

Аллельные варианты локусов гена *p66* у изолятов от мелких млекопитающих – резервуарных хозяев возбудителя иксодового клещевого боррелиоза *Borrelia bavariensis*, циркулирующего в природных очагах среднего Урала

К.А.Голидонова¹, Э.И.Коренберг¹, Ю.В.Ковалевский¹, Н.Б.Горелова¹, В.А.Матросова²

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта» РАН, Москва, Российская Федерация

Секвенированием методом полимеразной цепной реакции исследованы нуклеотидные последовательности локуса гена *p66* у 88 изолятов *Borrelia bavariensis*, выделенных от мелких млекопитающих 8 видов из природного очага, расположенного в Пермском крае России. Обнаружено 11 аллельных вариантов гена *p66*, отличающихся несинонимичными заменами нуклеотидных последовательностей в секвенированных локусах. Большинство вариантов выявлено у основного в этом регионе резервуарного хозяина боррелий – рыжей полевки (*Myodes glareolus*) и полевки-экономки (*Alexandromys oeconomicus*). Два из них оказались идентичными изолятам, полученным ранее от людей, больных иксодовым клещевым боррелиозом. Мелкие млекопитающие имеют решающее значение в сохранении генетической гетерогенности популяции *B. bavariensis* в периоды сезонной резервации эпизоотического процесса, включая циркуляцию аллельных вариантов, встречающихся у инфицированных людей и способствующих адгезии возбудителя.

Ключевые слова: *Borrelia bavariensis*, ген *p66*, аллельные варианты, мелкие млекопитающие, эпизоотический процесс

Для цитирования: Голидонова К.А., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., Горелова Н.Б., Матросова В.А. Аллельные варианты локусов гена *p66* у изолятов от мелких млекопитающих – резервуарных хозяев возбудителя иксодового клещевого боррелиоза *Borrelia bavariensis*, циркулирующего в природных очагах среднего Урала. Бактериология. 2025; 10(1): 50–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-50-57

Allelic variants of the *p66* gene loci in isolates from small mammals – reservoir hosts of the tick-borne borreliosis agent *Borrelia bavariensis* circulating in natural foci of the middle Urals

К.А.Golidonova¹, E.I.Korenberg¹, Yu.V.Kovalevskii¹, N.B.Gorelova¹, V.A.Matrosova²

¹N.F.Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

The nucleotide sequences of the *p66* gene locus in 88 *Borrelia bavariensis* isolates from small mammals of eight species from a natural focus located in the Perm region of Russia were analyzed by PCR-sequence analysis. Eleven allelic variants of the *p66* gene were detected, differing by nonsynonymous nucleotide sequence substitutions at sequenced loci. The majority of variants were detected in the main reservoir hosts of *Borrelia* in this region – the bank vole (*Myodes glareolus*) and the root vole (*Alexandromys oeconomicus*). Two of these variants were found to be identical to isolates obtained previously from humans with ixodid tick-borne borrelioses. Small mammals are crucial in maintaining the genetic heterogeneity of the *B. bavariensis* population during periods of seasonal quiescence of the epizootic process, including the circulation of allelic variants found in infected humans and contributing to the adhesion of the pathogen.

Key words: *Borrelia bavariensis*, *p66* gene, allelic variants, small mammals, epizootic process

Для корреспонденции:

Голидонова Кристина Андреевна, научный сотрудник лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России

Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Статья поступила 19.08.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Kristina A. Golidonova, Researcher of Laboratory of Infection Vectors, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 18 Gamaleya str., Moscow, 123098, Russian Federation

The article was received 19.08.2024, accepted for publication 31.03.2025

For citation: Golidonova K.A., Korenberg E.I., Kovalevskii Yu.V., Gorelova N.B., Matrosova V.A. Allelic variants of the *p66* gene loci in isolates from small mammals – reservoir hosts of the tick-borne borreliosis agent *Borrelia bavariensis* circulating in natural foci of the middle Urals. Bacteriology. 2025; 10(1): 50–57. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-50-57

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – группа этиологически самостоятельных хронических или рецидивирующих спирохетозных природноочаговых облигатно-трансмиссивных инфекций, возбудители которых передаются иксодовыми клещами [1]. Эти возбудители входят в комплекс спирохет *Borrelia burgdorferi* sensu lato, который включает более 22 видов. Патогенность для человека пока доказана только для *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. spielmanii* и *B. mayonii* [2]. В России выявлены природные очаги всех перечисленных видов боррелий, за исключением *B. mayonii*. Наибольшее эпидемическое значение имеют *B. garinii*, *B. afzelii* и *B. bavariensis* [1, 3–5]. В Евразии эти боррелии формируют сложные трехчленные паразитарные системы, неразрывно связанные с жизненными схемами таежного (*Ixodes persulcatus*) и европейского лесного (*I. ricinus*) клещей. Существование клещей невозможно без их прокормителей, которые в той или иной степени выполняют роль резервуарных хозяев боррелий. Мелкие млекопитающие – основные хозяева предимагинальных фаз развития этих клещей, причем наибольшее значение имеют лесные полевки родов *Myodes* и *Cruseomys*, а также землеройки бурозубки рода *Sorex* [6–8]. При выделении изолята для его номенклатуры были использованы первые буквы родового латинского названия животного-источника по И.М.Громову и др. [9], сохраняющиеся в музее боррелий и международном GenBank NCBI (см. далее). Здесь и далее в тексте статьи изменившиеся русские и латинские, а также английские названия мелких млекопитающих приведены в скобках по А.А.Лисовскому [10].

B. bavariensis описана как самостоятельный вид сравнительно недавно. К нему отнесены боррелии, считавшиеся ранее генетической подгруппой NT29 *B. garinii*, которая распространена в природных очагах Евразии [3, 11, 12]. Факторы

патогенности *B. bavariensis*, как и других возбудителей ИКБ, – поверхностные белки мембраны бактерии [13]. Инфекционный процесс «запускается» адгезией боррелий к клеткам млекопитающих. Для начала этого процесса большое значение имеет белок P66, контролируемый одноименным геном [14–16].

