

На правах рукописи

НОСОВ Никита Юрьевич

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ *Yersinia pestis*
СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА**

03.02.03 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Саратов – 2017

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: доктор биологических наук, старший научный сотрудник
Ерошенко Галина Александровна

Официальные оппоненты: **Кацы Елена Ильинична** - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук, заведующая лабораторией генетики микроорганизмов

Липницкий Анатолий Васильевич - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник лаборатории особо опасных микозов

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «25» мая 2017 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (410005 г. Саратов, ул. Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert/> ФКУЗ «Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб»

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Слудский Александр Аркадьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности проблемы

Чума – особо опасная природно-очаговая инфекционная болезнь, которая представляет серьезную угрозу для населения и способна привести к возникновению чрезвычайных ситуаций в области общественного здравоохранения, имеющих международное значение [Кутырев, Попова, 2016]. В Российской Федерации, других странах СНГ и ближнего зарубежья расположено 45 природных очагов чумы, во многих из которых постоянно регистрируется эпизоотическая активность. Растет активность природных очагов чумы в Сибири, что соответствует прогнозу по эпизоотической ситуации в природных очагах чумы России [Кутырев и др., 2014; 2015; Попов и др., 2013; 2016]. В 2014-2016 гг. впервые после 35-летнего отсутствия чумы в РФ в Горно-Алтайском высокогорном очаге зарегистрировано три случая заражения чумой человека [Кутырев и др., 2014; Балахонов и др., 2015; 2016; Попова и др., 2016]. Увеличивается миграция населения из неблагополучных по чуме регионов стран ближнего и дальнего зарубежья, что приводит к росту риска заноса возбудителя в РФ. В связи с этими фактами проблема совершенствования современных средств диагностики и идентификации возбудителя чумы в целях повышения эффективности эпидемического надзора и санитарной охраны границ России и стран СНГ приобретает особую актуальность.

В очагах чумы в России, других странах СНГ, ближнего зарубежья и в очагах Евразии широко распространены штаммы *Y. pestis* основного подвида античного и средневекового биоваров. Наибольшее распространение имеют штаммы средневекового биовара, которые циркулируют в 7 из 11 очагов РФ и в большинстве очагов стран СНГ [Павлова и др., 2012; Ерошенко и др., 2014]. Штаммы средневекового биовара также встречаются в очагах Ирана, Китая [Li et al., 2009; Morelli et al., 2010; Cui et al., 2013; Shahraki et al., 2016]. Они распространены в биоценозах различных ландшафтно-географических зон в очагах степного, горного, высокогорного, полупустынного и пустынного типов. Штаммы средневекового биовара – высоковирулентны и эпидемически значимы. Они вызвали большие эпидемии чумы с высоким уровнем летальности в Поволжье в начале 20 века. Их также считают этиологическим агентом второй пандемии чумы, которая в период «Черной Смерти» (1330-1347 гг.) унесла более трети населения Европы. По данным полногеномного анализа штаммы средневекового биовара – эволюционно молодая и генетически мономорфная группа штаммов, дифференциация которых по географическому и очаговому принципу является трудной задачей. В литературе представлено незначительное число работ, связанных с исследованием штаммов *Y. pestis* средневекового биовара. В международные генетические базы данных включены геномы лишь нескольких штаммов средневекового биовара, а также в целом небольшое число геномов штаммов *Y. pestis* других биоваров и подвидов, выделенных в России и других странах СНГ. Представленные в зарубежных публикациях данные по филогении штаммов средневекового биовара являются далеко не полными из-за отсутствия в них сведений о штаммах из природных очагов РФ и сопредельных государств. Без таких данных невозможен

анализ современной популяционной структуры и направлений эволюции штаммов средневекового биовара.

Решение проблемы дифференциации штаммов средневекового биовара от штаммов других биоваров и подвидов, а также внутрибиоварной дифференциации средневековых штаммов важно прежде всего с практической точки зрения. Разделение штаммов, отличающихся по вирулентности, по географическому региону и очагу происхождения, необходимо для проведения молекулярной экспертизы вспышек или отдельных случаев чумы. Ранее был разработан способ дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара от штаммов других биоваров и подвидов, а также способ разделения типичных и атипичных штаммов этого биовара [Ерошенко и др., 2013; Оглодин и др., 2015]. Однако не разработаны способы, позволяющие проводить дифференциацию штаммов средневекового биовара по филогенетической и географической (очаговой) принадлежности ввиду отсутствия эффективных ДНК мишеней, обеспечивающих такое разделение. Осуществленное в последнее время в РосНИПЧИ «Микроб» полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* из очагов РФ и стран СНГ позволяет решать задачи по анализу популяционной структуры средневекового биовара, а также по поиску ДНК мишеней (маркерные indel мутаций, SNPs) для разработки способов дифференциации средневековых штаммов на новом уровне.

В связи с высокой вирулентностью и эпидемической значимостью штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, их широким распространением на территории стран СНГ и сопредельных государств очевидна актуальность исследования этих штаммов.

Цель исследования: филогенетический анализ и разработка способов дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы Российской Федерации, других стран СНГ и ближнего зарубежья.

Задачи исследования:

1. Выбор штаммов *Y. pestis* средневекового биовара для получения полногеномных последовательностей, референтных для очагов РФ и стран СНГ. Проведение полногеномного секвенирования этих штаммов.
2. Разработка алгоритма биоинформационного анализа полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis*.
3. Анализ современной популяционной структуры штаммов средневекового биовара возбудителя чумы. Определение филогенетических связей средневековых штаммов из очагов РФ и других стран СНГ со штаммами из других регионов.
4. Выявление ДНК мишеней (indel мутации и SNPs) и разработка способов внутрибиоварной дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара по филогенетической и очаговой принадлежности методами ПЦР - и SNP типирования.
5. Разработка способа очаговой дифференциации штаммов средневекового биовара методом мультилокусного анализа переменного числа tandemных повторов MLVA25. Создание базы данных MLVA25 генотипов штаммов *Y. pestis* из очагов стран СНГ.

