

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-108-114

УДК 579.834.114:579.25

Е.С. Крупинская<sup>1</sup>, Э.И. Коренберг<sup>1</sup>, К.А. Голидонова<sup>1</sup>, Н.Б. Горелова<sup>1</sup>, В.А. Матросова<sup>2</sup>**Результаты апробации оптимизированного метода мультилокусного сиквенс-анализа патогенных боррелий группы *Borrelia burgdorferi sensu lato***<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

**Цель** исследования – апробация возможности идентификации изолятов патогенных боррелий группы *Borrelia burgdorferi sensu lato* по специфичности сцепленных последовательностей локусов их генов *recA* и *ospA*, т.е. оптимизированным методом мультилокусного сиквенс-анализа (МЛСА). **Материалы и методы.** Исследовано 25 изолятов боррелий от взрослых голодных клещей *Ixodes ricinus*, отловленных в лесостепной части Воронежской области. Изоляты получены посевом материала кишечника клещей на среду BSK. Их первичная идентификация проведена путем анализа сцепленных последовательностей локусов генов *recA* и *ospA* общей длиной 360 п.н. Выборочный контроль видовой принадлежности изолятов проведен в соответствии с протоколом полного МЛСА путем анализа нуклеотидных последовательностей 6 генов (*recA*, *ospA*, *rrs*, *hbb*, *groEL*, *fla*) и межгенного спейсера *rrf-rrl* (общей длиной всех 7 локусов 1187 п.н.) с использованием платформы BLAST, программ Sequence scanner 2 и MEGA11. **Результаты и обсуждение.** Исследована гетерогенность нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* у 25 изолятов боррелий. Путем построения дендрограмм среди изолятов выявлены пять различных вариантов последовательностей. Показано сходство изолятов внутри каждой из этих пяти групп, а также их отличие от аналогичных сцепленных последовательностей других видов патогенных боррелий комплекса *B. burgdorferi sensu lato*. Для подтверждения полученных результатов проведено выборочное исследование изолятов из каждой группы по полному протоколу МЛСА. Выявлено, что в исследованных экосистемах Воронежской области циркулируют боррелии пяти видов: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi sensu stricto* и *B. valaisiana*.

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

Корреспондирующий автор: Крупинская Екатерина Сергеевна, e-mail: katekrupp@yandex.ru.

Для цитирования: Крупинская Е.С., Коренберг Э.И., Голидонова К.А., Горелова Н.Б., Матросова В.А. Результаты апробации оптимизированного метода мультилокусного сиквенс-анализа патогенных боррелий группы *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 2:108–114. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-108-114

Поступила 17.01.2024. Принята к публ. 15.02.2024.

E.S. Krupinskaya<sup>1</sup>, E.I. Korenberg<sup>1</sup>, K.A. Golidonova<sup>1</sup>, N.B. Gorelova<sup>1</sup>, V.A. Matrosova<sup>2</sup>**Results of Practical Evaluation of the Optimized Method for Multilocus Sequence Analysis of Pathogenic *Borrelia burgdorferi sensu lato* Group**<sup>1</sup>National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russian Federation;<sup>2</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to test the possibility of identifying isolates of pathogenic *Borrelia burgdorferi sensu lato* by the specificity of linked sequences of their *recA* and *ospA* gene loci, i.e. using the optimized multilocus sequence analysis (MLSA) method. **Materials and methods.** 25 *Borrelia* isolates from adult hungry *Ixodes ricinus* ticks collected in the forest-steppe part of the Voronezh Region were studied. Isolates were obtained through seeding the mid-gut of ticks on BSK medium. Their primary identification was performed by analyzing the linked sequences of the *recA* and *ospA* gene loci with a total length of 360 bp. Selective control of species affiliation of *Borrelia* isolates was carried out according to the protocol of full MLSA via assessment of the nucleotide sequences of 6 genes (*recA*, *ospA*, *rrs*, *hbb*, *groEL*, *fla*) and the intergenic spacer *rrf-rrl* (total length of all 7 loci being 1187 bp) using the BLAST platform, Sequence scanner 2 and MEGA11 programs. **Results and discussion.** The heterogeneity of the nucleotide sequences of *recA* and *ospA* genes in 25 *Borrelia* isolates has been investigated. Construction of dendrograms has revealed at least 5 different sequence variants among the isolates. The similarity of isolates within each of these five groups, as well as their distinction from comparable linked sequences of other pathogenic species of the *B. burgdorferi sensu lato* complex is demonstrated. To confirm the results obtained, a set of isolates from each group was sampled using the full MLSA protocol. It has been established that five *Borrelia* species circulate in the studied ecosystems of the Voronezh Region: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi sensu stricto*, and *B. valaisiana*.

**Key words:** Ixodidae tick-borne borrelioses, MLSA, identification of the pathogen, laboratory diagnostics.

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

**Funding:** The authors declare no additional financial support for this study.

**Acknowledgements:** The authors are grateful to Yu.V. Kovalevsky, D.V. Trankvilevsky, G.A. Rakhal'sky and M.R. Khaliluev for assistance at various stages of the study.

