

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-134-141

УДК 579.834.114:579.25

Н.И. Хаммадов¹, А.И. Хамидуллина²

ПОДБОР ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПАТОГЕННЫХ БОРРЕЛИЙ

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Российская Федерация;²ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», Казань, Российская Федерация

Цель исследования – анализ генетических маркеров возбудителей болезни Лайма, которые можно использовать для специфичной индикации их максимально большего числа штаммов и изолятов. **Материалы и методы.** Нуклеотидные последовательности различных генов *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* загружены из базы данных NCBI (Национального центра биологической информатизации). Определение встречаемости анализируемых нуклеотидных последовательностей в генетическом коде различных организмов определяли в программной утилите nBLAST. Для дизайна праймеров и зондов использовали программу Vector NTI 9.1.0 (Invitrogen Corporation, Карлсбад, США). ДНК выделяли, используя набор реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200 («АмплиСенс», Москва, Россия), согласно инструкции производителя. Праймеры и зонды синтезировали в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия). Для проведения ПЦР использовались реактивы производства ЗАО «Синтол» (Москва, Россия). **Результаты и обсуждение.** Для достоверной индикации патогенных боррелий методами молекулярно-генетического анализа определены специфичные локусы (гены) различных видов возбудителей: *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, – которые отличались от генетических кодов других представителей рода *Borrelia* и от ДНК иных организмов. В результате предварительного определения аналитической значимости исследуемых локусов для дальнейшей работы выбраны следующие гены и локусы: *pepX*, *clpA*, *ospA*, *p83/100*, *ospC* и *flaB*, – из которых для практической индикации ДНК патогенных боррелий выбраны гены *flaB* и *ospA*. Индикация генетических маркеров *B. burgdorferi* и *B. afzelii* происходит при амплификации гена *flaB*, а *B. garinii* и *B. afzelii* – при использовании в качестве генетического маркера гена *ospA*.

Ключевые слова: боррелии, специфичность, полиморфизм генов, ПЦР.

Корреспондирующий автор: Хаммадов Наиль Ильдарович, e-mail: nikhammadov@mail.ru.

Для цитирования: Хаммадов Н.И., Хамидуллина А.И. Подбор генетических маркеров для выявления ДНК патогенных боррелий. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 2:134–141. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-134-141

N.I. Khammadoov¹, A.I. Khamidullina²

Genetic Markers for Detecting the DNA of Pathogenic Borrelia

¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation;²Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to analyze the genetic markers of Lyme disease pathogens, which can be used to specifically indicate maximum number of their strains and isolates. **Materials and methods.** The nucleotide sequences of various genes of *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* were downloaded from the NCBI database (National Center for Biological Informatization). The occurrence of the analyzed nucleotide sequences in the genetic code of various organisms was determined in the nBLAST software utility. For the design of primers and probes, the Vector NTI 9.1.0 program (“Invitrogen Corporation”, Carlsbad, USA) was used. DNA was isolated using the MAGNO-sorb kit, version 100-200 (“AmpliSens”, Moscow, Russia), according to the manufacturer’s instructions. Primers and probes were synthesized at “Evrogen” company (Moscow, Russia). For PCR, reagents manufactured by “Synthol” company (Moscow, Russia) were applied. **Results and discussion.** In order to perform the reliable indication of pathogenic *Borrelia*, specific loci (genes) of *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, which were significantly different from the genetic code of other representatives of the genus *Borrelia* and from the DNA of other organisms, have been determined by molecular-genetic methods. As a result of a preliminary determination of the analytical significance of the studied loci, the following genes and loci were selected for further work: *pepX*, *clpA*, *ospA*, *p83/100*, *ospC* and *flaB*, of which the *flaB* and *ospA* genes were selected for practical indication of pathogenic *Borrelia* DNA. The genetic markers of *B. burgdorferi* and *B. afzelii* are displayed during amplification of the *flaB* gene, while *B. garinii* and *B. afzelii* occur when the *ospA* gene is used as a genetic marker.

Key words: Borrelia, specificity, gene polymorphism, PCR.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nail I. Khammadoov, e-mail: nikhammadov@mail.ru.

Citation: Khammadoov N.I., Khamidullina A.I. Genetic Markers for Detecting the DNA of Pathogenic Borrelia. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 2:134–141. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-134-141

Received 06.02.2020. Revised 13.11.2020. Accepted 19.05.2022.

Khammadoov N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5669-1486>

Khamidullina A.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5593-2399>

Возбудитель боррелиоза – бактерия класса *Spirochaetia*, отряда *Spirochaetales*, семейства *Borreliaceae*, рода *Borrelia*, данный род насчитывает более

30 видов, из которых патогенными видами считаются *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* [1], маркерные локусы которых будут описаны в данной работе.

В России обращения людей с жалобами на укусы клещей не редки. В 2020 г. было зарегистрировано 989 случаев заболевания клещевым энцефалитом (0,67 случая на 100 тыс. населения) [2]. Показатель заболеваемости клещевыми боррелиозами в тот же период составил 2,85 случая на 100 тыс. населения [3]. Оба заболевания зарегистрированы почти во всех федеральных округах страны и за ее пределами.

Схожая симптоматика протекания клещевого энцефалита и боррелиоза, а также кардинальные различия в их лечении и профилактике подчеркивают необходимость своевременной дифференциации анализируемых биопатогенов друг от друга. Для точной и быстрой индикации указанных выше патогенов хорошо подходят молекулярно-генетические методы (например, ПЦР). Маркерные локусы, наиболее подходящие для индикации вируса клещевого энцефалита, были описаны ранее [4]. Аналогичная работа относительно генетических маркеров патогенных боррелий представлена в данной публикации.

