельных вариантов *p66 B. bavariensis.*

Большинство последовательностей анализируемого участка гена *p66* у изолятов от клещей обоих видов группируются в аллельные варианты нуклеотидных последовательностей №1 (56 из 123 изолятов; 45,5%) и №2 (30 из 123 изолятов; 24,4%). Эти варианты преобладают в гемипопуляциях голодных нимф и имаго таежного клеща, а также у напитавшихся нимф *I. trianguliceps* (Рисунок 23).

3.4.2 Анализ аминокислотных последовательностей фрагментов белка P66

Анализ результатов кластеризации нуклеотидных последовательностей изолятов *B. bavariensis* от клещей *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* (Рисунок 23) был сравнен с соответствующей дендрограммой аминокислотных последовательностей фрагментов белка P66 (Рисунок 25). Она

продемонстрировала группировку в 8 кластеров. Внутри каждого из них сходство аминокислот составило 100%, а различия между кластерами – от 1,1% до 4,3%. Значительная часть аминокислотных последовательностей этих изолятов группировалась в варианты №1 и №2, как на Рисунке 23.

Выравнивание аминокислотных последовательностей ряда клещевых изолятов, выбранных случайным образом и представляющих эти 8 аллельных вариантов, продемонстрировало их различия: от 1 до 4 аминокислотных замен. Исследованные нами изоляты от клещей отличались от референсного штамма PBi *B. bavariensis* 4 аминокислотными заменами: p.469I>L, p.492A>T, p.494N>S, и p.499T>A (Рисунок 26).

Аминокислотные последовательности изолятов варианта №1 были тождественными. Последовательности фрагментов белка P66 изолятов варианта №2 также оказались идентичными (Рисунок 26). Хотя последовательности исследованных участков их гена *p66* имели синонимичные замены и образовывали 2 кластера (Рисунок 23), эти замены не влияли на аминокислотные выражения белка.

Выравнивание последовательностей фрагментов белка P66 этих изолятов, выявило гетерогенный участок, состоящий из 18 аминокислот (с позиции 497 по 514 а.о.), где значительная часть замен произошла со сменой полярности некоторых аминокислот (Рисунок 26). Они отличаются друг от друга по разнообразию и характеру аминокислотных замен. Варианты №1 и №2 фрагмента белка P66 изолятов от клещей 2-х видов, отличаются друг от друга заменами со сменой полярности аминокислот в позициях 497, 508 и 513 а.о.

Остальные варианты характеризовались большим разнообразием аминокислотных замен, многие из которых также произошли со сменой полярности. Так, изоляты варианта №4 отличались от остальных изолятов заменами в позициях 508, 513 и 514, а №5 – в 509, 504 и 508 а.о. фрагментов белка P66. У изолятов, группирующихся в аллельный вариант №6, обнаружена одна замена в 499 позиции, которая произошла без смены полярности аминокислоты.

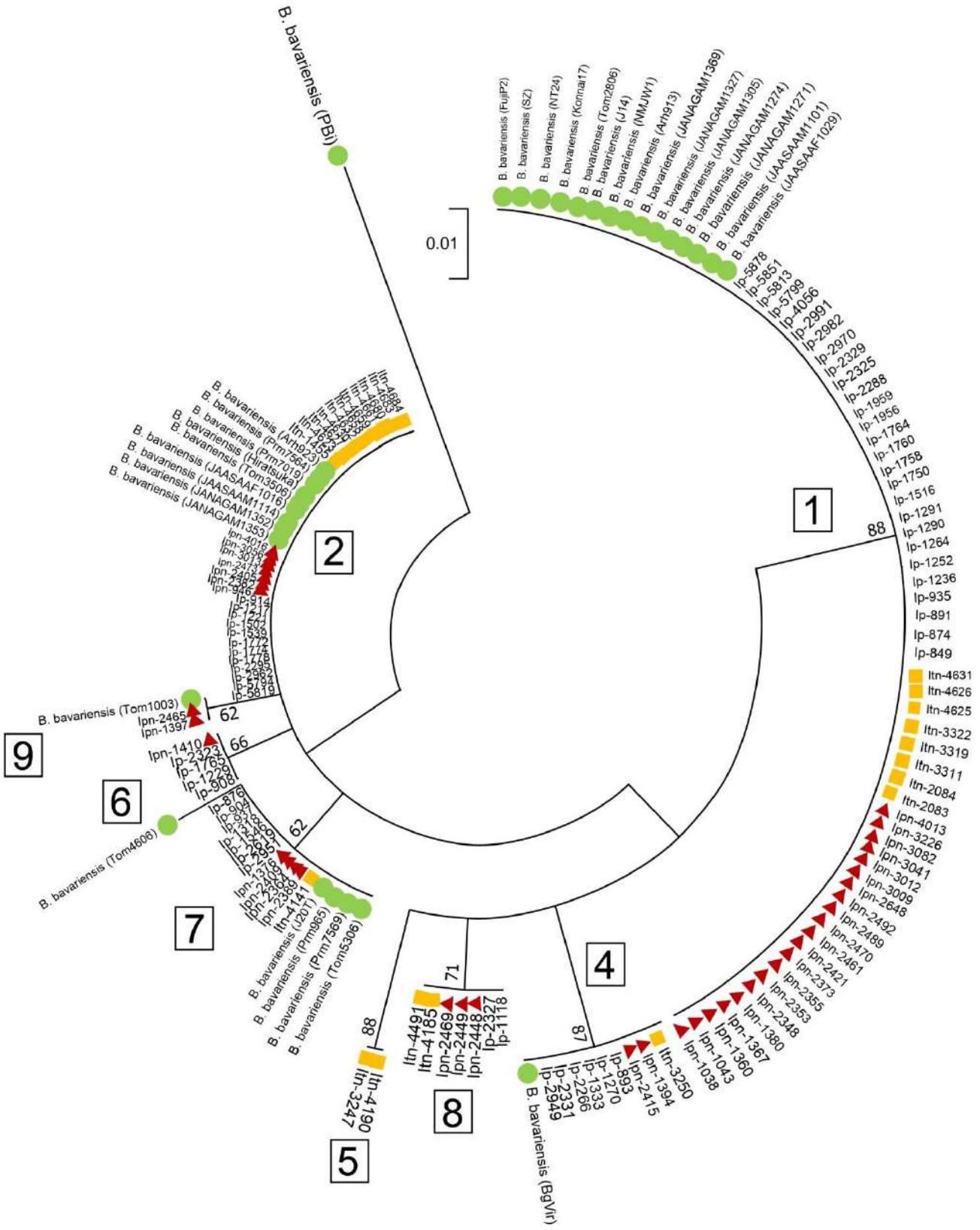


Рисунок 25 – Дендрограмма аминокислотных последовательностей фрагментов белка P66 (93 а.о.) у изолятов от нимф и имаго клеща *I. persulcatus*, а также от нимф клеща *I. trianguliceps*. Обозначения – в подписи к Рисунку 23.

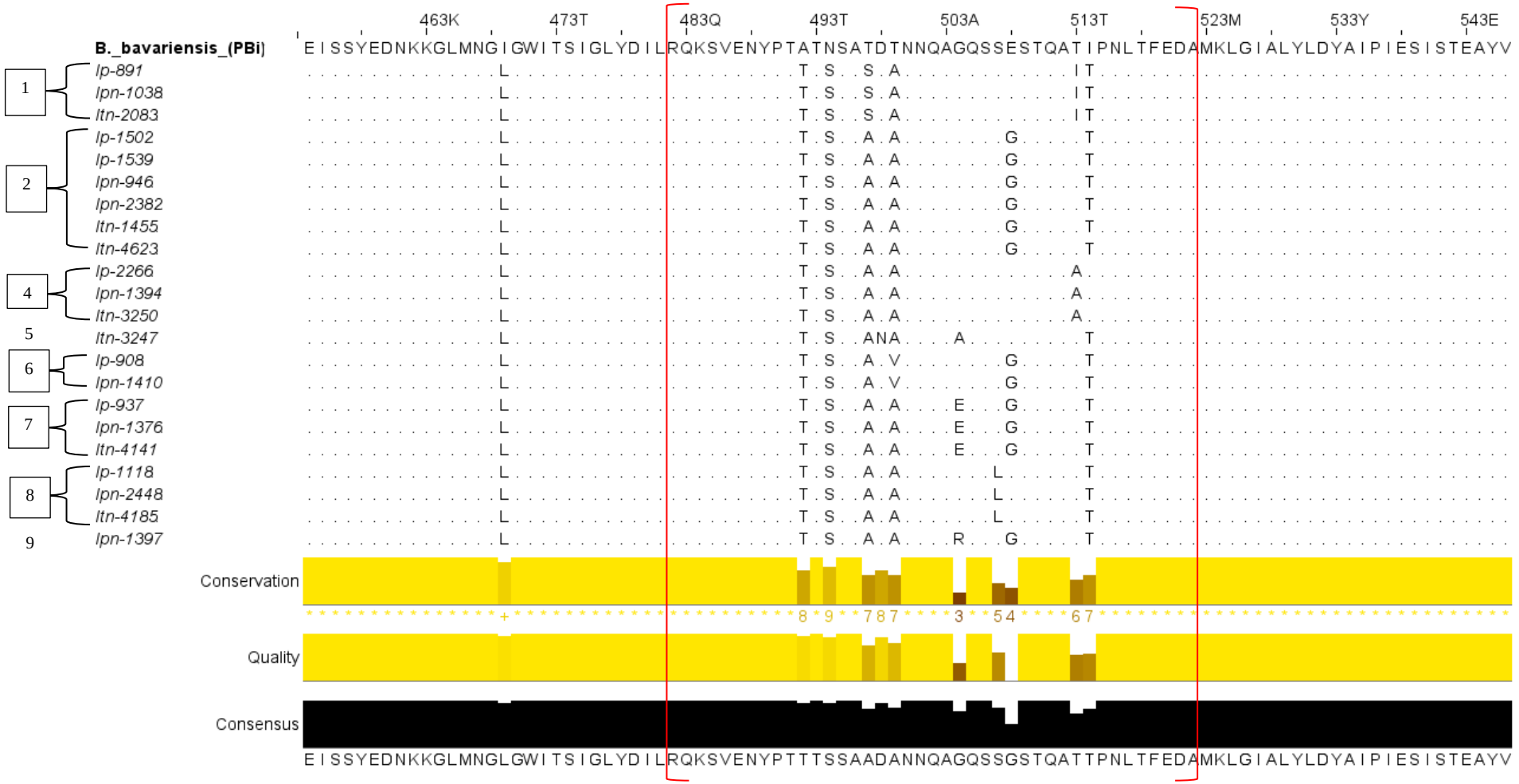


Рисунок 26 – Выравнивание аминокислотных последовательностей изолятов от нимф и имаго клеща *I. persulcatus*, от нимф клеща *I. trianguliceps*, представляющих выявленные варианты фрагментов белка P66 (93 а.о.). Их номера приведены по вертикали перед обозначением изолятов. Обозначения – в подписи к Рисунку 22.

Изоляты вариантов №7 и №9 отличались от остальных изолятов заменами в позиции 504 со сменой полярности аминокислот. Последовательности варианта №8 отличались от всех остальных аминокислотными заменами в позициях 507 и 508 (Рисунок 26).

В позиции 504 а.о. выравнивания аминокислотных последовательностей обнаружено наибольшее разнообразие замен: у выявленных вариантов белка P66 4 различные аминокислоты: глицин, аланин, глутаминовая кислота и аргинин; из которых половина – полярные, а половина – неполярные. В позиции 508 а.о. наоборот, у пяти аллельных вариантов присутствовала глутаминовая кислота, а у оставшихся – глицин (Рисунок 26).

Изоляты от нимф и имаго *I. persulcatus* имеют практически сходный набор вариантов фрагментов белка P66. Наиболее часто у изолятов от таежных клещей обоих фаз развития встречаются аллельные варианты №1 и №2: у нимф – 70,0% из 40 исследованных изолятов, у имаго – 67,2% из 58 (Рисунок 25, Таблица 12). Достоверные различия в частоте этих двух вариантов у нимф и взрослых таежных клещей не обнаружены (P = 0,39; критерий χ^2 = 0,748). Остальные варианты встречаются приблизительно в одинаковом соотношении у изолятов от обеих фаз развития клеща этого вида. Это свидетельствует о том, что голодные взрослые клещи *I. persulcatus* получают различные варианты фрагментов белка P66 боррелий [5, 6, 99, 121, 185] и их наиболее распространенные аллельные варианты от метаморфизирующих напитавшихся инфицированных нимф.

Изоляты от нимф *I. trianguliceps* содержат сходный набор (за исключением вариантов №5 и №9) аллельных вариантов *B. bavariensis* с изолятами от нимф таежного клеща (Рисунок 25, Таблица 12). Среди изолятов от нимф *I. trianguliceps*, преобладают варианты №1 и №2 фрагментов белка P66 (76,0%), как и среди изолятов от нимф *I. persulcatus* (70,0%). Достоверные различия в частоте таких вариантов у клещей двух видов на этой фазе развития не обнаружены (P = 0,60; критерий χ^2 = 0,277). Это свидетельствует о дополнительном участии клеща *I. trianguliceps* в сохранении генетической

гетерогенности возбудителя ИКБ *B. bavariensis* в природном очаге, основное значение которой имеют таежные клещи [173].

Таблица 12 – Варианты фрагмента белка P66 у изолятов от клещей *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*.

Вид и фаза развития клещей	**Исследовано изолятов**	**Из них число каждого из выявленных вариантов с порядковым номером фрагмента белка P66**								
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
нимфа *I. persulcatus*	40	21	7	–	2	–	1	4	3	2
имаго *I. persulcatus*	58	27	12	–	6	–	4	7	2	–
нимфа *I. trianguliceps*	25	8	11	–	1	2	–	1	2	–

Нимфы клещей *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* получают наиболее часто встречающиеся аллельные варианты *B. bavariensis* при питании на инфицированных мелких млекопитающих и передают их голодным имаго, среди которых уже взрослые таежные клещи заражают людей. Нимфы и личинки иксодовых клещей этих 2-х видов имеют сходный круг основных хозяев – прокормителей [11, 12, 118]. Голодные личинки таких клещей в большинстве случаев не могут быть инфицированы боррелиями группы ИКБ, т. к. трансовариальная передача этих спирохет происходит крайне редко [9, 20, 127, 145, 146, 167, 188, 191]. Поэтому предимагинальные фазы развития клещей этих двух видов могут получать наиболее часто встречающиеся аллельные варианты *B. bavariensis* при совместном питании на инфицированных мелких млекопитающих – резервуарных хозяевах боррелий, т. е. путем горизонтальной передачи.

3.5 Аллельные варианты гена *p66*, кодирующего белок P66, у изолятов *B. bavariensis* от мелких млекопитающих – резервуарных хозяев этого возбудителя

3.5.1 Анализ нуклеотидных последовательностей участков гена *p66*

Мелкие млекопитающие – основные хозяева предимагинальных фаз развития иксодовых клещей, причем наибольшее значение имеют лесные полевки рода *Myodes* и *Craseomys*, а также землеройки бурозубки рода *Sorex* [2, 94, 119]. Гетерогенность гена *p66* у изолятов *B. bavariensis*, полученных от различных мелких млекопитающих, ранее не описана. Для выяснения ее роли в поддержании циркуляции в природном очаге Пермского края генетических вариантов *B. bavariensis* проведен анализ участков нуклеотидных последовательностей у изолятов боррелий этого вида. В состав фауны мелких млекопитающих данного региона входят представители 16 видов мышевидных грызунов и насекомоядных [12]; от 8 наиболее распространенных были исследованы изоляты боррелий. Большинство из них получено от рыжих полевок и полевок-экономок, которые преобладают в населении мелких млекопитающих горно-таежных лесов Пермского края, имеют важное значение в прокормлении предимагинальных фаз иксодовых клещей и передают им боррелий [94].

Анализ нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* 88 изолятов *B. bavariensis* от 8 видов мелких млекопитающих с помощью построения дендрограммы выявил 14 кластеров (Рисунок 27). Сходство таких последовательностей, сгруппированных в отдельные кластеры, составило 99,5–100%, а различия между ними достигали 3,2% (индекс вариабельности 0,346). Нуклеотидные последовательности участков гена *p66* у изолятов от Sa-2815 до Crt-2082, Mo-1165 и Cg-2752, представленные на Рисунке 27 двумя кластерами, оказались на 99,5% сходными с изолятами от людей и иксодовых клещей, относящимся к варианту №1, отличаясь только одной синонимичной заменой в позиции 1575 п.н. (Рисунок 28, Таблица 13). Поэтому последовательности этих изолятов отнесены к аллельному варианту №1(ST328).

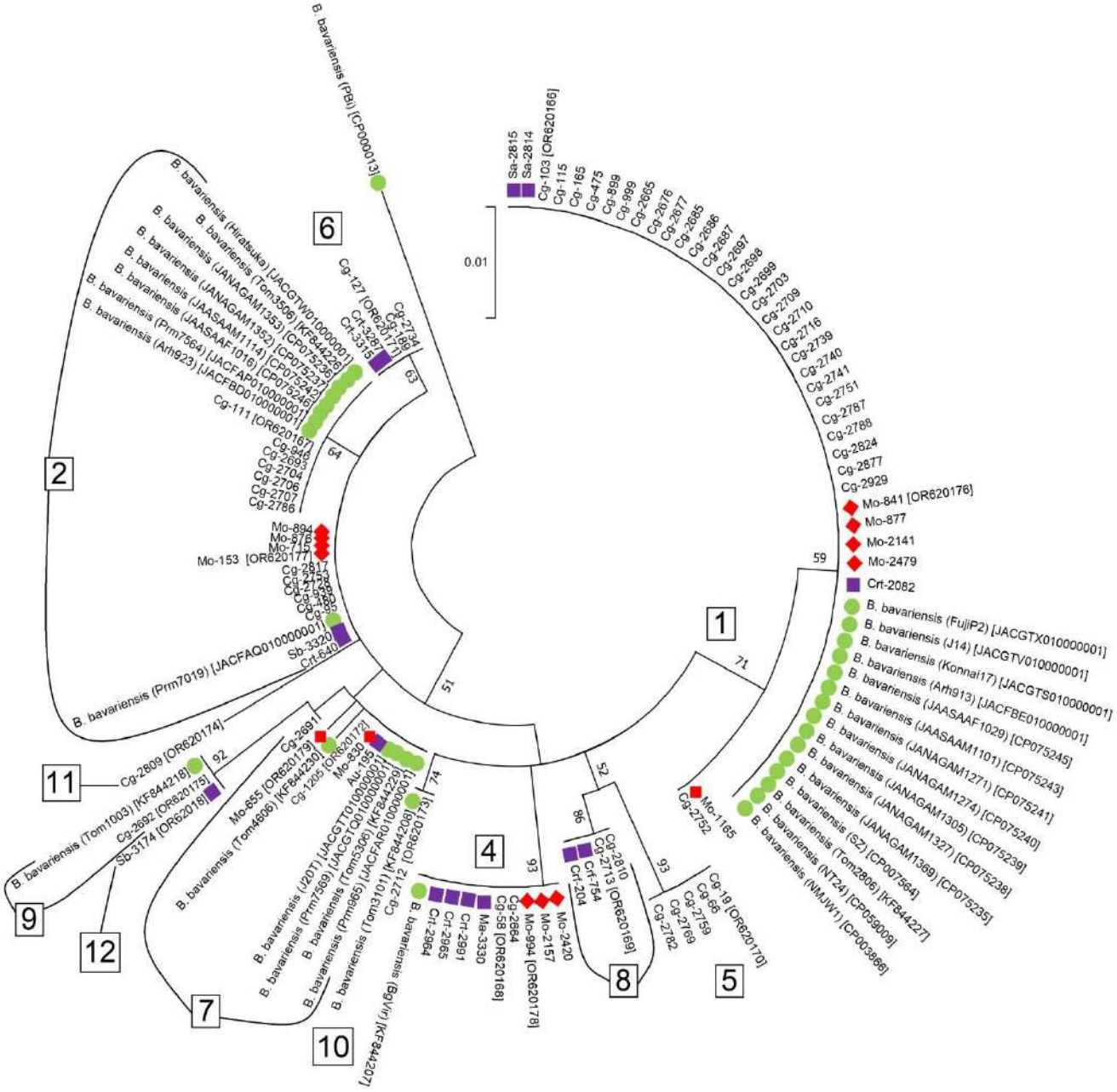


Рисунок 27 – Дендрограмма нуклеотидных последовательностей участков гена *p66* (280 п.н.) у изолятов от мелких млекопитающих различных видов. Изоляты от полевки-экономки обозначены красными ромбами, от мелких млекопитающих немногочисленных видов – фиолетовыми квадратами, штаммы *B. bavariensis* – зелеными кружками. В круглых скобках – наименование штаммов боррелий; в квадратных скобках — номера доступа последовательностей участка гена *p66* в GenBank NCBI. Номера аллельных вариантов отмечены цифрами в квадратах. В соответствии с публикациями [110, 132, 172] видовые названия изолятов NMJW1, Tom2806, SZ, BgVir, Tom5306, Tom4606, Tom 1003 изменены на *B. bavariensis*.