Corresponding author: Ekaterina S. Krupinskaya, e-mail: katekrupp@yandex.ru.

Citation: Krupinskaya E.S., Korenberg E.I., Golidonova K.A., Gorelova N.B., Matrosova V.A. Results of Practical Evaluation of the Optimized Method for Multilocus Sequence Analysis of Pathogenic *Borrelia burgdorferi* sensu lato Group. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 2:108–114. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-108-114

Received 17.01.2024. Accepted 15.02.2024.

Krupinskaya E.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1173-5590>  
Korenberg E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4452-4231>

Golidonova K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4832-6248>  
Matrosova V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2325-8584>

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – это группа этиологически самостоятельных спирохетозных природно-очаговых трансмиссивных инфекций, передающихся человеку иксодовыми клещами и поражающих различные системы органов [1]. Возбудители ИКБ – комплекс спирохет *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), включающий более 22 видов, для 6 из которых (*B. burgdorferi* sensu stricto [s.s.], *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. spielmanii* и *B. mayonii*) доказана патогенность для человека [2]. На территории России выявлены природные очаги всех перечисленных видов возбудителей ИКБ (за исключением *B. mayonii*), причем наибольшее эпидемическое значение имеют *B. garinii*, *B. afzelii* и *B. bavariensis* [1, 3]. Их основные переносчики – клещи *Ixodes persulcatus* и *I. ricinus*. В последние десятилетия по уровню заболеваемости ИКБ занимают первое место среди всех природно-очаговых инфекций. В 2022 г., например, в нашей стране зарегистрировано 7264 случая (4,98 на 100 тыс. населения) [4].

Для лабораторной диагностики ИКБ рекомендованы методы прямого выявления возбудителя или его ДНК: культивирование на питательной среде, обнаружение боррелий с помощью световой или электронной микроскопии, полимеразная цепная реакция (ПЦР), а также серологические методы [1, 5]. Результативным методом лабораторной идентификации возбудителей ИКБ оказалась ПЦР, для проведения которой анализируемым материалом могут быть различные биологические жидкости, а также биоптаты ряда органов и тканей. Использование ПЦР для индикации комплекса конкретных ДНК мишеней позволяет точно установить этиологию заболевания. Это важная задача дифференциальной лабораторной диагностики нозологических форм заболеваний группы ИКБ из-за возможных существенных различий в их клинических проявлениях на разных стадиях инфекционного процесса [2, 5–8].

В современных исследованиях для определения видовой принадлежности боррелий используют методы мультилокусного сиквенс-анализа (МЛСА) и сиквенс-типирования (МЛСТ), основанные на специфике выявленных ПЦР-методом нуклеотидных последовательностей ряда консервативных генов. Протокол МЛСА включает исследование локусов 6 генов (*rrs*, *hbb*, *groEL*, *recA*, *fla*, *ospA*) и локуса межгенного спейсера *rrf-rrl* [9]. Протокол МЛСТ включает анализ набора локусов 8 иных консервативных генов (*clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB* и *uvrA*) [10]. Контрольная идентификация изолятов боррелий двумя этими методами дала тождественные результаты [11]. Оба метода трудоемки и времяземки.

Для практической работы клинико-диагностических лабораторий, связанной с необходимостью идентификации проб от многих пациентов или из природных очагов, метод МЛСА представляется более рациональным, поскольку его протоколом предусмотрено исследование локусов меньшего числа генов.

Ранее путем анализа степени сходства нуклеотидных последовательностей локусов каждого из этих генов (перечислены выше) у репрезентативного пула изолятов одного заранее известного вида (*B. bavariensis*) выявлено, что гены *recA* и *ospA* дают наибольшее отличие от последовательностей аналогичных локусов типовых штаммов других патогенных видов боррелий. Показано также, что сцепленные нуклеотидные последовательности локусов всего двух этих генов позволяют подтвердить видовую принадлежность изолятов этого пула и их отличие от аналогичных сцепленных последовательностей боррелий других патогенных видов, вызывающих ИКБ. На основании полученных данных предложено оптимизировать МЛСА для определения видового статуса изолятов *B. burgdorferi* s.l. [12]. Однако возможность достоверной первичной идентификации предложенным методом патогенных боррелий различных видов оставалась неясной.

**Цель** исследования – апробация возможности идентификации видовой принадлежности изолятов патогенных боррелий группы *B. burgdorferi* s.l. по специфичности сцепленных последовательностей локусов их генов *recA* и *ospA*, т.е. оптимизированным методом МЛСА, который был предложен ранее [13].