Научная новизна исследования. По данным проведенного полногеномного секвенирования 46 штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы РФ, других стран СНГ и ближнего зарубежья, а также полногеномных последовательностей зарубежных штаммов, представленных в базе данных NCBI GenBank, определена современная популяционная структура средневекового биовара возбудителя чумы. Штаммы средневекового биовара широко распространены в очагах чумы в РФ и СНГ, а также в Монголии. Установлено, что все эти штаммы принадлежат к ветви 2.MED1 средневекового биовара, за исключением штаммов ветви 2.MED0 из Центрально-Кавказского высокогорного очага в РФ. В составе филогенетической ветви 2.MED1 выявлено наличие двух основных ветвей: Кавказско-Каспийской и Среднеазиатско-Китайской, соответствующих регионам распространения средневековых штаммов. Разработан алгоритм биоинформационного анализа полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* с использованием программ Wombac 2.0, MEGA 7.0, RAUP 4.0, PhyML 3.1, FigTree 1.4.3. При сравнении полногеномных последовательностей секвенированных штаммов средневекового биовара выявлены две делеции размером 33 т.п.н. и 73 п.н., маркерные для филогенетических ветвей 2.MED1 и .MED3 соответственно. С их использованием впервые разработан способ дифференциации средневековых штаммов по принадлежности к филогенетическим ветвям 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов. Впервые найдены SNPs, маркерные для штаммов *Y. pestis* из 5 природных очагов чумы РФ - Центрально-Кавказского высокогорного, Прикаспийского песчаного, Волго-Уральского песчаного, Волго-Уральского степного, Терско-Сунженского низкогорного. Разработан способ определения принадлежности штаммов *Y. pestis* средневекового биовара к пяти природным очагам чумы в РФ с помощью метода SNP типирования на основе найденных SNPs. Получены MLVA25 генотипы штаммов *Y. pestis* из 32 очагов РФ и других стран СНГ. В программе Bionumerics 7.6 создана база данных MLVA25 генотипов 54 штаммов, позволяющая устанавливать очаговую принадлежность штаммов *Y. pestis*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Штаммы *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы Российской Федерации и стран СНГ по данным полногеномного SNP анализа с применением разработанного биоинформационного алгоритма относятся к филогенетической ветви 2.MED1, которая делится на Кавказско-Каспийскую и Среднеазиатско-Китайскую ветви в соответствии с регионами распространения.
2. Найденные ДНК мишени, содержащие мутации в 33 т.п.н. и 73 п.н., маркерные SNPs, и разработанные способы дифференциации на основе методов ПЦР и SNP типирования обеспечивают определение принадлежности штаммов *Y. pestis* средневекового биовара к филогенетическим ветвям 2.MED1, 2.MED2, 2MED3, а также к пяти природным очагам чумы в Российской Федерации.
3. Полученные MLVA25 генотипы и созданная база данных MLVA25 генотипов из 10 природных очагов России и 22 очагов других стран СНГ позволяют проводить дифферен-

циацию штаммов *Y. pestis* по принадлежности к подвидам, биоварам и популяциям из отдельных природных очагов.

Теоретическая и практическая значимость

Определена современная популяционная структура штаммов *Y. pestis* средневекового биовара. Впервые установлена принадлежность средневековых штаммов из природных очагов РФ и очагов стран СНГ к филогенетической ветви 2.MED1 и наличие в ней Кавказско-Каспийской и Среднеазиатско-Китайской ветвей средневековых штаммов. Выявлены отличия в организации геномов средневековых штаммов. Полученные знания открывают перспективу для исследования направлений эволюции штаммов *Y. pestis* средневекового биовара и преобразований их генома, связанных с адаптацией к существованию в условиях различных биоценозов природных очагов чумы в ландшафтах степей, полупустынь и пустынь, исторических путей формирования современных границ распространения штаммов средневекового биовара.

Разработаны способы: ПЦР типирования штаммов разных филогенетических ветвей; способ SNP типирования штаммов из пяти природных очагов России. Создана база данных MLVA25 генотипов штаммов *Y. pestis* из 32 очагов стран СНГ и алгоритм определения очаговой принадлежности штаммов возбудителя чумы. Разработан эффективный биоинформационный алгоритм анализа данных полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis*. Разработанные способы дифференциации штаммов средневекового биовара с помощью методов ПЦР - SNP -, MLVA25 анализа и полногеномного секвенирования могут быть использованы для повышения эффективности эпидемиологического мониторинга, проводимого в очагах РФ и стран СНГ. По материалам работы составлены и утверждены двое методических рекомендаций: «Определение подвидовой, биоварной и очаговой принадлежности штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов России и сопредельных стран СНГ методом MLVA25 анализа», одобрены Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» 8.12.2015, протокол № 6 и утверждены директором института; «Алгоритм построения филогенетических деревьев штаммов *Yersinia pestis* по данным полногеномного SNP анализа», одобрены Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» 4.10.2016, протокол № 4 и утверждены директором института. В базу данных NCBI GenBank депонированы полногеномные последовательности 12 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из очагов РФ и других стран СНГ. Полученные данные включены в лекции курсов специализации «Бактериология. Основы безопасности работы с патогенными биологическими агентами I-II группы патогенности», курсов «ПЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов» при РосНИПЧИ «Микроб», а также в материалы монографии «Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья с 1876 по 2016 гг.» / Под ред. В. В. Кутырева, А. Ю. Поповой. - Саратов, 2016. - 223 с.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования
Работа выполнена в лаборатории молекулярной микробиологии в рамках 2-х плановых научно-исследовательских тем «Комплексный эколого-эволюционный анализ штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов Российской Федерации и сопредельных стран» 2014-2016 гг. (шифр темы

50-3-14, № гос. регистрации 0120.1450347), «Полногеномное секвенирование референтных последовательностей и совершенствование молекулярной идентификации штаммов возбудителя чумы из очагов Российской Федерации и сопредельных государств» 2016-2018 гг. (шифр темы 65-3-16, № гос. регистрации (AAAA-A16-116112810061-0).

Личный вклад автора состоит в анализе литературы, планировании экспериментов, непосредственном участии в получении и обработке экспериментальных данных, разработке методических подходов биоинформационного анализа полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis*, поиску ДНК мишеней для проведения внутрибиоварной дифференциации средневековых штаммов по филогенетической и очаговой принадлежности методами ПЦР – и SNP анализа. Автором лично получены MLVA25 генотипы штаммов *Y. pestis* из очагов чумы РФ и сопредельных государств, и создана база данных MLVA25 генотипов. Работу по полногеномному секвенированию штаммов выполняли совместно с заведующим лабораторией геномного и протеомного анализа к.х.н. Я.М. Красновым.

Степень достоверности и апробация работы. Степень достоверности полученных результатов основана на использовании большого фактического материала, полученного на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании с использованием современных научных методов. Все данные получены в повторяющихся экспериментах.

Материалы диссертации прошли апробацию на ряде Российских и зарубежных конференций и съездов: 2-ой Всероссийской научно-практической конференции «Микробиология в современной медицине» (Казань, 26 апреля 2014), научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (Москва, 18-20 марта 2014 г.); 2-ом Всероссийском семинаре памяти профессора Ю.П. Волкова «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения» (Саратов, 16-18 декабря 2015 г.); XII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года» (Саратов, 1-2 ноября 2016 г.); 12-ом Международном симпозиуме по иерсиниям (Тбилиси, Грузия, 25-28 октября 2016 г.); на итоговых конференциях РосНИПЧИ «Микроб» (2014- 2016 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 4 – в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России».

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 130 страницах текста, состоит из введения, главы обзора литературы, четырех глав собственных исследований (в том числе, одной главы с описанием материалов и методов), заключения и выводов. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 15 рисунками. Библиографический указатель содержит 158 отечественных и зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Представлен анализ публикаций отечественных и зарубежных авторов по исследованию современной популяционной структуры и глобальной филогении возбудителя чумы, организации его генома, методах молекулярного типирования штаммов *Y. pestis*.