Рисунок 28 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей участка гена *p66* (280 п.н.) у изолятов от мелких млекопитающих, представляющих его вероятные аллельные варианты. Обозначения – в подписи к Рисунку 24.

Таблица 13 – Нуклеотидные замены гена *p66* (280 п.н.) у изолятов от мелких млекопитающих (в сравнении с референсным штаммом *B. bavariensis* PBi; RefSeq GCA_000196215).

Возможные аллельные варианты *p66* по Рисунку 27	**Индекс вариабельности, d**	**Нуклеотидные замены**					
		Неуникальные (одинаковые для всех по референсу)		**Уникальные**			**Вставки или делеции**
		Синонимичные	**Несинонимичные**	**SNP**	**Синонимичные**	**Несиноимичные**	
Cg-103 и др.	0,346	2 (c.1383T>C c.1494C>T)	3 (c.1405A>C c.1474G>A c.1481A>G)	6	2 (c.1575C>T, c.1578C>T)	4 (c.1489A>T, c.1495A>G, c.1538C>T, c.1541T>C)	0
Cg-2752 и др.				5	1 (c.1578C>T)	4 (c.1489A>T, c.1495A>G, c.1538C>T, c.1541T>C)	0
Cg-95 и др.				5	1 (c.1578C>T)	4 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.1523A>G, c.1541T>C)	0
Cg-111 и др.				6	2 (c.1572A>G, c.1578C>T)	4 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.1523A>G, c.1541T>C)	0
Cg-58 и др.				5	2 (c.1575C>T, c.1578C>T)	3 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.178A>G)	0
Cg-19 и др.				8	3 (c.1545T>C, c.1575C>T, c.1578C>T)	5 (c.1489A>G, c.1492G>A, c.1495A>G, c.1511G>C, c.1541T>C)	0

Таблица 13 – (продолжение).

Возможные аллельные варианты *p66* по Рисунку 27	**Индекс вариа-бельности, d**	**Нуклеотидные замены**					
		Неуникальные (одинаковые для всех по референсу)		**Уникальные**			**Вставки или делеции**
		Синонимич-ные	**Несинони-мичные**	**SNP**	**Синонимичные**	**Несиноимичные**	
Cg-127 и др.	0,346	2 (c.1383T>C c.1494C>T)	3 (c.1405A>C c.1474G>A c.1481A>G)	6	1 (c.1578C>T)	5 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.1496C>T, c.1523A>G, c.1541T>C)	0
Cg-1205 и др.				6	1 (c.1578C>T)	5 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.152G>A, c.1523A>G, c.1541T>C)	0
Cg-2691				7	2 (c.1464C>T, c.1578C>T)	5 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.1511G>A, c.1523A>G, c.1541T>C)	0
Mo-655				6	1 (c.1578C>A)	5 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.1511G>A, c.1523A>G, c.1541T>C)	0
Cg-2713 и др.				6	2 (c.1545T>C, c.1578C>T)	4 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.1520C>T, c.1541T>C)	0

Таблица 13 – (продолжение).

Возможные аллельные варианты *p66* по Рисунку 27	**Индекс вариа-бельности, d**	**Нуклеотидные замены**					
		Неуникальные (одинаковые для всех по референсу)		**Уникальные**			**Вставки или делеции**
		Синони-мичные	**Несинони-мичные**	**SNP**	**Синонимичные**	**Несиноимичные**	
Cg-2692	0,346	2 (c.1383T>C c.1494C>T)	3 (c.1405A>C c.1474G>A c.1481A>G)	8	3 (c.1464C>T, c.1536T>C, c.1578C>T)	5 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.1510G>A, c.1523A>G, c.1541T>C)	0
Cg-2712				5	1 (c.1578C>T)	4 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.1531C>A, c.1541T>C)	0
Cg-2809				8	1 (c.1578C>T)	7 (c.1489A>G, c.1490C>A, c.1495A>G, c.1506A>C, c.1523A>G, c.1541T>C, c.1561G>A)	0
Sb-3174				8	3 (c.1464C>T, c.1536T>C, c.1578C>T)	5 (c.1489A>G, c.1495A>G, c.1510G>A, c.1523A>G, c.1541T>C)	c.1480_1481insCAA

Сходство нуклеотидных последовательностей у изолятов от Cg-111 до Cg-2786, от Mo-894 до Crt-640, образующие 2 кластера, а также изолята Hs-6 и изолятов от клещей, представляющие вариант №2, составило более 99,6%. Нуклеотидные последовательности этих изолятов отличались только одной синонимичной заменой в позиции 1575 п.н. (Рисунок 28). Эти данные позволили считать их аллельным вариантом №2 (ST128) участка гена *p66* (Рисунок 27).

Последовательность изолята Hs-139 (ST128), полученного от пациента с ИКБ, отличается от всех на 1,4–3,2% и принадлежит аллельному варианту №3 (раздел 3.3), также не обнаружена и у изолятов от мелких млекопитающих разных видов (Рисунок 27).

Порядковые номера этих вариантов даны в соответствии с их нуклеотидным сходством более 99%, кроме первых 9, обнаруженных ранее у изолятов от людей с ИКБ (раздел 3.2) и от клещей двух видов (раздел 3.4).

Последовательности участков гена *p66* изолятов от Cg-2691 до Au-195, образующих 3 кластера на дендрограмме (Рисунок 27), оказались сходными между собой на 99,3–100%. Они отличались между собой только в позициях 1464, 1511 и 1578 п.н. (Рисунок 28, Таблица 13), что позволило считать их одним аллельным вариантом (№7).

Нуклеотидные последовательности участка гена *p66* изолятов Cg-2692 и Sb-3174 отличаются более чем на 1,1%. Из всех изолятов от мелких млекопитающих только в последовательности единственного изолята Sb-3174 обнаружена вставка триплета CAA между 1480 и 1481 нуклеотидами (Рисунок 28, Таблица 13). Это послужило причиной отнесения изолятов Cg-2692 и Sb-3174 к разным аллельным вариантам: №9 и №12 (Рисунок 27).

Последовательности выявленных аллельных вариантов участков гена *p66* у изолятов от мелких млекопитающих оказались идентичны нуклеотидным последовательностям аналогичных вариантов у изолятов от *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*, а именно: №1, №2, №4–№9 (Рисунки 23 и 27). Варианты №10, №11 и №12, обнаруженные среди изолятов от зверьков, у иксодовых клещей 2-х видов не выявлены.

Для всех последовательностей гена *p66* частота нуклеотидов изолятов составляет 39,87% (A), 24,46% (T/U), 19,63% (C) и 16,04% (G), а оценка смещения транзиций/трансверсий (R) – 4,08. Выявленные транзиции (пурин–пурин, пиримидин–пиримидин) преобладают у боррелий всех видов комплекса *B. burgdorferi* s. l. Значение R у изолятов от резервуарных хозяев *B. bavariensis* почти идентично изолятам от клещей (раздел 3.4).

Таким образом, детальный анализ сходства последовательностей изолятов участка гена *p66* у изолятов от мелких млекопитающих показал их группировку в 14 кластеров на приведенной дендрограмме (Рисунок 27). Только 11 имели оригинальную последовательность нуклеотидов, позволившую считать их отдельными аллельными вариантами (аллели №1, №2 и №3 были выявлены у изолятов, описанных в предыдущих главах диссертации). Почти половина таких вариантов включает изоляты *B. bavariensis* от зверьков нескольких видов. Исключения составляют варианты аллелей, представленные единичными изолятами (№ 9, №10, №11 и №12). Варианты №1 и №2 обнаружены у большинства изолятов от мелких млекопитающих. Так, вариант №1 был в 37 из 88 изолятов (42,1%), а №2 – в 19 (21,6%).

Последовательности участков гена *p66* у изолятов *B. bavariensis* от мелких млекопитающих оказались идентичными аналогичным нуклеотидным последовательностям у ряда изолятов от клещей *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*: их сходство оказалось тождественным (99,3–100%) с последовательностями различных изолятов *B. bavariensis* из базы данных GenBank NCBI (раздел 3.4, Рисунок 23). Так, нуклеотидные последовательности изолята Cg-2712 (вариант №10) идентичны последовательности изолята Tom3101 (ST379, KF844208) от *I. persulcatus* из Томской области, а также сходны на 99,3% с таковыми изолятов Prm7019 (ST1070, JACFAQ010000001) и JAASAAM1091 (ST1126, CP075244) от клещей этого вида из Пермского края России и Японии.

Нуклеотидные последовательности вариантов №11 и №12, депонированные нами GenBank NCBI, отличались всего немногим более чем на 1% от последовательностей нуклеотидов изолятов из этой базы данных. Таким образом,

различные аллельные варианты участка гена *p66*, выявленные нами у изолятов *B. bavariensis* от мелких млекопитающих циркулируют в природных очагах не только Пермского края, но и в других частях ареала боррелий этого вида (разделы 3.3 и 3.4).

3.5.2 Анализ аминокислотных последовательностей фрагментов белка P66

Аминокислотные последовательности фрагментов белка P66 изолятов от исследованных мелких млекопитающих различных видов группировались в 11 вариантов (Рисунок 29). Сходство последовательностей фрагментов белка P66 внутри каждого выявленного варианта составило 100%, а отличия между ними достигали 7,4%.

Аминокислотное выравнивание выбранных случайным образом изолятов, представляющих 11 аллельных вариантов, продемонстрировало их различия (Рисунок 30). Каждый вариант отличался от других 1 – 4 заменами в аминокислотных последовательностях.

Значительная часть всех изолятов группировалась в варианты №1 и №2 (37 и 19 из 88 изолятов, соответственно). Аминокислотные последовательности изолятов варианта №1 оказались тождественными (Рисунок 30). Аминокислотные последовательности варианта №2 оказались сходными на 100%, хотя изоляты этого варианта группировались в 2 кластера на Рисунке 27. На этом рисунке изоляты варианта №7 группировались в 3 кластера. Однако, их нуклеотидные последовательности сходны на 99,3%, а аминокислотные выражения этих изолятов идентичны (Рисунок 30), что свидетельствует о принадлежности этих изолятов одному аллельному варианту (Рисунок 29). Нуклеотидные замены в последовательностях изолятов, принадлежавших этим трем вариантам (Рисунок 28, Таблица 13), оказались синонимичными, т. е. не влияли на аминокислоты в соответственных позициях.

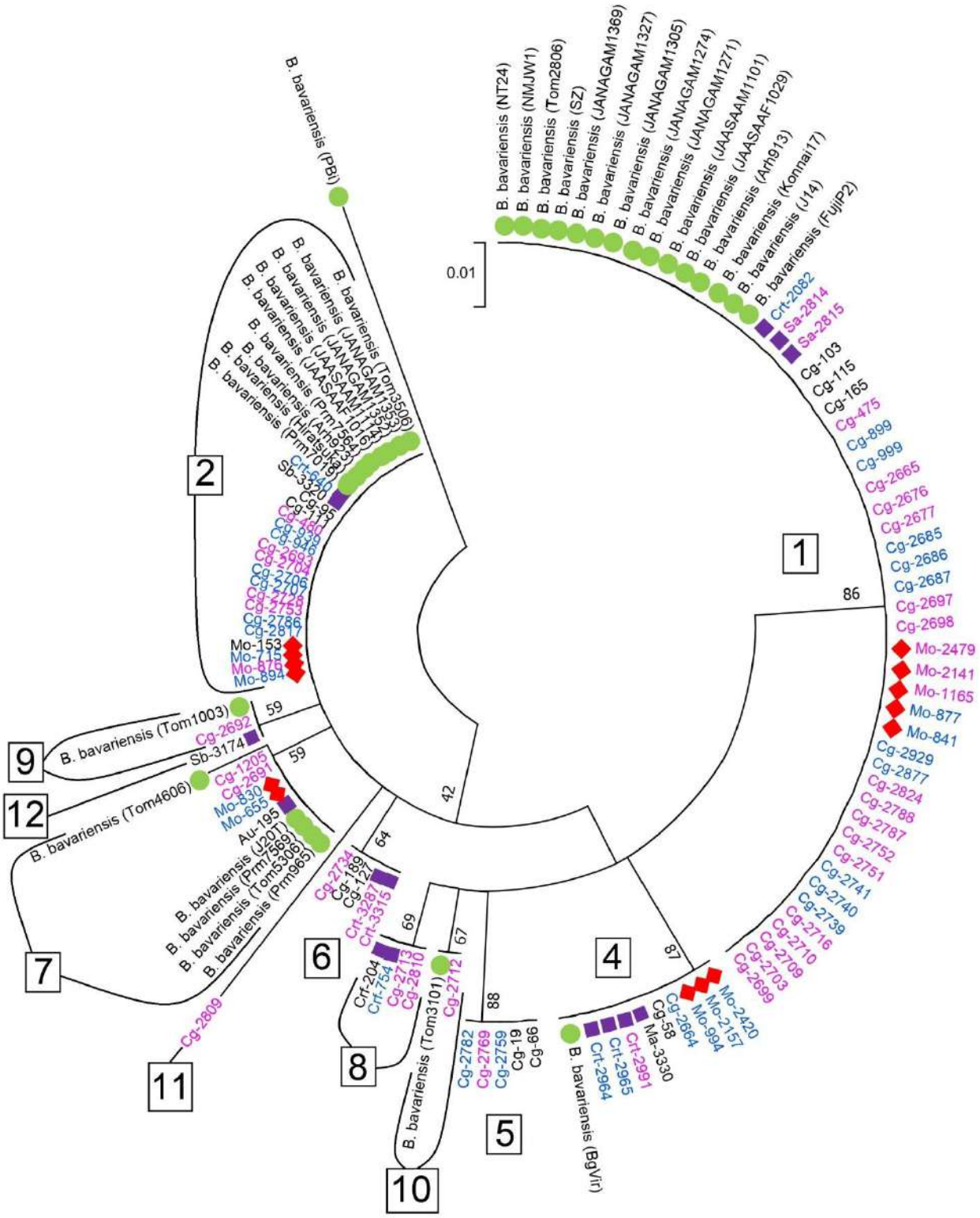


Рисунок 29 – Дендрограмма аминокислотных последовательностей фрагментов белка P66 (93 а.о.) у изолятов *B. bavariensis* от мелких млекопитающих различных видов. Обозначения – в подписи к Рисунку 27. Синим шрифтом выделены номера изолятов от зимовавших зверьков, розовым – от сеголеток.

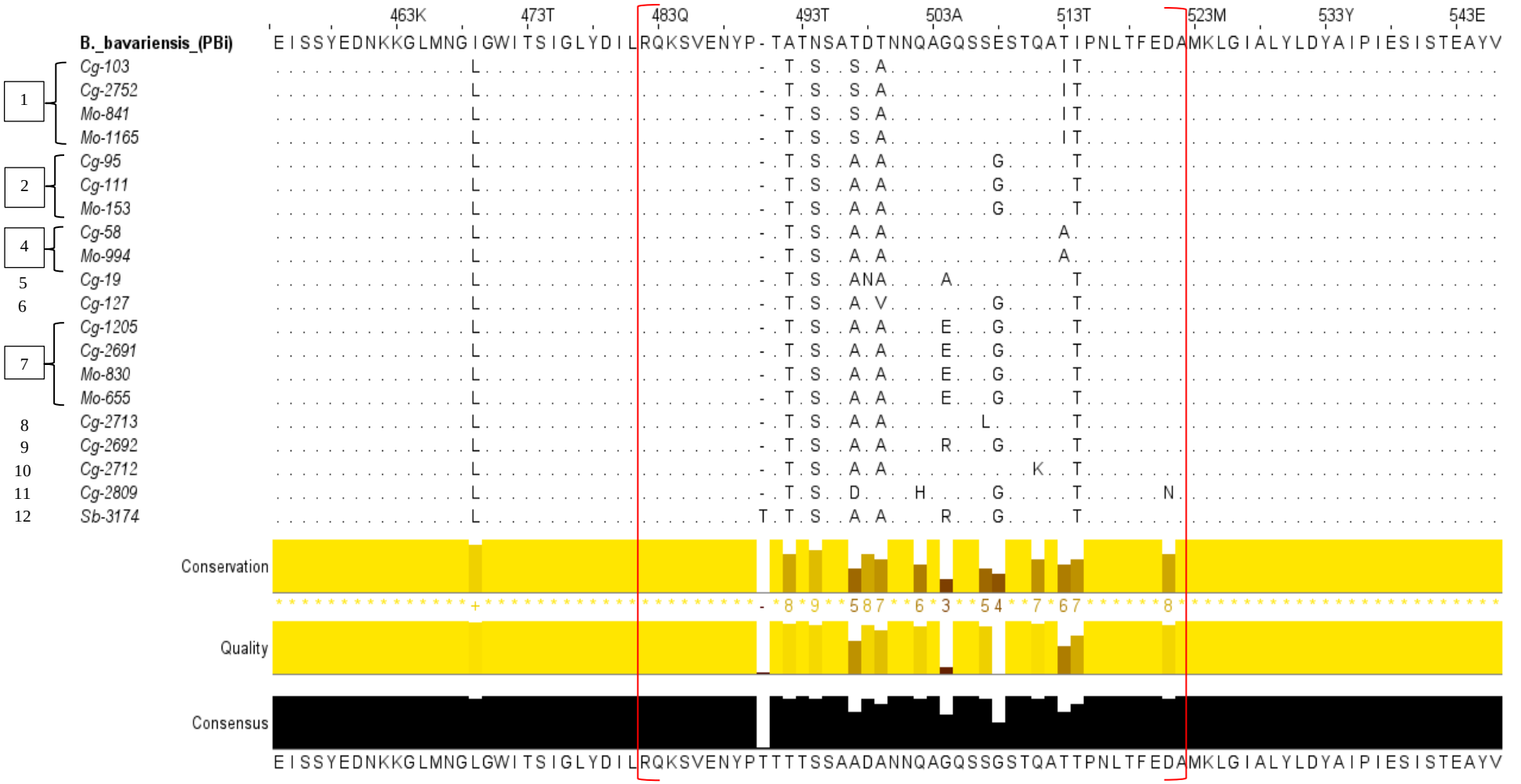


Рисунок 30 – Выравнивание аминокислотных последовательностей фрагментов белка P66 (93 а.о.) у изолятов *B. bavariensis* от мелких млекопитающих. Номер варианта приведен по вертикали перед обозначениями изолятов. Обозначения – в подписи к Рисунку 22.