В Пермском крае заражения ИКБ, как правило, происходят в результате укуса человека голодным инфицированным имаго клеща *I. persulcatus* – единственным источником возбудителей [17]. От пациентов в остром периоде заболевания были выделены изоляты *B. bavariensis* с тремя вариантами нуклеотидных и аминокислотных последовательностей локуса гена *p66* [18].

Цель исследования – выяснение роли мелких млекопитающих, резервуарных хозяев *B. bavariensis*, в поддержании циркуляции в природном очаге различных аллельных вариантов гена *p66*, кодирующего соответствующий белок этого возбудителя, включая варианты, выявленные у пациентов, больных ИКБ.

Материалы и методы

Исследовано 88 изолятов боррелий из Государственной коллекции микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней человека II–IV групп патогенности («ГКМ Гамалеи», Москва). Они получены в 1992–2003 гг. от мелких млекопитающих 8 видов (табл. 1) в природном очаге ИКБ в стационаре (58.32° с.ш., 57.43° в.д.) в горно-таежных лесах Чусовского района Пермского края. Указанный период времени охватывал 4 цикла динамики численности зверьков. По результатам первичной идентификации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)/полиморфизма длины рестрикционных фрагментов межгенного спейсера *rrfA-rrlB* они

Таблица 1. Количество исследованных изолятов от мелких млекопитающих разных видов и их распределение по аллельным вариантам локуса гена *p66*

Table 1. Number of studied isolates from small mammals of different species and their distribution by allelic variants of *p66* gene locus

Вид млекопитающего и буквенное обозначение изолятов* / Mammal species and letter designation of isolates	Исследовано изолятов / Isolates analysed	Из них число каждого из 11 выявленных вариантов с порядковым номером фрагмента белка P66 / Of these, the number of each of the 11 identified variants with the sequence number of P66 protein fragment											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Рыжая полевка / Bank vole (<i>Myodes glareolus</i>) – Cg	59	29	13	–	2	5	3	2	2	1	1	1	
Полевка-экономка / Root vole (<i>Alexandromys oeconomicus</i>) – Mo	14	5	4	–	3	–	–	2	–	–	–	–	–
Красная полевка / Northern red-backed vole (<i>Myodes rutilus</i>) – Crf	7	1	1	–	3	–	2	–	–	–	–	–	–
Красно-серая полевка / Grey red-backed vole (<i>Cruseomys rufocanus</i>) – Crf	2	–	–	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–
Лесная мышовка / Northern birch mouse (<i>Sicista betulina</i>) – Sb	2	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Обыкновенная бурозубка / Common shrew (<i>Sorex araneus</i>) – Sa	2	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Темная полевка / Field vole (<i>Agricola agrestis</i>) – Ma	1	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–
Малая лесная мышь / Herb wood mouse (<i>Sylvaemus uralensis</i>) – Au	1	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–
Всего / Total	88	37	19	0	9	5	5	5	4	1	1	1	1

*См. примечание к разделу «Введение». После латинского названия указаны буквы в обозначениях изолятов.
See note to the Introduction section. The Latin name is followed by the letters in the isolate designations.

были отнесены к *B. garinii* евразийской подгруппы NT29 [19]. Выборочная реидентификация методами мультилокусного сиквенс-анализа и типирования показала их принадлежность к виду *B. bavariensis* [3]. В исследованных экосистемах также циркулируют *B. afzelii* и *B. garinii*. Из 229 идентифицированных изолятов боррелий, полученных всего от мелких млекопитающих, почти 43% составили моно- и микст-культуры с *B. bavariensis* [20].

Мелких млекопитающих отлавливали живоловками в июле-августе, в период наибольшей сезонной инфицированности [21]. Их эвтаназию проводили диэтиловым эфиром в соответствии с нормативным документом времени отлова зверьков. Возраст полевок определяли по степени стертости зубов по критериям Н.В.Тупиковой и соавт. [22]. Изоляция боррелий посевом на среду BSK проб из мочевого пузыря и биоптатов кожи ушей зверьков, а также культивирование посевов описаны ранее [21]. Частота встречаемости вариантов структуры локуса гена *р66* среди изолятов *B. bavariensis*, полученных посевом биоптатов ушной кожи и проб из мочевых пузырей зверьков, достоверно не отличалась ($t = 0,04$, $t < 2,0$).

Выделение ДНК бактерий проведено коммерческим набором ПРОБА-НК «ДНК-технология» (Россия). ПЦР выполнена в объеме 30 мкл, содержащем 1 единицу Taq-полимеразы, 1х ПЦР-буфер с $MgCl_2$, 0,2 мкМ дНТФ, 3 мкл ДНК, деионизированную воду и по 0,2 мкМ праймеров: 5'GAAATCTCAAGCTATGAAGAC-3' (прямой) и 5'-СТАСАТАТГСТТСТГТТГАААТГГ-3' (обратный) [18]. Они фланкировали 280 п.н. локуса хромосомного гена *р66*, кодирующего одну из поверхностных петель белка Р66 [23]. ПЦР проведена в амплификаторе Mastercycler nexus Eppendorf (Германия). Реакционная смесь нагревалась до 94°C в течение 1 мин, далее подвергалась 30 циклам денатурации в течение 30 с при 94°C, отжигу в течение 30 с при 53°C, элонгации в течение 30 с при 72°C. Финальная элонгация проведена при той же температуре в течение 5 мин. ПЦР-продукты очищали коммерческим набором HiPureGel DNA MiniKit Magen (Китай).

Ампликоны секвенированы 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) в Центре коллективного пользования «Геном» (ИМБ РАН, Москва). Результаты проанализированы с использованием сервиса BLAST, программ Chromas, UGENE, MEGA11 и Jalview. Нуклеотидные и аминокислотные выравнивания выполнены методом Muscle. Дендрограмма построена с помощью 3-параметровой эволюционной модели Тамуры методом максимального правдоподобия при величине bootstrap 1000 повторов.

В базу данных GenBank NCBI депонировано 15 нуклеотидных последовательностей локуса гена *р66* (номера доступа OR620166-OR620180).