Методология и методы исследования. Методологию работы определяли соответственно поставленной цели и задачам исследования. Применительно к проблематике диссертации использовали: микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические, биоинформационные методы исследования. В работе использовано 142 штамма *Y. pestis*, преимущественно из очагов РФ, стран СНГ и ближнего зарубежья, в том числе 87 штаммов средневекового биовара. Выращивание штаммов проводили в LB бульоне и на LB агаре (рН 7,2) в течение 24-48 часов при 28°C и 37°C. Анализ дифференциальных биохимических свойств штаммов по ферментации рамнозы, глицерина, по денитрифицирующей активности выполняли с помощью традиционных методов лабораторной диагностики возбудителя чумы [Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней». 2013]. Выделение ДНК штаммов проводили набором «АхуПреп (AXYGEN Biosciences)». Сравнение секвенированных геномов штаммов осуществляли с помощью программ Mauve 2.3.1, Mega 7.0. Секвенирование участков генома бактерий выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems). Для полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis* использовали систему Ion PGM (Life technologies). Полногеномный SNP анализ выполняли в программе Wombac 2.0, построение филогенетических деревьев проводили в программе PhyML 3.1. Для визуализации дендрограмм использовали FigTree 1.4.3. Расчет праймеров для ПЦР выполняли с помощью программы Ugene 1.26.1. Базу данных MLVA25 генотипов исследуемых штаммов создавали в программе Bionumerics 7.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1 Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов России, других стран СНГ и ближнего зарубежья

Выбор штаммов *Y. pestis* средневекового биовара для получения полногеномных последовательностей, референтных для очагов РФ и стран СНГ. Вначале исследований был проведен отбор штаммов *Y. pestis* средневекового биовара с типичными свойствами из очагов РФ и стран СНГ для получения полногеномных последовательностей, референтных для этих очагов. Штаммы имели типичные культурально-морфологические свойства и характерные для средневековых штаммов биохимические особенности – отсутствие способности к редукции нитратов и к ферментации рамнозы при наличии способности к ферментации глицерина и арабинозы. Предпочтение отдавалось штаммам, полученным в последние годы от основных носителей в очаге или переносчиков. Для каждого природного очага было выбрано по одному или нескольким штаммам. Всего отобрано 46 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, для которых были получены полногеномные последовательности. В их числе были секвенированы также геномы средневековых штаммов, выделенных в начале века (1910-1932 гг.) во время больших эпидемий чумы в Поволжье.

Разработка биоинформационного алгоритма для исследования филогении *Y. pestis* на основе полногеномного SNP анализа. Для проведения эффективного филогенетического анализа штаммов *Y. pestis* по данным полногеномного SNP анализа разработан алгоритм построения филогенетических деревьев, включающий 4 основные этапа: проведение полногеномного SNP анализа, удаление SNPs в областях гомоплазии генома *Y. pestis*, проведение филогенетического анализа, визуализацию результатов. Для анализа SNPs в полной последовательности генома выбрана программа Wombac 2.0 на основе операционной системы Biolinux 8.0, которая позволяет проводить точный и быстрый анализ в сочетании с удобством ее использования. Эта программа создает файлы, содержащие выровненные SNP профили исследуемых штаммов, а также таблицу с указанием всех найденных нуклеотидных замен с их координатами по геному штамма, выбранного в качестве референтного. Полученные файлы используют на втором этапе, на котором проводят исключение из анализа 28 SNPs, расположенных в областях гомоплазий генома *Y. pestis* с применением программы MEGA 7.0. Отредактированные SNP профили штаммов переводят в формат программы Phylip при помощи программы RAUP 4.0 для их дальнейшего филогенетического анализа. На третьем этапе выполняется филогенетический анализ сравниваемых штаммов с использованием метода максимального правдоподобия Maximum Likelihood в программе PhyML 3.1. В качестве модели нуклеотидных замен выбрана 5-параметрическая модель HKY85 [Hasegawa et al., 1985]. Значение параметра бустрэп-анализа задают равным 300. В итоге получают файл в формате *txt*, содержащий информацию по филогенетическому анализу штаммов. На заключительном этапе проводят визуализацию текстового файла в виде дендрограммы в программе FigTree 1.4.3. Разработанный алгоритм является достаточно простым и эффективным, основан на использовании находящихся в открытом доступе и бесплатных программ, удобных в использовании. Мы рекомендуем применение этого алгоритма для специалистов противочумных учреждений в целях стандартизации и воспроизводимости получаемых в разных лабораториях результатов.

Современная популяционная структура *Y. pestis*. Разработанный биоинформационный алгоритм был использован для анализа современной популяционной структуры вида *Y. pestis* с учетом данных полногеномного секвенирования штаммов из очагов РФ, других стран СНГ и ближнего зарубежья. Был проведен полногеномный SNP анализ 165 штаммов различного происхождения, включая 98 штаммов из очагов РФ и других стран СНГ, секвенированных в РосНИПЧИ «Микроб», а также штаммов зарубежного происхождения, геномы которых содержатся в базе данных NCBI GenBank. В результате анализа этих штаммов выявлено 2046 полиморфных SNPs, которые были использованы для построения дендрограммы глобальной филогении *Y. pestis*. Построенная дендрограмма отражает современную популяционную структуру вида *Y. pestis* и включает 6 отдельных филогенетических линий эволюции. Наиболее древние из них представлены штаммами неосновных подвидов, включая штаммы линии O.PE7 из Тибета в Китае, штаммы кавказского подвида линии O.PE2 из очагов Кавказа и единственный штамм Анголы из Африки линии O.PE3. В одну филогенетическую линию O.PE4 объединились штаммы алтайского и гиссарского подвида, таласские штаммы из Кыргызстана и штаммы *microtus* из Ки-

тая. Наиболее молодую ветвь неосновных подвидов составили штаммы улегейского подвида из Монголии, которую мы предлагаем обозначить как 0.PE9. Все штаммы основного подвида, относящиеся к филогенетическим линиям 0.ANT, 1.ANT, 1.ORI/1INT, 3.ANT, 4.ANT, 2.ANT, 2 MED объединились в один кластер близкородственных штаммов, что подтверждает правильность отнесения этих штаммов к одному подвиду.

На основании выявленной популяционной структуры штаммов *Y. pestis* мы предлагаем усовершенствованную внутривидовую классификацию современных штаммов возбудителя чумы, в которой наряду с выделением таких подвидов, как *ssp. pestis* (биовары античный, средневековый, восточный, возможно также *intermedium*), *ssp. central asiatica* (центральноазиатский - биовары алтайский, *microtus*, гиссарский с включением таласских штаммов), *ssp. caucasica* (кавказский), *ssp. ulegeica* (улегейский) и *ssp. angolica* (ангольский), мы предлагаем выделение нового подвида *ssp. tibetica* (тибетский), представленного наиболее древними из сохранившихся штаммов *Y. pestis*, циркулирующих на территории Тибета в Китае, и лежащими в основании филогенетического дерева *Y. pestis*.

Анализ популяционной структуры средневекового биовара. Для определения современной популяционной структуры средневекового биовара с учетом штаммов *Y. pestis* из очагов чумы РФ, других стран СНГ и ближнего зарубежья использованы полногеномные последовательности 71 штамма средневекового биовара, в том числе 46 штаммов из очагов стран СНГ. Методом полногеномного SNP анализа определена филогения и современная популяционная структура штаммов *Y. pestis* средневекового биовара. Из дендрограммы на рисунке 1 видно, что, несмотря на генетическую однородность линии 2.MED, она четко делится на отдельные филогенетические ветви: 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3.