Выравнивание последовательностей фрагментов белка P66 этих изолятов, выявило гетерогенный участок, состоящий из 18 аминокислот (с позиции 497 по 514 а.о.), где значительная часть замен произошла со сменой полярности некоторых аминокислот (Рисунок 30). Они отличаются друг от друга по разнообразию и характеру аминокислотных замен, сходных с заменами фрагмента белка P66 у изолятов исследованных ранее (разделы 3.3.2 и 3.4.2). Данная вариабельная область локализована в поверхностной С-концевой петле белка P66 (позиции 482 – 522 а.о.) и, вероятно, подвергается иммунному воздействию вследствие ее иммуногенности.

Варианты №10–№12, обнаруженные только среди изолятов от мелких млекопитающих, также характеризовались разнообразием аминокислотных замен, многие из которых также произошли со сменой полярности. У изолята аллельного варианта №10 выявлена замена в позиции 511, которая произошла без смены полярности аминокислоты (Рисунок 30). Наибольшее количество аминокислотных замен произошло у изолята Cg-2809 (вариант №11): 4 замены в позициях 497, 499, 502 и 521 а.о., из которых первые две произошли со сменой полярности аминокислот.

Фрагмент белка P66 единственного изолята Sb-3174 от лесной мышовки (вариант №12), группировавшийся в один кластер с Cg-2692 от рыжей полевки (вариант №9), помимо замены в 504-й позиции отличался от всех изолятов вставкой треонина между позициями 490 и 491 (Рисунки 29 и 30). Наибольшее разнообразие замен отмечено в позиции 504, а в позиции 508, наоборот, наименьшее.

У изолятов от 8 разных видов мелких млекопитающих встречался практически сходный набор вариантов фрагментов белка P66 (Таблица 14). Так, почти все эти варианты (10) обнаружены у изолятов от рыжей полевки – фонового вида мелких млекопитающих. Меньше таких вариантов (4) обнаружено у изолятов от полевок-экономок (субфоновый вид) и от красной полевки (немногочисленный вид).

Таблица 14 – Количество исследованных изолятов от мелких млекопитающих разных видов (резервуарных хозяев боррелий) и распределение разных вариантов белка P66.

Вид млекопитающего и буквенное обозначение изолятов (Рисунки 27-30)	**Исследовано изолятов**	**Из них число каждого из вариантов с соответствующим номером фрагментов белка P66**											
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Рыжая полевка (*Myodes glareolus*) – Cg	59	29	13	–	2	5	3	2	2	1	1	1	–
Полевка-экономка (*Alexandromys oeconomus*) – Mo	14	5	4	–	3	–	–	2	–	–	–	–	–
Красная полевка (*Myodes rutilus*) – Crt	7	1	1	–	3	–	2	–	–	–	–	–	–
Красно-серая полевка *(Craseomys rufocanus*) – Crf	2	–	–	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–
Лесная мышовка (*Sicista betulina)* – Sb	2	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*) – Sa	2	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Темная полевка (*Agricola agrestis*) – Ma	1	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–
Малая лесная мышь (*Sylvaemus uralensis*) – Au	1	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–
Всего	**88**	**37**	**19**	**0**	**9**	**5**	**5**	**5**	**4**	**1**	**1**	**1**	**1**

Другие единичные варианты фрагментов белка P66 выявлены у изолятов от красной, красно-серой и темной полевок, лесной мышовки, обыкновенной бурозубки и малой лесной мыши (Рисунок 29, Таблица 14). Это связано с небольшим количеством исследованных изолятов от зверьков данных видов, что обусловлено их малой численностью в природных очагах Пермского края [7, 12, 118, 119]. Наши данные, как и другие исследования [75, 117], показывают, что различные аллельные варианты патогенных *B. bavariensis* могут быть у разных видов мелких млекопитающих.

Варианты №1 (38,6%) и №2 (19,3%) наиболее часто встречались у изолятов от рыжих полевок и полевок-экономок (Таблица 14). Такие варианты также обнаружены у изолятов от красной полевки и обыкновенной бурозубки. Бурозубки, имеющие существенное значение в прокормлении предимагинальных фаз клещей *I. persulcatus* и *I. trianguliceps,* составляют значительную долю вылова зверьков на территории Пермского края. Тем не менее, зараженность *S. araneus* боррелиями составляла не более 4–5% [12]; от зверьков этого вида изолированы только 2 культуры *B. bavariensis* (Таблица 14). Это свидетельствует о низкой восприимчивости обыкновенных бурозубок к боррелиям и подтверждает их слабое участие в циркуляции возбудителя ИКБ в природных очагах [9, 12, 20, 108].

Набор и соотношение вариантов фрагментов белка P66 у изолятов от мелких млекопитающих оказался сходным таковому у изолятов от предимагинальных фаз клещей *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* (раздел 3.4). Это свидетельствует о том, что нимфы и личинки таких иксодовых клещей могут получать аллельные варианты участка гена *p66 B. bavariensis* при совместном питании на инфицированных мелких млекопитающих – резервуарных хозяевах боррелий, поскольку преимагинальные фазы *I. persulcatus* и *I. trianguliceps* имеют сходный круг основных хозяев – прокормителей [11, 12, 118].

Для мелких млекопитающих, как известно, характерна небольшая индивидуальная продолжительность жизни (например, для рыжей полевки от 0,5 до 1,5 лет) и быстрая смена генераций в их популяциях (3 – 4 выводка в год),

за счет их скорого достижения половой зрелости [3]. Заражение боррелиями этих резервуарных хозяев обычно приводит к пожизненному хроническому инфекционному процессу, который сопровождается размножением возбудителя [163, 197]. Поэтому общая зараженность недавно родившихся молодых особей (сеголеток) меньше, чем «старых» перезимовавших зверьков [12, 57, 180].

У изолятов от рыжих полевок установленного нами возраста (сеголеток и перезимовавших особей) прослеживается сходный набор вариантов фрагментов белка P66 *B. bavariensis*. Объем наших данных позволил рассчитать доли изолятов с наиболее часто встречающимися вариантами №1 и №2 фрагментов белка P66. Отлов и бактериологическое исследование полевок осуществлены в конце лета, т. е. на исходе периода сезонной активности предимагинальных фаз развития клещей (глава 2). Поэтому значительная часть исследованных нами рыжих полевок – сеголеток могла стать прокормителями нимф клеща, инфицировавшихся на протяжении предшествовавшего весенне-летнего периода, а перезимовавшие зараженные зверьки могли получить боррелий в прошлом году еще молодыми особями. Частота встречаемости вариантов №1 и №2 у сеголеток и перезимовавших рыжих полевок практически не отличалась. Так, из 30 изолятов от сеголеток 21 (70,0%) имел в сумме эти варианты, а изоляты от перезимовавших зверьков: 16 (84,2%) из 19; различия между этими показателями недостоверны ($P = 0,26$; критерий $\chi^2 = 1,27$). Трансовариальная передача спирохет группы ИКБ от зараженных самок клеща личинкам дочерней генерации (в отличие, например, от вируса клещевого энцефалита) не происходит, или наблюдается в редких случаях. Поэтому молодые полевки заражаются различными аллельными вариантами возбудителя *B. bavariensis*, среди которых преобладают №1 и №2, от паразитирующих на них зараженных нимф клеща – переносчика. Инфицированные зверьки разного возраста становятся резервуарными хозяевами боррелий для кормящихся на них интактных личинок и нимф клещей, а зимовавшие инфицированные полевки обеспечивают возобновление эпизоотического процесса после его зимней резервации.

Результаты сравнительного анализа частотного распределения аллельных вариантов №1 и №2 нуклеотидных последовательностей участков *p66* у совокупности изолятов *B. bavariensis*, выделенных из биоптатов кожи ушной раковины (n = 34) и содержимого мочевого пузыря (n = 25) рыжих полевок, не выявили статистически значимых различий (P = 0,08; критерий χ^2 = 3,003). Это свидетельствует об отсутствии тропизма у исследуемых боррелий к определенному типу ткани в организме мелких млекопитающих, а также о высокой степени диссеминации бактерий в пределах организма реципиента.

Возрастная структура популяций мелких млекопитающих – один из показателей, определяющихся особенностями динамики численности зверьков. Различные варианты фрагментов белка P66 у изолятов *B. bavariensis* от мелких млекопитающих получены в годы, на протяжении которых наблюдались 4 цикла многолетней динамики численности, каждый из которых включал последовательное чередование ее подъема, спада и депрессии (Рисунок 31). В годы каждой из фаз колебаний численности зверьков, обнаружены изоляты *B. bavariensis*, имевшие не менее 7 вариантов фрагментов белка P66. Наиболее часто встречались варианты №1 и №2 (Таблица 15).

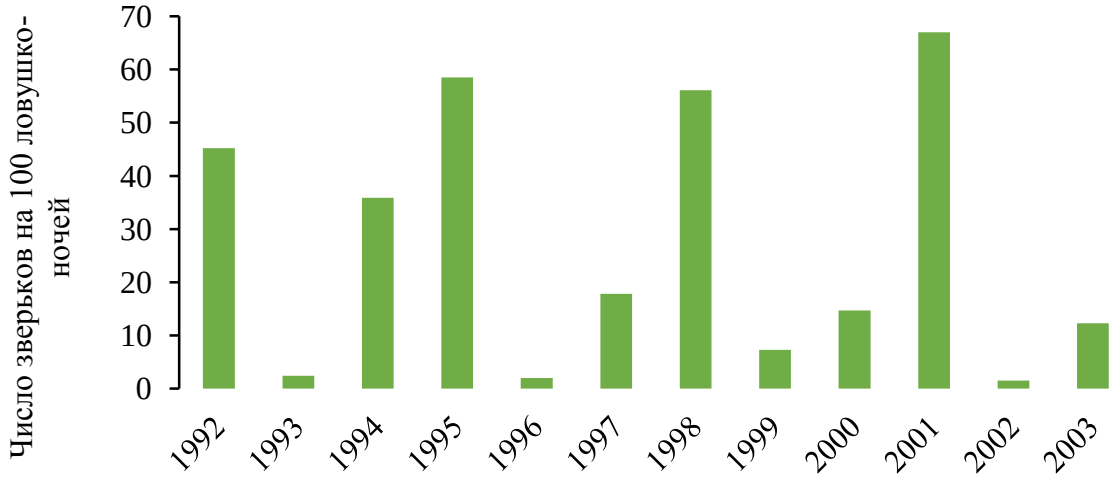


Рисунок 31 – Многолетняя динамика численности мелких млекопитающих по данным их отлова живоловками во второй половине лета в природном очаге Пермского края (по данным Ю.В. Ковалевского и др. [12]).

Таблица 15 – Варианты фрагментов белка P66 у изолятов от мелких млекопитающих, исследованных в разные годы динамики их численности.

Уровень численности мелких млекопитающих (по [12]) в годы изоляции боррелий	**Исследовано изолятов**	**Из них число каждого из вариантов с соответствующим номером фрагментов белка P66 (Рисунок 29)**											
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Высокий (1992, 1995, 1998, 2001)	28	9	8	–	5	2	2	1	1	–	–	–	–
Средний (1994, 1997, 2000, 2003)	54	27	10	–	4	3	2	3	2	1	1	1	–
Низкий (1993, 1996, 1999, 2002)	6	1	1	–	–	–	1	1	1	–	–	–	1

Некоторые отличия в наборе аллельных вариантов P66 на разных фазах динамики численности зверьков связано с небольшим количеством изолятов, которое удалось получить в годы ее депрессии. Тем не менее, на протяжении всех этапов динамики численности основных резервуарных хозяев боррелий прослеживается сходный набор аллельных вариантов *B. bavariensis* (Таблица 15) с преобладанием №1 и №2. Это показывает, что даже в годы депрессии численности резервуарные хозяева боррелий способствуют сохранению генетической гетерогенности популяции возбудителя ИКБ в его паразитарной системе.

3.6 Анализ встречаемости последовательностей участков гена *p66*, идентифицированных у людей с ИКБ, в контексте циркуляции возбудителя в природном очаге

Как отмечено во введении, циркуляция в природном очаге наиболее эпидемически значимых патогенных возбудителей ИКБ группы *B. burgdorferi* s. l. (включая *B. bavariensis*) базируется на сложном многолетнем цикле развития иксодовых клещей – переносчиков, который проходит со сменой их прокормителей – резервуарных хозяев боррелий [2, 20]. Основываясь на этом представлении и на общих количественных закономерностях состояния популяции боррелий на разных этапах паразитарной системы [21], нами составлена обобщенная схема основных, а также возможных второстепенных и редких путей передачи возбудителей ИКБ в природных очагах (Рисунок 32), которая детализирует общую схему циркуляции возбудителей ИКБ Ю. С. Балашова [2] и Э. И. Коренберга [20].

В лесах Среднего Урала на человека нападают в основном голодные инфицированные имаго и в редких случаях – нимфы таежного клеща [119]. На людей регулярно нападают нимфы и имаго *I. ricinus* [8, 22, 94], а также иксодовые клещи некоторых других видов, отсутствующие в этой части нозоареала ИКБ.

Голодные имаго клещей приобретают боррелий только в процессе трансфазовой передачи от напитавшихся зараженных нимф [21, 83, 84], которые могут получить боррелий от напитавшихся инфицировавшихся и успешно метаморфозировавших личинок [8, 21, 83], а также при паразитировании на зараженных мелких млекопитающих (Рисунок 32, позиции 3, 4 и 6) [8, 12, 108, 152]. Вероятность трансовариальной передачи боррелий от напитавшихся инфицированных самок клещей личинкам крайне мала (Рисунок 32, позиции 1–3) [8, 146, 167, 175, 191]. Поэтому голодные личинки остаются не зараженными и не способными передать боррелий своим прокормителям – мелким млекопитающим [5, 12, 21], а сами инфицируются в основном при прокормлении на резервуарных хозяевах (Рисунок 32, позиция 4) этих спирохет [9, 12, 83, 108, 127]. При питании

на таких зверьках голодные личинки и нимфы могут получить различные генетические варианты боррелий, что определяет возможность их дальнейшей трансфазовой передачи до последней фазы цикла развития клеща, т. е. голодных имаго, нападающих на человека.

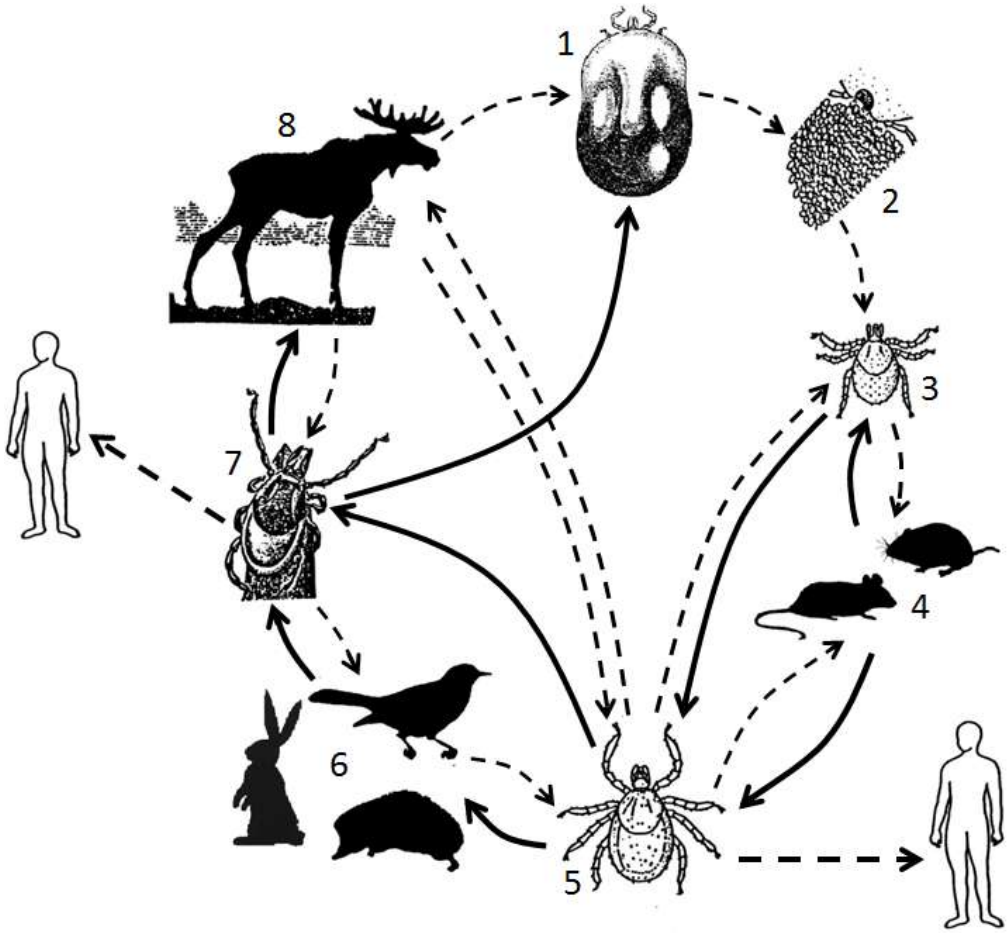


Рисунок 32 – Пути передачи наиболее распространенных евразийских возбудителей ИКБ (*B. burgdorferi* sensu lato) в их паразитарных системах, а также заражений людей. Сплошные стрелки обозначают основные направления передачи боррелий, пунктирные – возможные второстепенные и редкие. Цифрами отмечены компоненты паразитарной системы: 1 – напитавшиеся самки клеща, 2 – яйцекладка, 3 – голодные личинки, 4 – мелкие млекопитающие, 5 – голодные нимфы, 6 –млекопитающие средней величины и птицы, 7 – взрослые голодные клещи (имаго), 8 – крупные млекопитающие.

Исходя из основных направлений передачи боррелий в паразитарных системах, можно было предполагать, что происходит адаптация их различных генетических вариантов к хозяевам разных групп, которая, вероятно, оказывает влияние на частоту инфицирования людей определенными аллельными

вариантами боррелий. При этом важное значение должно принадлежать структуре генетических элементов, кодирующих факторы патогенности боррелий группы ИКБ. Один из них – пориновый мембранный белок Р66 [65, 80, 150, 151], имеющий первостепенное значение в адгезии возбудителей к эндотелиальным клеткам кровеносных сосудов млекопитающих и диссеминации боррелий в их организме [74, 122, 166].

В результате наших исследований среди 238 изолятов *B. bavariensis* от иксодовых клещей – переносчиков и мелких млекопитающих – резервуарных хозяев боррелий из природного очага в Пермском крае, а также от людей, заразившихся ИКБ, обнаружено 12 аллельных вариантов нуклеотидных последовательностей участков гена *p66,* кодирующих структуру фрагментов белка Р66 (Приложение Г). Набор аллельных вариантов гена *p66 B. bavariensis* у инфицированных переносчиков и резервуарных хозяев боррелий оказался практически одинаковым (Рисунок 33). Некоторые единичные нуклеотидные последовательности обнаружены только у изолятов от мелких млекопитающих (раздел 3.5). Не исключено, что при исследовании значительно большего количества изолятов число таких «редко» встречающихся аллельных вариантов могло бы увеличиться, а также были бы обнаружены еще более редкие варианты генетического полиморфизма участков исследованного гена.

Соотношение выявленных вариантов фрагментов белка Р66 *B. bavariensis* среди изолятов от переносчиков и фоновых резервуарных хозяев боррелий оказалось практически тождественным: преобладали №1 и №2 (ST328 и ST128), обнаруженные у изолятов от людей с ИКБ (67 – 76%, Таблица 16). При абсолютных величинах сравниваемых нами выборок статистически значимые различия в частоте этих вариантов среди изолятов *B. bavariensis* от всех основных групп источников возбудителя (иксодовые клещи и мелкие млекопитающие) не выявлены (P = 0,558 – 0,988; критерий χ^2 = 0,0002 – 0,344). Однако статистически значимые различия аллелей №1 и №2 имеются между изолятами боррелий от больных ИКБ и от имаго клеща *I. persulcatus* – единственного источника заражения человека в Пермском крае (P = 0,003; критерий χ^2 = 8,644).