Статистическая обработка данных выполнена для $p = 0,95$ в программе Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Большинство исследованных изолятов получено от рыжих полевок и полевок-экономок, преобладающих в населении

мелких млекопитающих горно-таежных лесов Пермского края, имеющих важное значение в прокормлении предимагинальных фаз иксодовых клещей и легко передающих им боррелии [8]. Рыжая полевка – один из основных резервуарных хозяев боррелий, широко распространена в лесной зоне России [24, 25]. Зараженность этих полевок боррелиями в изученном очаге составляла 17,6% [26]. Полевка-экономка обычно занимала второе место по вылову. Этот вид прокармливает значительную часть предимагинальных фаз клеща *I. persulcatus*. Полевка-экономка – дополнительный резервуарный хозяин боррелий [21]. Как и рыжая полевка, она распространена в лесной зоне России [7]. Зараженность экономок боррелиями составляла 23,1% [26]. Именно от этих двух видов зверьков получено большинство исследованных культур *B. bavariensis*. Красная, красно-серая полевки и другие, как правило, малочисленные грызуны представлены лишь единичными изолятами этой боррелии (табл. 1).

На исследованной территории значительная доля вылова мелких млекопитающих приходится на обыкновенную бурозубку, которая имеет существенное значение в прокормлении клещей *I. persulcatus* и *I. trianguliceps*. Однако показатель зараженности *S. araneus* боррелиями составлял не более 4–5% [26], от зверьков этого вида изолированы только 2 культуры *B. bavariensis* (табл. 1). Эти данные, как и работы других авторов [1, 24, 27, 28], свидетельствуют о низкой восприимчивости обыкновенных бурозубок к боррелиям и их слабом участии в поддержании эпизоотического процесса.

Дендрограмма нуклеотидных последовательностей локусов гена *р66* всех исследованных изолятов *B. bavariensis* от 8 видов мелких млекопитающих выявила 14 ветвей (рис. 1), из которых только 11 образовывали кластеры (т.е. аллельные варианты). Для дальнейшего анализа гетерогенности локусов гена *р66* и вариантов фрагмента белка Р66 в паразитарной системе *B. bavariensis* этим кластерам даны порядковые номера в соответствии с уменьшением числа сходных изолятов. При этом первые три номера сохранены за нуклеотидными последовательностями, выявленными у людей, больных ИКБ, причем третий вариант обнаружен только у 1 изолята от людей с ИКБ [18]. На этой дендрограмме в вариант №1 объединены две ветви, включающие изоляты от Sa-2814 до Hs-10, а также Mo-1165 и Cg-2752, поскольку сходство их нуклеотидных последовательностей локусов гена *р66* составило более 99,5%. Это тоже относится к вариантам №2 и №7 (рис. 1). Нуклеотидные последовательности локуса гена *р66* изолятов Cg-2692 и Sb-3174 отличались больше 1,1%, поэтому они разделяются на варианты №11 и №12 соответственно. Различия между выявленными 11 вариантами достигали 3,2%, а сходство нуклеотидных последовательностей изолятов, сгруппировавшихся в общие кластеры, составило 98,9–100%. Это свидетельствует о гетерогенности структуры гена *р66* *B. bavariensis*, которая выявлена и у патогенных боррелий других видов [29–31]. Почти в половине кластеров оказались изоляты от зверьков нескольких видов. Исключения составили некоторые варианты, представленные единичными изолятами. Приведенные данные подтверждают отсутствие четкой связи определенного варианта локуса гена *р66* с конкретным видом его хозяина. Мелкие млекопитающие разных видов могут быть хозяева-

ми нескольких различных генетических вариантов патогенных боррелий одного вида [20, 32].

Для того чтобы определить, насколько широко распространены выявленные аллельные варианты локуса гена *p66*, проведен анализ их нуклеотидного сходства с последовательностями, имеющимися в базе данных GenBank. Так, нуклеотидные последовательности изолятов варианта №4

(рис. 1) оказались сходными на 100% с таковыми у изолята BgVir *B. bavariensis*, выделенного от *I. persulcatus* из Томской области. Сиквенсы изолятов варианта №6 были наиболее сходными (99,6%) с последовательностями изолята Pm7019-12 *B. bavariensis*, выделенного от *I. persulcatus* из Пермского края. Вариант №7 идентичен таковым изолята Tom5306 и сходен на 99,6% с изолятом Tom4606 *B. bavariensis*, которые