Из дендрограммы следует, что наиболее древней ветвью эволюции средневекового биовара являются штаммы 2.MED0 из Центрально-Кавказского высокогорного очага в РФ, которые представлены на рисунке штаммом *Y. pestis* C-627, лежащим в основании дендрограммы. Далее от общего ствола эволюции отходят штаммы ветвей 2.MED2 и 2.MED3. Кластеры штаммов тесно сгруппированы, что говорит о близкородственности этих штаммов, циркулирующих в некоторых очагах Китая. Наиболее молодой и разнообразной ветвью средневекового биовара является ветвь 2.MED1, штаммы которой, как впервые установлено нами в этом исследовании, широко распространены в очагах чумы на территориях РФ, Казахстана, Кыргызстана, Узбекистана, Туркмении, Грузии, Азербайджана в очагах степного, пустынного, высокогорного и низкогорного типов. Эти штаммы также циркулируют в очагах Монголии, Индии, Ирана и Китая. Хотя штаммы этой ветви также достаточно мономорфны, с помощью разработанного биоинформационного алгоритма удалось выделить кластеры штаммов, составляющие популяционную структуру этой филогенетической ветви. Все исследованные штаммы 2.MED1 разделились на две основные группы согласно географическим регионам своего происхождения – Среднеазиатско-Китайскую и Кавказско-Каспийскую. Отдельно на дендрограмме расположились штаммы, выделенные в природных очагах Прикаспия в начале 20 века во время произошедших здесь больших эпидемий чумы.

Штаммы первой, Среднеазиатско-Китайской группы циркулируют в природных очагах Казахстана, Узбекистана, Туркменистана, Кыргызстана и Китая. В состав группы входят 3 кластера штаммов (рис. 1). Первый из них представлен изолятами из Северо-Приаральского (244), Кызылкумского (А-1825), Каракумского (816) и Приаральско-Каракумского (А-1763) пустынных очагов, расположенных в районе Аральского моря. Второй кластер образован штаммами из Прибалхашского пустынного (А-1920) и Таласского (А-1809) высокогорного очагов в Казахстане и Кыргызстане, а третий – штаммами из Китая (2501, 2504, 2506 и 2654). Штаммы второго и третьего кластеров более близки друг другу, что связано с их близким территориальным расположением – вдоль границы Китая с обеих сторон. Отдельно на дендрограмме расположились штаммы *Y. pestis* М-1524 из Муюнкумского пустынного очага и *Y. pestis* 139 из Таукумского пустынного очага.



Рисунок 1 – Филогения и популяционная структура средневекового биовара (2.MED) по данным полногеномного SNP анализа 46 штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы РФ и сопредельных государств (метод Maximum Likelihood с моделью замен НКУ при помощи программы PhyML 3.1).

Вторая группа филогенетической ветви 2.MED1 – Кавказско-Каспийская также состоит преимущественно из 3 кластеров штаммов *Y. pestis* (рис. 1, 2). Кавказско-Каспийская группа включает кластер средневековых штаммов из очагов Кавказа и Предкавказья, кластер современных штаммов из очагов Прикаспия и кластер штаммов, выделенных в очагах Прикаспия в начале 20 века. Кавказская группа представлена двумя кластерами штаммов. Первый из них образован изолятами из Центрально-Кавказского высокогорного (KM918), Терско-Сунженского низкогорного (1116 Д) и Приараксинского низкогорного (805) очагов, второй кластер – штаммами из Мильско-Карабахского (1240), Бозчельского (44) и Кобыстанского (261) равнинно-предгорных очагов, входящих в Закавказский равнинно-предгорный очаг, а также штаммом KIM10 из Ирана. Каспийская группа ветви 2.MED1 включает в себя два крупных кластера штаммов, выделенных из очагов Северного и Восточного Прикаспия. В кластер штаммов Восточного Прикаспия входят штаммы из Каракумского пустынного (813), Мангышлаского пустынного (173) и Устьюртского пустынного (M-549) очагов.

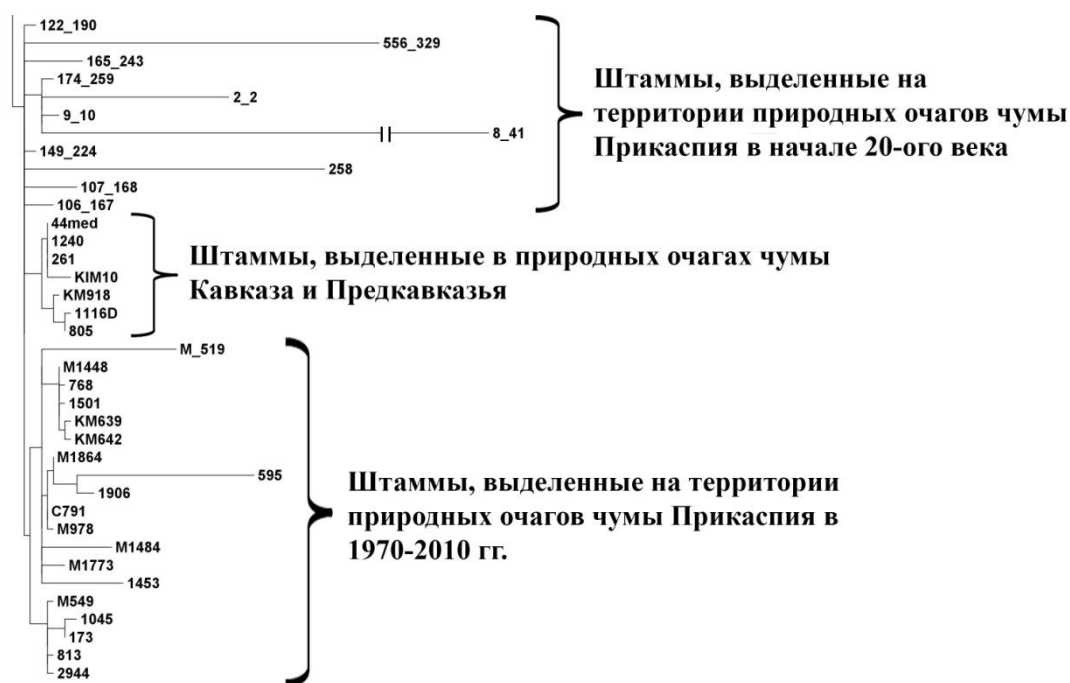


Рисунок 2 – Структура Кавказско-Каспийской группы филогенетической ветви 2.MED1 по данным полногеномного SNP анализа (метод Maximum Likelihood с моделью замен НКУ при помощи программы PhyML 3.1).

Второй кластер состоит из штаммов средневекового биовара из очагов северного Прикаспия (рис. 3). В этом кластере отдельная группа (обозначенная цифрой 1) представлена одним штаммом из Зауральского степного (M-1448) и 4 штаммами из Волго-Уральского песчаного очагов (768, M-1501, KM-639 и KM-642), выделенных в 1980-1990 гг. Другая группа под номером 2, состоит из штаммов из Прикаспийского песчаного (M-1864, 595 и 1906) и Дагестанского равнинно-предгорного очагов (С-791) 2003-2014 гг. и 1 штамма из Прикаспийского Северо-Западного степного очага (M-978) 1990 г.