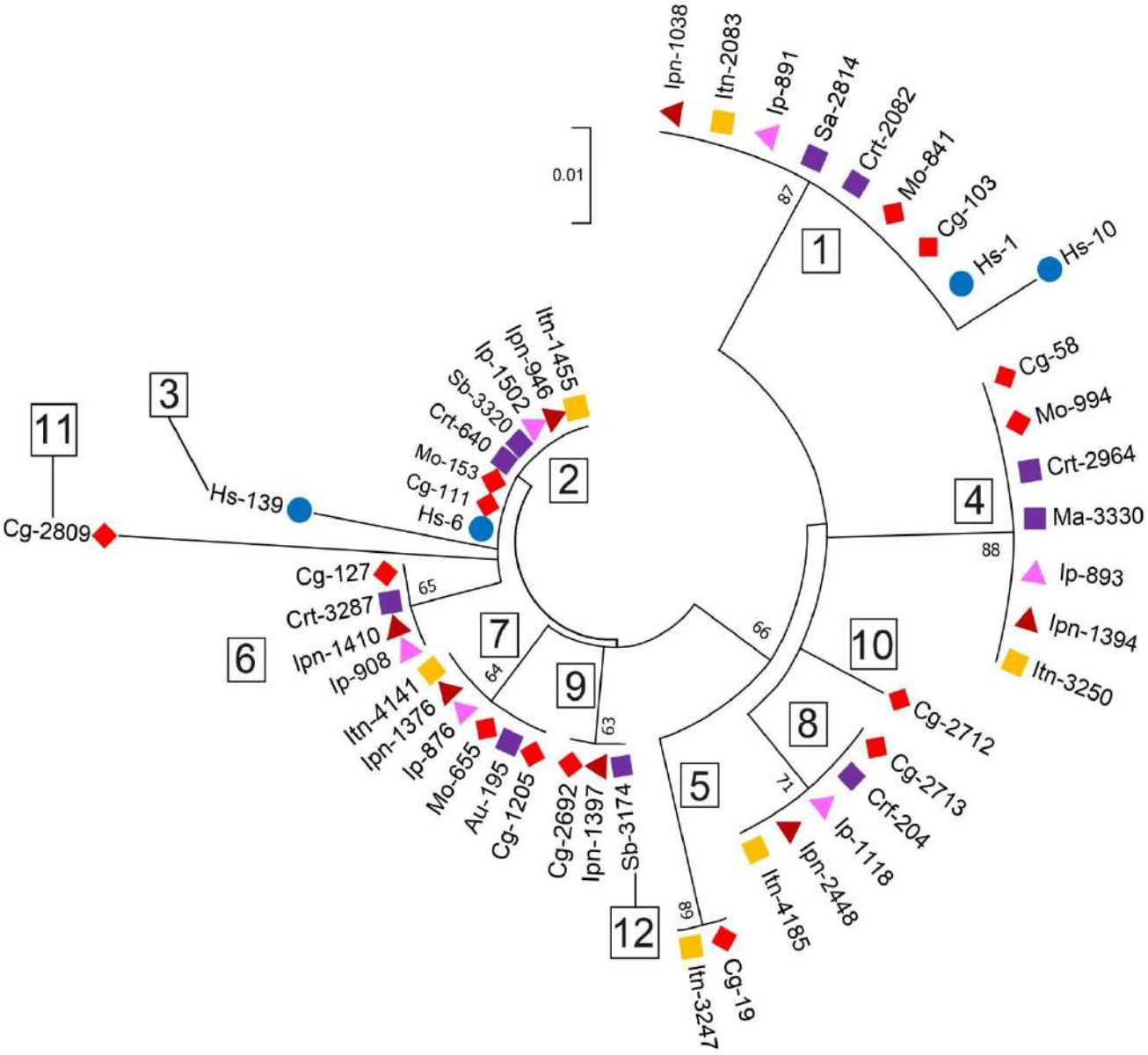


Рисунок 33 – Дендрограмма аминокислотных последовательностей фрагментов белка P66 (93 а.о.) у 47 изолятов, отобранных из всех видовых групп источников выделения для более наглядной демонстрации их сходства (дендрограмма а.п. всех 238 исследованных изолятов представлена в Приложении Г). Изоляты от людей с ИКБ выделены синими кружками, от фоновых видов резервуарных хозяев – красными ромбами, от мелких млекопитающих малочисленных видов – фиолетовыми квадратами, от имаго *I. persulcatus* – розовыми треугольниками, от нимф *I. persulcatus* – красными треугольниками, от нимф *I. trianguliceps* – желтыми квадратами. Порядковые номера аллельных вариантов указаны в квадратах.

Таблица 16 – Доля аллельных вариантов №1 и №2 гена *p66*, кодирующего белок P66, среди изолятов от больных ИКБ и от основных групп циркуляции возбудителя в паразитарной системе *B. bavariensis*.

Источник изолятов и их буквенные обозначения на Рисунке 33	**Раздел в диссертации**	**Исследовано изолятов**	**Из них число выявленных вариантов №1 и №2 фрагментов белка P66**	
			Абс	**%**
Люди, больные ИКБ (Hs)	3.3	27	26	96,3
Голодные имаго таежного клеща (Ip)	3.4	58	39	67,2
Нимфы таежного клеща (Ipn)	3.4	40	28	70,0
Фоновые виды грызунов – резервуарных хозяев боррелий (Cg и Mo)	3.5	73	51	69,9
Нимфы клеща *I. trianguliceps* (Itn)	3.4	25	19	76,0

Аллельные варианты №1 и №2 превалируют у инфицированных этими возбудителями взрослых таежных клещей, нападающих на человека на Среднем Урале (Таблица 16), что определяет заражения людей именно ими. Они выявлены почти у 70% изолятов от мелких млекопитающих фоновых видов – резервуарных хозяев боррелий, а также от нимф таежных клещей (Таблица 16).

Анализ последовательностей участка гена *p66* и аминокислотных последовательностей фрагментов одноименного белка в базе данных GenBank NCBI выявил аллельные варианты *B. bavariensis*, которые отличаются от обнаруженных в нашем исследовании. Их визуализация в форме дендрограммы (Рисунок 34) демонстрирует два обособленных кластера, ассоциированных с двумя генетическими подгруппами *B. bavariensis*: европейской (А), характеризующейся уникластерной структурой, и евразийской (Б), демонстрирующей поликластерную организацию.

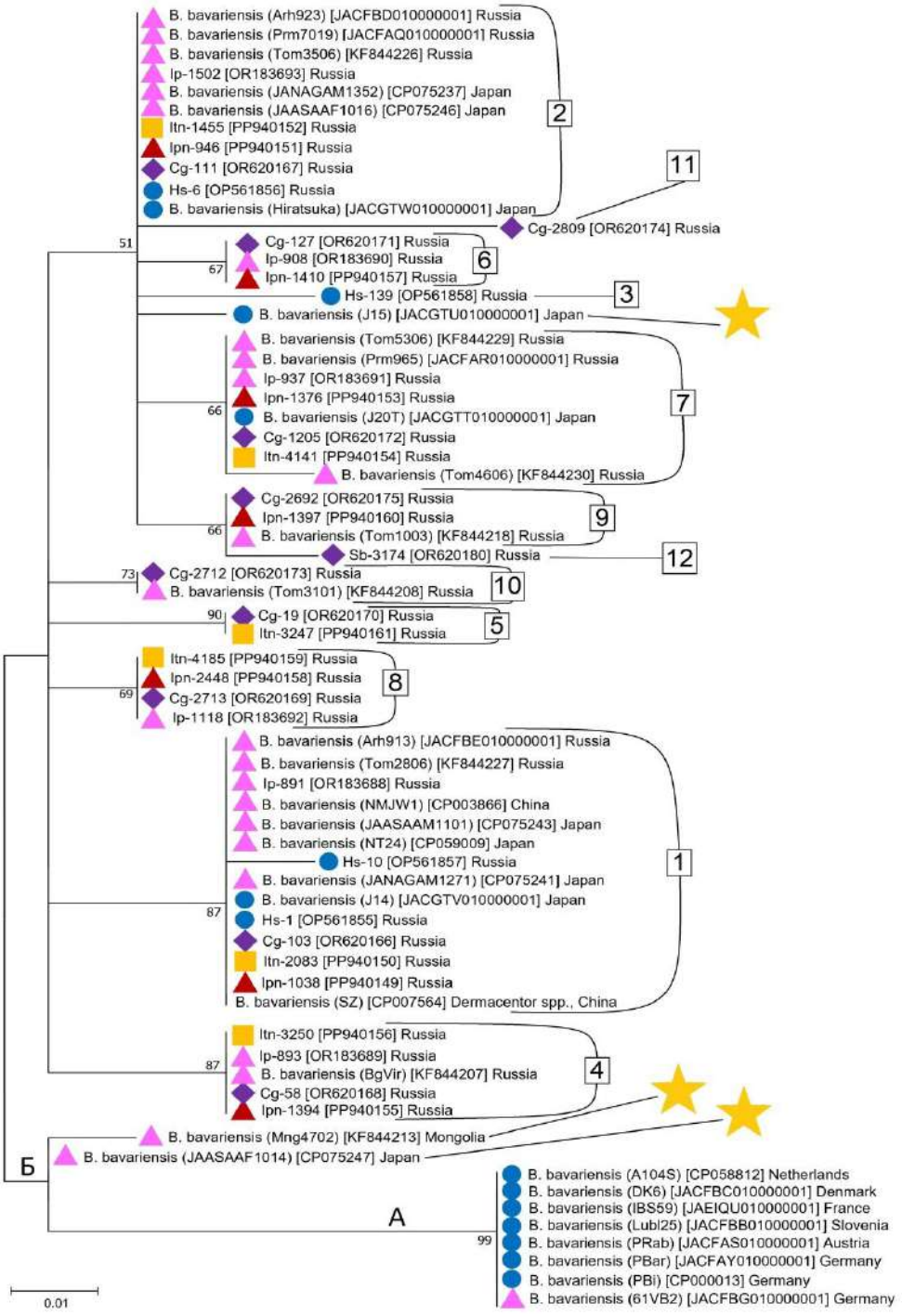


Рисунок 34 – Дендрограмма аминокислотных последовательностей, представляющих 12 вариантов белка P66 (93 а.о.) у изолятов *B. bavariensis* из Среднего Урала, 3 иных варианта из других регионов (обозначены желтыми звездами), и штаммов *B. bavariensis* из GenBank NCBI. Кластер А представляет европейскую подгруппу этих спирохет; кластер Б – евразийскую. В круглых скобках – наименование штаммов боррелий; в квадратных скобках — номера доступа нуклеотидных последовательностей в GenBank NCBI. Регион изоляции указан. В соответствии с публикациями [110, 132, 172] видовые названия изолятов NMJW1, Tom2806, SZ, BgVir, Tom5306, Tom4606, Tom 1003 изменены на *B. bavariensis*. Остальные обозначения – в подписи к Рисунку 33.

Кроме 12 вариантов фрагментов белка P66, выявленных нами среди изолятов *B. bavariensis* из Среднего Урала, база данных GenBank NCBI содержит другие варианты последовательностей этого возбудителя (Рисунок 34). Такие последовательности были обнаружены у изолятов от пациентов, больных ИКБ (J15), а также от клещей *I. persulcatus* (Arh923, Prm7569, Tom4606, BgVir, Tom1003, Tom3101, Mng4702, JAASAAF1014, JAASAAM1091) и *Dermacentor* sp. (SZ), собранных в различных географических регионах (Архангельская и Томская области, Пермский край России, Китай, Монголия, Япония).

Между аминокислотными последовательностями фрагментов белка P66 у выявленных нами аллельных вариантов евразийской подгруппы *B. bavariensis*, а также у изолятов боррелий этой подгруппы из GenBank NCBI существуют различия (Рисунок 35). В частности, аллельный вариант №1 отличается от других наличием в позициях 497, 508 и 513 следующих аминокислот: полярного серина, полярной отрицательно заряженной глутаминовой кислоты и неполярного изолейцина.

Аллельный вариант №2 характеризуется наличием в тех же позициях других аминокислот: неполярного аланина, неполярного глицина и полярного треонина.

В дополнение к аминокислотным заменам, специфичным для варианта №2, у аллельного варианта №3 выявлены еще две замены: полярного положительно заряженного лизина на полярный аспарагин (в позиции 463) и неполярного алифатического лейцина на неполярный ароматический фенилаланин (в позиции 465).

Идентичные нуклеотидные последовательности участков гена *p66* аллельных вариантов №1 и №2 *B. bavariensis* обнаружены только у японских изолятов J14 и Hiratsuka, полученных от людей с ИКБ в 1995 и 2008 гг., соответственно, и имеющихся в базе данных GenBank NCBI.

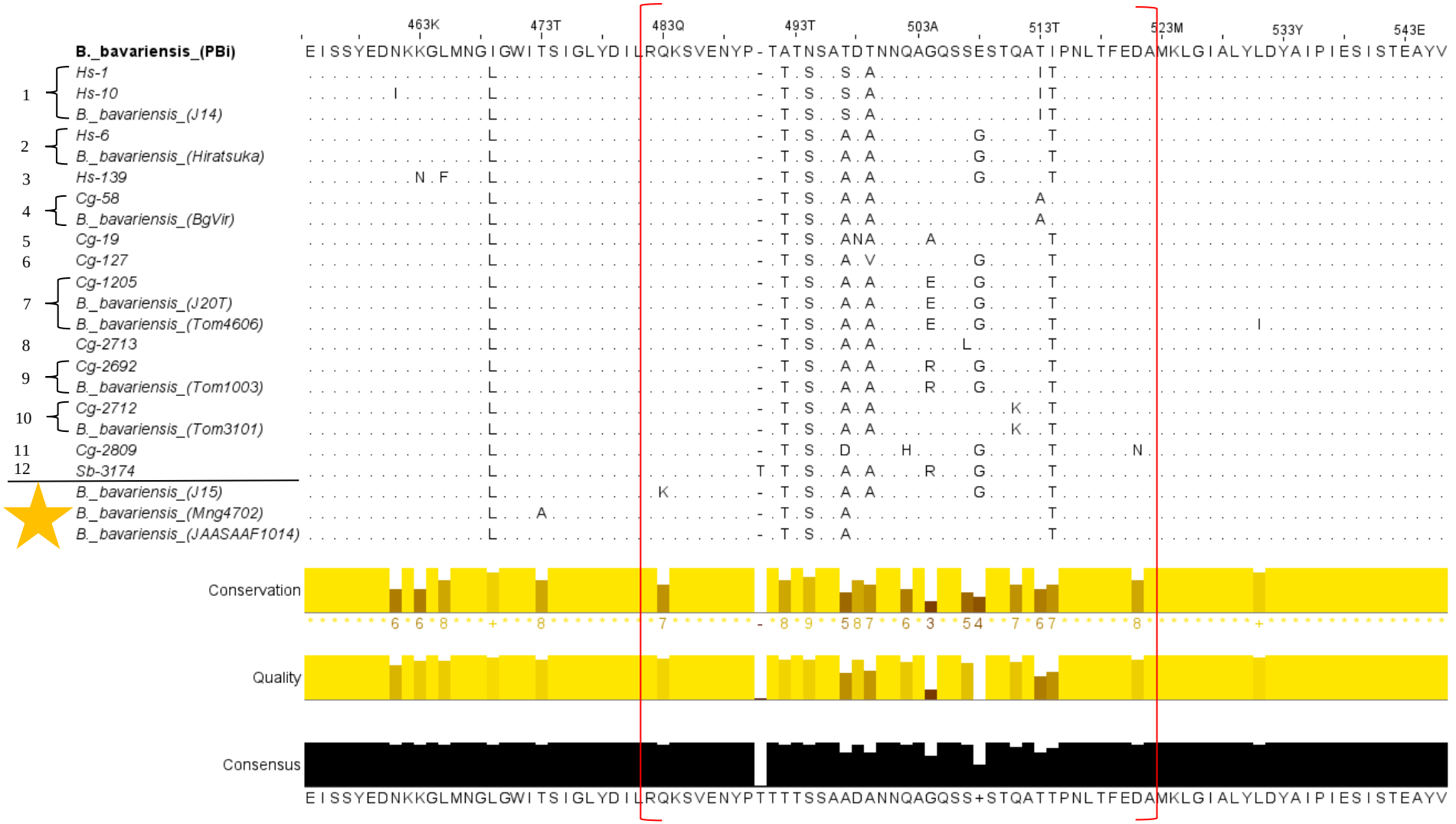


Рисунок 35 – Выравнивание аминокислотных последовательностей белка P66 (93 а.о.) у изолятов, представляющие все выявленные нами аллельные варианты евразийской подгруппы *B. bavariensis*, а также изолятов боррелий этого вида из GenBank NCBI. Номера вариантов приведены по вертикали перед обозначением изолята. Обозначения – в подписи к Рисунку 22.

В этой данных GenBank NCBI также имеется нуклеотидная последовательность *p66* изолята J20T, выделенного от инфицированного человека в 1996 году в Японии, которая оказалась идентична последовательностям аллельного варианта №7 *B. bavariensis* (Рисунки 34 и 35). Это может свидетельствовать о патогенности для человека данного варианта возбудителя ИКБ.

Предполагаемый аллельный вариант, идентифицированный у японского изолята J15 (ST381, JACGTU010000001), который получен в 1995 году от инфицированного человека, демонстрирует высокую гомологию с аллельным вариантом №2, за исключением аминокислотной замены глутамина на лизин в позиции 483. Потенциальный аллельный вариант, выявленный у японских штаммов JAASAAF1014 (ST1126, CP075247) и JAASAAM1091 (ST1126, CP075244) от *I. persulcatus*, помимо аналогичной замены, обнаруженной у варианта №1 в позиции 508, характеризуется дополнительной заменой аланина на треонин в позиции 500. Такие аминокислотные замены присутствуют в составе белка P66 монгольского изолята Mng4702 (ST137, KF844213) от таежных клещей, который отличается от всех перечисленных выше вариантов в позиции 473 заменой треонина на аланин (Рисунок 35). Полученные результаты свидетельствуют о значительной степени генетического полиморфизма евразийской подгруппы *B. bavariensis* в пределах исследованного фрагмента гена *p66.*

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В России среди различных инфекционных заболеваний, передающихся иксодовыми клещами, первое место занимают ИКБ [207], этиология которых, как было принято считать, в большинстве связана с двумя видами боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. – *B. afzelii*, *B. garinii* и их геномными подгруппами – VS461T и NT28, 20047T и NT29, соответственно [117, 134, 153, 154]. На Среднем Урале ИКБ составляют больше половины всех случаев трансмиссивных заболеваний человека [41], из которых приблизительно две третьи вызваны *B. garinii* NT29 [31, 33]. Результаты исследований геномных подгрупп *B. garinii* современными молекулярно-биологическими методами позволили выделить новый вид боррелий – *B. bavariensis* (глава 1), а подгруппу NT29 отнести к ее «азиатской субпопуляции» (по терминологии авторов) [132, 176, 189]. Анализ значения этого вида боррелий как этиологического агента ИКБ в России не проводился. Это побудило нас к реидентификации изолятов из музея боррелий лаборатории переносчиков инфекций («ГКМ – Гамалеи»), которые первичной идентификацией были отнесены к *B. garinii* NT29 [29]. Они были получены в 1992 – 2006 годах на Среднем Урале России от людей, больных ИКБ, а также от различных переносчиков и резервуарных хозяев боррелий.