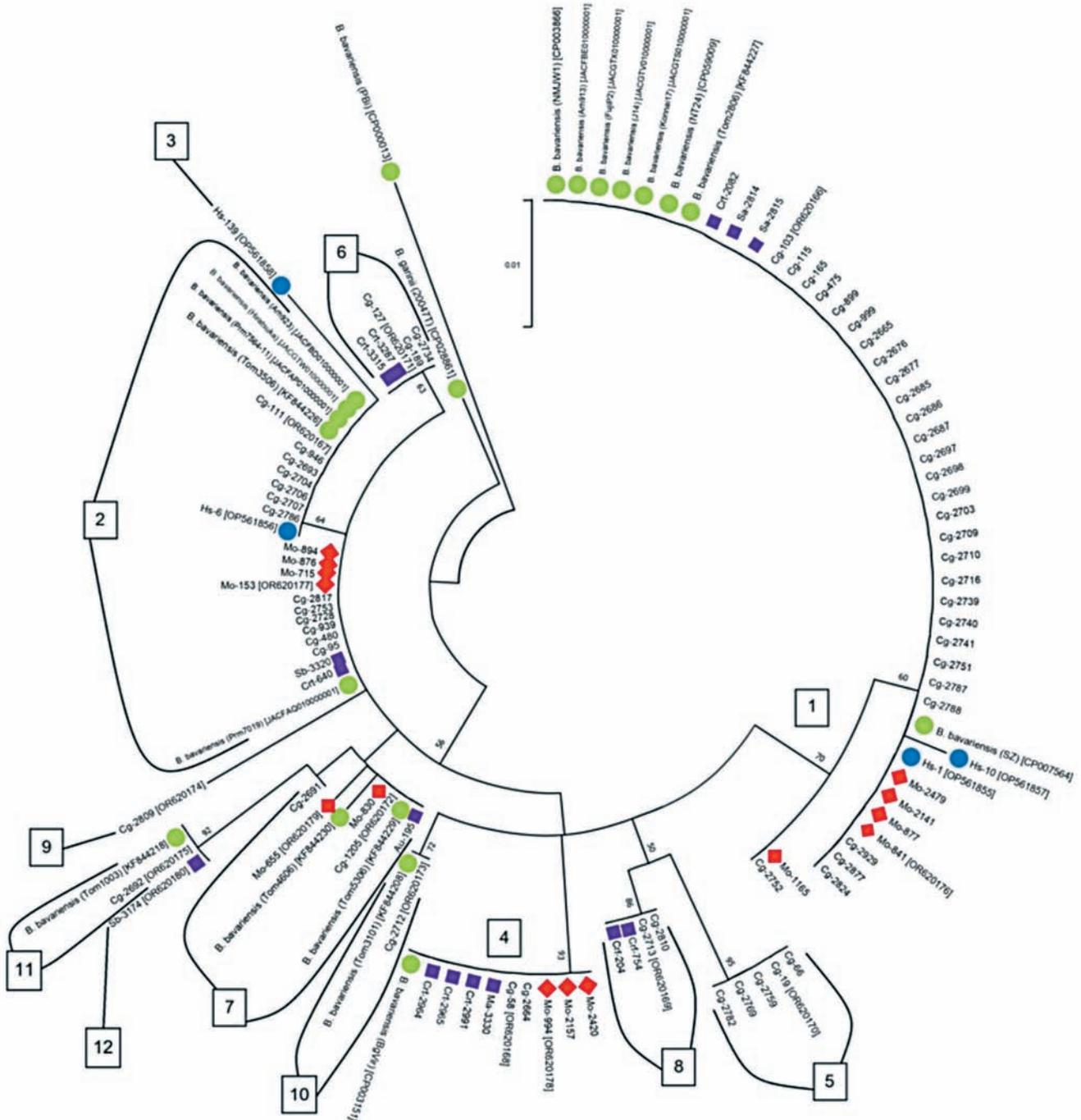


Рис. 1. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей локуса гена *p66* изолятов от мелких млекопитающих различных видов. Изоляты от полевки-экономки обозначены красными ромбами; изоляты от мелких млекопитающих других немногочисленных видов – фиолетовыми квадратами; изоляты от людей с ИКБ – синими кружками; типовые штаммы *B. bavariensis* – зелеными кружками. В круглых скобках – наименование штаммов боррелий; в квадратных скобках – номера доступа нуклеотидных последовательностей локуса гена *p66* в GenBank.

Fig. 1. Dendrogram of nucleotide sequences of *p66* gene locus of isolates from small mammals of different species. Isolates from the root vole are marked with red rhombuses; isolates from small mammals of other few species are marked with purple squares; isolates from humans with ITBB are marked with blue circles; typical strains of *B. bavariensis* are marked with green circles. In parentheses – names of *Borrelia* strains; in square brackets – access numbers of nucleotide sequences of *p66* gene locus in GenBank.

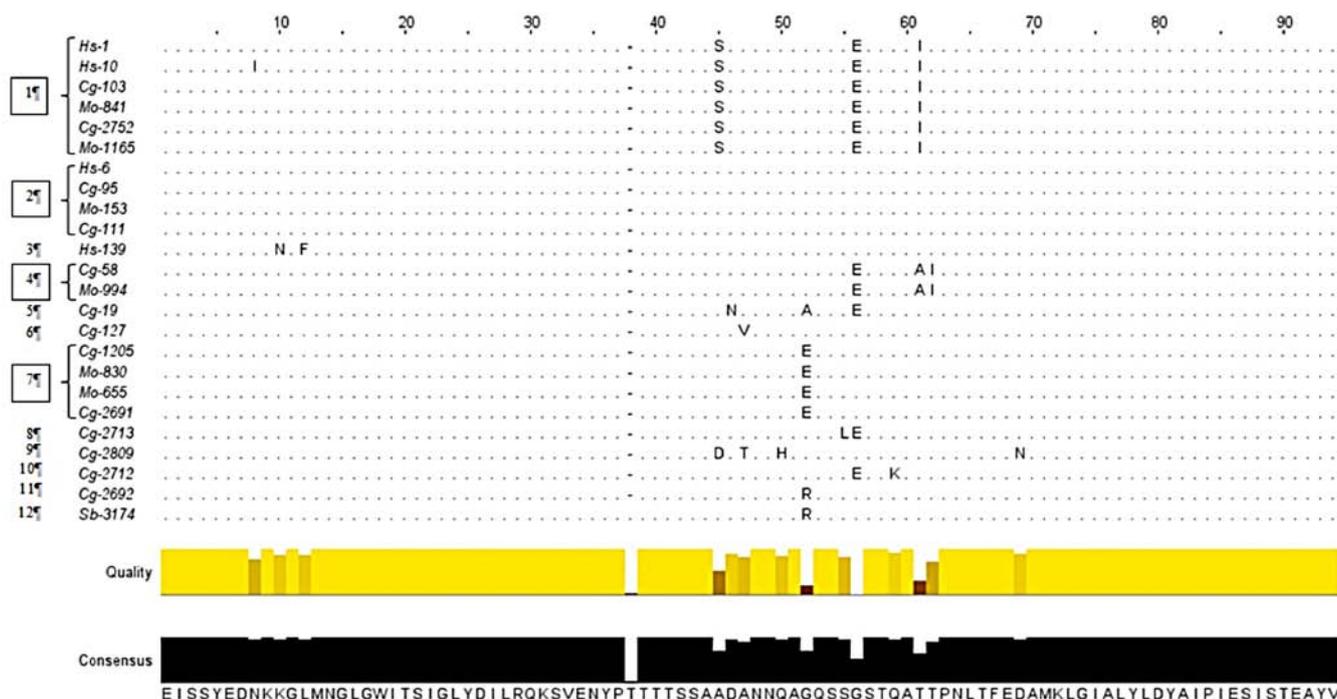


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей у выборочных изолятов от мелких млекопитающих, представляющих все выявленные варианты фрагмента белка Р66. Порядковый номер варианта приведен по вертикали перед номером изолята. Quality – качество выравнивания, consensus – консенсусная последовательность.