Цель исследования – анализ генетических маркеров возбудителей болезни Лайма, которые можно использовать для специфичной индикации их максимально большого числа штаммов и изолятов.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности различных генов *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* загружены из базы данных NCBI (Национального центра биологической информации) [5]. Определение встречаемости анализируемых нуклеотидных последовательностей в генетическом коде различных организмов определяли в программной утилите nBLAST [6]. Для дизайна праймеров и зондов использовали программу Vector NTI 9.1.0 (Invitrogen Corporation, Карлсбад, США).

В качестве исследуемого материала использовали плазмидную ДНК со вставкой маркерных локусов *clpA*, *ospA* и *flaB* (синтезирована в ЗАО «Евроген», Москва, Россия) и образцы нуклеиновых кислот, полученные от клещей родов *Ixodes* (24 особи) и *Dermacentor* (11 особей). Клещи собраны в черте города Казани и пригородной лесополосе (Волжско-Камский заповедник), каждый экземпляр исследован индивидуально. Плазмидная ДНК являлась маркером, определяющим специфичность как нуклеотидную последовательность для амплификации, а нуклеиновые кислоты клещей обоих видов – как внутренний контроль (подтверждение результативности выделения ДНК). Для амплификации ДНК применяли термоциклер C1000 с оптическим блоком CFX96 (BioRad, Интернациональный бизнес-парк, Сингапур). Выделение ДНК производили, используя набор «МАГНО-сорб» вариант 100-200 («АмплиСенс», Москва, Россия), согласно инструкции производителя. При работе с образцами клещей их предварительно измельчали на гомогенизаторе FastPrep-24 (MP Biomedicals, Гленвиллоу, США)

с применением Lysing Matrix A (MP Biomedicals, Гленвиллоу, США).

Для реакции амплификации использовали следующую состав реакционной смеси из расчета на одну пробу: 1,5 мкл 25 mM раствора $MgCl_2$; 1,5 мкл 2,5 mM раствора dNTP; 1,5 мкл 10x буфера для ПЦР; 0,5 мкл 10 pM раствора зонда для ПЦР; 10 pM раствора прямого и обратного праймеров по 0,5 мкл; 0,5 мкл Taq-полимеразы; 5 мкл нуклеиновых кислот и 3,5 мкл – деионизированной воды. При совместной амплификации плазмидной ДНК и ДНК клещей применяли следующую пропорцию: 5 мкл плазмидной ДНК и 3,5 мкл ДНК клещей (в данном случае в составе реакционной смеси деионизированная вода не применяется). Праймеры и зонды синтезировали в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия). Для ПЦР использовались реактивы производства ЗАО «Синтол» (Москва, Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 15 мкл. Амплификация нуклеиновых кислот осуществлялась по следующей программе: (I) денатурация ДНК при температуре 95 °C в течение 2 минут; (II) 5 циклов, состоящих из 10 секунд – при 95 °C, 30 секунд – при 59 °C; (III) 40 циклов, состоящих из: 10 секунд – при 95 °C, 30 секунд – при 57,5 °C. Детекция результата ПЦР происходит на каждом из 40 циклов третьей стадии ПЦР, при 57,5 °C по каналам Hex (R6G) и Cy5.

Результаты и обсуждение

Для достоверной индикации патогенных боррелий методами молекулярно-генетического анализа необходимо определить специфичные локусы (гены) *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, которые будут достоверно отличаться от генетического кода других представителей рода *Borrelia* и ДНК иных организмов. В среднем геном боррелий составляет 1219280 пар нуклеотидных оснований. Для анализа выбраны нуклеотидные последовательности *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, которые широко представлены в базе данных NCBI, что позволило провести их детальный анализ для подбора наиболее специфичного (амплификация нуклеиновых кислот патогенных боррелий) локуса. Наиболее интересующими нас в данном исследовании (имеющиеся у всех указанных выше видов боррелий) были следующие гены и локусы (GenBank ID): *omp66* (MN007126); плаزمида *cp32* (NZ_CP018293); *clpX* (MH747562.1); *clpA* (MH747556); *recG* (MH747536); *ospA* (MF279825); *p83/100* (MG010848); *rplB* (MF398161); *groEL* (KY828977); штамм B023 плазмиды (CP018279); плазмиды *cp26* (CP018266); *P66* (AY090473); *ospC* (HQ660512); *bmpC* и *bmpA* (AF222439); *bmpD* и *bmpC* (AF222435); *cspA* (GQ344485); *rpoB* (AF525483); *ospE* (AF029910); *L7/L12* (AY737707); *bmpA* (KM267258); *uvrA* (JX971419); *nifS* (JX971299); *rpoD* (U68016); *vlsE* (AY100632); *5S-23S ribosomal RNA* (JX649207); плазмиды *lp54* (AJ786368); *16S ribosomal RNA* (EU152127); *dbpA* (AB253535); *bbk32* (AB253531);

p17 (AJ131976); *recA* (AF465241); *flaB* (KT347453); *flagellin* (JF732876); *pyrG* (MG013953) [7–21].

Всего потенциальных генетических маркеров для специфичной амплификации нуклеиновых кислот патогенных боррелий – 34, относительно всех нуклеотидных последовательностей выполнен анализ с использованием алгоритма BLAST [6], результаты анализа отражены в табл. 1.