Исследование таких изолятов от больных ИКБ методами МЛСА и МЛСТ показало, что они относятся к евразийской подгруппе *B. bavariensis*, которая имеет три геновариант (раздел 3.1). Таким образом, используя современные молекулярно-генетические методы впервые показано, что данный вид *Borrelia* является этиологическим агентом ИКБ в Пермском крае. Вместе с тем, выявление случаев заболеваний у людей в Новосибирске [40] и на Дальнем Востоке [137], ассоциированных с тем же видом боррелий, свидетельствует о том, что *B. bavariensis*, наряду с *B. garinii* и *B. afzelii*, является возбудителем ИКБ на территории России. Данный вид боррелий также имеет внутривидовую гетерогенность, как было показано и для других видов *B. burgdorferi* s. l. [30, 129, 141, 172, 189]. Обнаружение боррелий евразийской подгруппы *B. bavariensis* у

клещей *I. persulcatus, I. ricinus, I. pavlovskyi,* а также у мелких млекопитающих в Европейской [30, 141, 142] и Азиатской [30, 141, 142, 161, 172] частях России свидетельствуют о ее широком распространении и циркуляции в природных очагах, что ранее относилось к *B. garinii* NT29 [28, 29].

Важное эпидемическое значение в России евразийской подгруппы *B. bavariensis* не исключает возможное распространение европейской геномной подгруппы этого вида боррелий, которая была обнаружена у клеща *I. ricinus* в Европейской части нашей страны [30]. Влияние различных подгрупп *B. bavariensis* на клинические проявления заболеваний нуждается в дальнейшем изучении. Выявленный ранее микст-изолят евразийской геномной подгруппы *B. bavariensis* + *B. garinii* от больного ИКБ в Пермском крае [4] позволяет предположить возможность микст-инфицирования людей при участии *B. bavariensis*.

Наши данные не выявили принципиальные различия между результатами идентификации первичных изолятов боррелий от людей, больных ИКБ, методами МЛСА и МЛСТ. При этом использование в качестве мишени какого-либо одного участка обычно не позволяет точно идентифицировать изучаемый образец [130, 160]. Детальный анализ генетической структуры пула изолятов *B. bavariensis*, показал, что нуклеотидные последовательности участков генов *recA* и *ospA* имеют наибольшие отличия от последовательностей других генов, рекомендованных для исследования протоколом МЛСА, а также четко отличаются от таковых у референсных штаммов других видов *B. burgdorferi* s. l. (раздел 3.1). Так, дендрограммы, построенные на основе результатов сцепленных последовательностей участков этих двух генов (Рисунок 14) и полного набора генов, предусмотренного методом МЛСА (Рисунок 8), продемонстрировали одинаковую видовую и геновариантную принадлежность изолятов. Идентификация изолятов боррелий неизвестной ранее видовой принадлежности по результатам нуклеотидных последовательностей хромосомного (*recA*) и плазмидного (*ospA*) генов подтверждена их выборочным исследованием полным методом МЛСА. Дендрограмма (Рисунок 17) сцепленных нуклеотидных

последовательностей генов *recA* и *ospA* продемонстрировала четкую группировку последовательностей из международной базы данных GenBank NCBI по видам патогенных боррелий. Таким образом, впервые показана возможность лабораторной идентификации этиологии заболеваний группы ИКБ оптимизированным методом МЛСА, который основан на анализе сцепленных нуклеотидных последовательностей участков генов *recA* и *ospA* (Приложение В). Предложенный метод соответствует общим рекомендациям видовой идентификации возбудителей [54, 109].

Исходя из основных, возможных второстепенных и редких направлений передачи боррелий (включая *B. bavariensis*) в паразитарных системах (раздел 3.6, Рисунок 32), была выдвинута гипотеза об адаптации их различных генетических вариантов к организмам хозяев разных групп, которая, вероятно, обуславливает частоту инфицирования людей определенными аллельными вариантами боррелий. В результате исследований набор аллельных вариантов гена *p66 B. bavariensis* у инфицированных клещей – переносчиков и мелких млекопитающих – резервуарных хозяев боррелий не имеет принципиальных отличий (раздел 3.6, Рисунок 33), что свидетельствует об отсутствии четкой хозяинной специфичности выявленных вариантов фрагментов белка P66 этих спирохет, как наблюдается у некоторых других видов патогенных *B. burgdorferi* sensu lato [29, 36]. Это в свою очередь указывает на отсутствие влияния хозяев различных видов на гетерогенность возбудителя ИКБ, циркулирующего в природном очаге.

Аллельные варианты №1 и №2 превалируют у инфицированных этими возбудителями имаго таежных клещей, нападающих на человека на Среднем Урале, что определяет заражения людей именно ими. Они также доминируют у нимф клещей этого вида. Эта предимагинальная фаза цикла развития клещей имеет широкий круг прокормителей и осуществляет горизонтальную передачу боррелий резервуарным хозяевам, а также ее вертикальную передачу при

метаморфозе напитавшихся инфицированных особей в имаго (раздел 3.6, Рисунок 32). Поэтому нимфам принадлежит ключевая роль в сохранении в природных очагах генетической гетерогенности *B. bavariensis* (видимо и других возбудителей ИКБ *B. burgdorferi* s. l.), и передаче человеку спирохет, содержащих именно эти аллельные варианты.

Изоляты от мелких млекопитающих фоновых видов включают широкий спектр вариантов фрагментов белка P66 *B. bavariensis* (раздел 3.5). Эти резервуарные хозяева длительно сохраняют в паразитарной системе генетически контролируемый полиморфизм его структуры, включая преобладание аллельных вариантов, заражающих человека наиболее часто (раздел 3.6, Таблица 16). Такая функция инфицированных зверьков, в организме которых боррелии персистируют практически пожизненно [163, 197], особенно важна в ежегодные периоды отсутствия сезонной активности клещей. Однако это не означает, что редко встречающиеся в паразитарной системе *B. bavariensis* аллельные варианты, не обнаруженные среди изолятов от больных людей, а выявленные только у мелких млекопитающих (№10 – №12) или у взрослых *I. persulcatus* (№4 – №9), не могут вызвать заболевание человека ИКБ. Такие случаи могут произойти при значительно большей зараженности имаго таежного клеща (или нимф *I. ricinus*), укусивших человека, упомянутыми редкими вариантами структуры белка P66, циркулирующими в паразитарной системе возбудителя. В регионах, где основной переносчик боррелий – клещ *I. ricinus*, преобладает европейская генетическая подгруппа *B. bavariensis* [132, 168], которая видимо, может включать иные варианты фрагментов белка P66.

Анализом последовательностей участка гена *p66* и аминокислотных последовательностей фрагментов одноименного белка *B. bavariensis* из базы данных GenBank NCBI (раздел 3.6., Рисунок 34) продемонстрирована бóльшая генетическая гетерогенность евразийской подгруппы этого вида боррелий, чем европейской, что также показано другими исследователями [53, 92, 141, 176]. Фрагменты гена *p66*, выявленные среди наших изолятов *B. bavariensis* из Среднего Урала, обнаружены у различных штаммов евразийской подгруппы этого

вида боррелий из GenBank NCBI, которые получены от пациентов с ИКБ, от клещей *I. persulcatus* и *Dermacentor* sp. и собраны в различных географических регионах: Архангельская и Томская области, Пермский край России, Китай и Япония. В этой базе данных также найдены нуклеотидные последовательности участка гена *p66* евразийской подгруппы *B. bavariensis*, которые отличаются от выявленных в данном исследовании и обнаружены у таежных клещей в Японии и Монголии (раздел 3.6). Эти данные подтверждают широкое распространение патогенной для человека евразийской генетической подгруппы *B. bavariensis*, а также указывают на преимущественную связь ее циркуляции с таежным клещом [29, 53, 132], в которую могут вовлекаться иксодовые клещи других видов.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей фрагмента белка P66 исследованных изолятов, а также штаммов евразийской подгруппы *B. bavariensis* выявил их сходства и определенные различия (раздел 3.6, Рисунок 35). В результате проведенного исследования установлено, что анализируемые нуклеотидные последовательности обнаружены у изолятов евразийской подгруппы *B. bavariensis*, выделенных от пациентов с ИКБ в двух географически удаленных регионов: Пермского края (аллельные варианты №1 и №2) и Японии. У японских изолятов, согласно данным GenBank NCBI, идентифицированы две последовательности фрагмента гена *p66*, кодирующего белок P66: одна из них идентична аллельному варианту №7, а другая представляет собой предполагаемый другой аллельный вариант (раздел 3.6). Отсутствие дополнительных последовательностей участка гена *p66* евразийской подгруппы *B. bavariensis* от пациентов с ИКБ в открытых базах данных ограничивает сравнительный анализ. Однако совокупность имеющихся результатов исследования позволяет предположить патогенный потенциал данных аллельных вариантов для человека.

Таким образом, представленные результаты в разделе 3.6 демонстрируют значительную гетерогенность аминокислотной последовательности P66 у *B. bavariensis*, а обнаруженные замены, характеризующиеся изменениями физико-химических свойств аминокислотных остатков, могут оказывать влияние на

конформационную структуру и, предположительно, на функциональную активность этого белка. Дальнейшие исследования, направленные на установление взаимосвязи между структурно-функциональными особенностями аллельных вариантов P66 и их патогенным потенциалом, будут способствовать изучению биохимических процессов адгезии боррелий на клетки человека, а также совершенствованию диагностики, терапии и профилактики ИКБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение современных методов видовой идентификации (МЛСА и МЛСТ) позволило установить точную таксономическую принадлежность изолятов боррелий, выделенных от пациентов с ИКБ. В частности, реидентификация репрезентативной выборки музейных изолятов, ранее классифицированных как подгруппа NT29 *B. garinii*, подтвердила их принадлежность к евразийской подгруппе *B. bavariensis*. Полученные результаты, в совокупности с опубликованными данными и информацией из базы GenBank NCBI, указывают на широкое распространение данной подгруппы *B. bavariensis* в различных регионах Евразии, что обусловливает ее значимую роль в инфекционной патологии ИКБ.

Сравнительным анализом методов МЛСТ и МЛСА продемонстрирована их сопоставимая эффективность для видовой идентификации боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. Для определения конкретного вида патогенных боррелий этой группы, вызвавшего ИКБ (т.е. для уточнения этиологии заболевания), разработан и апробирован оптимизированный метод МЛСА, основанный на секвенировании плазмидного гена *ospA* и хромосомного гена *recA*. Его применение дает возможность повысить эффективность клинических диагностических лабораторий и при этом уменьшает трудоемкость работы и затраты на ее проведение.

Паразитарные системы *B. bavariensis*, вызывающей заболевания ИКБ у населения Среднего Урала и других регионов Евразии, включает не менее 12 аллельных вариантов участка гена *p66*, кодирующего белок P66, необходимый для начала инфекционного процесса. Два из них (порядковые номера 1 и 2) существенно преобладают среди изолятов этого возбудителя от резервуарных хозяев и переносчиков, а также от людей, больных ИКБ. Полиморфизм нуклеотидных последовательностей гена *p66* обуславливает вариации аминокислотного состава соответствующего белка. Их особенности, характерные для белка P66 у аллельных вариантов №1 и №2, вероятно, влияют на его

конформацию и, как следствие, на усиление его функции, включая адгезию боррелий на клетки реципиентов. Эти варианты белковой структуры можно рассматривать как предпочтительные кандидатные мишени для создания профилактических препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Сцепленные последовательности участков двух генов (плазмидного *ospA* и хромосомного *recA*) из 7, рекомендованных протоколом МЛСА, продемонстрировали их значительные различия между патогенными боррелиями группы *B. burgdorferi* s. l. (3,6–8,3%), включая близкие виды *B. garinii* и *B. bavariensis*. Результаты апробации такого оптимизированного метода МЛСА боррелий позволяют рекомендовать его для ускоренной практической лабораторной диагностики конкретного вида возбудителя ИКБ.

2. У большинства исследованных изолятов *B. bavariensis* от больных ИКБ на Среднем Урале преобладают два варианта (порядковые номера 1 и 2; 96,3%) нуклеотидных последовательностей гена *p66*, также обнаруженные у иксодовых клещей и пациентов ряда других регионов Евразии.

3. Между компонентами паразитарной системы *B. bavariensis* (клещами – переносчиками и млекопитающими – резервуарными хозяевами) на Среднем Урале циркулируют не менее 12 аллельных вариантов гена *p66*. Их наборы и частота встречаемости у ее основных компонентов сходны. Это свидетельствует об отсутствии избирательной хозяинной специфичности конкретных аллелей.

4. В природном очаге у инфицированных голодных имаго таежного клеща (*I. persulcatus*) – практически единственного источника заражения людей *B. bavariensis* на Среднем Урале, – как и в паразитарной системе в целом, преобладают (67,2% изолятов от имаго) два аллельных варианта (№1 и №2) гена *p66* этого возбудителя из 12, что определяет частоту их обнаружения у больных людей ИКБ.

5. Аллельные варианты, преобладающие в паразитарной системе *B. bavariensis* и обнаруженные у больных людей, имеют существенные отличия от остальных аллелей в последовательности нуклеотидов гена *p66*. Они приводят к аминокислотным заменам (S497A, E508G и I513T), которые, видимо, могут повлиять на конформацию белка P66, усиливающую его адгезивную функцию. Это позволяет рассматривать обнаруженные варианты белковой структуры, как

перспективные целевые мишени для создания профилактических препаратов, направленных на предотвращение инфицирования людей ИКБ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Факторы патогенности боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* s. l. – поверхностные белки, обеспечивающие их инвазию в организм хозяина и начало инфекционного процесса. Для этого необходима адгезия боррелий на клетки реципиента, а также их уклонение от иммунной системы организма. Такие функции, прежде всего, выполняют белки P66 и OspC, кодируемые (соответственно) одноименным хромосомным и плазмидным генами. Биохимический механизм этих двух процессов нуждается в дальнейшем изучении. Исследование преобладающих аллельных вариантов этих генов (*p66* и *ospC*) у изолятов от людей с ИКБ, переносчиков и резервуарных хозяев является перспективной задачей. Так, две выявленные нами структуры белка P66, которые чаще других вариантов определяют начало инфекционного процесса, вызванного *B. bavariensis*, а также способствуют эпизоотическому и эпидемическому процессам, можно рассматривать в качестве кандидатных мишеней для начала дальнейших исследований по созданию профилактического препарата, предотвращающего заболевания людей ИКБ. В этой связи первостепенное значение для разработки такого поливалентного «анти ИКБ» препарата имеет изучение степени сходства функционально аналогичных белковых структур других наиболее распространенных в Евразии возбудителей ИКБ: *B. garinii, B. afzelii*, а также *B. miyamotoi*, относящейся по современным представлениям к группе возбудителей клещевых возвратных боррелиозов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АКБ – аргасовые клещевые боррелиозы

а.о. – аминокислотные остатки

а.п. – аминокислотные последовательности

БД – электронная база данных музея культур боррелий

в.д. – восточная долгота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфаты

ИКБ – иксодовые клещевые боррелиозы

кДа – кило Дальтон

мкл – микролитр

мкм – микрометр

МЛСА – мультилокусный сиквенс-анализ

МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование

мкг – микрограмм

мкМ – микромоль

мл – миллилитр

нг – нанограмм

нм – нанометр

нСм – нано Сименс

п.н. – пары нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР–ПДРФ – полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК– рибосомальная рибонуклеиновая кислота

с.ш. – северная широта

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

5S, 16S, 23S – субъединицы рибосомы

$\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ – виды интегринов

AMAS – Анализ множественного выравнивания последовательностей (Alignment Manipulation and Summary)

B. burgdorferi s. l. – *Borrelia burgdorferi* sensu lato

B. burgdorferi s. s.– *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

BLOSUM62 – матрица замен, используемая в биоинформатике для выравнивания аминокислотных последовательностей (Blocks Substitution Matrix)

BSK – питательная среда для культивирования боррелий Барбура-Стоннера-Келли (Barbour-Stoenner-Kelly)

cds – кодирующая последовательность гена (coding sequence)

clpA – ген, кодирующий субъединицу A Clp-протеазы

clpX – ген, кодирующий субъединицу X Clp-протеазы

fla – ген, кодирующий белок флагеллина

GenBank NCBI – открытая база данных, поддерживаемая Национальным центром биотехнологической информации США (NCBI)

groEL – ген, кодирующий шаперон GroEL

hbb – ген, кодирующий гистоноподобный белок Hbb

IgM, IgG – иммуноглобулины классов M и G

nifS – ген, кодирующий аминотрансферазу

OspA, OspB, OspC – поверхностные мембранные белки боррелий

ospA – ген, кодирующий белок OspA

ospC – ген, кодирующий белок OspC

pepX – ген, кодирующий дипептидил-аминопептидазу

PubMLST – открытая база данных, поддерживаемая профессорами Мартином Мейденом, Анжелой Брюггеманн, доктором Китом Джолли и грантом The Wellcome Trust

pyrG – ген, кодирующий цитидинтрифосфат-синтетазу

p66 – ген, кодирующий белок P66

P66 – белок порин боррелий

recA – ген, кодирующий белок RecA, отвечающий за репарацию ДНК

recG – ген, кодирующий ДНК-рекомбиназу

rplB – ген, кодирующий 50S субъединицу рибосомального белка L2

rrfA-rrlB – межгенный спейсер боррелий

rrs – ген, кодирующий 16S субъединицу рРНК

SIRPα – рецептор на поверхности клеток макрофагов

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

ST – сиквенс-тип

TBE – трис-боратный буфер

TIGR – институт геномных исследований Роквилл, Мэриленд, США

uvrA – ген, кодирующий ABC-экзонуклеазу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А. Н. Особенности очагов клещевых инфекций в урбаноценозах / А. Н. Алексеев, Е. В. Дубинина, А. Мовилэ. // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 55.

2. Балашов, Ю. С. Паразитизм клещей и насекомых на наземных позвоночных / Ю. С Балашов. – Санкт-Петербург: Наука, 2009. – 357 с. – ISBN 978-5-02-026336-9.

3. Башенина, Н. В. Европейская рыжая полевка / А. А. Аристов, Н. В. Башенина, А. Д. Бернштейн [и др.]; под ред. Н. В. Башенина.–Москва: Академический научно-издательский, производственно-полиграфический и книгораспространительский центр Российской академии наук "Издательство "Наука", 1981. – 352 с.

4. Воробьева, Н. Н. Предварительные данные об этиологии эритемной формы иксодовых клещевых боррелиозов в Пермской области / Воробьева Н.Н., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., [и др.]. // Природноочаговые инфекции в России: современная эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения; Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции Омского государственного университета им. Ф.М. Достоевского. – Омск, 1998. – С. 77–78.

5. Горелова, Н. Б. Взаимоотношения возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов с мелкими млекопитающими в природных очагах Среднего Урала / Н. Б. Горелова, Ю. В. Ковалевский, Э. И. Коренберг [и др.]. // Сибирская зоологическая конференция; Тезисы докладов всероссийской конференции, посвященной 60-летию Института систематики и экологии животных СО РАН. – Новосибирск, 2004. – С. 367–368.

6. Горелова, Н. Б. Зараженность боррелиями различных фаз клеща *Ixodes persulcatus* Sch. (по наблюдениям в природных очагах Среднего Урала) / Н. Б. Горелова, Э. И. Коренберг, Ю. В. Ковалевский [и др.]. // Акарологическое совещание (8; 2004; Санкт-Петербург); Материалы VIII Всероссийского акарологического совещания Зоологического института РАН. – Санкт-Петербург, 2004а. – С. 27–30.

7. Григорьева, Л. А. Землеройки как резервуар боррелий на северо-западе России / Л. А. Григорьева. // Паразитология. – 1996. – Т. 30, № 5. – С. 458–462.