Рисунок 3 – Структура каспийской группы Кавказско-Каспийской ветви 2.MED1 (метод Maximum Likelihood с моделью замен НКУ при помощи программы PhyML 3.1)

В состав каспийской группы вошли отдельными ветвями и штаммы из Волго-Уральского степного (М-1484), Урало-Эмбенского пустынного (М-1453) и Копетдагского пустынного (М-519) очагов чумы, также расположенных на севере Прикаспия. Из рисунка 3 видно, что в целом скорость эволюции штаммов этой ветви, выделенных в современный период, сопоставима, и штаммы в кластерах тесно сгруппированы, отличаясь друг от друга небольшим числом SNPs.

Одна из наиболее интересных групп ветви 2.MED1 представлена штаммами, выделенными в Прикаспийских очагах в период больших эпидемий чумы в начале 20 века, Нами исследованы штаммы, полученные в Волго-Уральском песчаном (31(38), 556(329), 174(259), 2(2), 8(41), 106(167)), Волго-Уральском степном (122(190), 107(168)), Прикаспийском песчаном (258), Прикаспийском северо-западном степном (9(10)) и Зангезуро-Карабахском горном (149(224), 165(243)) очагах в период с 1910-1932 гг. По данным дендрограмм ветви 2.MED1 (рис. 2, 3) эти штаммы относятся к отдельным независимым ветвям эволюции средневекового биовара, несмотря на то, что они были выделены в тех же очагах чумы северного Прикаспия, что и современные (но эволюционно отличные) штаммы 1970-2014 гг. из этих очагов. Почти все эти штаммы эволюционировали независимо друг от друга и с разной скоростью. Они не имеют общих SNPs со штаммами, выделенными на территории этих же очагов за последние 40 лет. Возможно, эволюция этих штаммов была связана с изменениями в биоценозах природных очагов, в период существования этих штаммов. Таким образом, нами впервые проведен развернутый анализ популяционной структуры и филогении штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов России, ближнего и дальнего зарубежья. Получены полногеномные последовательности штаммов средневекового биовара, референтные для очагов РФ и других стран СНГ, составлена схема распространения штаммов средневекового биовара в очагах чумы в Евразии (рис. 4).

2 Анализ особенностей организации генома штаммов средневекового биовара и разработка способов внутрибиоварной дифференциации штаммов этого биовара

Поскольку метод полногеномного секвенирования является достаточно дорогим, требует наличия дорогостоящего оборудования и реактивов, важной задачей является разработка более простых, но эффективных методов дифференциации штаммов средневекового биовара.

Сравнительный анализ организации генома штаммов *Y. pestis* средневекового биовара разного происхождения. Для проведения сравнительного анализа организации геномов штаммов использован 71 штамм разных филогенетических ветвей 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3, секвенированных в РосНИПЧИ «Микроб», или из базы данных NCBI GenBank. Для сравнительного анализа геномов проводили попарное полногеномное выравнивание исследуемых последовательностей штаммов, которое выполняли в программе Mauve 2.4.0 с применением функций «Align with progressive Mauve» и «Move contigs». В результате проведенного сравнения последовательностей геномов штаммов *Y. pestis* ветвей 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3 и 2.MED0 найдена большая делеция размером 33 т.п.н., характерная для штаммов 2.MED1 и расположенная на хромосоме между генами YPN_2804 и YPN_2837 в позиции 3161933-3195112 (по номенклатуре генома *Y. pestis* Nepal516, номер доступа № ACNQ00000000).

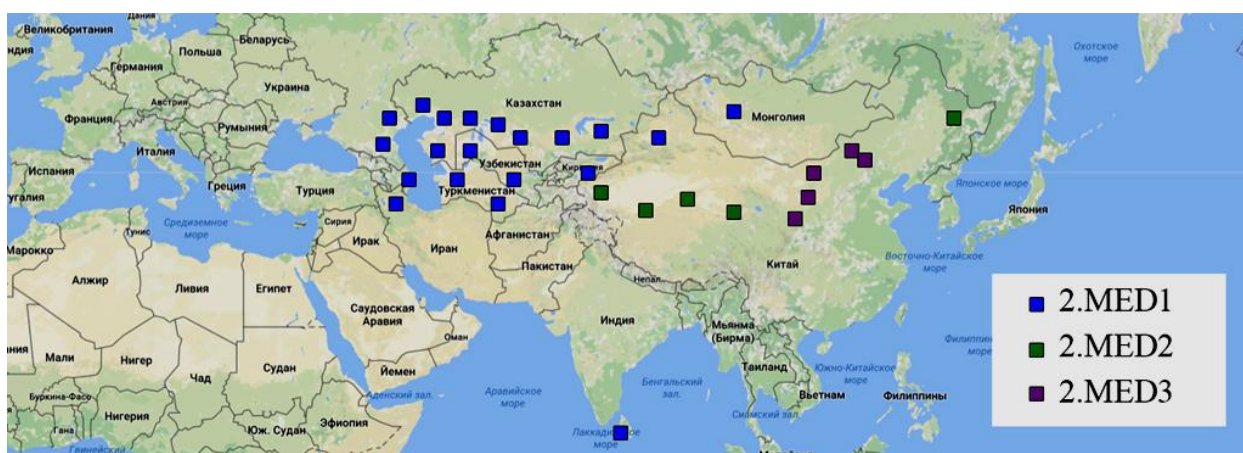


Рисунок 4 – Схема распространения штаммов средневекового биовара в природных очагах Евразии

Специфичность этой крупной делеции доказана при анализе полногеномных последовательностей 51 штамма ветви 2.MED1. Найденная область содержит большое число генов, продукты которых связаны с обменом АТФ и энергетическим обменом; связыванием ДНК; резистентностью к лекарственным препаратам и проявлением ряда биохимических свойств. Данная область полностью сохраняется у штаммов ветвей 2.MED2, 2.MED3 и 2.MED0. Также обнаружена делеция размером 73 п.н. в гене *clpV* (y1538 по номенклатуре генома штамма *Y. pestis* KIM10, NCBI GenBank, номер доступа NC_004088), специфическая для штаммов 2.MED3. У штаммов ветвей 2.MED0, 2.MED1 и 2.MED2 этот ген находится в интактном состоянии. На основе двух мишеней 2.MED1 и 2.MED3 разработан способ дифференциации средневековых штаммов ветвей 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов (ПЦР-ЭФ).

Разработка способа определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям средневекового биовара методом ПЦР. Для детекции найденных ДНК мишеней методом ПЦР-ЭФ рассчитаны праймеры на ДНК мишени 2.MED1 (участок гена YPN_2820) и 2.MED3 (участок гена *clpV*) следующего состава: 2.MED1-S ATAGGTAATAGCGGCACTC / 2.MED1-As TGACTCCATTGAAGACGCT,

2.MED3-S AGTAATGGGTTGTTCTGCC / 2.MED3-As CACCAGAAGCGAATGAAGC.

С помощью этих праймеров устанавливают филогенетическую принадлежность исследуемого штамма по сумме двух независимых ПЦР реакций, на основе определения наличия/отсутствия и размеров образуемых ПЦР продуктов в сравнении с маркерами молекулярных масс, а также с амплификатами типичных средневековых штаммов. Отсутствие ПЦР продукта размером 100 п.н. при использовании мишени 2.MED1 и наличие амплификата в 235 п.н. по мишени 2.MED3 (интактный ген, как и у типичного штамма ветви 2.MED1) свидетельствует о принадлежности штамма к ветви 2.MED1. При наличии амплификата по мишени 2.MED1 (100 п.н.) и амплификата по мишени 2.MED3, соответствующего интактному гену (235 п.н., как и у типичного штамма ветви 2.MED2), исследуемый штамм относят к ветви 2.MED2. В случае наличия амплификата по мишени 2.MED1 (100 п.н.) и выявления делеции по мишени 2.MED3 (размер образуемого фрагмента 162 п.н.) штамм относят к линии 2.MED3. Анализ эффективности разработанного способа проведен на 78 штаммах средневекового биовара *Y. pestis*, выделенных на территории РФ, стран ближнего зарубежья, Китая, Индии, Монголии. В том числе было исследовано 50 штаммов средневекового биовара из 7 природных очагов РФ, 21 штамма из очагов Средней Азии, 3 штаммов из Китая, 3 штаммов из Индии и 1 штамма из Монголии. В результате проведенного типирования была подтверждена принадлежность штаммов из природных очагов РФ и стран Средней Азии к филогенетической ветви 2.MED1. Нами впервые выявлена циркуляция в природных очагах Монголии средневековых штаммов, поскольку найден штамм *Y. pestis* 239 (25), выделенный в Дзабханском аймаке Монголии. С помощью разработанного способа ПЦР типирования, установлена его принадлежность к ветви 2.MED1. К этой же филогенетической ветви принадлежали все три имевшихся в нашей коллекции средневековых штамма из Индии. Три исследованных штамма средневекового биовара из двух провинций Китая относились к ветви 2.MED2. Таким образом, из 78 исследованных методом ПЦР типирования штаммов средневекового биовара, выявлено только три штамма ветви 2.MED2, не выявлено штаммов 2.MED3, что подтверждает эндемичность штаммов двух последних ветвей для очагов Китая.

Возможности разработанного способа дифференциации штаммов средневекового биовара могут быть расширены за счет включения в схему двух других ранее найденных ДНК мишеней – MED24, которая по наличию маркерной делеции в 24 п.н. позволяет отделять штаммы средневекового биовара от штаммов других биоваров и подвидов, и мишени pСКF – плазмиды, маркерной для штаммов ветви 2.MED0 [Одинокоев и др., 2013; Оглодин, 2015].

Для дальнейшей дифференциации штаммов средневекового биовара ветви 2.MED1, распространенных в очагах чумы в РФ и странах СНГ, по очаговой принадлежности нами разрабо-

тан способ SNPs типирования, основанный на использовании единичных полиморфных нуклеотидов - SNPs, маркерных для штаммов *Y. pestis* из отдельных природных очагов.

Разработка способа определения очаговой принадлежности средневековых штаммов на основе маркерных для очагов SNPs. С помощью программы Wombac 2.0 на основе сравнения полногеномных последовательностей штаммов средневекового биовара найдены SNPs, маркерные для пяти природных очагов чумы РФ: Центрально-Кавказского высокогорного, Прикаспийского песчаного, Волго-Уральского песчаного, Волго-Уральского степного, Терско-Сунженского низкогорного. Найденные маркерные SNPs приведены в таблице.

Выявление маркерных SNP проводят путем амплификации содержащих их участков генома с помощью рассчитанных праймеров методом ПЦР, секвенирования ПЦР продуктов и анализа полученных нуклеотидных последовательностей с помощью программы MEGA 7.0 путем выравнивания на соответствующий участок генома штамма *Y. pestis* CO92. По наличию маркерного нуклеотида в указанной позиции используемого локуса определяют принадлежность исследуемого штамма *Y. pestis* к одному из пяти указанных природных очагов в РФ. Проверка эффективности найденных ДНК мишеней для SNP типирования проведена на 62 штаммах средневекового биовара возбудителя чумы, выделенных в природных очагах РФ и стран ближнего зарубежья.

Таблица – Определение очаговой принадлежности штаммов *Y. pestis* средневекового биовара методом SNP типирования

Природный очаг Мишень, позиция	Центрально-Кавказский высокогорный (01)	Терско-Сунженский низкогорный (02)	Волго-Уральский песчаный (16)	Волго-Уральский степной (15)	Прикаспийский песчаный (43)
Focus01, 380909*	G	C	C	C	C
Focus02, 3966143	G	A	G	G	G
Focus16, 2082661	C	C	A	C	C
Focus15, 570744	C	C	C	T	C
Focus43, 3496401	G	G	G	G	A

*Позиции даны по геному штамма *Y. pestis* CO92 NC_003143

Из этой выборки 30 штаммов были из указанных 5 очагов РФ. Остальные штаммы выделены в очагах стран ближнего зарубежья (Казахстан, Туркмения, Киргизия и Узбекистан), а также в 2 других очагах РФ, в которых циркулируют штаммы средневекового биовара (Прикас-

пийский Северо-Западный степной и Дагестанский равнинно-предгорный) и ряда очагов Кавказа и Предкавказья за пределами РФ. В результате проведенного анализа доказана 100% специфичность выбранных SNPs для штаммов из пяти указанных очагов чумы России. Таким образом, на основе сравнения полногеномных последовательностей секвенированных штаммов из очагов РФ и других стран СНГ найдены ДНК мишени (indel мутации и SNPs), с использованием которых впервые разработаны способы дифференциации штаммов средневекового биовара по филогенетической принадлежности и принадлежности к пяти природным очагам чумы в России.

3 Дифференциация штаммов *Y. pestis* из природных очагов РФ и стран ближнего зарубежья методом MLVA

Еще одним из доступных методов, обладающим высоким разрешением в отношении чумного микроба, является метод мультилокусного анализа VNTR последовательностей MLVA. Метод MLVA широко использовался для изучения штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Китая, Бразилии, Мадагаскара и других зарубежных стран, но ограниченно применялся для изучения штаммов из природных очагов РФ и стран ближнего зарубежья. Нами проведен анализ MLVA25 по 25 локусам VNTR у 54 штаммов из природных очагов РФ, стран СНГ и ближнего зарубежья, а также 20 штаммов *Y. pestis*, полногеномные последовательности которых представлены в базе данных NCBI GenBank. Участки генома этих штаммов, содержащие VNTR локусы, амплифицировали методом ПЦР с использованием стандартных праймеров [Le Fle`che et al., 2001]. ПЦР фрагменты секвенировали, полученные нуклеотидные последовательности 25 VNTR локусов штаммов использовали для построения дендрограммы по методу Maximum Likelihood в программе PhyML 3.1. Для визуализации изображения полученной дендрограммы применяли программу FigTree 1.4.3. На полученной дендрограмме штаммы *Y. pestis* образовали четко выраженные кластеры. Отдельную группу штаммов, составили штаммы филогенетической линии 0.PE4, куда вошли штаммы алтайского и гиссарского подвидов, таласские штаммы и штаммы *microtus* из Китая. Второй кластер штаммов сформировали штаммы восточного биовара филогенетической линии 1.ORI и штаммы линии 1.IN из Китая, которые считают предшественниками восточного биовара. В третий кластер вошли штаммы всех остальных неосновных подвидов – кавказского (0.PE2) и улегейского подвидов, штамм Ангола из Африки (0.PE3). Четвертый кластер составили штаммы античного биовара линии 4.ANT из Тувинского горного, Горно-Алтайского высокогорного и Баян-Улегейского района Монголии. При этом метод MLVA25 разделил штаммы 2014-2016 гг., выделенные при эпидемическом осложнении в Горно-Алтайском высокогорном очаге, на две группы по времени выделения: на штаммы 2012, 2014 гг. и штаммы 2016 гг., хотя по SNP профилю они оказались идентичными.