## Материалы и методы

Исследованы 25 неидентифицированных первичных изолятов *B. burgdorferi* s.l. из музея боррелий лаборатории переносчиков инфекций на базе Государственной коллекции микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней человека II–IV групп патогенности («ГКМ – Гамалеи»). Они были получены путем индивидуального посева на среду BSK материала кишечника взрослых голодных особей европейского лесного клеща (*I. ricinus* L.) – единственного основного переносчика боррелий в описываемом регионе. Большинство клещей, от которых получены изоляты, собраны весной 2021 г. на флаг с наземной растительности лесных экосистем лесостепной части Воронежской области: в Верхнехавском районе (51°53'54" с.ш. 39°45'07" в.д.) и Центральном районе г. Воронежа (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.

Культивирование боррелий осуществляли при температуре 32 °С в течение одного месяца. Выделение бактериальной ДНК и очистка ПЦР-продуктов проведены с помощью коммерческого набора «Проба-НК» («ДНК-технология», Россия) и HiPure Gel DNA Mini Kit (Magen, Китай). МЛСА и оптимизированный МЛСА выполнены по схемам, предложенным D. Richter *et al.* [9] и К.А. Голидоновой и соавт. [12]. ПЦР проведена в амплификаторе Eppendorf Mastercycler nexus (Eppendorf, Германия). Ампликоны секвенированы с помощью набора реактивов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific, США) на автоматическом секвенаторе 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в Межинститутском Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва).

Выборочный контроль идентификации изолятов при помощи оптимизированного МЛСА осуществлен путем сравнения полученных результатов с данными их исследования по полному протоколу МЛСА. Анализ результатов секвенирования проведен с использованием платформы BLAST, программ Sequence scanner 2 и MEGA11. Соответствующие дендрограммы построены с включением аутгруппы нуклеотидных последовательностей локусов 6 генов типовых штаммов патогенных для человека боррелий, которые содержит база данных GenBank: *recA* (149 п.н.), *ospA* (211 п.н.), *rrs* (480 п.н.), *hbb* (327 п.н.), *groEL* (224 п.н.), *fla* (304 п.н.), а также межгенного спейсера *rrf-rrl* (181 п.н.). Сцепленные нуклеотидные последовательности генов *recA* и *ospA* исследуемых изолятов, а также последовательностей локусов этих генов у всех видов боррелий аутгруппы использованы для построения дендрограмм методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA) при величине bootstrap 1000 повторов с поправкой Джукса – Кантора.

### Результаты и обсуждение

Поскольку возможность идентификации видовой принадлежности патогенных боррелий группы *B. burgdorferi* s.l. оптимизированным методом МЛСА основана на сцепленных последовательностях генов *recA* и *ospA*, нами проанализирована степень гетерогенности локусов этих генов у 25 исследуемых изолятов. Соответственно по данным секвенирования построены две дендрограммы: по гену *recA* и по гену *ospA*. Нуклеотидные последовательности локусов гена *ospA* кластеризовались с соответствующими последовательностями этого гена у пяти различных видов аутгруппы: 11 – с *B. afzelii*, 10 – в одном кластере с *B. garinii* и *B. bavariensis*, 3 – с *B. valaisiana* и 1 – с *B. burgdorferi* s.s. (рис. 1). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *ospA* выявил сходство изолятов, кластеризовавшихся

с *B. afzelii*, на 92,2–100 %, *B. garinii* – 94,8–100 %, *B. bavariensis* – 92,6–100 %, *B. valaisiana* – 97,1–100 %. Аналогичная дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена *recA*, опубликованная ранее [13] и не приведенная из-за ограничения объема статьи, дала в целом сходные результаты. Однако отмечены отличия в кластеризации некоторых конкретных изолятов. Так, по последовательности локуса гена *recA* изолят Ir-6364 был ближе к *B. afzelii*, а по сиквенсу локуса гена *ospA* – к *B. garinii*. Изоляты Ir-6370 и Ir-6397, находившиеся по результату секвенирования локусов этого гена в одном кластере с *B. garinii* и *B. bavariensis*, по последовательностям гена *ospA* кластеризовались с *B. afzelii*. Изложенные факты подтвердили, что результаты секвенирования локуса только одного из генов, *recA* или *ospA*, не позволяют четко идентифицировать видовую принадлежность изолята и стимулировали проверку такой возможности по сцепленным последовательностям этих генов, как это было предложено оптимизацией МЛСА [12]. Соответствующая дендрограмма (рис. 2) демонстрирует четкую кластеризацию сцепленной последовательности всех тестируемых изолятов и подтверждает наличие среди них по крайней мере пяти различных вариантов.

С аналогичными сцепленными последовательностями *B. afzelii* кластеризовались 12 изолятов, 5 – с *B. garinii*, 4 – с *B. bavariensis*, 3 – с *B. valaisiana* и 1 – с *B. burgdorferi* s.s. Максимальное сходство сцепленных нуклеотидных последовательностей изолятов в каждой из этих групп (без *B. burgdorferi* s.s.) составляло 100 % с незначительными отклонениями некоторых минимальных значений, кроме одного изолята *B. bavariensis*, для которого этот показатель составил 90,3 %. Отличия сцепленных последовательностей локусов генов *recA* и *ospA* каждого из пяти видов боррелий, обнаруженных среди тестируемых изолятов, от патогенных боррелий других видов составляли от 4 до 15 %.