У указанных микроорганизмов гомология к анализируемым генам не ниже 89 %.

Все анализируемые гены (табл. 1) – специфичные для рода *Borrelia*.

В результате определения аналитической значимости исследуемых локусов (BLAST-анализ) для дальнейшей работы выбраны следующие гены: *pepX*, *clpA*, *ospA*, *p83/100*, *ospC*, *flaB* и *flagellin*. В табл. 2

указаны виды боррелий, обладающие идентичными анализируемым генам нуклеотидными последовательностями.

Цифровые обозначения в табл. 2 указывают на количество выявляемых изолятов соответствующего организма при поисковом запросе по каждому из анализируемых маркерных локусов.

При анализе представленных маркерных локусов установлено, что гены *ospA* и *flaB* характеризуются большим количеством выявляемых изолятов *B. afzelii*, *B. garinii* и *B. burgdorferi* и минимальным содержанием гетерогенных организмов со схожим нуклеотидным составом генома (гомология ниже 95 %). Комбинация вышеуказанных маркерных локусов позволяет исключить выявление гетерогенных организмов и повысить эффективность

Таблица 1 / Table 1

Встречаемость анализируемых генов у микроорганизмов рода *Borrelia*
The occurrence of analyzed genes in microorganisms of the genus *Borrelia*

Организм Organism	Маркерный локус / Marker locus																																	
	<i>omp66</i>	<i>pepX</i>	<i>clpX</i>	<i>clpA</i>	<i>recG</i>	<i>ospA</i>	<i>p83/100</i>	<i>rplB</i>	<i>groEL</i>	<i>pB023</i>	<i>cp26</i>	<i>P66</i>	<i>ospC</i>	<i>bmpC/A</i>	<i>bmpD/C</i>	<i>cspA</i>	<i>rpoB</i>	<i>ospE</i>	<i>L7/L12</i>	<i>bmpA</i>	<i>tnrA</i>	<i>nifS</i>	<i>rpoD</i>	<i>vlsE</i>	<i>5S-23S</i>	<i>lp54</i>	<i>l6S</i>	<i>dbpA</i>	<i>bbl32</i>	<i>p17</i>	<i>recA</i>	<i>flaB</i>	<i>flagellin</i>	<i>pyrG</i>
<i>B. afzelii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. garinii</i>	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+		+		+	+		+	+	+	+	+
<i>B. burgdorferi</i>	+			+	+	+	+	+	+		+	+	+				+		+	+	+	+			+		+				+	+	+	+
<i>B. spielmanii</i>			+	+	+			+	+											+	+					+	+		+		+		+	+
<i>Borrelia bavarientis</i>	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+		+	+		+		+	+	+	+	+				+				+		+	+
<i>B. japonica</i>			+	+	+			+	+								+				+	+	+				+						+	
<i>B. lanei</i>			+	+	+			+	+												+						+				+	+		+
<i>B. mayonii</i>	+	+	+	+	+		+	+	+		+			+			+		+	+	+	+	+				+				+	+	+	+
<i>B. yangtzensis</i>			+	+	+			+	+					+							+	+					+				+	+	+	+
<i>B. valaisiana</i>	+		+	+	+			+	+	+	+						+		+	+	+	+	+		+		+				+	+	+	+
<i>B. tanukii</i>									+																			+					+	+
<i>B. carolinensis</i>			+	+																							+						+	+
<i>B. maritima</i>	+		+		+			+	+		+			+			+		+	+	+	+	+				+					+	+	
<i>B. chilensis</i>	+		+		+			+	+								+		+	+	+	+	+				+				+	+		+
<i>B. finlandensis</i>		+									+																						+	+
<i>B. bissetti</i>		+	+	+	+			+	+		+			+			+		+	+	+	+	+				+				+	+	+	+
<i>B. lusitaniae</i>			+	+	+			+	+								+				+	+					+				+	+	+	+
<i>B. sinica</i>			+	+				+													+	+					+							+
<i>B. kurtenbachii</i>			+	+	+			+													+	+												+
<i>B. andersonii</i>				+	+			+	+					+			+			+	+						+			+		+	+	+
<i>B. americana</i>				+	+			+													+	+					+				+		+	+
<i>B. californiensis</i>					+			+	+												+	+					+			+		+		
<i>B. turdi</i>									+																		+				+		+	
<i>Borrelia</i> sp.																											+							