Пятый кластер на MLVA25 дендрограмме составили штаммы античного биовара линии 0.ANT из Тянь-Шаньского и Алайского высокогорных очагов Кыргызстана. В шестой кластер вошли штаммы античного биовара линии 2.ANT, к которой относятся штаммы из Забайкальского степного очага и штаммы из пограничных регионов Китая и Монголии. В кластер 7 вошли штаммы средневекового биовара филогенетической линии 2.MED (рис. 5). В основании

кластера средневековых штаммов, как и в случае полногеномного SNP анализа, лежит штамм C-627, относящийся к древней филогенетической линии 2.MED0. Штаммы линии 2.MED1 делятся на ряд отдельных групп, во многом повторяя кластеризацию, полученную при использовании данных полногеномного SNP анализа. Кластер 1 на рисунке 5 представляет собой штаммы Среднеазиатско-Китайской ветви средневекового биовара. Кластер 2 включает штаммы кавказской группы Кавказско-Каспийской ветви средневекового биовара. Третья, самая большая группа представлена штаммами средневекового биовара, выделенными на территории Прикаспия. При этом штаммы, полученные в начале 20 века, образуют 4 кластера, удаленные от современных штаммов, выделенных в этих очагах за последние 40 лет.

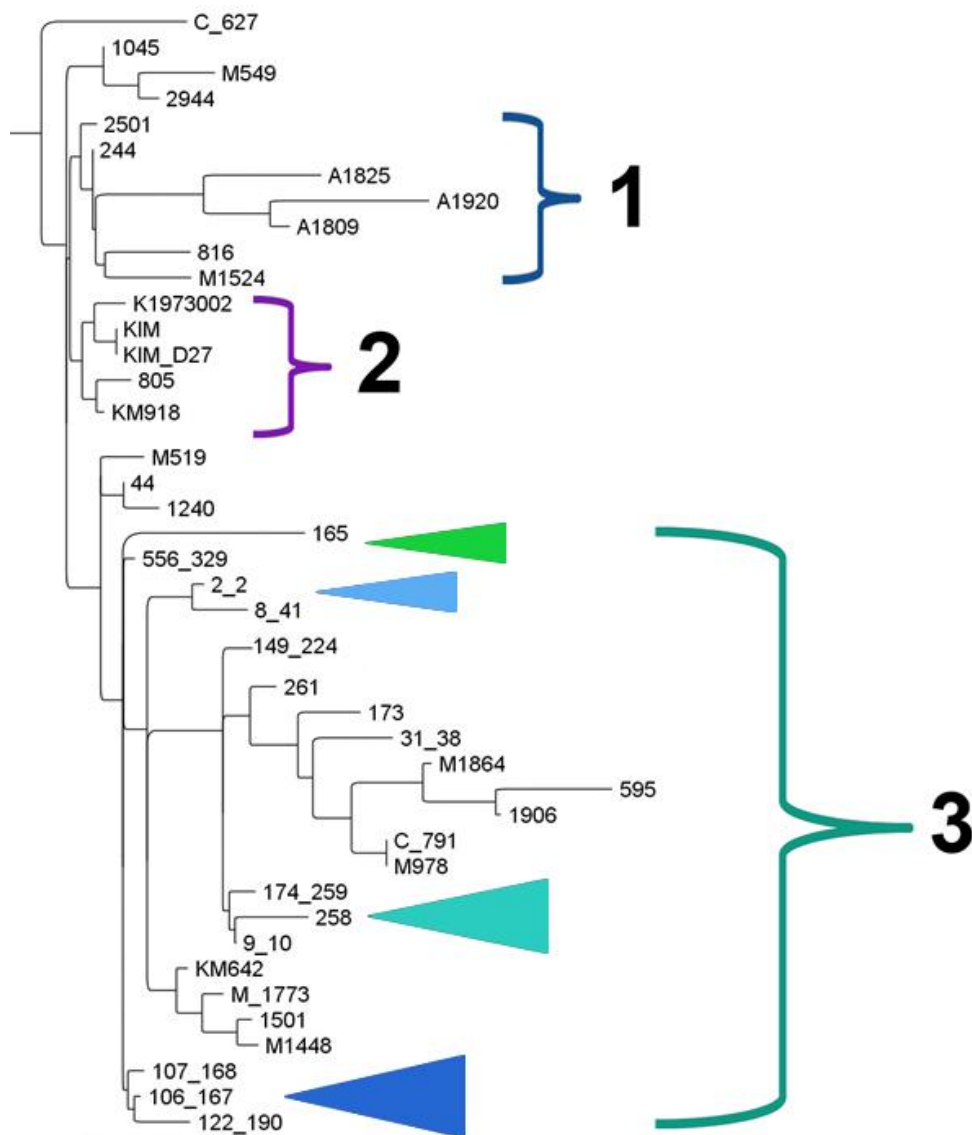


Рисунок 5 – MLVA25 дендрограмма штаммов *Y. pestis* средневекового биовара. Программа PhyML 3.1. Кластеры штаммов из очагов Прикаспия начала 20 века отмечены цветными треугольниками

Современные штаммы из Прикаспийских очагов образуют на дендрограмме два отдельных кластера. Один из них включает штаммы из Волго-Уральского песчаного очага, а второй штаммы из Прикаспийского песчаного (M-1864, 595 и 1906), Прикаспийского Северо-Западного степного (M-978) и Дагестанского равнинно-предгорного (C-791) очагов. Эти данные

свидетельствует о том, что хотя метод MLVA25 не позволяет точно воспроизводить порядок эволюционной дивергенции отдельных филогенетических ветвей *Y.pestis*, но он правильно кластеризует эти штаммы по очагу и времени их происхождения, часто даже более эффективно, чем метод полногеномного SNP анализа. Ввиду этого метод MLVA25 может быть полезен при проведении эпидемиологического мониторинга природных очагов чумы и случаев эпидемиологических осложнений.

Впервые созданная база MLVA25 генотипов для 10 очагов чумы в РФ и 22 очагов стран СНГ повысит эффективность мониторинга природных очагов чумы. Преимущество метода MLVA25 заключается в высокой разрешающей способности, позволяющей дифференцировать штаммы схожие по SNP профилю. Проведенное нами сравнение полученных MLVA25 генотипов штаммов с полногеномными последовательностями штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI GenBank, свидетельствует об уникальности MLVA25 генотипов штаммов из очагов чумы РФ и стран ближнего зарубежья. Полученные MLVA25 генотипы могут быть использованы для установления принадлежности вновь выделяемых изолятов возбудителя чумы к подвиду, биовару, природному очагу и конкретной филогенетической линии.

Подводя итоги проведенным исследованиям следует заключить, что впервые выполнен масштабный анализ штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов России, других стран СНГ, ближнего и дальнего зарубежья. Впервые определена глобальная популяционная структура штаммов средневекового биовара. Получены полногеномные последовательности средневековых штаммов, референтные для очагов РФ и стран СНГ. Разработаны способы идентификации и дифференциации штаммов средневекового биовара с помощью методов ПЦР-, SNP -, MLVA25 типирования, полногеномного секвенирования. Полученные данные и разработанные способы будут полезны на практике для повышения эффективности эпидемического надзора и санитарной охраны границ России и стран СНГ. Перспектива дальнейших исследований в этом направлении заключается в увеличении числа полногеномных последовательностей средневековых штаммов и MLVA25 генотипов, референтных для очагов, мезоочагов и отдельных участков очагов РФ и других стран СНГ, что повысит разрешающую способность созданной системы молекулярного типирования штаммов *Y. pestis* средневекового биовара.

Выводы

1. По данным молекулярно-генетического анализа 87 штаммов *Yersinia pestis* основного подвида средневекового биовара впервые установлено, что штаммы из очагов чумы Российской Федерации, других стран СНГ и ближнего зарубежья относятся к филогенетической линии 2.MED1 и делятся на Кавказско-Каспийскую и Среднеазиатско-Китайскую ветви этого биовара.

2. Получены полногеномные последовательности 46 штаммов средневекового биовара, референтные для 7 очагов России и 16 очагов стран СНГ. Определена современная популяционная структура штаммов средневекового биовара с учетом штаммов из Российской Федерации и стран ближнего зарубежья.

3. Разработан алгоритм биоинформационного анализа полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis*, включающий полногеномный SNP анализ с помощью программы Wombac 2.0, удаление SNPs в областях гомополазии генома *Y. pestis* в программах MEGA 7.0 и RAUP 4.0, филогенетический анализ в программе PhyML 3.1 и визуализацию результатов с использованием программы FigTree 1.4.3.

3. Впервые найдены ДНК мишени: делеции в 33 т.п.н. между генами YPN_2804 и YPN_2837 и в 73 п.н. в гене *clpV*, на основе которых разработан способ дифференциации штаммов средневекового биовара по их принадлежности к филогенетическим ветвям 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов.

4. Разработан способ SNP типирования штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из Центрально-Кавказского высокогорного, Терско-Сунженского низкогорного, Волго-Уральского песчаного, Волго-Уральского степного и Прикаспийского песчаного очагов на основе найденных SNPs, маркерных для этих очагов.

5. Получены MLVA25 генотипы 52 штаммов *Y. pestis* из 32 очагов России и стран СНГ, создана база данных MLVA25 генотипов штаммов и разработан алгоритм определения подвидовой, биоварной и очаговой принадлежности штаммов с применением программ MEGA 7.0, PhyML 3.1 и Bionumerics 7.6.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Куклева, Л.М. Фенотипические и молекулярно-генетические особенности штаммов *Yersinia pestis* из Забайкальского степного очага чумы / Л.М. Куклева, Н.Ю. Шавина, Н.А. Виноградова, **Н.Ю. Носов**, Г.А. Ерошенко, Н.П. Гусева, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. - 2013. – Вып. 3 - С. 44-48. (из Перечня ВАК)

2. Ерошенко, Г.А. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств / Г.А. Ерошенко, Я.М. Краснов, **Н.Ю. Носов**, Л.М. Куклева, К.А. Никифоров, Е.Г. Оглодин, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. - 2015. – Вып. 4 - С. 58-64. (из Перечня ВАК)

3. Куклева, Л.М. Анализ разнообразия и определение геновариантов штаммов возбудителя чумы из очагов Монголии / Л.М. Куклева, Н.Ю. Шавина, Г.Н. Одинокоев, Е.Г. Оглодин, **Н.Ю. Носов**, Н.А. Виноградова, Н.П. Гусева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Генетика. - 2015. – Вып. 3 (51) - С. 298-305. (из Перечня ВАК)

4. **Носов, Н.Ю.** Филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы Российской Федерации и сопредельных стран / Н.Ю. Носов, Е.Г. Оглодин, Я.М. Краснов, Л.М. Куклева, Н.Ю. Шавина, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. - 2016. – Вып. 2 - С. 75-78. (из Перечня ВАК)

5. **Носов, Н.Ю.** Определение MLVA25 генотипов штаммов возбудителя чумы из природных очагов России и сопредельных государств / **Н.Ю. Носов**, А.В. Черкасов, Н.Ю. Шавина, Н.П. Гусева, Г.Н. Одинокоев, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Молекулярная диагностика-2014: сб. тр. VIII Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. - М., 2014. - Т. 1. – С. 449.
6. **Носов, Н.Ю.** Использование MLVA типирования для кластеризации штаммов возбудителя чумы из природных очагов Российской Федерации и сопредельных государств / **Н.Ю. Носов**, Н.Ю. Шавина, Л.М. Куклева, Н.П. Гусева, Г.А. Ерошенко // Микробиология в современной медицине: матер. Второй ежегодной заочной науч.- практ. конф., приуроченной к 200-летию Казанского гос. мед. ун-та (Казань, 26 апр. 2014 г.). - Казань, 2014. - С. 45-47.
7. **Носов, Н.Ю.** Методы биоинформационного анализа полногеномных последовательностей возбудителя чумы / Н.Ю. Носов // Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения: сб. тр. II Всерос. семинара памяти профессора Ю. П. Волкова. – Саратов, 2015. – Т. 1. – С. 86-91.
8. **Nosov, N.Yu.** Population structure of *Yersinia pestis* of medieval biovar based on the whole genome sequencing of strains from the plague foci of CIS countries / **N.Yu. Nosov**, G.A. Eroshenko, Zh.V. Alkhova, V.V. Kutyrev // 12th International symposium on *Yersinia*: матер. междунар. конф. Тбилиси, Грузия 25-28 октября 2016 г. - Georgian Biosafety Association, Тбилиси, Грузия, 2016. – С. 50.
9. **Носов, Н. Ю.** ПЦР - и SNP - типирование штаммов возбудителя чумы средневекового биовара из природных очагов Российской Федерации / **Н.Ю. Носов**, Г.А. Ерошенко, Ж.В. Матвеева, В.В. Кутырев // Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года: матер. XIII Межгосударственной научно-практической конференции / Под ред. профессора А.Ю. Поповой, академика РАН В.В. Кутырева. - Саратов, 2016. - С. 175-177.
10. **Носов, Н. Ю.** Эффективный биоинформационный алгоритм построения филогенетических деревьев штаммов *Yersinia pestis* на основе полногеномного SNP анализа / **Н.Ю. Носов**, Г.А. Ерошенко // Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года: матер. XIII Межгосударственной научно-практической конференции / Под ред. профессора А.Ю. Поповой, академика РАН В.В. Кутырева. - Саратов, 2016. - С. 174-175.
11. Ерошенко, Г.А. Разнообразие штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов чумы в Киргизии / Г.А. Ерошенко, Е.Г. Оглодин, **Н.Ю. Носов**, Я.М. Краснов, Л.М. Куклева, В.В. Кутырев // Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005

г.) до 2016 года: матер. XIII Межгосударственной научно-практической конференции / Под ред. профессора А.Ю. Поповой, академика РАН В.В. Кутырева. - Саратов, 2016. - С. 83-85.

Подписано к печати 24.03.2017

Формат 60 x 84 1/16 Печать лазерная Бумага офисная

Объем 1,0 усл. п.л. Тираж 100 экз.

Отпечатано на полиграфическом оборудовании ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46