8. Григорьева, Л. А. Особенности трансовариальной и трансфазовой передачи возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов (*Borrelia burgdorferi* s.1.) европейским лесным клещем *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodinae) / Л. А. Григорьева, О. А. Митева, В. А. Мясников [и др.]. // III Международный паразитологический симпозиум «Современные проблемы общей и частной паразитологии»; Материалы III международного паразитологического симпозиума «Современные проблемы общей и частной паразитологии». – Санкт-Петербург: Издательство ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2019. – С. 91–94.

9. Григорьева, Л. А. Паразитарная система *Ixodes persulcatus* (Ixodinae) – *Borrelia garinii* – мелкие млекопитающие на северо-западе России / Л. А. Григорьева, О. А. Митева, Е. П. Самойлова // Труды Зоологического института РАН. – 2024. – Т. 328, № 2. – С. 308–322.

10. Громов, И. М. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны / И. М. Громов, М. А. Ербаева. – Санкт-Петербург: ЗИН, 1995. – 522 с.

11. Ковалевский, Ю. В. Экология клеща *Ixodes tringuliceps* и его роль в природных очагах иксодовых клещевых боррелиозов Среднего Урала / Ю. В. Ковалевский, Э. И. Коренберг, Н. Б. Горелова, В. В. Нефедова. // Зоологический журнал. – 2013. – Т. 92, № 5. – С. 505–516.

12. Ковалевский, Ю. В. Многолетняя динамика эпизоотического процесса природных очагов иксодовых клещевых боррелиозов в горнотаежных лесах Среднего Урала / Ю. В. Ковалевский, Э. И. Коренберг, Н. Б. Горелова. // Паразитология. – 2004. – Т. 38, № 2. – С. 105–121.

13. Конькова-Рейдман, А. Б. Клещевые трансмиссивные инфекции на южном Урале: этиология, эпидемиология, клиника, профилактика / А. Б. Конькова-Рейдман, В. Н. Тарасов, В. И. Злобин // Уральский медицинский журнал. – 2011. – Т. 91, № 13. – С. 8–13.

14. Коренберг, Э. И. Болезнь Лайма / Э. И. Коренберг. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 1993. – № 1. – С. 48–51.

15. Коренберг, Э. И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в Пермском крае (этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение и профилактика) / Э. И. Коренберг, Н. Н. Воробьева, О. Н. Сумливая [и др.]. // Методические рекомендации для врачей. – Пермь: ГОУ ВПО ПГМА им. ак. Е. А. Вагнера Росздрава, 2007. – 67 с.

16. Коренберг, Э. И. Резервуарные хозяева и переносчики боррелий – возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов в России / Э. И. Коренберг, Н. Б. Горелова, Д. Постик [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. – №6. С. 36–38.

17. Коренберг, Э. И. Иксодовые клещевые боррелиозы – новая группа заболеваний человека / Э. И. Коренберг, В. Н. Крючечников. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1996. – № 4. – С. 104–108.

18. Коренберг, Э. И. Первые итоги и задачи изучения болезни Лайма в СССР / Э. И. Коренберг, В. Н. Крючечников, Ю. В. Ковалевский. // Вестник АМН СССР. – 1990. – № 6. – С. 52–57.

19. Коренберг, Э. И. Этиологическая структура южнотаежных сочетанных природных очагов иксодовых клещевых боррелиозов / Э. И. Коренберг, В. В. Нефедова, Н. Б. Горелова [и др.]. // Вестник РАМН. – 2011. – № 10. – С. 10–14.

20. Коренберг, Э. И. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами / Э. И. Коренберг, В. Г. Помелова, Н. С. Осин; под ред. А. Л. Гинцбурга, В. Н. Злобина. – Москва: ООО «Комментарий», 2013. – 463 с. – ISBN 978-5-94822-070-3.

21. Коренберг, Э. И. Общая схема циркуляции возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов в природных очагах Евразии / Э. И. Коренберг, М. Б. Сироткин, Ю. В. Ковалевский. // Зоологический журнал. – 2016. – Т. 95, № 3. – С. 283–299.

22. Коренберг, Э. И. Адаптивные черты биологии близких видов иксодовых клещей, определяющие их распространение (на примере таежного – *Ixodes persulcatus* Sch. и европейского лесного – *Ixodes ricinus* L. 1758) / Э. И. Коренберг, М. Б. Сироткин, Ю.В. Ковалевский. // Успехи современной биологии. – 2021. – Т. 141, № 3. – С. 271–286.

23. Куркатова, Л. А. Современное состояние отечественного музея боррелий / Л. А. Куркатова, Э. И. Коренберг, Н. Б. Горелова // Здоровье населения и среда обитания: ЗНиСО. – 2017. – Т. 290, № 5. – С. 54–56.

24. Лабинская А. С. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II / Колл. авторов. // Под ред. А. С. Лабинской, Н. Н. Костюковой, С. М. Ивановой. – Москва: Издательство БИНОМ, 2010. – 1152 с. – ISBN 978-5-9518-0412-9.

25. Лисовский, А. А. Млекопитающие России: список видов и прикладные аспекты / А. А. Лисовский, Б. И. Шефтель, А. П. Савельев [и др.]. // Сборник трудов Зоологического музея Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. – Москва: ООО Товарищество научных изданий КМК, 2019. – Т. 56. – 191 с. – ISBN 978-5-978-5-907099-83-8.

26. Миноранская, Н. С. Эпидемиологическая характеристика иксодовых клещевых боррелиозов в Красноярском крае / Н. С. Миноранская, Н. В. Андронова, Е. И. Миноранская. // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 147–148.

27. Морозов, А. В. Различия в аминокислотной последовательности поверхностно-экспонированного участка белка P66 у различных изолятов *Borrelia afzelii* / А. В. Морозов, Э. И. Коренберг, И. А. Фадеева, Н. Б. Горелова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2008. – № 1. – С. 38–40.

28. Нефедова, В. В. Генетическая гетерогенность *Borrelia garinii* в природном очаге Среднего Урала / В. В. Нефедова, Э. И. Коренберг, Н. Б. Горелова, Ю. В. Ковалевский. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – Т. 55, № 3. – С. 139–142.

29. Нефедова, В. В. Генетические варианты *Borrelia garinii* – широко распространенного евразийского возбудителя заболеваний группы иксодовых клещевых борелиозов / В. В. Нефедова, Э. И. Коренберг, Н. Б. Горелова. // Молекулярная генетика микробиология и вирусология. – 2010. –№ 3. – С. 7–12.

30. Нефедова, В. В. Мультилокусный сиквенс-анализ «нетипичных» *Borrelia burgdorfei* sensu lato, изолированных в России / В. В. Нефедова, Э. И. Коренберг, Н. Б. Горелова. // Молекулярная генетика микробиология и вирусология. – 2017. – Т. 35, № 4. – С. 145–150.

31. Нефедова, В. В. Изоляция возбудителя иксодового клещевого боррелиоза из крови больных / В. В. Нефедова, В. Ю. Тетерин, Э. И. Коренберг [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 1. – С. 63–66.

32. Рудакова, С. А. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2013–2022 гг. и прогноз на 2023 г. / С. А. Рудакова, О. Е. Теслова, Н. Е. Муталинова [и др.]. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 2. – С. 75–87.

33. Тетерин В. Ю. Клинико-лабораторная диагностика инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в Пермском крае / В. Ю. Тетерин, Э. И. Коренберг, В. В. Нефедова, [и др.]. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2013. – № 4. – С. 11–15.

34. Тупикова, Н. В. Определитель возраста лесных полевок / Н. В. Тупикова, Г. А. Сидорова, Э. А. Коновалова. // Материалы к познанию фауны и флоры СССР, 1970. – Вып. 45 (60). – С. 160–167.

35. Фадеева, И. А. Генетические варианты *Borrelia afzelii*–одного из возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов / И. А. Фадеева, В. В. Нефедова, Э. И. Коренберг, Н. Б. Горелова. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2005. – № 3. – С. 18–22.

36. Фадеева, И. А. Аллельные варианты *Borrelia afzelii*, выявленные на основании секвенирования хромосомного гена *p66* / И. А. Фадеева, Э. И.

Коренберг, Ю. В. Андрейчук [и др.]. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2006. – № 2. – С. 33–36.

37. Фадеева, И. А. Генетическая гетерогенность *Borrelia afzelii* в природном очаге Среднего Урала / И. А. Фадеева, Э. И. Коренберг, В. В. Нефедова [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006а. – № 3. – С. 27–30.

38. Фоменко, Н. В. Генетические особенности ДНК боррелий вида *Borrelia miyamotoi*, выявляемых в таежных клещах / Н.В. Фоменко, В.Ю. Боргояков, В.В. Панов. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2011. – № 2. – С. 12–17.

39. Фоменко, Н. В. Выявление *Borrelia miyamotoi* в клещах *Ixodes persulcatus* на территории России / Н. В. Фоменко, Н. Н. Ливанова, В. Ю. Боргояков [и др.] // Паразитология. – 2010. – Т. 44, № 3. – С. 201–211.

40. Фоменко, Н. В. Разнообразие *Borrelia burgdorferi* sensu lato в природных очагах Новосибирской области / Н. В. Фоменко, Е. В. Романова, Ю. Ю. Караваева [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т. 5, № S1. – С. 93–98.

41. Фризен, В. И. Место заболеваний, передающихся иксодовыми клешами, в инфекционной патологии Пермской области / В. И. Фризен, М. В. Афанасьева, Э. И. Коренберг [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2004. – Т. 5, № 15. – С. 27–29.

42. Antonara, S. *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using in vivo phage display / S. Antonara, R. M. Chafel, M. LaFrance, J. Coburn. // Molecular microbiology. – 2007. – V. 66, № 1. – P. 262–276.

43. Arnaboldi, P. M. Cross-Reactive Epitopes in *Borrelia burgdorferi* p66 / P. M. Arnaboldi, R. J. Dattwyler. // Clinical and vaccine immunology: CVI. – 2015. – V. 22, № 7. – P. 840–843.

44. Baranton, G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis / G. Baranton, D.

Postic, I. Saint Girons [et al.]. // International journal of systematic bacteriology. – 1992. – V. 42, № 3. – P. 378–383.

45. Barbour, A. G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes / A. G. Barbour // The Yale journal of biology and medicine. – 1984. – V. 57, № 4. P. 521–525.

46. Barbour, A. G. A genome-wide proteome array reveals a limited set of immunogens in natural infections of humans and white-footed mice with *Borrelia burgdorferi* / A. G. Barbour, A. Jasinskas, M. A. Kayala [et al.]. // Infection and immunity. – 2008. – V. 76, № 8. – P. 3374–3389.

47. Barbour, A. G. Biology of *Borrelia* species / A. G. Barbour, S. F. Hayes. // Microbiological reviews. – 1986. – V. 50, № 4. – P. 381–400.

48. Barbour, A. G. Evolution and distribution of the *ospC* gene, a transferable serotype determinant of *Borrelia burgdorferi* // A. G. Barbour, B. Travinsky. // mBio. – 2010. – V. 1, № 4. – e00153-10.

49. Bárcena-Uribarri, I. P66 porins are present in both Lyme disease and relapsing fever spirochetes: a comparison of the biophysical properties of P66 porins from six *Borrelia* species / I. Bárcena-Uribarri, M. Thein, A. Sacher [et al.]. // Biochimica et biophysica acta. – 2010. – V. 1798, № 6. – P. 1197–1203.

50. Bárcena-Uribarri, I. Use of nonelectrolytes reveals the channel size and oligomeric constitution of the *Borrelia burgdorferi* P66 porin / I. Bárcena-Uribarri, M. Thein, E. Maier, [et al.]. // PloS one. – 2013. – V. 8, № 11. – e78272.

51. Barstad, B. Direct Molecular Detection and Genotyping of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Cerebrospinal Fluid of Children with Lyme Neuroborreliosis / B. Barstad, H. Quarsten, D. Tveitnes [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 2018. – V. 56, № 5. – e01868-17.

52. Becker, N. S. Recurrent evolution of host and vector association in bacteria of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato species complex / N. S. Becker, G. Margos, H. Blum [et al.]. // BMC genomics. – 2016. – V. 17, № 1. – P. 734.

53. Becker, N. S. High conservation combined with high plasticity: genomics and evolution of *Borrelia bavariensis* / N. S. Becker, R. E. Rollins, K. Nosenko [et al.]. // BMC genomics. – 2020. – V. 21, № 1. – P. 702.

54. Branda, J. A. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis / J. A. Branda, A. C. Steere. // Clinical microbiology reviews. – 2021. – V. 34, № 2. – e00018-19.

55. Brangulis, K. Crystal structure of the membrane attack complex assembly inhibitor BGA71 from the Lyme disease agent *Borrelia bavariensis* / K. Brangulis, I. Akopjana, I. Petrovskis [et al.]. // Scientific reports. – 2018. – V. 8, № 1. – P. 11286.

56. Brooks, C. S. Global analysis of *Borrelia burgdorferi* genes regulated by mammalian host-specific signals / C. S. Brooks, P. S. Hefty, S. E. Jolliff, D. R. Akins. // Infection and immunity. – 2003. – V. 71, № 6. – P. 3371–3383.

57. Buffet, J. P. Co-infection of *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. in bank voles from a suburban forest / J. P. Buffet, M. Marsot, E. Vaumourin [et al.]. // Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. – 2012. – V. 35, № 6. – P. 583–589.

58. Bunikis, I. *Borrelia* channel-forming proteins: structure and function : diss. / Ignas Bunikis; Department of Molecular Biology, laboratory for molecular infection medicine Sweden (MIMS), Umeå University. – Umeå, 2010. – 77 p.

59. Bunikis, J. Surface exposure and species specificity of an immunoreactive domain of a 66-kilodalton outer membrane protein (P66) of the *Borrelia* spp. that cause Lyme disease / J. Bunikis, L. Noppa, Y. Ostberg [et al.]. // Infection and immunity. – 1996. – V. 64, № 12. – P. 5111–5116.

60. Bunikis, J. A surface-exposed region of a novel outer membrane protein (P66) of *Borrelia* spp. is variable in size and sequence / J. Bunikis, C. J. Luke, E. Bunikiene [et al.]. // Journal of bacteriology. – 1998. – V. 180, № 7. – P. 1618–1623.

61. Bunikis, J. Non-heritable change of a spirochaete's phenotype by decoration of the cell surface with exogenous lipoproteins / J. Bunikis, H. Mirian, E. Bunikiene, A. G. Barbour. // Molecular microbiology. – 2001. – V. 40, № 2. – P. 387–396.

62. Bunikis, J. Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe / J. Bunikis, U. Garpmo, J. Tsao [et al.]. // Microbiology (Reading). – 2004. – V. 150, № Pt 6. – P. 1741-1755.

63. Bunikis, J. Typing of *Borrelia* relapsing fever group strains / J. Bunikis, J. Tsao, U. Garpmo [et al.]. // Emerging infectious diseases. – 2004a. – V. 10, № 9. – P. 1661–1664.

64. Bunikis, J. Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins / J. Bunikis, A. G. Barbour. // Infection and immunity. – 1999. – V. 67, № 6. – P. 2874–2883.

65. Bunikis, J. Molecular analysis of a 66-kDa protein associated with the outer membrane of Lyme disease *Borrelia* / J. Bunikis, L. Noppa, S. Bergström // Fems Microbiology Letters. – 1995. – V. 131, № 2. – P. 139–145.

66. Burgdorfer, W. Relationship of *Borrelia burgdorferi* to its arthropod vectors / W. Burgdorfer, J. F. Anderson, L. Gern [et al.]. // Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum. – 1991. – V. 77. – P. 35–40.

67. Canica, M. M. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis / M. M. Canica, F. Nato, L. du Merle [et al.]. // Scandinavian journal of infectious diseases. – 1993. – V. 25, № 4. – P. 441–448.

68. Cerar, T. Differences in genotype, clinical features, and inflammatory potential of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains from Europe and the United States / T. Cerar, F. Strle, D. Stupica [et al.]. // Emerging infectious diseases. – 2016. – V. 22, № 5. – P. 818–827.

69. Clark, K. *Borrelia* species in host-seeking ticks and small mammals in northern Florida / K. Clark. // Journal of clinical microbiology. – 2004. – V. 42, № 11. – P. 5076–5086.

70. Clark, K. Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States / K. Clark, A. Hendricks, D.

Burge. // Applied and environmental microbiology. – 2005. – V. 71, № 5. – P. 2616–2625.

71. Coburn, J. Integrins alpha(v)beta3 and alpha5beta1 mediate attachment of Lyme disease spirochetes to human cells / J. Coburn, L. Magoun, S. C. Bodary, J. M. Leong. // Infection and immunity. – 1998. – V. 66, № 5. – P. 1946–1952.

72. Coburn, J. Characterization of a candidate *Borrelia burgdorferi* beta3-chain integrin ligand identified using a phage display library / J. Coburn, W. Chege, L. Magoun [et al.]. // Molecular microbiology. – 1999. – V. 34, № 5. – P. 926–940.

73. Coburn, J. Lyme disease pathogenesis / J. Coburn, B. Garcia, L. T. Hu, [et al.]. // Current issues in molecular biology. – 2021. – V. 42. – P. 473–518.

74. Coburn, J. Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin alphavbeta3 / J. Coburn, C. Cugini. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – V. 100, № 12. – P. 7301–7306.

75. Coipan, C. E. The genetic diversity of *Borrelia afzelii* is not maintained by the diversity of the rodent hosts / C. E. Coipan, G. L. A. van Duijvendijk, T. R. Hofmeester [et al.]. // Parasit Vectors. – 2018. – V. 11, № 1. – P. 454.

76. Coipan, E. C. Imbalanced presence of *Borrelia burgdorferi* s. l. multilocus sequence types in clinical manifestations of Lyme borreliosis / E. C. Coipan, S. Jahfari, M. Fonville [et al.]. // Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. – 2016. – V. 42. – P. 66–76.

77. Coleman, J. L. Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete: their role in early diagnosis / J. L. Coleman, J. L. Benach. // The Journal of infectious diseases. – 1987. – V. 155, № 4. – P. 756–765.

78. Cugini, C. Regulation of expression of the *Borrelia burgdorferi* beta(3)-chain integrin ligand, P66, in ticks and in culture / C. Cugini, M. Medrano, T. G. Schwan, J. Coburn // Infection and immunity. – 2003. – V. 71, № 2. – P. 1001–1007.

79. Curtis, M. W. Characterization of stress and innate immunity resistance of wild-type and Deltap66 *Borrelia burgdorferi* / M. W. Curtis, B. L. Hahn, K. Zhang [et al.]. // Infection and immunity. – 2018. – V. 86, № 2. – e00186–e00117.

80. Curtis, M. W. Identification of amino acid domains of *Borrelia burgdorferi* P66 that are surface exposed and important for localization, oligomerization, and porin function of the protein / M. W. Curtis, C. H. Fierros, B. L. Hahn [et al.]. // Front Cell Infect Microbiol. – 2022. – V. 12. – P. 991689.

81. Defoe, G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* p66 sequences required for integrin alpha(IIb)beta(3) recognition / G. Defoe, J. Coburn. // Infection and immunity. – 2001. – V. 69, № 5. – P. 3455–3459.

82. Dubska, L. Differential role of passerine birds in distribution of *Borrelia* spirochetes, based on data from ticks collected from birds during the postbreeding migration period in Central Europe / L. Dubska, I. Literak, E. Kocianova [et al.]. // Applied and environmental microbiology. – 2009. – V. 75, № 3. – P. 596–602.

83. Eisen, L. Vector competence studies with hard ticks and *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes: A review / L. Eisen. // Ticks and tick-borne diseases. – 2020. – V. 11, № 3. – P. 101359.

84. Eisen, L. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato / L. Eisen, R. S. Lane; Eds. J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek // In Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing: Wallingford, UK. – 2002. – P. 91–115.