Приведенные цифры получены в результате расчетов по всем исследуемым изолятам. Они сведены в таблицу (по аналогичной с табл. 1 форме), размеры которой не позволяют воспроизвести ее в данной статье. Эта рабочая таблица выявила большое сходство последовательностей локусов у изолятов внутри каждой группы и их вполне достоверные отличия по этим особенностям от большинства патогенных боррелий других видов группы *B. burgdorferi* s.l.

Контроль информации о видовой принадлежности изолятов, протестированных оптимизированным методом МЛСА, проведен тестированием части из них по полному протоколу МЛСА. Исходя из большого сходства между сиквенсами изолятов определенного вида, для случайного выборочного контроля отобраны по одному изоляту каждого из пяти выявленных видов боррелий: Ir-6448, Ir-6470, Ir-6485, Ir-6521, Ir-6522. О принадлежности каждого из них к тому виду боррелий, который установлен по сцепленным последовательностям локусов генов *recA* и

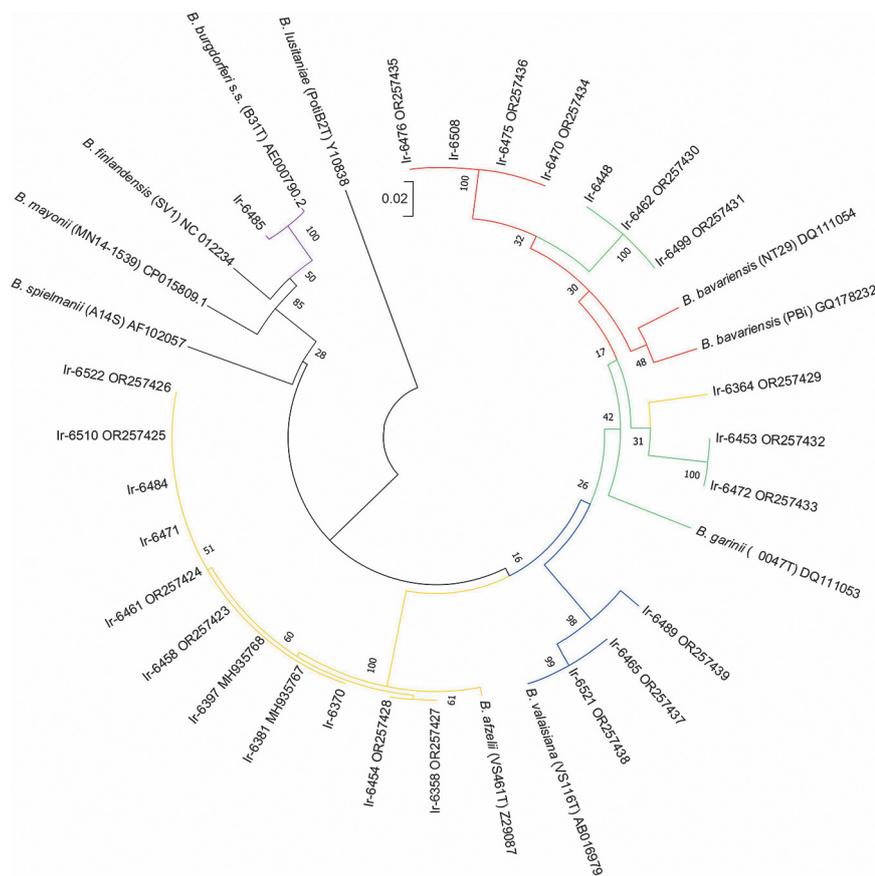


Рис. 1. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей локусов гена *ospA* у 25 изолятов боррелий. Изоляты обозначены буквами Ir (от клеща *I. ricinus*) и цифрами. В круглых скобках – обозначения типовых штаммов боррелий

Fig. 1. Dendrogram of nucleotide sequences of *ospA* gene loci in 25 *Borrelia* isolates. Isolates are labeled with the letters "Ir" (from the tick *I. ricinus*) and numbers. Designations of typical *Borrelia* strains are given in parentheses.

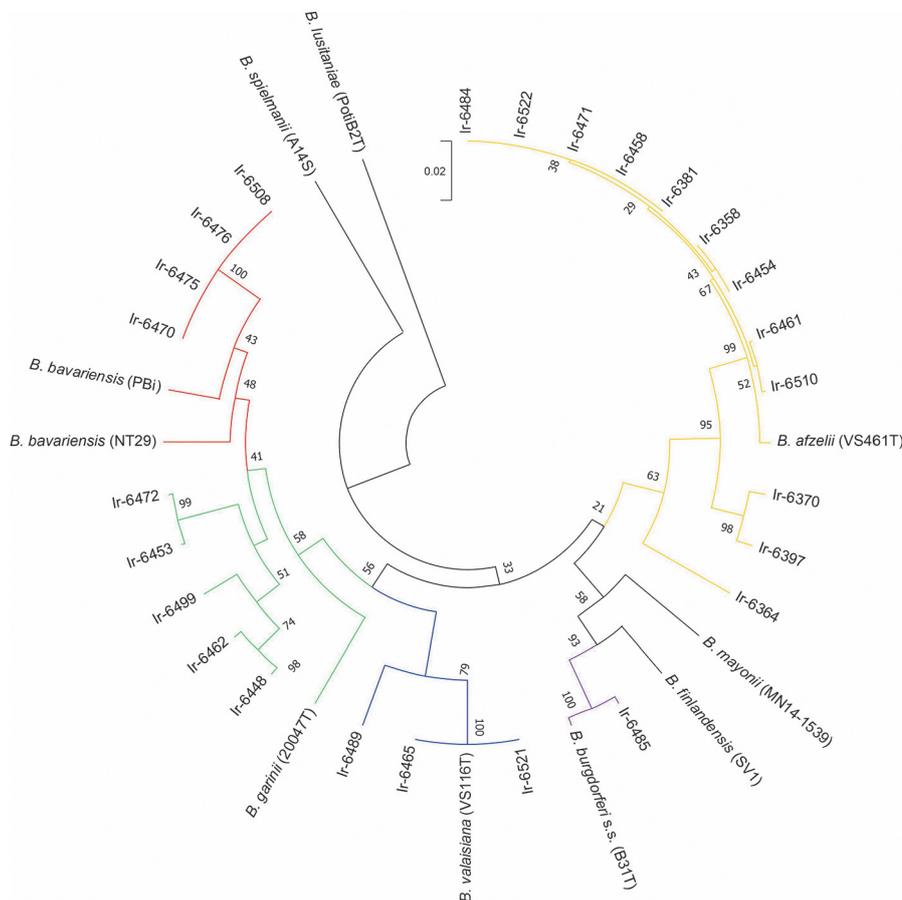


Рис. 2. Дендрограмма сцепленных нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* (обозначения – в подписи к рис. 1)

Fig. 2. Dendrogram of concatenated nucleotide sequences of *recA* and *ospA* genes (see designations to Fig. 1)

Таблица 1 / Table 1

Сходство (в %) сцепленных нуклеотидных последовательностей генов *recA* и *ospA* «контрольных» изолятов с аналогичными сцепленными последовательностями типовых штаммов боррелий выявленных видов

Similarity (in %) of linked nucleotide sequences of *recA* and *ospA* genes in “control” isolates with analogous linked sequences of typical *Borrelia* strains of identified species

Номера изолятов и виды боррелий Isolate number and <i>Borrelia</i> species	Ir-6448	Ir-6470	Ir-6485	Ir-6521	Ir-6522	<i>B. afzelii</i> (VS461T)	<i>B. bavariensis</i> (NT29)	<i>B. bavariensis</i> (PBi)	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (B31T)	<i>B. garinii</i> (20047T)	<i>B. valaisiana</i> (VS116T)
Ir-6448	100										
Ir-6470	96,7	100									
Ir-6485	88,6	89,4	100								
Ir-6521	91,7	90,8	91,4	100							
Ir-6522	89,7	90,6	90,8	88,3	100						
<i>B. afzelii</i> (VS461T)	90,3	91,1	90,8	88,9	99,4	100					
<i>B. bavariensis</i> (NT29)	94,2	95,6	90,0	91,1	90,0	90,6	100				
<i>B. bavariensis</i> (PBi)	94,7	96,7	90,0	91,4	90,3	90,8	96,4	100			
<i>B. burgdorferi</i> s.s. (B31T)	89,2	90,0	99,4	91,4	91,4	91,4	90,6	90,6	100		
<i>B. garinii</i> (20047T)	93,6	94,4	89,2	89,7	89,7	90,3	92,5	94,7	89,7	100	
<i>B. valaisiana</i> (VS116T)	91,7	90,8	91,4	100,0	88,3	88,9	91,1	91,4	91,4	89,7	100

*ospA*, свидетельствует наибольшая степень сходства с аналогичной последовательностью одного из типовых штаммов боррелий (табл. 1). Контрольное тестирование перечисленных изолятов методом МЛСА также подтвердило видовой статус четырех из них, установленный изначально «слепым» определением (рис. 3). Но итоги опытной и контрольной идентификации изолята Ir-6470 совпали не вполне: сцепленные последовательности секвенированных участков генов *recA* и *ospA* оказались идентичными таковым у *B. bavariensis* (рис. 2), а по итогу полного МЛСА они кластеризовались между кладами типовых изолятов данного вида и чрезвычайно близкой к нему *B. garinii* (рис. 3). До придания одному из генотипов *B. garinii* самостоятельного видового ранга *B. bavariensis* [14] их считали одним видом. По сходству сцепленных сиквенсов локусов генов *recA* и *ospA* изолят Ir-6470 оказался ближе к виду *B. bavariensis* (95,6–96,7%), к которому мы его относим, чем к *B. garinii* 20047T – 94,4% (табл. 1).

Итак, апробация оптимизированного метода МЛСА [12] «слепой» идентификацией 25 изолятов боррелий от взрослых клещей *I. ricinus* позволила по отличиям сцепленных последовательностей локусов генов *recA* и *ospA* выявить пять различных видов группы *B. burgdorferi* s.l. Номера доступа депонированных в GenBank исходных сиквенсов этих локусов, по которым сделаны заключения о видовой принадлежности каждого изолята, представлены в табл. 2. Судя по полученным нами данным, в лесостепной части Воронежской области более распространены и, следовательно, могут чаще вызывать заболевание ИКБ *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*.

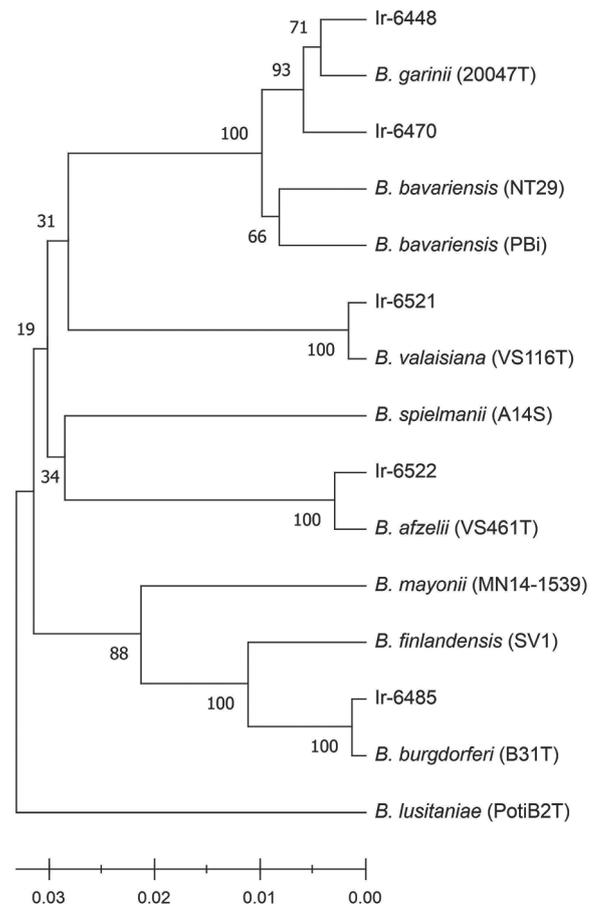


Рис. 3. Дендрограмма сцепленных сиквенсов выборочных изолятов боррелий, тестируемых по полному протоколу МЛСА (обозначения – в подписи к рис. 1)

Fig. 3. Dendrogram of linked sequences of selected *Borrelia* isolates tested through the full MLSA protocol (see designations to Fig. 1)

Таблица 2 / Table 2

Результаты идентификации 25 изолятов боррелий оптимизированным методом МЛСА

Results of identification of 25 *Borrelia* isolates using optimized MLSA

Изолят Isolate	Вид Species	Номер доступа GenBank / GenBank access number		
		Ген <i>recA</i> / <i>recA</i> gene	Ген <i>ospA</i> / <i>ospA</i> gene	
Ir-6358	<i>Borrelia afzelii</i>	–	OR257427	
Ir-6364		–	OR257429	
Ir-6370		OR340850	–	
Ir-6381		OR340843	MH935767	
Ir-6397		OR340849	MH935768	
Ir-6454		OR340844	OR257428	
Ir-6458		–	OR257423	
Ir-6461		OR340847	OR257424	
Ir-6471		OR340845	–	
Ir-6484		–	–	
Ir-6510		OR340848	OR257425	
Ir-6522		OR340846	OR257426	
Ir-6448		<i>Borrelia garinii</i>	OR340851	–
Ir-6453			OR340852	OR257432
Ir-6462	OR340853		OR257430	
Ir-6472	OR340855		OR257433	
Ir-6499	OR340854		OR257431	
Ir-6470	<i>Borrelia bavariensis</i>	OR340856	OR257434	
Ir-6475		OR340858	OR257436	
Ir-6476		OR340857	OR257435	
Ir-6508		–	–	
Ir-6465	<i>Borrelia valaisiana</i>	OR340859	OR257437	
Ir-6489		OR340860	OR257439	
Ir-6521		OR340861	OR257438	
Ir-6485	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	OR340862	OR257440	

В отличие от боррелий этих видов, которые разными методами были обнаружены здесь и ранее [14, 15], четвертый патогенный вид – *B. burgdorferi* s.s. – выявлен впервые и представлен в исследованном пуле одним изолятом. Его «удельное» значение в этиологии ИКБ нуждается в дальнейшем изучении, как и боррелий всех видов, циркулирующих в данном регионе, включая *B. valaisiana*, патогенность которой еще не вполне доказана [2]. Особую актуальность этой задачи подчеркивает возможность циркуляции боррелий нескольких видов в одной экосистеме при их единственном пути передачи человеку – клещом *I. ricinus*. Так, вблизи с. Большая Приваловка Верхнехавского района циркулируют все пять видов боррелий (табл. 2), а в Центральном районе г. Воронежа – минимум три вида (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. valaisiana*).

Представленные данные подтверждают возможность лабораторной идентификации патогенных видов боррелий группы *B. burgdorferi* s.l. предложенным ранее [12] оптимизированным методом МЛСА, основанным на анализе сцепленных нуклеотидных последовательностей локусов генов *recA* и *ospA*.

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

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность Ю.В. Ковалевскому, Д.В. Транквилевскому, Г.А. Рахальскому и М.Р. Халилуеву за помощь на разных этапах проведения исследования.

**Список литературы**

1. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М.: Комментарий; 2013. 463 с.
2. Hunfeld K.-P., Gray J., editors. Lyme Borreliosis. Springer International Publishing: Cham, Switzerland; 2022. 236 p. DOI: 10.1007/978-3-030-93680-8.
3. Рудакова С.А., Теслова О.Е., Муталинова Н.Е., Пенъевская Н.А., Блох А.И., Рудаков Н.В., Савельев Д.А., Кузьменко Ю.Ф., Транквилевский Д.В. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2013–2022 гг. и прогноз на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 2:75–87. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-75-87.
4. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору

в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2023. 368 с.

5. Guérin M., Shawky M., Zedan A., Octave S., Avallé B., Mafucci I., Padiolleau-Lefèvre S. Lyme borreliosis diagnosis: state of the art of improvements and innovations. *BMC Microbiol.* 2023; 23(1):204. DOI: 10.1186/s12866-023-02935-5.

6. Рудакова С.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е., Штрек С.В., Пен'евская Н.А., Рудаков Н.В. Основные итоги изучения иксодовых клещевых боррелиозов в Сибири по материалам Омского НИИ природно-очаговых инфекций. *Национальные приоритеты России.* 2021; 3:26–31.

7. Хаммадов Н.И., Хамидуллина А.И. Подбор генетических маркеров для выявления ДНК патогенных боррелий. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 2:134–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-134-141.

8. Воронкова О.В., Ильинских Е.Н., Рудиков А.А., Полторацкая Т.Н., Есимова И.Е., Лукашова Л.В., Карпова М.Р. Клинико-эпидемиологические проявления очагов иксодового клещевого боррелиоза в Томской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2022; 21(4):70–9. DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-4-70-79.

9. Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.-R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt. 4):873–81. DOI: 10.1099/ijs.0.64050-0.

10. Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S.A., Cornet M., Piesman J., Donaghy M., Bormane A., Hurn M.A., Feil E.J., Fish D., Casjens S., Wormser G.P., Schwartz I., Kurtenbach K. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(25):8730–5. DOI: 10.1073/pnas.0800323105.

11. Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Крупинская Е.С. Сравнительный анализ результатов исследования изолятов боррелий методами мультилокусного сиквенс-анализа (MLSA) и типирования (MLST). *Национальные приоритеты России.* 2021; 3:141–45.

12. Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Гинцбург А.Л. Оптимизация мультилокусного сиквенс-анализа для лабораторной идентификации возбудителей иксодового клещевого боррелиоза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022; 99(5):514–24. DOI: 10.36233/0372-9311-296.

13. Крупинская Е.С., Голидонова К.А., Горелова Н.Б., Транквилевский Д.В. Предварительные результаты апробации оптимизированного метода мультилокусного сиквенс-анализа патогенных боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* sensu lato. В кн.: Материалы Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 180-летию со дня рождения К.А. Тимирязева, г. Москва, 5–7 июня 2023 г.: сборник статей. Т. 1. М.; 2023. С. 308–13. [Электронный ресурс]. URL: <http://elib.timacad.ru/dl/full/S10112023SMUiS1.pdf/view>.

14. Margos G., Wilske B., Sing A., Hizo-Teufel A., Cao W.C., Chu C., Scholz H., Straubinger R.K., Fingerle V. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013; 63(Pt. 11):4284–8. DOI: 10.1099/ijs.0.052001-0.

15. Ромашов Б.В., Волгина Н.С., Штанников А.В., Ромашова Н.Б., Транквилевский Д.В., Бахметьева Ю.О. Иксодовый клещевой боррелиоз на территории Воронежской области: экологические и эпизоотологические особенности. *Российский паразитологический журнал.* 2012; 1:45–51.

## References

1. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. [Natural-Focal Infections Transmitted by Ixodidae Ticks]. Moscow: "Commentary"; 2013. 463 p.