Fig. 2. Amino acid sequence alignment of selected isolates from small mammals representing all identified variants of P66 protein fragment. The variant number is given vertically before the isolate number. Quality – quality of alignment, consensus – consensus sequence.

выделены от таежных клещей из Томской области. Нуклеотидные последовательности вариантов №10 и №11 идентичны сиквенсам изолятов Tom3101 и Tom1003 *B. bavariensis* соответственно, полученных также от таежных клещей Томской области. Следовательно, можно утверждать, что выявленные аллельные варианты локуса гена *r66* у изолятов от мелких млекопитающих достаточно широко распространены в России.

Дендрограмма аминокислотных последовательностей фрагментов белка Р66 у всех изолятов от исследованных мелких млекопитающих различных видов (не приведена в связи с ограничением объема статьи) в целом подтвердила их кластеризацию на рис. 1 и выявила, что из 14 ветвей только 11 оказались с несинонимичными нуклеотидными заменами локусов гена *r66* (табл. 1). Внутри этих кластеров аминокислотные последовательности белка Р66 были идентичны: значительная часть всех изолятов группировалась в 1 и 2 кластеры (37 и 19 из 88 изолятов соответственно). У изолятов от рыжих полевков обнаружено 10 вариантов фрагмента белка Р66; у полевков-экономок – 4. Наиболее часто зверьки этих видов были инфицированы боррелиями с 1-м (38,6 ± 5,2%) и 2-м (19,3 ± 4,2%) вариантами нуклеотидных последовательностей гена *r66* (табл. 1).

Аминокислотное выравнивание выборочных образцов каждого варианта фрагмента белка Р66 (рис. 2) показало, что они отличаются друг от друга по разнообразию и характеру аминокислотных замен. Оно выявило переменный участок, состоящий из 31 аминокислоты, в котором большая часть замен произошла со сменой полярности определенных аминокислот. Обнаружено, что 1-й и 2-й варианты фрагмента белка Р66 отличаются друг от друга заменами со

сменой полярности аминокислот в позициях 45, 56 и 61. Остальные варианты характеризовались большим количеством аминокислотных замен, многие из которых также произошли со сменой полярности (рис. 2). Такие замены, предположительно, могут влиять на структуру петли белка Р66 и, следовательно, на его функции, включая степень адгезивности боррелий к клеткам человека, что требует отдельного специального изучения.

Исследованные изоляты были получены в годы разной численности зверьков. Во все годы ее динамики среди изолятов от мелких млекопитающих с той или иной частотой обнаружено не менее 5 вариантов фрагмента белка Р66, из которых наиболее часто встречались варианты 1 и 2 (табл. 2). Эти данные позволяют считать, что мелкие млекопитающие даже в годы депрессии их численности способствуют сохранению генетической гетерогенности возбудителя ИКБ в природном очаге. Отсутствие тех или иных вариантов структуры белка Р66 среди изолятов, полученных в определенные годы (табл. 2), объясняется их редкостью, требующей исследования большего числа образцов.

Для мелких млекопитающих, как известно, характерны небольшая индивидуальная продолжительность жизни и быстрая смена поколений в их популяциях. Заражение боррелиями этих резервуарных хозяев обычно приводит к пожизненному хроническому инфекционному процессу, который сопровождается размножением возбудителя [33]. Поэтому среди «старых» перезимовавших зверьков зараженность особей выше, чем среди секолеток [27, 34]. В этой связи мы сравнили доли изолятов с наиболее часто встречающимися вариантами белка Р66 (варианты 1 и 2) среди рыжих полевков установленного возраста, в отношении которых объем наших

Таблица 2. Варианты фрагмента белка Р66 у изолятов от мелких млекопитающих, исследованных в разные годы динамики их численности

Table 2. P66 protein fragment variants in isolates from small mammals examined in different years of population dynamics

Уровень численности мелких млекопитающих в годы изоляции боррелий (по [27]) / Population levels of small mammals during <i>Borrelia</i> isolation years (according to [27])	Исследовано изолятов / Isolates analysed	Из них число каждого из 11 выявленных вариантов с порядковым номером фрагмента белка Р66 / Of these, the number of each of the 11 identified variants with the sequence number of P66 protein fragment											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Высокий (1992, 1995, 1998, 2001) / High	28	9	8	–	5	2	1	2	1	–	–	–	–
Средний (1994, 1997, 2000, 2003) / Middle	54	27	10	–	4	3	3	2	2	1	1	1	–
Низкий (1993, 1996, 1999, 2002) / Low	6	1	1	–	–	–	1	1	1	–	–	–	1

данных позволял произвести соответствующий расчет. Так, из 30 изолятов от полевков-сеголеток 21 (70,0 ± 6,5%) имели один из этих вариантов белка, а 19 изолятов от перезимовавших «старых» зверьков – 16 (84,2 ± 5,2%). Различия между приведенными показателями недостоверны ($t = 0,17$; $t < 2,0$). Изложенные факты свидетельствуют о том, что перезимовавшие зараженные мелкие млекопитающие, наряду с личинками и нимфами, инфицировавшимися в предшествующем сезоне, сохраняют паразитарную систему боррелий и их генетическую гетерогенность в природном очаге в период сезонной резервации эпизоотического процесса. Такая функция резервуарных хозяев особенно важна, поскольку трансовариальная передача спирохет группы возбудителей ИКБ от зараженных самок клеща личинкам дочерней генерации не происходит или (в отличие, например, от вируса клещевого энцефалита) наблюдается в редких случаях [1, 28, 35, 36]. Поэтому голодные личинки могут получить боррелии только при паразитировании на мелких млекопитающих, что определяет возможность дальнейшей трансфазовой передачи этих спирохет нимфам.