85. Exner, M. M. Protection elicited by native outer membrane protein Oms66 (p66) against host-adapted *Borrelia burgdorferi*: conformational nature of bactericidal epitopes / M. M. Exner, X. Wu, D. R. Blanco [et al.]. // Infection and immunity. – 2000. – V. 68, № 5. – P. 2647–2654.

86. Fabrizio, G. Genomic characterization and antibiotic susceptibility of biofilm-forming *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* from patients with erythema migrans / G. Fabrizio, I. Cavallo, F. Sivori [et al.]. // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2025. – V. 15. – P. 1619660.

87. Fierros, C. H. *Borrelia burgdorferi* tolerates alteration to P66 porin function in a murine infectivity model / C. H. Fierros, M. L. Faucillion, B. L. Hahn [et al.]. // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2025. – V. 14. – P. 1528456.

88. Filippova, N. A. A Hypothesis for the paleogenesis of the distribution of the main vectors for the Lyme disease / N. A. Filippova; Eds. F. Dusbábek, V. Bukva. // In Modern Acarology. Academia: Prague, Czechia. – 1991. – V. 1. – P. 109–118.

89. Fingerle, V. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s. l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. / V. Fingerle, U. C. Schulte-Spechtel, E. Ruzic-Sabljic [et al.]. // International journal of medical microbiology: IJMM. – 2008. – V. 298, № 3–4. – P. 279–290.

90. Fraser, C. M. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. / C. M. Fraser, S. Casjens, W. M. Huang [et al.]. // Nature. – 1997. – V. 390, № 6660. – P. 580–586.

91. Fukunaga, M. The 23S/5S ribosomal RNA genes (*rrl/rrf*) are separate from the 16S ribosomal RNA gene (*rrs*) in *Borrelia burgdorferi*, the aetiological agent of Lyme disease / M. Fukunaga, Y. Yanagihara, M. Sohnaka. // Journal of general microbiology. – 1992. – V. 138, № 5. – P. 871–877.

92. Gatzmann, F. NGS population genetics analyses reveal divergent evolution of a Lyme borreliosis agent in Europe and Asia / F. Gatzmann, D. Metzler, S. Krebs [et al.]. // Ticks and tick-borne diseases. – 2015. – V. 6, № 3. – P. 344–351.

93. Geller, J. *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in tick populations in Estonia / J. Geller, L. Nazarova, O. Katargina, I. Golovljova. // Parasites & vectors. – 2013. – № 6. – P. 202.

94. Gern, L. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe / L. Gern, P. Humair; Eds. J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek // In Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing: Wallingford, UK. – 2002. – P. 149–174.

95. Gómez Díaz, E. Genetic structure of marine *Borrelia garinii* and population admixture with the terrestrial cycle of Lyme borreliosis / E. Gómez Díaz, T.

Boulinier, N. Sertour [et al.]. // Environmental Microbiology. – 2011. – V. 13, № 9. – P. 2453–2467.

96. Gorelova, N. B. Small mammals as reservoir hosts for *Borrelia* in Russia / N. B. Gorelova, E. I. Korenberg, Y. V. Kovalevskii, S. V. Shcherbakov. // Zentralblatt fur Bakteriologie: international journal of medical microbiology. – 1995. – V. 282, № 3. – P. 315–322.

97. Grimm, D. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals / D. Grimm, K. Tilly, R. Byram [et al.]. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – V. 101, № 9. – P. 3142–3147.

98. Gromiha, M. M. Neural network-based prediction of transmembrane beta-strand segments in outer membrane proteins / M. M. Gromiha, S. Ahmad, M. Suwa. // Journal of computational chemistry. – 2004. – V. 25, № 5. – P. 762–767.

99. Hammer, B. *Borrelia burgdorferi* sensu lato transmission from tick vector to host: Experimental evidence of the involvement of the larval stage of *Ixodes ricinus* / B. Hammer, T. Meiners, A. Marangoni [et al.]. // International Journal of Medical Microbiology. – 2002. – V. 291, Suppl. 33. – P. 211.

100. Hammerschmidt, C. BGA66 and BGA71 facilitate complement resistance of *Borrelia bavariensis* by inhibiting assembly of the membrane attack complex / C. Hammerschmidt, Y. Klevenhaus, A. Koenigs [et al.]. // Molecular microbiology. – 2016. – V. 99, № 2. – P. 407–424.

101. Hanincová, K. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia / K. Hanincová, V. Taragel'ová, J. Koci [et al.]. // Applied and environmental microbiology. – 2003. – V. 69, № 5. – P. 2825–2830.

102. Hao, Q. Distribution of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in China / Q. Hao, X. Hou, Z. Geng [et al.]. // Journal of Clinical Microbiology. – 2011. – V. 49, № 2. – P. 647–650.

103. Hao, Q. Polymorphism of P66 in *Borrelia burgdorferi* strains in China / Hao, Q., H. X. Liu, X. X. Hou [et al.]. // Biomedical and environmental sciences: BES. – 2021. – V. 34, № 5. – P. 364–371.

104. Hou, X. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from Jiangxi, southeastern China region / X. Hou, J. Xu, Q. Hao [et al.]. // International journal of clinical and experimental medicine. – 2014. – V. 7, № 12. – P.5563–5567.

105. Hu, C. M. *Apodemus* sp. rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area in Switzerland / C. M. Hu, P. F. Humair, R. Wallich, L. Gern. // Zentralblatt fur Bakteriologie: international journal of medical microbiology. 1997. – V. 285, № 4. – P. 558–564.

106. Hu, C. M. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field / C. M. Hu, B. Wilske, V. Fingerle [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 2001. – V. 39, № 3. – P. 1169–1171.

107. Huegli, D. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland / D. Huegli, C. M. Hu, P. F. Humair [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 2002. – V. 40, № 12. – P. 4735–4737.

108. Humair, P. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals / P. Humair, N. Turrian, A. Aeschilimann, L. Gern. // Folia Parasitology (Praha). – 1993. – V. 40, № 1. – P. 65–70.

109. Hunfeld, K.-P. Lyme borreliosis / K.-P. Hunfeld, J. Gray. – Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022. – 234 p. – ISBN 978-3-030-93679-2.

110. Igolkina, Y. Genetic Diversity of Siberian Isolates of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato by the *ospA* Gene/ Y. Igolkina, V. Rar, V. Yakimenko [et al.]. // Microorganisms. – 2025. – V. 13, № 12. – P. 2825.

111. Jahfari, S. Melting pot of tick-borne zoonoses: the European hedgehog contributes to the maintenance of various tick-borne diseases in natural cycles urban and suburban areas / S. Jahfari, S. C. Ruyts, E. Frazer-Mendelewska [et al.]. // Parasites & vectors. – 2017. – V. 10, № 1. – P. 134.

112. Johnson, R. C. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease / R. C. Johnson, G. P. Schmid, F. W. Hyde [et al.]. // International journal of systematic bacteriology. – 1984. – V. 34, № 4. – P. 496–497.

113. Kenedy, M. R. Structural modeling and physicochemical characterization provide evidence that P66 forms a β-barrel in the *Borrelia burgdorferi* outer membrane / M. R. Kenedy, A. Luthra, A. Anand [et al.]. // Journal of bacteriology. – 2014. – V. 196, № 4. – P. 859–872.

114. Korenberg, E. I. Comperative ecology and epidemiology of Lyme disease and tick-borne encephalitis in the former Sovet Union / E. I. Korenberg. // Parasitology Today. – 1994. – V. 10, № 4. – P. 157–160.

115. Korenberg, E. I. Ixodid Tick-borne Borrelioses (ITBB's)–infections of the Lyme borreliosis group in Russia: country report / E. I. Korenberg. // Report of WHO Workshop on Lyme Borreliosis Diagnosis and Surveillance. Warsaw. WHO/CDC/VPH/95.141-1. – 1995. – P. 128–136.

116. Korenberg, E. I. The prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes persulcatus* (Schulze) and *I. ricinus* (L.) ticks in their sympatric zone / E. I. Korenberg, Yu. V. Kovalevskii, M. L. Levin, T. V. Schegoleva. // Folia parasitologica. – 2001. – V. 48. – P. 63–68.

117. Korenberg, E. I. Genotyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia / E. I. Korenberg, V. V. Nefedova, I. A. Fadeeva, N. B. Gorelova; Eds. F.C. Cabello, D. Hulinska, H.P. Godfrey // In Molecular Biology of Spirochetes. IOS Press. Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington. – 2006. – P. 174–199.

118. Korenberg, E. I. Comparative analysis of the roles of *Ixodes persulcatus* and *I. trianguliceps* ticks in natural foci of ixodid tick-borne borrelioses in the Middle Urals, Russia / E. I. Korenberg, Y. V. Kovalevskii, N. B. Gorelova, V. V. Nefedova. // Ticks and tick-borne diseases. – 2015. – V. 6, № 3. – P. 316–321.

119. Korenberg, E. I. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia / E. I. Korenberg, N. B. Gorelova, Y. V. Kovalevskii; Eds. J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek // In Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing: Wallingford, UK. – 2002. – P. 175–200.

120. Kraiczy, P. Hide and seek: how Lyme disease spirochetes overcome complement attack / P. Kraiczy. // Frontiers in immunology. – 2016. – № 7. – P. 385.

121. Krampitz, H. E. In vivo isolation and maintenance of some wild strains of European hard tick spirochetes in mammalian and arthropod hosts / H. E. Krampitz. // A parasitologist's view. Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology. – 1986. – V. 263, № 1–2. – P. 21–28.

122. Kumar, D. Intravital imaging of vascular transmigration by the Lyme spirochete: requirement for the integrin binding residues of the *B. burgdorferi* P66 protein / D. Kumar, L. C. Ristow, M. Shi [et al.]. // PLoS pathogens. – 2015. – V. 11, № 12. – e1005333.

123. Kurtenbach, K. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato –the key role of host complement / K. Kurtenbach, S. De Michelis, S. Etti [et al.]. // Trends in microbiology. – 2002. – V. 10, № 2. – P. 74–79.

124. LaFrance, M. E. The *Borrelia burgdorferi* integrin ligand P66 affects gene expression by human cells in culture / M. E. LaFrance, J. V. Pierce, S. Antonara, J. Coburn. // Infection and immunity. – 2001. – V. 79, № 8. – P. 3249–3261.

125. LaRocca, T. J. Bactericidal action of a complement-independent antibody against relapsing fever *Borrelia* resides in its variable region / T. J. LaRocca, L. I. Katona, D. G. Thanassi, J. L. Benach. // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). – 2008. – V. 418, № 9. – P. 6222–6228.

126. Lee, J. T. Development of a sequence-based in silico OspA typing method for *Borrelia burgdorferi* sensu lato / J. T. Lee, Z. Li, L. D. Nunez [et al.]. // Microbial genomics. – 2024. – V. 10, № 5. – P. 001252.

127. Lindso, L. K. Vector competence of *Ixodes ricinus* instars for the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in different small mammalian hosts / L. K. Lindso, H. Viljugrein, A. Mysterud. // Parasites & vectors. – 2024. – V. 17, № 1. – P. 23.

128. Margos, G. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi* / G. Margos, A. G. Gatewood, D. M. Aanensen [et al.]. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – V. 105, № 25. – P. 8730–8735.

129. Margos, G. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes / G. Margos, S. A. Vollmer, M. Cornet [et al.]. // Applied and environmental microbiology. – 2009. – V. 75, № 16. – P. 5410–5416.

130. Margos, G. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato / G. Margos, S. A. Vollmer, N. H. Ogden, D. Fish. // Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. – 2011. – V. 11, № 7. – P. 1545–1563.

131. Margos, G. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia / G. Margos, B. Wilske, A. Sing [et al.]. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2013. – V. 63, № Pt 11. – P. 4284–4288.

132. Margos, G. *Borrelia bavariensis*: vector switch, niche invasion, and geographical spread of a tick-borne bacterial parasite / M. Gabriele, F. Volker, R. Stuart. // Frontiers in Ecology and Evolution. – 2019. – V. 7. – P. 401.

133. Markowicz, M. Oligoarthritis caused by *Borrelia bavariensis*, Austria, 2014 / M. Markowicz, S. Ladstatter, A. M. Schotta [et al.]. // Emerging infectious diseases. – 2015. – V. 21, № 6. – P. 1052–1054.

134. Masuzawa, T. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in far eastern Russia / T. Masuzawa, A. Iwaki, Y. Sato [et al.]. // Microbiology and immunology. – 1997. – V. 41, № 8. – P. 595–600.

135. Masuzawa, T. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia / T. Masuzawa. // Japanese journal of infectious diseases. – 2004. – V. 57, № 6. – P. 229–235.

136. Masuzawa, T. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Moscow province - a sympatric region for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* / T. Masuzawa, I. G. Kharitonenkov, T. Kadosaka [et al.]. // International journal of medical microbiology: IJMM. – 2005. – V. 294, № 7. – P. 455–464.

137. Mediannikov, O. Y. Diversity of Borrelia burgdorferi Sensu Lato in Russian Far East. / O. Y. Mediannikov, L. Ivanov, N. Zdanovskaya, [et. al.]. // Microbiology and Immunology. – 2005. – V. 48, № 3 – C. 191–197.

138. Medrano, M. S. Interaction of *Borrelia burgdorferi* Hbb with the *p66* promoter / M. S. Medrano, P. F. Policastro, T. G. Schwan, J. Coburn. // Nucleic acids research. – 2010. – V. 38, № 2. – P. 414–427.

139. Miyamoto, K. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia / K. Miyamoto, T. Masuzawa; Eds. J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, G. Stanek // In Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing: Wallingford, UK. – 2002. – P. 201–222.

140. Mommert, S. Sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA and differentiation of *Borrelia* species by LightCycler PCR / S. Mommert, R. Gutzmer, A. Kapp, T. Werfel. // Journal of clinical microbiology. – 2001. – V. 39, № 7. – P. 2663–2667.

141. Mukhacheva, T. A. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* s. l. in Russia / T. A. Mukhacheva, S. Y. Kovalev. // Ticks and tick-borne diseases. – 2013. – V. 4, № 4. – P. 275–279.

142. Mukhacheva, T. A. *Borrelia* spirochetes in Russia: Genospecies differentiation by real-time PCR / T. A. Mukhacheva, S. Y. Kovalev. // Ticks and tick-borne diseases. – 2014. – V. 5, № 6. – P. 722–726.

143. Munro, H. J. Evidence for *Borrelia bavariensis* Infections of *Ixodes uriae* within Seabird Colonies of the North Atlantic Ocean / H. J. Munro, N. H. Ogden, L. R. Lindsay [et al.]. // Applied and environmental microbiology. – 2017. – V. 83, № 20. – e01087-17.

144. Munro, H. J. Genetic diversity of *Borrelia garinii* from *Ixodes uriae* collected in seabird colonies of the northwestern Atlantic Ocean / H. J. Munro, N.H. Ogden, S. Mechai [et al.]. // Ticks Tick Borne Disease. – 2019. – V. 10, № 6. – P. 101255.

145. Nakao, M. Reservoir competence of the wood mouse, *Apodemus* speciosus ainu, for the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Hokkaido, Japan / M. Nakao, K. Miyamoto. // Medical Entomology and Zoology. – 1993. – V. 44, № 2. – P. 69–84.

146. Nefedova, V. V. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus* / V. V. Nefedova, E. I. Korenberg, N. B. Gorelova, Y. V. Kovalevskii. // Folia parasitologica. – 2004. – V. 51. – P. 67–71.

147. Norris, D. E. Culturing selects for specific genotypes of *Borrelia burgdorferi* in an enzootic cycle in Colorado / D. E. Norris, B. J. Johnson, J. Piesman [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 1997. – V. 35, № 9. – P. 2359–2364.

148. Norris, D. E. Population genetics and phylogenetic analysis of Colorado *Borrelia burgdorferi* / D. E. Norris, B. J. Johnson, J. Piesman [et al.]. // The American journal of tropical medicine and hygiene. – 1999. – V. 60, № 4. – P. 699–707.

149. Nowalk, A. J. Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins / A. J. Nowalk, R. D. Gilmore, J. A. Carroll. // Infection and immunity. – 2006. – V. 74, № 7. – P. 3864–3873.

150. Ntchobo, H. Recognition of multiple antibody epitopes throughout *Borrelia burgdorferi p66*, a candidate adhesin, in patients with early or late manifestations of Lyme disease / H. Ntchobo, H. Rothermel, W. Chege [et al.]. // Infection and immunity. – 2001. – V. 69, № 3. – P. 1953–1956.

151. Ornstein, K. Differential immune response to the variable surface loop antigen of P66 of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in geographically diverse populations of Lyme borreliosis patients / K. Ornstein, Y. Ostberg, J. Bunikis [et al.]. // Clinical and diagnostic laboratory immunology. – 2002. – V. 9, № 6. – P. 1382–1384.

152. Ostfeld, R. S. Life history and demographic drivers of reservoir competence for three tick-borne zoonotic pathogens / R. S. Ostfeld, T. Levi, A. E. Jolles [et al.]. // PloS one. – 2014. – V. 9, № 9. – e107387.

153. Postic, D. Two genomic species in *Borrelia burgdorferi* / D. Postic, C. Edlinger, C. Richaud [et al.]. // Research in microbiology. – 1990. – V. 141, № 4. – P. 465–475.

154. Postic, D. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)–*rrl* (23S) intergenic spacer

amplicons / D. Postic, M. V. Assous, P. A. Grimont, G. Baranton. // International journal of systematic bacteriology. – 1994. – V. 44, № 4. – P. 743–752.

155. Postic, D. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates / D. Postic, E. Korenberg, N. Gorelova [et al.]. // Research in microbiology. – 1997. – V. 148, № 8. – P. 691–702.

156. Priem, S. An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis / S. Priem, M. G. Rittig, T. Kamradt [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 1997. – V. 35, № 3. – P. 685–690.

157. Probert, W. S. Identification and characterization of a surface-exposed, 66-kilodalton protein from Borrelia burgdorferi / W. S. Probert, K. M. Allsup, R. B. LeFebvre. // Infection and immunity. – 1995. – V. 63, № 5. – P. 1933–1939.

158. Pukhovskaya, N. M. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in ixodid ticks in the Far East of Russia / Pukhovskaya, N. M., Morozova, O. V., Vysochina, N. P. [et al.]. // International journal for parasitology. Parasites and wildlife. – 2019. – № 8. – P. 192–202.

159. Qiu, W. G. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States / W. G. Qiu, D. E. Dykhuizen, M. S. Acosta, B. J. Luft. // Genetics. – 2002. – V. 160, № 3. – P. 833–849.

160. Radolf, J. D. Lyme disease and relapsing fever spirochetes: genomics, molecular biology, host interactions and disease pathogenesis / J. D. Radolf, D. S. Samuels. – Caister Academic Press: Poole, UK, 2021. – 760 p. – ISBN 978-1-913652-62-3.

161. Rar, V. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia / V. Rar, N. Livanova, S. Tkachev [et al.]. // Parasites & vectors. – 2017. – V. 10, № 1. – P. 258.

162. Rar, V. *Ixodes persulcatus*/*pavlovskyi* natural hybrids in Siberia: Occurrence in sympatric areas and infection by a wide range of tick-transmitted agents /

V. Rar, N. Livanova, Y. Sabitova [et al.]. // Ticks and tick-borne diseases. – 2019. – V. 10, № 6. – P. 101254.

163. Rar, V. The First Study of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Persistence in Small Mammals Captured in the *Ixodes persulcatus* Distribution Area in Western Siberia / V. Rar, V. Yakimenko, Y. Igolkina [et al.]. // Pathogens. – 2025. – V. 14, № 12. – P. 1200.

164. Richter, D. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. / D. Richter, D. Postic, N. Sertour [et al.]. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2006. – V. 56, № Pt.4. – P. 873–81.