Таблица 2 / Table 2

Встречаемость анализируемых генов у боррелий разных видов

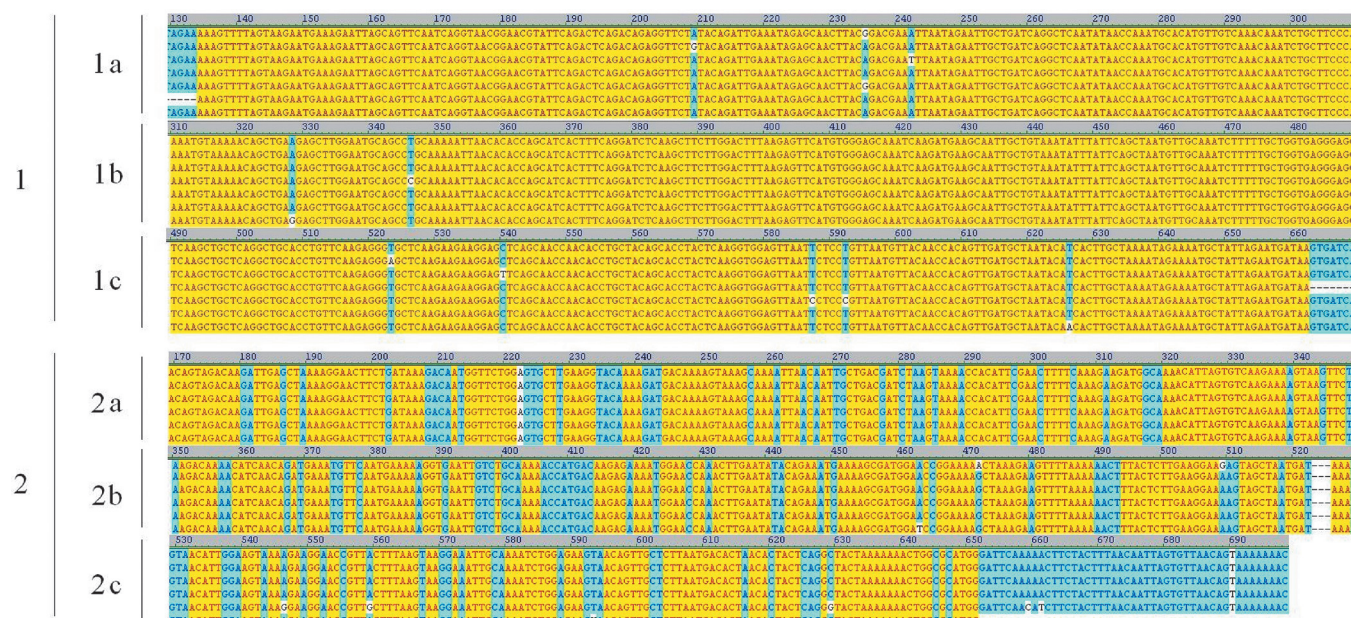
 Frequency of the analyzed genes in different species of *Borrelia*

Организм / Organism	Маркерный локус / Marker locus						
	<i>pepX</i>	<i>clpA</i>	<i>ospA</i>	<i>p83/100</i>	<i>ospC</i>	<i>flaB</i>	<i>flagellin</i>
<i>B. afzelii</i>	14	26	>100	39	66	>100	>100
<i>B. garinii</i>	64	>100	>100	—	65	—	—
<i>B. burgdorferi</i>	4	—	10	4	37	>100	>100
<i>B. spielmanii</i>	1	—	—	—	—	—	—
<i>B. bavariensis</i>	12	32	—	—	8	—	—
<i>B. japonica</i>	—	1	—	—	—	—	—
<i>B. lanei</i>	—	1	—	—	—	—	—
<i>B. mayonii</i>	—	—	—	2	—	—	—
<i>B. yangtzensis</i>	—	—	—	—	1	—	—
<i>B. valaisiana</i>	—	—	—	—	1	—	—
<i>B. tanukii</i>	—	—	—	—	2	—	—
<i>B. carolinensis</i>	—	—	—	—	1	—	—

индикации патогенных боррелий. Специфичное выявление генетических маркеров *B. burgdorferi* и *B. afzelii* у максимально большего количества их изолятов достигается благодаря анализу гена *flaB*. Амплификация гена *ospA* позволяет выявить ДНК *B. garinii* и *B. afzelii*. Мультилокусный подход для индикации и типирования патогенных боррелий описывается многими исследователями, при этом в качестве основного инструмента интерпретации полученных данных чаще всего используется анализ нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма BLAST [6] при секвенировании

искомых генов (чаще всего применяются гены *flaB*, *glpQ*, *OspA*, *16S pPHK* и межгенный участок *5S-23S pPHK*) [22–24].

Степень комплементарности различных изолятов выявляемых боррелий к общей нуклеотидной последовательности каждого гена отличается. С целью выявления наиболее консервативных участков внутри анализируемого локуса произведено взаимное сравнение ДНК изолятов с различной степенью гомологии по каждому из анализируемых маркерных локусов. Результат такого сравнения представлен на рис. 1.



Нуклеотидные основания, выделенные желтым цветом, характеризуются идентичностью во всех анализируемых последовательностях. Выделение белым цветом указывает на точечную замену анализируемого основания (совпадение менее 50 % по отношению к общему числу анализируемых случаев), синий цвет – совпадение более 50 % по отношению к общему числу анализируемых нуклеотидов.

В результате сравнения ДНК микроорганизмов, характеризующихся наличием анализируемых генов, удалось установить, что ген *flaB* обладает наименьшей вариабельностью последовательности нуклеотидов. В совокупности с наличием гена *flaB* лишь у бактерий вида *B. afzelii* и *B. burgdorferi* применение данного маркера целесообразно для выявления генетического материала патогенных боррелий. Анализ гена *ospA* (для выявления ДНК *B. garinii* и *B. afzelii*) также подразумевает наличие маловариабельных участков для дизайна комплементарных им олигонуклеотидных затравок.

Исходя из вариабельности генов *flaB* и *ospA*, выполнен дизайн праймеров и зондов для амплификации каждого из маркерных локусов, которые представлены в табл. 3.

Дизайн праймеров и зондов для ПЦР осуществлялся комплементарно локусам маркерных последовательностей ДНК, характеризующихся минимальной вариабельностью нуклеотидов искомым изолятов патогенных боррелий. Так, удалось достичь отсутствия полиморфизма в составе олигонуклеотидов во всех случаях, кроме праймеров для амплификации гена *ospA*. Все димеры и вторичные структуры не оказывают негативного влияния на процесс амплификации, так как характеризуются минимальной длиной.