Наиболее распространенные у изолятов от мелких млекопитающих 1-й и 2-й варианты фрагмента белка Р66 (табл. 1) оказались идентичны таковым двум вариантам у изолятов от людей, больных ИКБ, в Пермском крае. Сравнение их нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с таковыми из базы данных GenBank выявило, что эти два варианта были обнаружены у изолятов от людей, больных ИКБ, в Японии, а также у изолятов от клещей *I. persulcatus* в России, Китае и Японии [18]. Это позволяет предполагать, что два аллельных варианта (1-й и 2-й) гена *p66* имеют наибольшее распространение в природных очагах *B. bavariensis* с основным переносчиком таежным клещом и резервуарными хозяевами этих спирохет – мелкими млекопитающими.

Заключение

Результаты исследования показывают, что фоновым видам мелких млекопитающих (за исключением землероек) принадлежит решающее значение в поддержании циркуляции *Borrelia bavariensis* с различными вариантами фрагмента белка Р66, включая 2 доминирующих, обнаруженных ранее у людей, заразившихся ИКБ. В восточно-европейских горно-таежных лесах наиболее важное значение для поддержания генетической гетерогенности возбудителя в природном очаге и ее сохранения в межэпизоотический период имеет рыжая полевка.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Изучение эколого-генетических факторов повышенной патогенности возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов как основа прогнозирования их эпидемической опасности в разработки средств лабораторной диагностики» (121030900383-2). Секвенирование ампликонов частично проведено за счет средств ИМБ РАН.

Financial support

The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation “Study of ecological and genetic factors of increased pathogenicity of ixodid tick-borne borreliosis pathogens as a basis for predicting their epidemic danger in the development of laboratory diagnostic tools” (121030900383-2). Sequencing of amplicons was partially carried out at the expense of the IMB RAS.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Коренберг ЭИ, Помелова ВГ, Осин НС. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М.: Комментарий, 2013.
2. Hunfeld K-P, Gray J. Lyme Borreliosis. Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022.
3. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB. Multilocus Sequence Analysis of “Atypical” *Borrelia burgdorferi* sensu lato Isolated in Russia. *Mol Gen Mikrobiol Virol.* 2017;32:196-203. DOI: 10.3103/S0891416817040073
4. Golidonova KA, Korenberg EI, Gorelova NB, Ginzburg AL. Multilocus Sequence Analysis of Isolates from Patients with the Erythemic Form of Ixodid Tick-Borne Borreliosis. *Mol Gen Microbiol Virol.* 2021;36:170-175. DOI: 10.3103/S089141682104008X
5. Рудакова СА, Теслова ОЕ, Муталинова НЕ, Пеньевская НА, Блох АИ, Рудаков НВ, и др. 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
6. Gern L, Humair P. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control.* J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (Eds.). CAB International, Oxford, 2002;149-174. DOI: 10.1079/9780851996325.0149
7. Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskii YuV. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control.* J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (Eds.). CAB International, Oxford, 2002;175-200. DOI: 10.1079/9780851996325.01

8. Балашов ЮС. Паразитизм клещей и насекомых на наземных позвоночных. СПб.: Наука, 2009.
9. Громов ИМ. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: ЗИН, 1995.
10. Лисовский АА (ред.). Млекопитающие России: список видов и прикладные аспекты. М.: Т-во научн. изданий КМК, 2019.
11. Margos G, Wilske B, Sing A, Hizo-Teufel C, Cao WC, Chu C, et al. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Nov;63(Pt 11):4284–4288. DOI: 10.1099/ijs.0.052001-0
12. Margos G, Fingerle V, Reynolds SE. *Borrelia bavariensis*: Vector Switch, Niche Invasion, and Geographical Spread of a Tick-Borne Bacterial Parasite. *Front Ecol Evol.* 2019;7:401. DOI: 10.3389/fevo.2019.00401
13. Samuels DS, Radolf JD. *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis.* Caister Academic Press: Poole, UK, 2010;299–331.
14. Coburn J, Cugini C. Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin alphavbeta3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Jun 10;100(12):7301–6. DOI: 10.1073/pnas.1131117100
15. Curtis MW, Fierros CH, Hahn BL, Surdel MC, Kessler J, Anderson PN, et al. Identification of amino acid domains of *Borrelia burgdorferi* P66 that are surface exposed and important for localization, oligomerization, and porin function of the protein. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Sep 23;12:991689. DOI: 10.3389/fcimb.2022.991689
16. Tan X, Castellanos M, Chaconas G. Choreography of Lyme Disease Spirochete Adhesins To Promote Vascular Escape. *Microbiol Spectr.* 2023 Aug 17;11(4):e0125423. DOI: 10.1128/spectrum.01254-23
17. Коренберг ЭИ, Воробьева НН, Сумливая ОН, Фризен ВИ, Афанасьева МВ. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в Пермском крае (этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение и профилактика). Методические рекомендации для врачей. Пермь, 2007.
18. Golidonova K, Korenberg E, Krupinskaya E, Matrosova V, Gintzburg A. Allelic Variants of *P66* Gene in *Borrelia bavariensis* Isolates from Patients with Ixodid Tick-Borne Borreliosis. *Microorganisms.* 2022 Dec 19;10(12):2509. DOI: 10.3390/microorganisms10122509
19. Неведова ВВ, Коренберг ЭИ, Горелова НБ, Ковалевский ЮВ. Генетическая гетерогенность *Borrelia garinii* в природном очаге Среднего Урала. *Бюллетень ВШЦ СО РАМН.* 2007;55(3):139–142.
20. Korenberg EI, Nefedova VV, Fadeeva IA, Gorelova NB. Genotyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. *Molecular Biology of Spirochetes.* F.C. Cabello, D. Hulinska and H.P. Godfrey (Eds.). IOS Press. Amsterdam, 2006;174–199.
21. Gorelova NB, Korenberg EI, Kovalevskii YV, Shcherbakov SV. Small mammals as reservoir hosts for *Borrelia* in Russia. *Zentralbl Bakteriol.* 1995 Apr;282(3):315–22. DOI: 10.1016/S0934-8840(11)80132-5
22. Тупилова НВ, Сидорова ГА, Коновалова ЭА. Определитель возраста лесных полевков. *Материалы к познанию фауны и флоры СССР.* 1970;45(60):160–167.
23. Ornstein K, Ostberg Y, Bunikis J, Noppa L, Berglund J, Norrby R, et al. 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 Nov;9(6):1382–4. DOI: 10.1128/cdli.9.6.1382-1384.2002
24. Humair PF, Turrian N, Aeschlimann A, Gern L. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol (Praha).* 1993;40(1):65–70.
25. Башенина НВ (ред.). Европейская рыжая полевка. М.: Наука, 1981.
26. Коренберг ЭИ, Ананьина ЮВ, Горелова НБ, Савельева ОВ, Ковалевский ЮВ, Петров ЕМ. Южнаторежные сочетанные природные очаги спирохетозов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2011 Сен-Окт;(5):27–30.
27. Ковалевский ЮВ, Коренберг ЭИ, Горелова НБ. Многолетняя динамика эпизоотического процесса природных очагов иксодовых клещевых боррелиозов в горнотажных лесах Среднего Урала. *Паразитология.* 2004;38(2):105–121.
28. Grigoryeva LA, Miteva OA, Samoylova EP. Parasitic system *Ixodes persulcatus* (Ixodidae) – *Borrelia garinii* – small mammals in the northwest of Russia. *Proceedings of the Zoological Institute RAS.* 2024;328(2):308–322. DOI: 10.31610/trudyzin/2024.328.2.308
29. Bunikis J, Garpmo U, Tsao J, Berglund J, Fish D, Barbour AG. Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology (Reading).* 2004 Jun;150(Pt 6):1741–1755. DOI: 10.1099/mic.0.26944-0
30. Фадеева ИА, Коренберг ЭИ, Андрейчук ЮВ, Марков АЛ, Горелова НБ. Аллельные варианты *Borrelia afzelii*, выявленные на основании секвенирования хромосомного гена р66. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2006;(2):33–36.
31. Hao Q, Liu HX, Hou XX, Zhang L, Yang XN, Wan KL. Polymorphism of P66 in *Borrelia burgdorferi* Strains in China. *Biomed Environ Sci.* 2021 May 20;34(5):364–371. DOI: 10.3967/bes2021.048
32. Coipan CE, van Duijvendijk GLA, Hofmeester TR, Takumi K, Sprong H. The genetic diversity of *Borrelia afzelii* is not maintained by the diversity of the rodent hosts. *Parasites Vectors* 2018;(11):454. DOI: 10.1186/s13071-018-3006-2
33. Voordouw MJ, Lachish S, Dolan MC. The Lyme disease pathogen has no effect on the survival of its rodent reservoir host. *PLoS One.* 2015 Feb 17;10(2):e0118265. DOI: 10.1371/journal.pone.0118265
34. Sipari S, Hytönen J, Pietikäinen A, Mappes T, Kallio ER. The effects of *Borrelia* infection on its wintering rodent host. *Oecologia.* 2022 Dec;200(3–4):471–478. DOI: 10.1007/s00442-022-05272-y
35. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskii YV. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia Parasitol (Praha).* 2004 Mar;51(1):67–71. DOI: 10.14411/fp.2004.010
36. Rolland L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013 Feb;4(1–2):46–51. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.06.008