165. Ristow, L. C. The β_3-integrin ligand of *Borrelia burgdorferi* is critical for infection of mice but not ticks / L. C. Ristow, H. E. Miller, L. J. Padmore [et al.]. // Molecular microbiology. – 2012. – V. 85, № 6. – P. 1105–1118.

166. Ristow, L. C. Integrin binding by *Borrelia burgdorferi* P66 facilitates dissemination but is not required for infectivity. / L. C. Ristow, M. Bonde, Y. Lin [et al.]. // Cellular microbiology. – 2015. – V. 17, № 7. – P. 1021–1036.

167. Rollend, L. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations / L. Rollend, D. Fish, J. E. Childs. // Ticks and tick-borne diseases. – 2013. – V. 4, № 1-2. – P. 46–51.

168. Rollins, R. E. Out of Asia? Expansion of Eurasian Lyme borreliosis causing genospecies display unique evolutionary trajectories / R. E. Rollins, K. Sato, M. Nakao [et al.]. // Molecular Ecology. – 2023. – V. 32, № 4. – P. 786–799.

169. Rosa, P. A. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete / P. A. Rosa, K. Tilly, P. E. Stewart. // Nature reviews. Microbiology. – 2005. – V. 3, № 2. – P. 129–143.

170. Rudenko, N. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. / N. Rudenko, M. Golovchenko, T. Lin [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 2009. – V. 47, № 12. – P. 3875–80.

171. Rudenko, N. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a novel species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex isolated from rodents and a tick from the south-eastern

USA / N. Rudenko, M. Golovchenko, L. Grubhoffer, J. H. Oliver. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2011. – V. 61, № Pt 2. – P. 381–383.

172. Sabitova, Y. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Western Siberia, Russia and Northern Mongolia / Y. Sabitova, N. Fomenko, A. Tikunov [et al.]. // Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. – 2018. – V. 62. – P. 160–169.

173. Sabitova, Y. Detection and genetic characterization of a putative novel *Borrelia* genospecies in *Ixodes apronophorus* / *Ixodes persulcatus* / *Ixodes trianguliceps* sympatric areas in Western Siberia / Y. Sabitova, V. Rar, A. Tikunov [et al.]. // Ticks and tick-borne diseases. – 2023. – V. 14, № 1. – P. 102075.

174. Samuels, D. S. *Borrelia*: molecular biology, host interaction and pathogenesis / D. S. Samuels, J. D. Radolf. – Caister Academic Press: Poole, UK, 2010. – 548 p. – ISBN: 978-1-904455-58-5.

175. Schlesinger, P. A. Maternal-fetal transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi* / P. A. Schlesinger, P. H. Duray, B. A. Burke [et al.]. // Annals of internal medicine. – 1985. – V. 103, № 1. – P. 67–68.

176. Scholz, H. C. High prevalence of genetically diverse *Borrelia bavariensis*-like strains in *Ixodes persulcatus* from Selenge Aimag, Mongolia / H. C. Scholz, G. Margos, H. Derschum [et al.]. // Ticks and tick-borne diseases. – 2013. – V. 4, № 1–2. – P. 89–92.

177. Schwan, T. G. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding / T. G. Schwan, J. Piesman, W. T. Golde [et al.]. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1995. – V. 92, № 7. – P. 2909–2913.

178. Shah, J. S. Development of a sensitive PCR-dot blot assay to supplement serological tests for diagnosing Lyme disease / J. S. Shah, I. D' Cruz, S. Ward [et al.]. // European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. – 2018. – V. 37, № 4. – P. 701–709.

179. Sinsky, R. J. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents / R. J. Sinsky, J. Piesman. // Journal of clinical microbiology. – 1989. – V. 27, № 8. – P. 1723–1727.

180. Sipari, S. The effects of *Borrelia* infection on its wintering rodent host / S. Sipari, J. Hytönen, A. Pietikäinen [et al.]. // Oecologia. – 2022. – V. 200, № 3–4. – P. 471–478.

181. Skare, J. T. The Oms66 (p66) protein is a *Borrelia burgdorferi* porin / J. T. Skare, T. A. Mirzabekov, E. S. Shang [et al.]. // Infection and immunity. – 1997. – V. 65, № 9. – P. 3654–3661.

182. Skuballa, J. European Hedgehogs as Hosts for *Borrelia* spp., Germany / J. Skuballa, R. Oehme, K. Hartelt [et al.]. // Emerging infectious diseases. – 2007. – V. 13, № 6. – P. 952–953.

183. Skuballa, J. Occurrence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies including *B. afzelii, B. bavariensis*, and *B. spielmanii* in hedgehogs (Erinaceus spp.) in Europe / J. Skuballa, T. Petney, M. Pfäffle [et al.]. // Ticks and tick-borne diseases. – 2012. – V. 3, № 1. – P. 8–13.

184. Smith, L. G. Lyme disease: a review with emphasis on the pregnant woman / L. G. Smith, M. Pearlman, L. G. Smith, S. Faro. // Obstetrical & gynecological survey. – 1991. – V. 46, № 3. – P. 125–130.

185. Stanek, G. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals / G. Stanek, I. Burger, A. Hirschl [et al.]. // Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology. – 1986. – V. 263, № 1–2. – P. 29–33.

186. Stanek, G. Lyme borreliosis / G. Stanek, G. P. Wormser, J. Gray, F. Strle // Lancet (London, England). – 2012. – V. 379, № 9814. – P. 461–473.

187. Stanek, G. Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment / G. Stanek, F. Strle. // FEMS microbiology reviews. – 2018. – V. 42, № 3. – P. 233–258.

188. Süss, J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview / J. Süss. // Ticks and tick-borne diseases. – 2011. – V. 2, № 1. – P. 2–15.

189. Takano, A. Multilocus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human-pathogenic *Borrelia garinii* in Japan / A. Takano, M. Nakao, T. Masuzawa [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 2011. – V. 49, № 5. – P. 2035–2039.

190. Tal, M. C. P66 is a bacterial mimic of CD47 that binds the anti-phagocytic receptor SIRPα and facilitates macrophage evasion by *Borrelia burgdorferi*. Preprint. / M.C. Tal, P. S. Hansen, H. A. Ogasawara [et al.]. // bioRxiv: the preprint server for biology. – 2024. – 591704. Published 2024 Apr 30.

191. Talleklint, L. Transmission of *Borrelia burgdorferi* s. l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme Borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden / L. Talleklint, T. G. Jaenson. // Journal of Medical Entomology. – 1994. – V. 31, № 6. – P. 880–886.

192. Tan, X. Choreography of Lyme disease spirochete adhesins to promote vascular escape / X. Tan, M. Castellanos, G. Chaconas. // Microbiology Spectrum – 2023. – V. 11, № 4. – e0125423.

193. Taragel'ová, V. Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of Borrelia garinii, the causative agent of borreliosis in Central Europe / V. Taragel'ová, J. Koci, K. Hanincová [et al.]. // Applied and environmental microbiology. – 2008. – V. 74, № 4. – P. 1289–1293.

194. Terriere, N. Zoonotic pathogens linked with hedgehog diphtheric disease / N. Terriere, E. Glazemaekers, S. Bregman [et al.]. // Transboundary and emerging diseases. – 2022. – V. 69, № 6. – P. 3618–3623.

195. Tijsse-Klasen, E. Ability to cause erythema migrans differs between *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates / E. Tijsse-Klasen, N. Pandak, P. Hengeveld [et al.]. // Parasites & vectors. – 2013. – № 6. – P. 23.

196. Veinović, G. Isolation and cultivation of Borrelia lusitaniae from the blood of a patient with multiple erythema migrans. / G. Veinović, J. Malinić, R. Sukara [et al.]. // Journal of infection in developing countries. – 2025. – V. 19, № 4. – P. 630–635.

197. Voordouw, M. J. The Lyme disease pathogen has no effect on the survival of its rodent reservoir host / M. J. Voordouw, S. Lachish, M. C. Dolan. // PLoS ONE. – 2015. – V. 10, № 2. – e0118265.

198. Wang, G. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications / G. Wang, A. P. van Dam, I. Schwartz, J. Dankert. // Clinical microbiology reviews. – 1999. – V. 12, № 4. – P. 633–653.

199. Wang, G. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* / G. Wang, L. Dionysios, P. Mukherjee [et al.]. // Current Protocols in Microbiology. – 2014. – V. 34, № 1. – P.12C.5.1–12C.5.31.

200. Welte, W. Structure and function of the porin channel / W. Welte, U. Nestel, T. Wacker, K. Diederichs. // Kidney international. – 1995. – V. 48, № 4. – P. 930–940.

201. Wilske, B. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis / B. Wilske, V. Preac-Mursic, U. B. Göbel [et al.]. // Journal of clinical microbiology. – 1993. – V. 31, № 2. – P. 340–350.

202. Wilske, B. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany / B. Wilske, U. Busch, H. Eiffert, [et al.]. // Medical microbiology and immunology. – 1996. – V. 184, № 4. – P. 195–201.

203. Wilske, B. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development / B. Wilske, U. Busch, V. Fingerle [et al.]. // Infection. – 1996a. – V. 24, № 2. – P. 208–212.

204. Yang, X. Characterization of multiprotein complexes of the *Borrelia* burgdorferi outer membrane vesicles / X. Yang, K. Promnares, J. Qin [et al.]. // Journal of proteome research. – 2011. – V. 10, № 10. – P. 4556–4566.

205. Zhou X. Establishment of multiple locus variable-number tandem repeat analysis assay for genotyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato detected in China. / X. Zhou, X. Hou, Z. Geng [et al.]. // Biomedical and environmental sciences : BES. – 2014. – V. 27, № 9. – P. 665–675.

206. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г. N 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» (с изменениями и дополнениями) // КонсультантПлюс, 1977. – 10 с.

207. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2025 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2026. – 407 с.

Приложение А

(обязательное)

Регистрационные номера депонированных и использованных в работе нуклеотидных последовательностей участков различных генов боррелий

Таблица 1 – Регистрационные номера нуклеотидных последовательностей участков 15 генов и межгенного спейсера *rrfA–rrlB* боррелий, депонированных в международную базу данных GenBank NCBI

Гены	Количество изолятов	Регистрационные номера нуклеотидных последовательностей в международной базе данных GenBank NCBI
rrs	6	MZ423869–MZ423871; MW981426; MT713138; MT713144
hbb	7	MZ005315–MZ005317; MZ427325–MZ427326; MT713139; MT713145
groEL	5	MZ427327–MZ427328; MT713140; MT713143; MT713146
recA	28	OU214356–OU214357; LR862289–LR862290; OD916881–OD916884; OR340843–OR340862
fla	7	MZ005319–MZ005321; MZ427329–MZ427330; MT713141; MT713147
ospA	27	OM310938–OM310939; MZ427331–MZ427333; MT713142; MT713148; MH935767–MH935768; OR257423–OR257440
rrfA-rrlB	5	OU214075–OU214076; LR828307–LR828308; LR861813
clpA	5	MZ401044–MZ401048
clpX	5	MZ401049–MZ401053
nifS	5	MZ401054–MZ401058
pepX	5	MZ401059–MZ401063
pyrG	5	MZ401064–MZ401068
recG	5	MZ401069–MZ401073
rplB	5	MZ401074–MZ401078
uvrA	5	MZ401079–MZ401083
p66	52	OP561855–OP561858; OR183688–OR183707; OR620166–OR620180; PP940149–PP940161

Приложение Б

(обязательное)

Свидетельство о государственной регистрации электронной базы данных музея

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

RU2020621769

ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ

Номер регистрации (свидетельства): **2020621769** Дата регистрации: **30.09.2020** Номер и дата поступления заявки: **2020621155 17.07.2020** Дата публикации и номер бюллетеня: **30.09.2020 Бюл. № 10** Контактные реквизиты: **Нет**	Автор(ы): **Коренберг Эдуард Исаевич (RU),** **Горелова Наталия Борисовна (RU),** **Ершов Иван Феликсович (RU),** **Голидонова Кристина Андреевна (RU)** Правообладатель(и): **федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)**

Название базы данных:
Электронная база данных музея изолятов спирохет рода Borrelia

Реферат:
База данных предназначена для быстрого поиска по унифицированным заданным паспортным данным, необходимым для цели конкретного микробиологического исследования и научного анализа около 1250 уже накопленных первичных и типовых изолятов этих микроорганизмов, принадлежащих к их различным видам (геногруппам), которые получены на протяжении ряда лет в основном сотрудниками лаборатории переносчиков инфекций от резервуарных хозяев и переносчиков во многих регионах Евразии. В дальнейшем в базе данных будут стандартизовано заноситься сведения о вновь поступающих изолятах для депонирования и хранения в музее. База данных дает возможность учитывать наличие изолятов боррелий разных видов, следить за их «движением» и использованием аликвот, закладке этих материалов на хранение или (и) изъятии из него. По каждому изоляту в базу данных вносится полная характеристика, полученная при его дальнейших исследованиях разными методами. Информация, хранящаяся в базе данных, необходима для дальнейших научных исследований биоразнообразия микроорганизмов рода Borrelia, их таксономии, распространения, особенностей биологии, внутривидовой гетерогенности и степени патогенности для человека.

Вид и версия системы управления базой данных:	MySQL
Объем базы данных:	80 МБ

Приложение В

(справочное)

Протокол оптимизированного метода МЛСА

Идентификация боррелий оптимизированным методом мультилокусного сиквенс-анализа (МЛСА) включает в себя этапы:

1. Экстракция (выделение) ДНК из образцов клинического материала коммерческими наборами.
2. Амплификация фрагментов генов *recA* и *ospA* в обычном (классическом) амплификаторе.
3. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле.
4. Очистка коммерческими наборами полученных положительных образцов путем вырезания полос из геля.
5. Секвенирование полученных ПЦР-продуктов (на базе коллективных центров).
6. Анализ результатов с помощью программ Sequence Scanner v1.0 или Chromas, MEGA11 или UGENE, а также сервиса BLAST NCBI.

Необходимое оборудование и расходные материалы:

1. Бокс микробиологической безопасности II класса (БМБ)
2. ПЦР-бокс
3. Микроцентрифуга
4. Центрифуга-вортекс
5. Термостат
6. Аспиратор с сосудом-ловушкой
7. Аналитические весы
8. Амплификатор
9. Камера для горизонтального электрофореза с гелевой рамкой, гребенками, заливочным столиком и источником питания

10. Трансиллюминатор
11. Видеосистема гель-документирования
12. Компьютер
13. Дозаторы различных объемов
14. Наконечники для различных объемов
15. Пробирки/стрипы/плашки для всех этапов работы
16. Щипцы
17. Скальпель
18. pH-метр или индикаторная лакмусовая бумага
19. Флуориметр Qubit или спектрофотометр NanoDrop

Необходимые реактивы:

1. Коммерческий набор для выделения ДНК из образцов клинического материала
2. Этанол 70%
3. Этанол 96%
4. Деионизированная вода (mQ)
5. ПЦР-буфер с магнием
6. Taq-полимераза
7. Дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ)
8. Специфичные праймеры
9. Агароза
10. Трис(гидроксиметил)аминометан
11. Борная кислота
12. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)
13. Гидроксид натрия
14. Дистиллированная вода
15. Этидиум бромид
16. Маркер длин
17. Краска для нанесения в гель

18. Коммерческий набор для очистки ДНК из геля
19. Дезинфицирующее средство
20. Средство для ДНК-деконтаминации

Поэтапное исследование

1. Экстракция (выделение) ДНК из образцов клинического материала проводится в БМБ II класса. Для этого этапа необходимы различные коммерческие наборы для выделения ДНК. Выделенная ДНК хранится в морозильнике на –20°С в течение 6 месяцев.

2. Амплификация фрагментов генов *recA* и *ospA* в обычном (классическом) амплификаторе.

Таблица 1 – Названия и последовательности праймеров

Наименование праймеров	**Последовательности праймеров**
recA, прямой	GTGGATCTATTGTATTAGATGAAGCTCTTG
recA, обратный	GCCAAAGTTCTGAAACATTAACTCCCAAAG
ospA, прямой	AATAGGTCTAATATTAGCCTTAATAGC
ospA, обратный	TTGATACTAATGTTTTGCCATCTTCTT

Амплификацию проводят в реакционной смеси на 50 мкл с добавлением ДНК в количестве 3-5 мкл. Дополнительно к исследованию добавляют положительный (ДНК боррелий) и отрицательный контроль (mQ).

Таблица 2 – Состав смеси для проведения ПЦР

Наименование реагентов	**Концентрация регентов на 1 пробу**
Праймеры прямой и обратный	0,2 мкМ каждого
ПЦР-буфер с магнием	1× кратный
дНТФ	200 мкМ каждого
Taq-полимераза	1,25 единиц
mQ	В остатке

Условия для проведения ПЦР:

1) Предварительная денатурация 93°С – 1 мин

2) 35 циклов
   - 93°С – 1 мин
   - 59°С – 1 мин
   - 72°С – 1 мин

3) Финальная элогнация 72°С – 5 мин

4) Хранение 4°С.

3. Электрофоретическую детекцию продуктов амплификации проводят в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере (TBE) 1,5 % агарозу с добавлением специального красителя ДНК – бромистого этидия. Полученные ПЦР-продукты и контроли вместе с красителем вносят в лунки геля; дополнительно в отдельную лунку вносят маркер длин для проверки размера продукта (для *recA* – 156 п.н., для *ospA* – 261 п.н.).

После окончания электрофореза, продолжающегося от 30 минут до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254–310 нм). Результаты регистрируют в протоколах и в компьютере с помощью видеосистемы гель-документирования.

4. Очистка коммерческими наборами полученных положительных образцов путем вырезания полос из геля. Для этого этапа необходимы различные коммерческие наборы для очистки ДНК из агарозного геля. Проводят проверку наличия продукта и концентрации путем проведения гель-электрофореза или измерением образца в приборе типа флуориметра Qubit или спектрофотометра NanoDrop. Очищенная ДНК хранится в морозильнике на –20°С в течение 6 месяцев.

5. Секвенирование полученных очищенных ПЦР-продуктов можно провести на базе коллективных центров, или, если имеется, в собственной лаборатории согласно протоколам к имеющемуся секвенатору.

6. Полученные результаты нуклеотидных последовательностей анализируют с помощью программ Sequence Scanner v1.0 или Chromas, MEGA11 или UGENE, а также сервиса BLAST NCBI.

Первичные файлы ABI просматриваются в первых двух программах, представленных выше, и переводятся в FASTA файлы. Анализируются пики, отсекается плохо читаемые нуклеотидные последовательности. Далее полученные нуклеотидные последовательности сравнивают с различными видами боррелий с помощью сервиса BLAST NCBI. Одновременно сцепленные нуклеотидные последовательности генов *recA* и *ospA* используют для построения выравнивания, а затем дендрограммы в программе MEGA11 или UGENE. Важно держать заготовку файлов MAS (выравнивание) и MTSX (дендрограмма), содержащих основные (контрольные) аутгруппы боррелий.

По результатам анализа сходства нуклеотидных последовательностей образцов с контрольными аутгруппами с помощью сервиса BLAST NCBI, а также построения дендрограмм на основе этих данных можно точно идентифицировать вид боррелий.

Ссылки:

1. Richter, D. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. / D. Richter, D. Postic, N. Sertour [et al.]. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2006. – V. 56, № Pt.4. – P. 873–81.

2. Голидонова, К. А. Оптимизация мультилокусного сиквенс-анализа для лабораторной идентификации возбудителей иксодового клещевого боррелиоза / К. А. Голидонова, Э. И. Коренберг, А. Л. Гинцбург. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99, № 5. – С. 514–524.

Приложение Г

(справочное)

Дендрограмма аминокислотных последовательностей белка P66 (93 а.о.) 238 исследованных изолятов.

Обозначения в подписи к Рисунку 33 (раздел 3.6).