2. Hunfeld K.-P., Gray J., editors. Lyme Borreliosis. Springer International Publishing: Cham, Switzerland; 2022. 236 p. DOI: 10.1007/978-3-030-93680-8.

3. Rudakova S.A., Teslova O.E., Mutalino N.E., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Rudakov N.V., Savel'ev D.A., Kuz'menko Yu.F., Trankvilevsky D.V. [Review of the epidemiological situation on ixodid tick-borne borrelioses in the Russian Federation in 2013–2022 and Forecast for 2023]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2023; (2):75–87. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-75-87.

4. [On the State of Sanitary and Epidemiological Welfare of the Population in the Russian Federation in 2022. State Report].

Moscow: [Federal Service for Surveillance on Consumers' Rights Protection and Human Well-being]; 2023. 368 p.

5. Guérin M., Shawky M., Zedan A., Octave S., Avallé B., Mafucci I., Padiolleau-Lefèvre S. Lyme borreliosis diagnosis: state of the art of improvements and innovations. *BMC Microbiol.* 2023; 23(1):204. DOI: 10.1186/s12866-023-02935-5.

6. Rudakova S.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E., Shtrek S.V., Pen'evskaya N.A. [Main results of the study of ixodid tick-borne borreliosis in Siberia based on the materials of the Omsk Research Institute of Natural Focal Infections]. *Natsional'nye Prioritety Rossii [National Priorities of Russia].* 2021; (3):26–31.

7. Khammatov 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):134–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-134-141.

8. Voronkova O.V., Ilyinskikh E.N., Rudikov A.A., Poltoratskaya T.N., Esimova I.E., Lukashova L.V., Karpova M.R. [Clinical and epidemiological manifestations of ixodid tick-borne borreliosis foci in the Tomsk region]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention].* 2022; 21(4):70–9. DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-4-70-79.

9. Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.-R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt. 4):873–81. DOI: 10.1099/ijs.0.64050-0.

10. Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S.A., Cornet M., Piesman J., Donaghy M., Bormane A., Hurn M.A., Feil E.J., Fish D., Casjens S., Wormser G.P., Schwartz I., Kurtenbach K. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(25):8730–5. DOI: 10.1073/pnas.0800323105.

11. Golidonova K.A., Korenberg E.I., Krupinskaya E.S. [Comparative analysis of the results of studying *Borrelia* isolates by multilocus sequencing analysis (MLSA) and typing (MLST)]. *Natsional'nye Prioritety Rossii [National Priorities of Russia].* 2021; (3):141–45.

12. Golidonova K.A., Korenberg E.I., Gintsburg A.L. [Optimized multilocus sequence analysis for laboratory identification of pathogens of ixodid tick-borne borreliosis]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology].* 2022; 99(5):514–24. DOI: 10.36233/0372-9311-296.

13. Krupinskaya E.S., Golidonova K.A., Gorelova N.B., Trankvilevsky D.V. [Preliminary results of approbation of the optimized method for multilocus sequencing analysis of pathogenic *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex]. In: [Proceedings of the International Scientific Conference of Young Scientists and Specialists, Dedicated to the 180th Anniversary of Birth of K.A. Timiryazev, Moscow, June 5–7, 2023. Collection of Articles]. Vol. 1. Moscow; 2023. P. 308–13. [Internet]. Available from: <http://elib.timacad.ru/dl/full/S10112023SMUiS1.pdf/view>.

14. Margos G., Wilske B., Sing A., Hizo-Teufel A., Cao W.C., Chu C., Scholz H., Straubinger R.K., Fingerle V. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013; 63(Pt. 11):4284–8. DOI: 10.1099/ijs.0.052001-0.

15. Romashov B.V., Volgina N.S., Shtannikov A.V., Romashova N.B., Trankvilevsky D.V., Bakhmet'eva Yu.O. [Ixodid tick-borne borreliosis on the territory of the Voronezh Region: ecological and epizootiological peculiarities]. *Rossiiskij Parazitologicheskij Zhurnal [Russian Journal of Parasitology].* 2012; (1):45–51.

## Authors:

Krupinskaya E.S., Korenberg E.I., Golidonova K.A., Gorelova N.B. National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya. 18, Gamaleya St., Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: [info@gamaleya.org](mailto:info@gamaleya.org).

Matrosova V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology. 32, Vavilova St., Moscow, 119334, Russian Federation. E-mail: [isinfo@eimb.ru](mailto:isinfo@eimb.ru).

## Об авторах:

Крупинская Е.С., Коренберг Э.И., Голидонова К.А., Горелова Н.Б. Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи. Российская Федерация, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18. E-mail: [info@gamaleya.org](mailto:info@gamaleya.org).

Матросова В.А. Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта. Российская Федерация, 119334, Москва, ул. Вавилова, 32. E-mail: [isinfo@eimb.ru](mailto:isinfo@eimb.ru).