References

1. Korenberg EI, Pomelova VG, Osin NS. *Prirodnocochagovye infekcii, peredayushchiesya iksodovymi kleshchami.* Moscow: Kommentarij, 2013. (In Russian).
2. Hunfeld K-P, Gray J. *Lyme Borreliosis.* Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022.
3. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB. Multilocus Sequence Analysis of “Atypical” *Borrelia burgdorferi* sensu lato Isolated in Russia. *Mol Gen Mikrobiol Virol.* 2017;32:196–203. DOI: 10.3103/S0891416817040073
4. Golidonova KA, Korenberg EI, Gorelova NB, Gintzburg AL. Multilocus Sequence Analysis of Isolates from Patients with the Erythemic Form of Ixodid Tick-Borne Borreliosis. *Mol Gen Microbiol Virol.* 2021;36:170–175. DOI: 10.3103/S089141682104008X
5. Rudakova SA, Teslova OE, Mutalynova NE, Pen’evskaya NA, Blokh AI, Rudakov NV, et al. Review of the Epidemiological Situation on Ixodic Tick-Borne Borreliosis in the Russian Federation in 2013–2022 and Forecast for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2023;2:75–87. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-75-87 (In Russian).
6. Gern L, Humair P. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control.* J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (Eds.). CAB International, Oxford, 2002;149–174. DOI: 10.1079/9780851996325.0149
7. Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskii YuV. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control.* J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane and G. Stanek (Eds.). CAB International, Oxford, 2002;175–200. DOI: 10.1079/9780851996325.0175