Для контроля качества выделения нуклеиновых кислот применялись праймеры и зонды, описанные ранее [4], с обозначением *Ixodes* и *Dermacentor*. Данные затравки применяются в мультиплексном

формате (все олигонуклеотиды для контроля качества выделения нуклеиновых кислот применяются в одной пробирке).

Праймеры для индикации клещевого боррелиоза (Forward primer *flaB*, Reverse primer *flaB*, Forward primer *ospA*, Reverse primer *ospA*) имеют среднюю температуру плавления ($57,67 \pm 0,26$) °C, а олигонуклеотиды для контроля амплификации – ($56,35 \pm 0,29$) °C, что минимизирует влияние контрольной амплификации на прохождение специфичной ПЦР при температуре отжига 57,8 °C.

Для контроля ПЦР (специфичная часть положительного контрольного образца для этапа ПЦР) была создана следующая нуклеотидная последовательность (5'CAGGCTCAATATAACCAAATGCACATTGCTCCTTCTGGAGCGGGATCAAACAAATCTGCTTCCCAAATGTAAAAACAAATTGACGGATATTTTATCAGAAGAGCTTGGATTAAACACACCAGCATCACTTTCAGGACCTGTTTTAAGTAATGAAGGGTATTATGAATCATGAAAGTTCTTGTAAAGTAAAGAAAAGACAAAGACGGTAAATACAGCCAAACTTGAAGTAAAGGAACCTTCTGATAAAAGCAATGGTTCGAGGTGCTTGAAGGTACAAAAGCTGACAAAAGTAAAGCAAAGTTAACCATTTTC3'). Вставку маркерной последовательности в плазмиду pAL2-T заказали в ЗАО «Евроген». Результат ПЦР с плазмидной ДНК и ДНК клещей представлен на рис. 2.

Для определения предела обнаружения синтетической ДНК подготовили 10 десятикратных разведений плазмиды с начальной концентрацией 375 нг/мкл, что соответствует (для применяемой плазмиды) 99417428000 геном-эквивалентов на миллилитр (ГЭ/мл). Каждое из разведений амплифицировали в четырех повторях. Предельное работоспособное (все реакции ПЦР успешны) разбавление составило 10^{-9} , что соответствует одной молекуле ДНК в реакционной смеси (200 ГЭ/мл).

Интерпретация результатов амплификации осуществляется следующим образом. Визуализация

Таблица 3 / Table 3

Применяемые в работе для амплификации олигонуклеотиды
Oligonucleotides used in the work for amplification

Название праймера, зонда Name of primer, probe	Нуклеотидная последовательность Nucleotide sequence
Forward primer <i>flaB</i>	CAGGCTCAATATAACCAAATGCACAT
Reverse primer <i>flaB</i>	CCTGAAAGTGATGCTGGTGTGTTAAT
Probe <i>flaB</i>	(R6G)TCAAACAAATCTGCTTCCCAAATGTAAAAACA(BHQ1)
Forward primer <i>ospA</i>	TGTTAATTTTGCTTTACTTTTGTGAGCTTT
Reverse primer <i>ospA</i>	AAGTTCTTGTAAAGTAAAGAAAAAGACAAAGACG
Probe <i>ospA</i>	(R6G)AGAACCATTGTTTTATCAGAAGTTCCTTTAGCTCAA(BHQ1)
Forward primer <i>Ixodes</i>	CATATTGAATTTGAGGAGGATTTTCAGT
Reverse primer <i>Ixodes</i>	TGTGAAGTAAGGGTGGAAAGGGAT
Probe <i>Ixodes</i>	(Cy5)ACACTCACTCGATTTTTTTCTTTTACATTTTATTTTACCTTT(RTQ2)
Forward primer <i>Dermacentor</i>	GCTAAGAGAATGGAATTTTCAGGGAA
Reverse primer <i>Dermacentor</i>	AGATGCCCAACTAAGAATTCCTAAT
Probe <i>Dermacentor</i>	(Cy5)AAGAAACAATTATATAAATTAAGGACAAGAAGACCCTAAGAA(RTQ2)

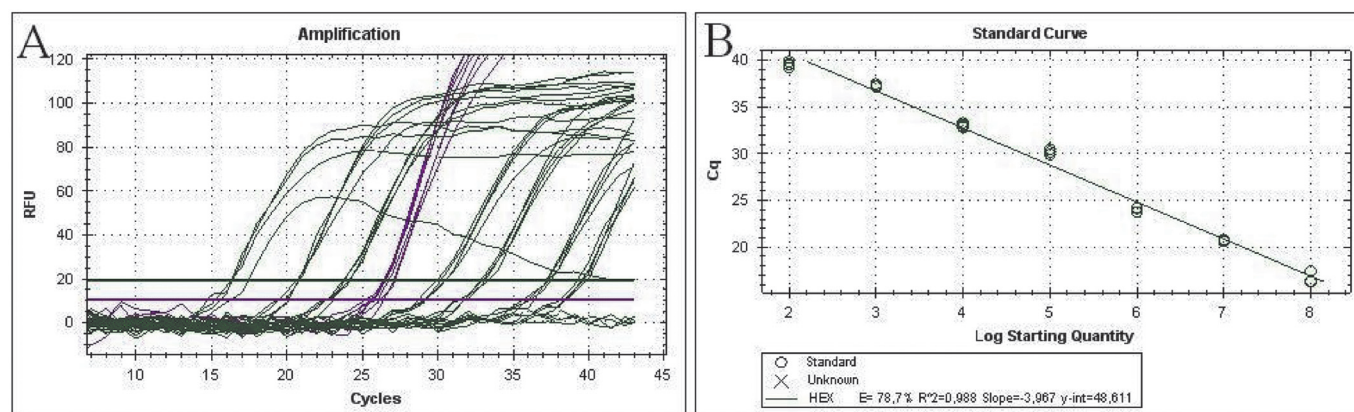


Рис. 2. Амплификация маркерных локусов для индикации патогенных боррелий (ген *flaB*):
 А – амплификация контрольной и клещевой ДНК; В – количественная калибровка плазмидного контроля

Fig. 2. Amplification of marker loci to indicate pathogenic *Borrelia* (*flaB* gene):
 А – amplification of control and tick DNA; В – quantitative calibration of plasmid control

ПЦР с олигонуклеотидными затравками для выявления клещевого боррелиоза происходит по каналу Нех (он же R6G), а внутреннего контроля – по каналу Cy5. Так, индикация *B. burgdorferi* и *B. afzelii* осуществляется с использованием гена *flaB*, амплификация генетического маркера *ospA* позволяет идентифицировать боррелии видов *B. garinii* и *B. afzelii*. Мультиплексный подход исследования ДНК боррелий позволяет выявлять максимальное количество изолятов и штаммов боррелий видов *B. garinii*, *B. burgdorferi* и *B. afzelii* (табл. 2).

При получении положительного результата ПЦР по каналу Нех результат амплификации по каналу Cy5 можно не учитывать. В случае отсутствия амплификации по каналу Нех и наличия сигнала флуоресценции (положительной ПЦР) по каналу Cy5 можно утверждать об отсутствии в анализируемом материале патогенных боррелий. Отрицательный результат амплификации по обоим каналам (подтверждение работоспособности общих компонентов реакционной смеси и применяемых специфичных олигонуклеотидов происходит при амплификации положительного контрольного образца) может свидетельствовать о потере ДНК в процессе выделения (или ингибировании реакции) либо о принадлежности исследуемого клеща к биологическому виду, который не амплифицируется с олигонуклеотидами внутреннего контроля амплификации, применимыми в данном исследовании. Подтвердить отсутствие потери генетического материала при выделении ДНК и качественную очистку от ингибиторов ПЦР можно, повторив анализ начиная с этапа выделения ДНК, дополнительно добавив плазмидную ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность (5'CAT ATTGAATTTGAGGAGGATTTTCAGTGCTAAGAA CACTCACTCGATTTTTCCTTACATTTTATTTT CTTTTTCAGGGAATCCCTTCCACCCTTACTTCSACA3'), аналогичную генетическому маркеру для амплификации генетического материала клещей рода *Ixodes* (вставка осуществляется аналогично случаю с положительным контролем амплификации).

В этом случае при качественном выделении ДНК будет положительный результат ПЦР по каналу Cy5, если по-прежнему амплификация пробы не произошла (а проба с положительным контролем амплифицируется), нужно заменить набор для выделения ДНК и повторить анализ.

Осуществив подбор генетических маркеров для выявления ДНК патогенных боррелий, установили, что наиболее эффективной для этого является амплификация генов *flaB* и *ospA*, интерпретировать результат амплификации следует по обоим генам. Определить качество выделения ДНК можно при амплификации генетического материала клещей родов *Ixodes* и *Dermacentor*.

В дальнейшем нами планируется работа по подтверждению практической эффективности разработанных олигонуклеотидов для индикации маркерных генов патогенных боррелий (*flaB* и *ospA*) в сравнении с коммерческими тестами.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Благодарность. Благодарим Дениса Владимировича Тишина за предоставление образцов клещей для исследования.

Список литературы

- Бессолицына Е.А., Копосова О.Н. Подбор праймеров для идентификации *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi*. В кн.: Общество. Наука. Инновации (НПІК-2019): Сборник статей XIX Всероссийской научно-практической конференции: в 4 т. Киров: Вятский государственный университет; 2019. Т. 1. Биологические и химические науки. С. 13–9. [Электронный ресурс]. URL: <https://yadi.sk/i/JsFAWdHJQ2ilHg>.
- Андаев Е.И., Никитин А.Я., Яценко Е.В., Веригина Е.В., Толмачёва М.И., Аюгин Н.И., Матвеева В.А., Балахонов С.В. Тенденции развития эпидемического процесса клещевого вирусного энцефалита в Российской Федерации, лабораторная диагностика, профилактика и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:6–16. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-6-16.
- Рудакова С.А., Пеньевская Н.А., Блох А.И., Рудаков Н.В., Транквилевский Д.В., Савельев Д.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2010–2020 гг. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:52–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-52-61.

4. Хаммадов Н.И. Поиск генетических маркеров вируса клещевого энцефалита для его специфичной индикации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:122–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-122-128.
5. National Center for Biotechnology Information. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения 03.03.2022).
6. Basic Local Alignment Search Tool. [Электронный ресурс]. URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (дата обращения 03.03.2022).
7. Bunikis J., Noppa L., Bergström S. Molecular analysis of a 66-kDa protein associated with the outer membrane of Lyme disease *Borrelia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995; 131(2):139–45. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07768.x.
8. Ornstein K., Ostberg Y., Bunikis J., Noppa L., Berglund J., Norrby R., Bergström S. 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. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002; 9(6):1382–4. DOI: 10.1128/cdli.9.6.1382-1384.2002.
9. Gorbacheva V.Y., Godfrey H.P., Cabello F.C. Analysis of the bmp gene family in *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(7):2037–42. DOI: 10.1128/jb.182.7.2037-2042.2000.
10. Kišová-Vargová L., Mucha R., Čerňanská D., Bhide M. Host-dependent differential expression of factor H binding proteins, their affinity to factor H and complement evasion by Lyme and relapsing fever borreliae. *Vet. Microbiol.* 2011; 148(2–4):341–7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.09.026.
11. Sung S.Y., Lavoie C.P., Carlyon J.A., Marconi R.T. Genetic divergence and evolutionary instability in ospE-related members of the upstream homology box gene family in *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex isolates. *Infect. Immun.* 1998; 66(10):4656–68. DOI: 10.1128/IAI.66.10.4656-4668.1998.
12. Mukhacheva T.A., Kovalev S.Y. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi s.l.* in Russia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(4):275–9. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.02.004.
13. Pan M.J., Tsai C.P., Yeh J.C. Sequence diversity of a gene encoding a putative primary sigma factor among *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997; 148(2):153–8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10281.x.
14. Wang D., Botkin D.J., Norris S.J. Characterization of the vls antigenic variation loci of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia garinii* Ip90 and *Borrelia afzelii* ACAI. *Mol. Microbiol.* 2003; 47(5):1407–17. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03386.x.
15. Chao L.L., Lu C.F., Shih C.M. Molecular detection and genetic identification of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* from patients presenting with a rare skin manifestation of prurigo pigmentosa in Taiwan. *Int. J. Infect. Dis.* 2013; 17(12):e1141–7. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.08.004.
16. Wallich R., Pattathu J., Kiti ratschky V., Brenner C., Zipfel P.F., Brade V., Simon M.M., Kraiczky P. Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein I of the Lyme disease spirochetes *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infect. Immun.* 2005; 73(4):2351–9. DOI: 10.1128/IAI.73.4.2351-2359.2005.
17. Zygnier W., Jaros S., Wedrychowicz H. Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet. Parasitol.* 2008; 153(1–2):139–42. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.01.036.
18. Koci J., Derdákova M., Peterková K., Kazimirová M., Selyemová D., Labuda M. *Borrelia afzelii* gene expression in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006; 6(3):296–304. DOI: 10.1089/vbz.2006.6.296.
19. Jauris-Heipke S., Rössle B., Wanner G., Habermann C., Rössler D., Fingerle V., Lehnert G., Lobentanzer R., Pradel I., Hillenbrand B., Schulte-Spechtel U., Wilske B. Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: recombinant expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med. Microbiol. Immunol.* 1999; 187(4):213–9. DOI: 10.1007/s004300050095.
20. Espi A., Del Cerro A., Somoano A., García V., Prieto J.M., Barandika J.F., García-Pérez A.L. *Borrelia burgdorferi sensu lato* prevalence and diversity in ticks and small mammals in a Lyme borreliosis endemic Nature Reserve in North-Western Spain. Incidence in surrounding human populations. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2017; 35(9):563–8. DOI: 10.1016/j.eimc.2016.06.011.
21. Nunes M., Parreira R., Maia C., Lopes N., Fingerle V., Vieira M.L. Molecular identification of *Borrelia* genus in questing hard ticks from Portugal: Phylogenetic characterization of two novel Relapsing Fever-like *Borrelia* sp. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40:266–74. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.03.008.
22. Jungnick S., Margos G., Rieger M., Dzaferovic E., Bent S.J., Overzier E., Silaghi C., Walder G., Wex F., Koloczek J., Sing A., Fingerle V. *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii*: Population structure and differential pathogenicity. *Int. J. Med. Microbiol.* 2015; 305(7):673–81. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.08.017.
23. Zhai B., Niu Q., Liu Z., Yang J., Pan Y., Li Y., Zhao H., Luo J., Yin H. First detection and molecular identification of *Borrelia* species in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) from Northwest China. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:149–55. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.028.
24. Ružić-Sabljić E., Cerar T. *Borrelia* genotyping in Lyme disease. *Open Dermatology J.* 2016; 10(1):6–14. DOI: 10.2174/1874372201610010006.

References

1. Bessolitsyna E.A., Koposova O.N. [Selection of primers for identification of *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi*]. In: [Society. Science. Innovations (SPC-2019) Collection of papers of the XIX All-Russian Scientific and Practical Conference: in 4 volumes. Vyatka State University]. 2019. Vol. 1. [Biological and Chemical Sciences]. P. 13–9. Available from: <https://yadi.sk/i/JsFAWdHJQ2iHhg>.
2. Andaev E.I., Nikitin A.Ya., Yatsmenko E.V., Verigina E.V., Tolmacheva M.I., Ayugin N.I., Matveeva V.A., Balakhonov S.V. [Trends in epidemic process development of tick-borne encephalitis in the Russian Federation, laboratory diagnosis, prophylaxis and forecast for 2021]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):6–16. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-6-16.
3. Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Rudakov N.V., Trankvilevsky D.V., Savel'ev D.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E. [Review of the epidemiological situation on ixodic tick-borne borreliosis in the Russian Federation in 2010–2020 and prognosis for 2021]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (2):52–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-52-61.
4. Khammadoy N.I. [Search for genetic markers of tick-borne encephalitis virus for its specific indication]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):122–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-122-128.
5. National Center for Biotechnology Information. (Cited 3 Mar 2022). [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
6. Basic Local Alignment Search Tool. (Cited 3 Mar 2022). [Internet]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.
7. Bunikis J., Noppa L., Bergström S. Molecular analysis of a 66-kDa protein associated with the outer membrane of Lyme disease *Borrelia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995; 131(2):139–45. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07768.x.
8. Ornstein K., Ostberg Y., Bunikis J., Noppa L., Berglund J., Norrby R., Bergström S. 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. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002; 9(6):1382–4. DOI: 10.1128/cdli.9.6.1382-1384.2002.
9. Gorbacheva V.Y., Godfrey H.P., Cabello F.C. Analysis of the bmp gene family in *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(7):2037–42. DOI: 10.1128/jb.182.7.2037-2042.2000.
10. Kišová-Vargová L., Mucha R., Čerňanská D., Bhide M. Host-dependent differential expression of factor H binding proteins, their affinity to factor H and complement evasion by Lyme and relapsing fever borreliae. *Vet. Microbiol.* 2011; 148(2–4):341–7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.09.026.
11. Sung S.Y., Lavoie C.P., Carlyon J.A., Marconi R.T. Genetic divergence and evolutionary instability in ospE-related members of the upstream homology box gene family in *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex isolates. *Infect. Immun.* 1998; 66(10):4656–68. DOI: 10.1128/IAI.66.10.4656-4668.1998.
12. Mukhacheva T.A., Kovalev S.Y. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi s.l.* in Russia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(4):275–9. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.02.004.
13. Pan M.J., Tsai C.P., Yeh J.C. Sequence diversity of a gene encoding a putative primary sigma factor among *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997; 148(2):153–8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10281.x.
14. Wang D., Botkin D.J., Norris S.J. Characterization of the vls antigenic variation loci of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia garinii* Ip90 and *Borrelia afzelii* ACAI. *Mol. Microbiol.* 2003; 47(5):1407–17. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03386.x.
15. Chao L.L., Lu C.F., Shih C.M. Molecular detection and genetic identification of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* from patients presenting with a rare skin manifestation of prurigo pigmentosa in Taiwan. *Int. J. Infect. Dis.* 2013; 17(12):e1141–7. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.08.004.
16. Wallich R., Pattathu J., Kiti ratschky V., Brenner C., Zipfel P.F., Brade V., Simon M.M., Kraiczky P. Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein I of the Lyme disease spirochetes *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infect. Immun.* 2005; 73(4):2351–9. DOI: 10.1128/IAI.73.4.2351-2359.2005.

17. Zygner W., Jaros S., Wedrychowicz H. Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet. Parasitol.* 2008; 153(1–2):139–42. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.01.036.
18. Koci J., Derdákova M., Peterková K., Kazimirová M., Selyemová D., Labuda M. *Borrelia afzelii* gene expression in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006; 6(3):296–304. DOI: 10.1089/vbz.2006.6.296.
19. Jauris-Heipke S., Rössle B., Wanner G., Habermann C., Rössler D., Fingerle V., Lehnert G., Lobentanzer R., Pradel I., Hillenbrand B., Schulte-Spechtel U., Wilske B. Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: recombinant expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med. Microbiol. Immunol.* 1999; 187(4):213–9. DOI: 10.1007/s004300050095.
20. Espí A., Del Cerro A., Somoano A., García V., Prieto J.M., Barandika J.F., García-Pérez A.L. *Borrelia burgdorferi sensu lato* prevalence and diversity in ticks and small mammals in a Lyme borreliosis endemic Nature Reserve in North-Western Spain. Incidence in surrounding human populations. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2017; 35(9):563–8. DOI: 10.1016/j.eimc.2016.06.011.
21. Nunes M., Parreira R., Maia C., Lopes N., Fingerle V., Vieira M.L. Molecular identification of *Borrelia* genus in questing hard ticks from Portugal: Phylogenetic characterization of two novel Relapsing Fever-like *Borrelia* sp. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40:266–74. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.03.008.
22. Jungnick S., Margos G., Rieger M., Dzaferovic E., Bent S.J., Overzier E., Silaghi C., Walder G., Wex F., Koloczek J., Sing A., Fingerle V. *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii*: Population structure and differential pathogenicity. *Int. J. Med. Microbiol.* 2015; 305(7):673–81. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.08.017.
23. Zhai B., Niu Q., Liu Z., Yang J., Pan Y., Li Y., Zhao H., Luo J., Yin H. First detection and molecular identification of *Borrelia* species in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) from Northwest China. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:149–55. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.028.
24. Ružić-Sabljić E., Cerar T. *Borrelia* genotyping in Lyme disease. *Open Dermatology J.* 2016; 10(1):6–14. DOI: 10.2174/1874372201610010006.

Authors:

Khamdov N.I. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety. Science city-2, Kazan, Republic of Tatarstan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@mail.ru.

Khamidullina A.I. Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman. 35, Siberian Highway, Kazan, Republic of Tatarstan, 420029, Russian Federation. E-mail: kgavm_baumana@mail.ru.

Об авторах:

Хаммадов Н.И. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Российская Федерация, 420075, Республика Татарстан, Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@mail.ru.

Хамидуллина А.И. Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. Российская Федерация, 420029, Республика Татарстан, Казань, Сибирский Тракт, 35. E-mail: kgavm_baumana@mail.ru.