8. Balashov YuS. Parazitizm kleshchej i nasekomyh na nazemnyh pozvonochnyh. Saint Petersburg: Nauka, 2009. (In Russian).
9. Gromov IM. Mlekopitayushchie fauny Rossii i sopredel'nyh territorij. Zajceobraznye i gryzuny. Saint Petersburg: ZIN, 1995. (In Russian).
10. Lisovsky AA (Eds). The Mammals of Russia: species list and applied issues. Moscow: KMK Sci. Press, 2019. (In Russian).
11. Margos G, Wilske B, Sing A, Hizo-Teufel C, Cao WC, Chu C, et al. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Nov;63(Pt 11):4284-4288. DOI: 10.1099/ijs.0.052001-0
12. Margos G, Fingerle V, Reynolds SE. *Borrelia bavariensis*: Vector Switch, Niche Invasion, and Geographical Spread of a Tick-Borne Bacterial Parasite. *Front Ecol Evol.* 2019;7:401. DOI: 10.3389/fevo.2019.00401
13. Samuels DS, Radolf JD. *Borrelia*: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis. Caister Academic Press: Poole, UK, 2010;299-331.
14. Coburn J, Cugini C. Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin alphavbeta3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Jun 10;100(12):7301-6. DOI: 10.1073/pnas.1131117100
15. Curtis MW, Fierros CH, Hahn BL, Surdel MC, Kessler J, Anderson PN, et al. Identification of amino acid domains of *Borrelia burgdorferi* P66 that are surface exposed and important for localization, oligomerization, and porin function of the protein. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Sep 23;12:991689. DOI: 10.3389/fcimb.2022.991689
16. Tan X, Castellanos M, Chaconas G. Choreography of Lyme Disease Spirochete Adhesins To Promote Vascular Escape. *Microbiol Spectr.* 2023 Aug 17;11(4):e0125423. DOI: 10.1128/spectrum.01254-23
17. Korenberg EI, Vorob'eva NN, Sumlivaya ON, Frizen VI, Afanas'eva MV. Infekcii, peredayushchiesya iksovovymi kleshchami, v Permskom krae (etiologiya, epidemiologiya, patogenez, klinika, diagnostika, lechenie i profilaktika). Metodicheskie rekomendacii dlya vrachej. Perm', 2007. (In Russian).
18. Golidonova K, Korenberg E, Krupinskaya E, Matrosova V, Gintsburg A. Allelic Variants of P66 Gene in *Borrelia bavariensis* Isolates from Patients with Ixodid Tick-Borne Borreliosis. *Microorganisms.* 2022 Dec 19;10(12):2509. DOI: 10.3390/microorganisms10122509
19. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskij YuV. Geneticheskaya geterogenost' *Borrelia garinii* v prirodnom ochage Srednego Urala. *Byulleten' VSNC SO RAMN.* 2007;55(3):139-142. (In Russian).
20. Korenberg EI, Nefedova VV, Fadeeva IA, Gorelova NB. Genotyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. *Molecular Biology of Spirochetes.* F.C. Cabello, D. Hulinska and H.P. Godfrey (Eds.). IOS Press. Amsterdam, 2006;174-199.
21. Gorelova NB, Korenberg EI, Kovalevskii YV, Shcherbakov SV. Small mammals as reservoir hosts for *Borrelia* in Russia. *Zentralbl Bakteriol.* 1995 Apr;282(3):315-22. DOI: 10.1016/s0934-8840(11)80132-5
22. Tupikova NV, Sidorova GA, Konovalova EA. Opredelitel' vozrasta lesnyh polevok. *Materialy k poznaniyu fauny i flory SSSR.* 1970;45(60):160-167. (In Russian).
23. Ornstein K, Ostberg Y, Bunikis J, Noppa L, Berglund J, Norrby R, et al. 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 Nov;9(6):1382-4. DOI: 10.1128/cdli.9.6.1382-1384.2002
24. Humair PF, Turrian N, Aeschlimann A, Gern L. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol (Praha).* 1993;40(1):65-70.
25. Bashenina NV (red.). *Evropejskaya ryzhaya polevka.* Moscow: 'Nauka' Publ., 1981. (In Russian).
26. Korenberg EI, Anan'ina IuV, Gorelova NB, Savel'eva OV, Kovalevskii IuV, Petrov EM. Yuzhnatoezhnye sochetannye prirodnye ochagi spirochetozov. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2011 Sep-Oct;(5):27-30. (In Russian).
27. Kovalevskij YuV, Korenberg EI, Gorelova NB. Mnogoletnyaya dinamika epizooticheskogo processa prirodnyh ochagov iksovovyh kleshchevyh borreliozov v gornotaezhnyh leash Srednego Urala. *Parazitologiya.* 2004;38(2):105-121. (In Russian).
28. Grigoryeva LA, Miteva OA, Samoylova EP. Parasitic system *Ixodes persulcatus* (Ixodidae) – *Borrelia garinii* – small mammals in the northwest of Russia. *Proceedings of the Zoological Institute RAS.* 2024;328(2):308-322. DOI: 10.31610/trudyzin/2024.328.2.308. (In Russian).
29. Bunikis J, Garpmo U, Tsao J, Berglund J, Fish D, Barbour AG. Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology (Reading).* 2004 Jun;150(Pt 6):1741-1755. DOI: 10.1099/mic.0.26944-0
30. Fadeeva IA, Korenberg EI, Andreichuklu V, Markov AL, Gorelova NB. Allele variants of *Borrelia afzelii* found by sequencing of the chromosome gene *p66*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 2006;(2):33-6. (In Russian).
31. Hao Q, Liu HX, Hou XX, Zhang L, Yang XN, Wan KL. Polymorphism of P66 in *Borrelia burgdorferi* Strains in China. *Biomed Environ Sci.* 2021 May 20;34(5):364-371. DOI: 10.3967/bes2021.048
32. Coipan CE, van Duijvendijk GLA, Hofmeester TR, Takumi K, Sprong H. The genetic diversity of *Borrelia afzelii* is not maintained by the diversity of the rodent hosts. *Parasites Vectors* 2018;(11):454. DOI: 10.1186/s13071-018-3006-2
33. Voordouw MJ, Lachish S, Dolan MC. The Lyme disease pathogen has no effect on the survival of its rodent reservoir host. *PLoS One.* 2015 Feb 17;10(2):e0118265. DOI: 10.1371/journal.pone.0118265
34. Sipari S, Hytönen J, Pietikäinen A, Mappes T, Kallio ER. The effects of *Borrelia* infection on its wintering rodent host. *Oecologia.* 2022 Dec;200(3-4):471-478. DOI: 10.1007/s00442-022-05272-y
35. Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskii YV. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia Parasitol (Praha).* 2004 Mar;51(1):67-71. DOI: 10.14411/fp.2004.010
36. Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013 Feb;4(1-2):46-51. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.06.008

Информация о соавторах:

Коренберг Эдуард Исаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России

Ковалевский Юрий Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России

Горелова Наталия Борисовна, научный сотрудник лаборатории переносчиков инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России

Матросова Вера Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта» РАН

Information about co-authors:

Eduard I. Korenberg, PhD, DSc (Biological Sciences), professor, principal researcher of Laboratory of Infection Vectors, N.F.Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation

Yurii V. Kovalevskii, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of Laboratory of Infection Vectors; N.F.Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation

Natalia B. Gorelova, Researcher of Laboratory of Infection Vectors; N.F.Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation

Vera A. Matrosova, PhD in Biological Sciences, Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology