

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Ставропольский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Чекрыгина Елена Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ И ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ
В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ, КОМПЛЕКСНОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПАТОГЕНОВ ТЕРРИТОРИИ**

1.5.11 - микробиология

диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
А.С. Волынкина

Ставрополь – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Цель и задачи исследования	9
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
Методология и методы исследования.....	11
Место выполнения работы и личный вклад соискателя в получение результатов исследования.....	11
Основные положения, выносимые на защиту.....	12
Публикации.....	14
Объем и структура диссертации.....	14
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым и острым кишечным инфекциям в Ставропольском крае в 2016–2022 гг.	15
1.2 Методы молекулярно-генетического типирования микроорганизмов ...	21
1.2.1 Методы молекулярно-генетического типирования бактерий	22
1.2.2 Методы молекулярно-генетического типирования вирусов	29
1.2.3 Способы идентификации геновариантов возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекций, актуальных для территории Ставропольского края	31
1.3 Применение методов молекулярно-генетического типирования при проведении микробиологического мониторинга	38
1.4 Заключение по обзору литературы	40
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1 Материал для идентификации генетических вариантов возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекций.....	43
2.2 Микробиологические методы.....	46
2.3 Выделение ДНК и РНК	47

2.4 Детекция НК возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекций.....	47
2.5 Идентификация геновариантов возбудителей природно-очаговых инфекций	48
2.6 Субвидовое типирование возбудителей острых кишечных инфекций.....	53
2.7 Биоинформатический и статистический анализ	55
2.8 Картографический анализ	55
ГЛАВА 3 ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ.....	57
3.1 Генетическое типирование штаммов <i>Francisella tularensis</i>	57
3.2 Идентификация генетических вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки.....	66
3.2.1 Генетическая идентификация вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки на основе секвенирования фрагментов S, M и L сегментов генома вируса	66
3.2.2 Полногеномное секвенирование штаммов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выделенных на территории Ставропольского края в 2016–2022 гг.....	75
3.3 Идентификация геновидов риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок.....	78
3.4 Генетическое типирование изолятов ДНК <i>Coxiella burnetii</i>	80
3.5 Идентификация геновидов боррелий.....	81
3.6 Генетическая идентификация ортохантавирусов	83
3.7 Генетическая идентификация вируса Западного Нила.....	88
ГЛАВА 4 ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ.....	90
4.1 MLVA-5 типирование штаммов <i>Salmonella enterica</i> серовар Enteritidis.....	90
4.2 Молекулярное типирование РНК-изолятов рота-, коро-, энтеровирусов.....	93

ГЛАВА 5 ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПРИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ РАСШИФРОВКЕ СЛУЧАЕВ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ.....	96
5.1 Создание базы данных генетических профилей возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекций, выявленных в Ставропольском крае	96
5.2 Применение методов молекулярно-генетического типирования для эпидемиологической расшифровки вспышек и случаев заболевания ПОИ в Ставропольском крае	99
5.2.1 Молекулярно-генетическое типирование штаммов <i>Francisella tularensis</i> , изолированных в период вспышки туляремии в Петровском районе в 2017 г. ..	99
5.2.2 Генетическая идентификация культур <i>Francisella tularensis</i> , изолированных в период вспышки туляремии в Петровском районе в 2022 г.	104
5.2.3 Молекулярно-генетическая идентификация РНК-изолята вируса ККГЛ, вызвавшего летальный случай КГЛ в Андроповском районе в 2022 г.	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ	120
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	122
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОДОЛЖЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	124
СПИСОК ИСТОЧНИКОВ.....	126
Приложение 1	152

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Систематический мониторинг за циркуляцией патогенных микроорганизмов на территории Российской Федерации (РФ) — одна из основных задач государственного санитарно-эпидемиологического надзора. Важным направлением совершенствования системы эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в настоящее время является разработка тактики молекулярно-генетического мониторинга штаммов патогенных микроорганизмов, направленного на систематическое получение информации, о геновариантах возбудителей инфекционных болезней бактериальной и вирусной этиологии, циркулирующих в отдельных регионах. [25; 26; 35; 107; 114; 122].

Молекулярно-генетические методы исследования, основанные на секвенировании геномных последовательностей, широко используются для идентификации и дифференциации патогенных микроорганизмов. На современном этапе разработаны протоколы идентификации генетических вариантов большинства патогенных микроорганизмов, с использованием различных способов генотипирования, основанных на фрагментном и полногеномном секвенировании: мультилокусного анализа варибельного числа тандемных повторов (MLVA), мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), а также фрагментного и полногеномного секвенирования (WGS) [160; 171].

Методы молекулярного типирования могут использоваться для решения различных задач, главными из которых являются: эпидемиологический анализ отдельных случаев и вспышек инфекционных заболеваний (в т.ч. выявление источника инфекции, установление региона происхождения штамма микроорганизма и вероятных путей распространения инфекции), мониторинг генетической структуры популяций возбудителей (характеристика генетической гетерогенности популяции и особенностей территориального распространения отдельных геновариантов), характеристика свойств штаммов патогенных

микроорганизмов, прогнозирование наличия эпидемически значимых фенотипических признаков штаммов микроорганизмов, таких как вирулентность, лекарственная устойчивость [170; 182; 183; 184].

В последние годы методы генетической идентификации микроорганизмов были успешно применены для эпидемиологического анализа эпидемий холеры на Гаити [116; 168] и лихорадки Эбола в Западной Африке [74; 124; 131; 142], лихорадки Зика [119; 126; 180] и др., а также характеристики популяций возбудителей наиболее актуальных, в т.ч. особо опасных, инфекций в РФ: *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, ортохантавирусов, вируса Западного Нила (ЗН), вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), вируса SARS-CoV-2, возбудителей острых кишечных и других инфекций [1; 2; 5; 46; 64; 85; 139; 181; 187].

Одной из задач молекулярно-генетического мониторинга за возбудителями инфекционных болезней является создание баз данных, содержащих сведения о генетических особенностях штаммов, характерных для территории отдельных регионов, а также эпидемиологически значимой информации об изолятах (сведений о месте и времени выделения патогенов, особенностях клинического течения и исходе заболевания и др.). Наличие информации о генетических вариантах патогенных микроорганизмов, циркулирующих в отдельных регионах, необходимо для повышения эффективности молекулярно-эпидемиологического анализа при расследовании отдельных случаев и вспышек инфекционных заболеваний.

К микроорганизмам, для которых наиболее актуально проведение генетического мониторинга популяций, относятся возбудители особо опасных, зоонозных и природно-очаговых инфекций, способные вызывать тяжелые формы заболеваний, а также другие патогены, распространение которых может приводить к массовым вспышкам инфекций, в т.ч. возбудители острых кишечных и респираторных инфекций. В Ставропольском крае значительную долю в структуре инфекционной заболеваемости занимают острые кишечные и воздушно-капельные инфекции (ОКИ), из природно-очаговых инфекций (ПОИ)

наибольшую актуальность представляют туляремия, лихорадка Ку, Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) [13; 77]. Данный регион, в силу его высокой значимости в качестве рекреационного центра страны, требует особого внимания при реализации мер по профилактике инфекционных болезней.

Комплексное генетическое профилирование патогенных микроорганизмов, актуальных для Ставропольского края, не проводилось. Составление геномных портретов штаммов возбудителей инфекционных болезней человека, циркулирующих в этом регионе, позволит получить новые данные о микробиологических особенностях региональных вариантов патогенов, создать методологическую основу для молекулярного анализа при эпидемиологическом расследовании вспышек инфекций.

Степень разработанности темы исследования

Генетический анализ популяций отдельных возбудителей ПОИ и ОКИ, актуальных для Ставропольского края, был выполнен различными научными группами в рамках изучения генетической гетерогенности патогенных микроорганизмов, циркулирующих на территории РФ. Так, Тимофеевым В.С. MLVA-25 генотипах штаммов *F. tularensis*, изолированных на территории Ставропольского края (в период с 1948 по 2003 гг.) и других регионов РФ [85]. Сотрудниками Омского научно-исследовательского института природно-очаговых инфекций (Шпыновым С.Н., Рудаковым Н.В. и др.) установлена циркуляция в Ставропольском крае отдельных видов риккетсий (*Rickettsia slovaca* и *R. aeschlimannii*) [81]. Сотрудники ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (Орлова Т.Н., Василенко Н.Ф. и др.) изучали вопросы циркуляции боррелий в регионе [67; 68]. Информация о выявлении некоторых геновидов боррелий, в т.ч. *Borrelia miyamotoi* в иксодовых клещах в Ставропольском крае, представлены в работах Платонова А.Е. [163]. Данные о геновариантах вируса ЗН представлены в работах Батурина А.А. [2]. Волинкиной А.С., Лисицкой Я.В., Котеневым Е.С. проводились работы по субвидовому генотипированию изолятов РНК вирусов ККГЛ, ЗН, ортохантавирусов,

циркулирующих в субъектах Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) [18; 19; 57; 58; 59; 61; 91].

В отчетных материалах референс-центров по мониторингу за возбудителями ОКИ и сальмонеллезом, функционирующих на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора представлены сведения о геновариантах возбудителей ОКИ вирусной этиологии (ротавирусов, норовирусов) и генотипах *Salmonella enterica*, серовар Enteritidis (*S. Enteritidis*), выделенных в 2012–2022 гг. из образцов клинического материала от больных ОКИ в Ставропольском крае [28]. В публикациях сотрудников ФБУН ННИИ ЭМ им. академика И.Н. Блохиной» (Голицыной Л.Н., Новиковой Н.А. и др.) описаны генетические варианты энтеровирусов, выявленные на территории ряда регионов юга европейской части РФ [21; 22; 24; 64; 65].

Однако, непрерывный молекулярно-генетический мониторинг циркуляции возбудителей ПОИ и ОКИ на территории Ставропольского края не проводился. Отсутствуют данные об особенностях территориального распространения и соотношении геновариантов возбудителей ПОИ в Ставропольском крае. Не проводилась оценка эпидемиологической значимости генетических вариантов возбудителей инфекционных болезней, характерных для территории региона. Накопление информации о генетических вариантах патогенных микроорганизмов, изолированных на территории Ставропольского края, позволит повысить эффективность мониторинга за состоянием популяций возбудителей инфекционных болезней и своевременно выявлять появление новых генетических вариантов в регионе.

Вышеизложенное обуславливает актуальность проведения геномного анализа штаммов и изолятов ДНК/РНК возбудителей ПОИ и ОКИ на территории Ставропольского края и создания базы данных для хранения и обработки результатов идентификации генетических вариантов.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: комплексное молекулярно-генетическое типирование возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекционных болезней, циркулирующих на территории Ставропольского края, анализ выявленных геновариантов.

Задачи исследования

1. Выполнить молекулярно-генетическое типирование штаммов и изолятов нуклеиновых кислот (НК) возбудителей ПОИ, циркулирующих на территории Ставропольского края, получить новые данные о генотипах этих штаммов и изолятов ДНК/РНК, характерных для изучаемого региона.

2. Провести молекулярно-генетическое типирование штаммов и изолятов НК возбудителей ОКИ бактериальной и вирусной этиологии, определить характерные в данный период геноварианты.

3. Создать базу данных, содержащих сведения о генетических вариантах возбудителей ОКИ и ПОИ, выявленных в регионе, проанализировать их территориальное распространение.

4. Оценить эффективность использования результатов комплексного молекулярно-генетического мониторинга штаммов территории региона (баз данных) при эпидемиологической расшифровке спорадических случаев и вспышек инфекционных заболеваний.

5. Разработать предложения по порядку использования методов генетического анализа для комплексного молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителей ПОИ и ОКИ.

Научная новизна

Впервые выполнено комплексное молекулярно-генетическое популяционное профилирование возбудителей ПОИ и ОКИ, циркулирующих на территории субъекта РФ (на примере Ставропольского края). Получены новые сведения о генетических вариантах возбудителей ПОИ (боррелий, риккетсий, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, ортохантавирусов, вирусов ККГЛ и ЗН) и

ОКИ (сальмонелл, ротавирусов, норовирусов, энтеровирусов), выявленных на данной территории.

Получены новые данные об особенностях распространения отдельных генетических вариантов возбудителей ПОИ в регионе: в т.ч. штаммов возбудителя туляремии генетических подгрупп В.І и В.ІІІ и отдельных CanSNP типов (В.170, В.181, В.203, В.21, В.215, В. 26, В.77, В.79), штаммов вируса ККГЛ генетической линии Европа-3, РНК-изолятов ортохантавируса Тула, относящихся к отдельным подгруппам в пределах генотипа, геновидов боррелий и риккетсий.

Впервые на юге европейской части России выявлены и охарактеризованы РНК-изоляты ортохантавирусов CampRipley (RPLV) и Kenkeme (KKMV).

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены данные о генетических особенностях штаммов возбудителей ПОИ и ОКИ, с применением геоинформационных систем локализованы места их выделения в Ставропольском крае. Результаты исследований могут быть использованы при проведении молекулярно-эпидемиологического анализа спорадических случаев и вспышек инфекционных заболеваний, мониторинга популяций возбудителей ПОИ и ОКИ, а также прогнозирования развития эпидемиологической ситуации на основании анализа данных о биологических особенностях отдельных геновариантов возбудителей.

Создана и зарегистрирована в ФИПС база данных «Генетические варианты возбудителей ОКИ и ПОИ, выявленные в Ставропольском крае в 2016–2021 гг.», (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620152 от 12 января 2022 г. представлено в приложении 1).

Разработаны методические рекомендации «Геномное профилирование ПБА отдельных регионов (на примере Ставропольского края)» (учрежденческий уровень внедрения, утверждены директором ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 2021 г.).

Результаты работы используются при чтении лекций на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России в рамках преподавания дисциплин «Общая микробиология», «Микробиология», «Вирусология»

студентам по направлениям подготовки (специальностям) «Лечебное дело», «Стоматология», «Педиатрия», «Биотехнология».

Методология и методы исследования

При выполнении работы были использованы микробиологические, вирусологические, молекулярно-генетические методы (индикация НК возбудителей методом ПЦР, секвенирование ДНК по Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование (NGS)), а также методы биоинформатического, геоинформационного и статистического анализов.

Место выполнения работы и личный вклад соискателя в получение результатов исследования

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России в рамках НИР «Молекулярно-генетический анализ возбудителей инфекционных болезней в системе обеспечения эпидемиологической безопасности (на примере Ставропольского края)» (Рег. № НИР: АААА-А17-11710134045-9). Исследования одобрены Этическим комитетом ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России (выписка из протокола заседания № 59 от 17.11.2016). Лабораторные исследования проведены на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора в 2016–2022 гг. в рамках договоров о сотрудничестве ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России и ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора №335/16 от 01.11.2016, №11 от 23.10.2017, договора о сотрудничестве от 20.06.2019.

Диссертант принимал участие в выполнении лабораторных исследований образцов полевого и клинического материала на наличие нуклеиновых кислот возбудителей ОКИ и ПОИ, выполнил молекулярно-генетические исследования штаммов и изолятов НК возбудителей ОКИ и ПОИ, анализ и интерпретацию полученных результатов, сформулировал выводы и основные положения, выносимые на защиту. Обработку результатов MLVA-25 и CanSNP типирования штаммов *F. tularensis* проводили в соавторстве с биологом лаборатории диагностики бактериальных инфекций отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Гнусаревой О.А.

Генетическую идентификацию боррелий в образцах полевого материала на основе анализа последовательности участка гена *16s rRNA* выполняли в соавторстве с младшим научным сотрудником лаборатории диагностики бактериальных инфекций отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Зайцевой О.А.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Осуществлено комплексное молекулярно-генетическое профилирование возбудителей ПОИ и ОКИ на территории субъекта РФ (на примере Ставропольского края), установлена циркуляция штаммов возбудителей ПОИ: *F. tularensis* генетических подгрупп В.І, В.ІІІ и CanSNP типов В.170, В.181, В.203, В.21, В.215, В.26, В.77, В.79, *Borrelia miyamotoi*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *C. burnetii*, вируса ККГЛ (генотипов Европа-1 и Европа-3), вируса ЗН (русской подгруппы 2 генотипа), штаммов *R. raoultii*, *R. aeschlimanii*, *R. slovaca*, *R. helvetica*, *R. massiliae*, ортохантавирусов Тула, Camp Ripley, Kenkeme, и штаммов возбудителей ОКИ: *S. enterica* серовар Enteritidis, принадлежащих к 25 MLVA типам, ротавирусов генетических вариантов G4[P8], G2[P4], G9[P8], норовирусов генотипов GII.4, GII.13, GII.3, GII.2, энтеровирусов Echo 5 и Echo 3.

2. Выявленные геноварианты ПОИ и ОКИ имеют различную эпидемиологическую значимость: низким эпидемическим потенциалом обладают ортохантавирусы Тула, Kenkeme и CampRipley, все выявленные варианты риккетсий группы КПЛ, отдельные геновиды боррелий (*B. lusitaniae*, *B. valaisiana*); высокую эпидемическую значимость имеют все выявленные варианты вируса ККГЛ, возбудителя туляремии, отдельные MLVA-типы *S. Enteritidis*, геноварианты рота-, норо- и энтеровирусов.

3. На территории юга европейской части России впервые установлена циркуляция ортохантавирусов CampRipley (RPLV) и Kenkeme (KKMV).

4. Накопленные данные о распространении отдельных генетических вариантов возбудителей ПОИ и ОКИ в Ставропольском крае могут быть

использованы при эпидемиологическом анализе вспышек и спорадических случаев инфекций, а также мониторинге популяций возбудителей.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы подтверждена достаточной репрезентативностью выборки образцов для исследования (охарактеризовано 350 штаммов и изолятов НК возбудителей ПОИ, а также 154 штамма и изолята НК возбудителей ОКИ), длительным сроком наблюдений (сбор материала осуществлялся в период с 2016 по 2022 гг.), использованием методов исследования, позволяющих выполнить поставленные задачи, в т.ч. методов молекулярно-генетического типирования, полногеномного секвенирования, биоинформатического и статистического анализа результатов генетического анализа. Статистическую достоверность топологии филогенетических деревьев оценивали методом Bootstrap-анализа в программе Mega 11.

Диссертация апробирована на заседании кафедры микробиологии ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России (протокол № 45 от 20.02.2023 г.).

Основные результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования представлены и обсуждены на научных конференциях: XI съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2017); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика-2017» (Москва, 2017); II Всероссийской научно-практической конференции «Инфекционные болезни, общие для человека и животных» Ставрополь, 2017), XII Съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (г. Москва, 2022), Научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологии и диагностики особо опасных, природно-очаговых и других инфекций» в рамках Международного молодежного форума «Неделя науки – 2022» (г. Ставрополь, 2022); Региональной научно-практической конференции с международным участием, посвященной 70-летию со дня основания ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора «Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе» (Ставрополь, 2022).

Публикации

Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы отражены в 13 научных публикациях, в том числе в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук» — 3.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 152 страницах, состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка источников литературы, включающего 191 источник, в т.ч. 99 отечественных и 92 зарубежных авторов. Работа содержит 14 таблиц, 22 рисунка, содержит 1 приложение.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым и острым кишечным инфекциям в Ставропольском крае в 2016–2022 гг.

Ставропольский край — регион юга европейской части России, входит в состав Северо-Кавказского федерального округа (СКФО). Территория Ставропольского края занимает центральную часть Предкавказья и северные склоны Большого Кавказа. Административно-территориальная структура Ставропольского края включает 26 административных районов и 10 городов регионального значения. Регион граничит с Ростовской областью, Краснодарским краем, Республиками Калмыкия, Дагестан, Северная Осетия-Алания, Чеченской, Кабардино-Балкарской, Карачаево-Черкесской республиками [4; 37].

Ставропольский край — один из крупнейших рекреационных регионов РФ, в пределах края расположен уникальный оздоровительно-курортный регион — Кавказские Минеральные Воды (КМВ), включающий города-курорты: Пятигорск, Железноводск, Лермонтов, Ессентуки, Кисловодск, территорию Георгиевского, Минераловодского и Предгорного районов [39]. В связи с высокой рекреационной нагрузкой на регион, большим количеством туристов, посещающих регион в течение года (1 771 898 человек в 2022 г.) [69], возможностью заноса инфекций, возникновения массовых вспышек инфекционных заболеваний, а также инфицирования возбудителями ПОИ, характерными для региона, меры противодействия инфекционным болезням имеют важное значение.

Климат в регионе — умеренно-континентальный, с большой годовой амплитудой температур и небольшим количеством осадков [37].

Территория Ставропольского края представлена, главным образом степными ландшафтами (западные, северные и восточные районы). Полупустынные ландшафты занимают территорию, примыкающую к Кумо-Манычской впадине, а также Терско-Кумское междуречье. В центральной части

края, на территории Ставропольской возвышенности, расположены участки лесостепных ландшафтов, доля которых составляет 4 % от общей площади региона. Южную часть территории Ставропольского края занимают предгорные ландшафты, представляющие собой переходную зону от равнин Предкавказья к горным склонам Большого Кавказа [37].

В Ставропольском крае лидирующие позиции в структуре инфекционной заболеваемости занимают ОКИ и воздушно-капельные инфекции [93; 94; 95; 96; 97; 98; 99]. Кроме того, на территории региона расположены природные очаги ряда инфекций: КГЛ, лихорадки Ку, туляремии, иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) и др. [6; 13; 77]. Общее количество случаев заболевания ПОИ, зарегистрированных в Ставропольском крае в 2016-2022 гг. представлено в таблице 1.

Таблица 1 — Динамика заболеваемости природно-очаговыми инфекциями в Ставропольском крае (2016-2022 гг.)

Нозологическая форма	Количество зарегистрированных случаев заболевания ПОИ							
	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2016-2022
Крымская геморрагическая лихорадка	60	19	15	38	8	19	16	175
Лихорадка Западного Нила	-	-	2	4	-	-	3	9
Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом	-	-	-	4	-	-	0	4
Иксодовый клещевой боррелиоз	39	32	35	37	6	16	36	201
Риккетсиозы	-	-	-	-	-	-	1	1
Лихорадка Ку	41	43	45	40	8	24	69	270
Туляремия	-	49	2	1	2	1	76	131
Лептоспироз	11	5	5	7	4	5	10	47

Крымская геморрагическая лихорадка. Заболеваемость КГЛ в Ставропольском крае регистрируется ежегодно с 1999 г [43; 62; 66; 75; 76]. В 2016–2022 гг. в регионе выявлено 175 случаев заболевания КГЛ. Наибольшее количество больных КГЛ зарегистрировано в 2016 г. Заболеваемость КГЛ в 2016–2022 гг. отмечалась на территории 20 административных районов Ставропольского края, наибольшее количество случаев выявлено в Апанасенковском (26), Ипатовском (21), Нефтекумском (20), Петровском (13), Арзгирском (13), Труновском (11), Красногвардейском (11) районах [50; 51; 52;

53; 54; 55; 56]. Случаи заболевания КГЛ регистрируются весной, летом и осенью, пик заболеваемости отмечается в мае-июне, что соответствует периоду наибольшей активности клещей *Hyalomma marginatum* — основного переносчика вируса ККГЛ [9; 16; 17]. Среднемноголетний уровень зараженности иксодовых клещей вирусом ККГЛ в Ставропольском крае в 2016–2020 гг. составил 4,8 % [8; 12; 16; 17].

Лихорадка Ку. В 2016–2022 гг. в Ставропольском крае выявлено 270 случаев заболевания людей лихорадкой Ку [50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 89]. Эпидемиологические проявления лихорадки Ку отмечались в пределах всех ландшафтных зон Ставропольского края [77]. Наибольшее количество случаев заболевания лихорадкой Ку в Ставропольском крае выявлено в административных районах, расположенных в пределах степной (66,7 %), и полупустынной ландшафтных зон (25,4 %) [6; 60; 77]. Циркуляция возбудителя лихорадки Ку, по данным лабораторного исследования эпизоотологического материала, установлена на территории 20 из 26 административных районов Ставропольского края. ДНК *S. burnetii* выявлена в пулах иксодовых клещей, относящихся к 14 видам в т.ч.: *H. marginatum* (33,7 % от всех положительных пулов) и *R. turanicus* (22,8 %) *Dermacentor* sp. (20,7 %), *H. scupense* (7,0 %), *H. punctata* (6,1 %), *B. annulatus* (3,6 %) и *I. ricinus* (2,1 %). Наибольшее количество положительных пулов иксодовых клещей выявлено на территории Нефтекумского и Левокумского районов [7; 32; 60].

Иксодовый клещевой боррелиоз. Больные ИКБ в Ставропольском крае регистрируются ежегодно. В 2016–2022 гг. в регионе выявлен 201 случай заболевания ИКБ [50; 51; 52; 53; 54; 55; 56]. Природный очаг ИКБ охватывает всю территорию Ставропольского края, наиболее активные участки природного очага расположены в лесостепной и предгорной ландшафтных зонах края, где регистрируется наиболее высокая численность иксодовых клещей *Ixodes ricinus*, являющихся основным переносчиком патогенных боррелий [7; 13; 29]. Наибольшее количество больных ИКБ (49,0 %) выявлено в предгорной ландшафтной зоне, в т.ч. г. Кисловодске и других городах региона КМВ. В

лесостепной зоне зарегистрировано 37,8 % от всех случаев ИКБ в крае, более 60 % из которых — в г. Ставрополь [31; 33; 34]. Маркеры патогенных боррелий (16s РНК) выявлены в иксодовых клещах *I. ricinus* (96,1 % от всех положительных пулов), *I. redikorzevi* (1,4 %), *D. marginatus*, *D. reticulatus* (по 1,1 %). Наиболее высокая инфицированность иксодовых клещей боррелиями отмечается в городах-курортах региона КМВ и г. Ставрополе [29; 30; 31; 32; 33].

Туляремия. В Ставропольском крае в 2016–2022 гг. зарегистрирован 131 случай заболевания туляремией. В 2017 г. отмечалось максимальное количество случаев заболевания туляремией (49 случаев), в 2018–2021 гг. отмечены спорадические случаи заражения людей туляремией (1–2 случая ежегодно). В 2022 г. отмечалось резкое увеличение числа случаев заболевания туляремией, зарегистрировано 76 больных [50; 51; 52; 53; 54; 55; 56]. Заболеваемость туляремией выявлена на территории 8 административных районов, наибольшее количество случаев зарегистрировано в Петровском (16 случаев), Ипатовском (17 случаев) и Красногвардейском (6 случаев) районах [27; 77; 86]. Циркуляция *F. tularensis* на территории региона подтверждена при исследовании полевого материала и проб объектов окружающей среды молекулярно-генетическим, серологическим и биологическим методами [3; 10; 11; 20; 27].

Лихорадка Западного Нила. Спорадические случаи заболевания ЛЗН в Ставропольском крае зарегистрированы в 2018 г. (2 случая; 1 — в г. Ставрополе, 1 — в г. Ессентуки), 2019 г. (4 случая: 2 — в Георгиевском районе (инфицирование произошло на территории Ставропольского края), 2 — в г. Ставрополь (завозные из Астраханской области и Краснодарского края) и в 2022 г. (3 случая: по 1 случаю в г. Ставрополь, Александровском и Благодарненском районах) [50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 63; 79].

Циркуляция вируса ЗН на территории Ставропольского края подтверждена при исследовании пулов орнитофильных комаров и проб печени и головного мозга птиц молекулярно-генетическими и серологическими методами [63].

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС). В Ставропольском крае в 2019 г. зарегистрировано 4 завозных случая ГЛПС, в т.ч.:

в Кочубеевском районе (3 случая, заражение произошло на территории Республики Татарстан), в Благодарненском районе (1 случай — заражение произошло при временном пребывании на территории Республик Татарстан и Башкортостан) [50; 51; 52; 53; 54; 55; 56]. Циркуляция ортохантавирусов на территории Ставропольского края подтверждена при исследовании органов грызунов и мелких млекопитающих молекулярно-генетическими и серологическими методами [14; 58; 61].

Риккетсиозы группы КПЛ. В Ставропольском крае случай заболевания риккетсиозом неуточненной этиологии впервые зарегистрирован в 2022 г. На территории края отмечается циркуляция риккетсий группы КПЛ. Методом ПЦР ДНК риккетсий группы КПЛ выявлена в пулах иксодовых клещей 14 видов, в т.ч. *D. marginatus* (29,4 % от всех положительных пулов), *D. reticulatus* (29,4 %), *H. marginatum* (21,6 %), *R. turanicus* (5,6 %), *H. punctata* (4,9 %) и *I. ricinus* (4,2 %) и др. Риккетсии группы КПЛ выявлены в иксодовых клещах, собранных на территории всех ландшафтно-географических зон Ставропольского края, наиболее высокая зараженность клещей риккетсиями группы КПЛ отмечалась в степной зоне.

Лептоспироз. В 2016–2022 гг. в Ставропольском крае выявлено 47 случаев заболевания людей лептоспирозом. Заболеваемость лептоспирозом в указанный период регистрировалась на территории 13 административных районов Курского, Георгиевского, Советского, Степновского, Кировского, Петровского, Буденновского, Новоалександровского, Грачевского, Нефтекумского, Минераловодского, Изобильненского, Красногвардейского, Шпаковского, а также в городах Ставрополе, Кисловодске и Ессентуки. Наибольшее количество больных лептоспирозом выявлено в г. Ставрополе (7 случаев), Курском (6) и Георгиевском (4) районах [50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 83; 84].

Эпидемиологическая обстановка по острым кишечным инфекциям. В 2016–2022 гг. в Ставропольском крае отмечались спорадические случаи заболевания ОКИ бактериальной и вирусной этиологии [93; 94; 95; 96; 97; 98; 99] (таблица 2).

Наиболее актуальной ОКИ бактериальной этиологии для Ставропольского

края с высокими эпидемиологическими рисками по формированию эпидемических очагов групповой заболеваемости является сальмонеллез.

Среди ОКИ вирусной этиологии наиболее значимыми являются ротавирусная и норовирусная инфекции. Уровень заболеваемости ротавирусной инфекцией в период с 2016 по 2022 г. оставался на стабильном уровне, с периодическими незначительными подъемами. Заболеваемость норовирусной инфекцией в 2016–2022 гг. в Ставропольском крае регистрировалась ежегодно, отмечались, главным образом, эпидемические вспышки норовирусной инфекции.

Таблица 2 — Динамика заболеваемости острыми кишечными инфекциями в Ставропольском крае (2016–2022 гг.)

Нозологическая форма	Количество зарегистрированных случаев заболевания ОКИ (на 100 тыс. населения)						
	2016 г.	2017 г.	2018 г.	2019 г.	2020 г.	2021 г.	2022 г.
Острые кишечные инфекции	567,1	573,3	592,7	548,9	210,8	178,5	310,7
В т.ч. вызванные:							
<i>Salmonella</i> sp.	17,68	13,28	12,62	27,28	11,38	8,2	14,43
Ротавирусами	41,22	28,2	26,57	30,28	10,41	20,87	21,52
Норовирусами	10,36	8,46	9,91	6,82	2,22	2,6	2,22
<i>Campylobacter</i> sp.	0,61	0,11	0,18	0,32	0,18	0,11	0,07
<i>Escherichia coli</i> (патогенные)	9,82	14,74	10,34	12,46	6,08	3,32	7,34
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3,97	2,28	3,14	2,25	0,50	0,18	0,5

В течение 2018-2022 гг. в Ставропольском крае наблюдается тенденция к стабилизации эпидемиологической ситуации по ОКИ. В 2020–2021 гг. в регионе отмечалось снижение уровня заболеваемости ОКИ как бактериальной, так и вирусной этиологии, что связано с введением ограничительных мер в рамках реализации противоэпидемических и профилактических мероприятий против COVID-19 — новой коронавирусной инфекции, в т.ч. ограничений в работе объектов общественного питания.

1.2 Методы молекулярно-генетического типирования микроорганизмов

Различные методы лабораторной диагностики (индикации, идентификации и типирования микроорганизмов) используются в эпидемиологии, микробиологии и вирусологии для решения широкого круга задач, в т.ч.: для лабораторного подтверждения диагноза, проведения эпидемиологического расследования случаев и вспышек инфекционных заболеваний, мониторинга за циркуляцией штаммов микроорганизмов в популяции и характеристики их биологических свойств, связанных с патогенностью, вирулентностью, устойчивостью к антибактериальным и противовирусным препаратам [122; 171].

Применение методов типирования микроорганизмов направлено на внутривидовую идентификацию и дифференциацию штаммов патогенных бактерий и вирусов [166; 173].

Методы субвидового типирования микроорганизмов подразделяют на фенотипические (классические) и молекулярно-генетические [128; 166; 173]. Фенотипические методы основаны на сравнении различных характеристик штаммов, в т.ч.: особенностей роста на разных питательных средах, морфологических, серологических, биохимических характеристик, а также физиологических особенностей. Фенотипические методы субвидового типирования микроорганизмов, такие как биотипирование, серотипирование, фаготипирование обладают низкой дискриминирующей способностью и применимы для внутривидового типирования микроорганизмов с высоким уровнем фенотипической изменчивости, однако, большинство возбудителей инфекционных болезней фенотипически однородны. Существенно ограничивает возможности применения фенотипических методов типирования микроорганизмов необходимость выделения чистой культуры возбудителя, т.к. это значительно увеличивает срок проведения исследования. Кроме того, этиологическими агентами ряда инфекционных заболеваний являются трудно культивируемые бактерии и вирусы [160; 166; 171; 173].

Широкое применение для внутривидовой идентификации микроорганизмов нашли методы молекулярно-генетического типирования, позволяющие выявлять тонкие различия и генетическое родство между штаммами микроорганизмов на основе анализа различий геномных последовательностей. Внедрение в лабораторную практику методов генетического типирования позволило значительно усовершенствовать алгоритмы идентификации микроорганизмов и описать различные типы (подтипы, геноварианты) бактерий и вирусов [166; 171; 173].

К настоящему времени разработаны различные протоколы субвидового генетического типирования микроорганизмов.

1.2.1 Методы молекулярно-генетического типирования бактерий

Для молекулярно-генетического типирования бактерий разработаны подходы, основанные на анализе различий нуклеиновых кислот, содержащихся в микробной клетке, в т.ч. хромосомной ДНК, внехромосомной ДНК (плазмиды и фаги) и РНК [166; 171; 173]. Существующие технологии генотипирования бактерий можно разделить на несколько категорий:

- основанные на анализе внехромосомной ДНК;
- основанные на электрофоретическом разделении фрагментов, полученных в результате рестрикции геномной ДНК (методы на основе электрофоретического разделения фрагментов ДНК после рестрикции);
- основанные на электрофоретическом разделении фрагментов нуклеиновых кислот, амплифицированных методом ПЦР (методы на основе ПЦР);
- основанные на гибридизации нуклеиновых кислот;
- основанные на секвенировании нуклеиновых кислот [166; 171; 173].

Способы генетического типирования различаются по дискриминирующей способности, степени воспроизводимости, сложности проведения анализа и интерпретации результатов, скорости выполнения и стоимости исследования. Для

большинства видов патогенных бактерий разработаны протоколы генотипирования на основе различных подходов, однако в лабораторной практике для решения различных эпидемиологических задач используются методы, обладающие достаточной дискриминирующей способностью и высокой воспроизводимостью, а также для которых разработаны автоматизированные протоколы анализа результатов типирования и созданы базы данных для хранения и обмена результатами генетического типирования. Наибольшей дискриминирующей способностью обладают методы, основанные на анализе данных высокопроизводительного секвенирования [106; 150; 161]. Также для эпидемиологических исследований широкое применение нашли технологии электрофореза в пульсирующем поле (PFGE), MLST и методы на основе ПЦР, среди которых наиболее часто используется метод MLVA [123; 154; 166; 173].

PFGE — универсальный подход к генотипированию, который можно применять для любого культивируемого вида бактерий, метод не требует наличия информации о первичной последовательности геномной ДНК. Способ генотипирования с помощью пульс-электрофореза основывается на сравнительном анализе фрагментов ДНК, полученных при обработке хромосомной ДНК микроорганизма эндонуклеазами рестрикции. На первом этапе анализа микробные клетки помещаются в агарозные блоки и лизируются. Геномная ДНК бактерий в агарозных блоках обрабатывается эндонуклеазами рестрикции, полученные рестрикционные фрагменты, анализируются при проведении электрофореза в пульсирующем поле, что позволяет разделять фрагменты больших размеров. Визуализацию результатов проводят с использованием геледокументирующих систем. Результат генотипирования методом пульс-электрофореза представляет собой электрофореграмму, содержащую определенное количество фрагментов ДНК различного размера, характерное для разных штаммов (геновариантов) бактерий. Дифференцирующая способность технологии PFGE выше, чем у большинства методов молекулярного типирования на основе ПЦР. Разработан *on-line* ресурс — Pulse Net International, содержащий стандартизованные протоколы анализа, а также рекомендации по

организации локальных баз данных для хранения и обмена результатами генотипирования бактерий способом пульс-электрофореза. Факторами, ограничивающими применение метода PFGE, являются высокая трудоемкость, а также сложности интерпретации и сравнения результатов исследования, полученных в разных лабораториях [166; 171; 173].

Подходы к генотипированию бактерий на основе ПЦР остаются востребованными и используются в рутинной лабораторной практике, что связано с универсальностью протоколов исследования, легкостью проведения анализа и интерпретации результатов, низкой трудоемкостью, высокой пропускной способностью методов и низкой стоимостью анализа. Методы ПЦР-типирования можно использовать при проведении эпидемиологического анализа вспышек инфекционных заболеваний для быстрой идентификации этиологического агента и выявления источника инфекции. Способы типирования на основе ПЦР часто используются в качестве скрининговых тестов на первом этапе анализа, с целью выбора определенного количества штаммов микроорганизмов для исследования другими методами с высокой дифференцирующей способностью, но более трудоемкими или дорогостоящими.

Методы генотипирования на основе ПЦР включают:

- амплификацию со случайными праймерами;
- рестрикционный анализ ПЦР фрагментов;
- геномный анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов;
- амплификацию повторяющихся элементов, в т.ч.: повторяющихся палиндромных элементов REP, энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных последовательностей ERIC, последовательностей BOX, прямых повторяющихся элементов DR;
- MLVA [166; 171; 173].

Среди технологий ПЦР типирования наибольшее распространение получил метод MLVA, основанный на амплификации участков бактериальной геномной ДНК, содержащих последовательности tandemных повторов (VNTR-локусы) и

определении числа tandemных повторов в нескольких (от 5 до 42) VNTR-локусах бактериального генома. Многие бактериальные геномы содержат участки с повторяющимися tandemными последовательностями ДНК, размером от нескольких нуклеотидных оснований до более чем 100 пар нуклеотидов (п.н.) Количество повторов в tandemе может существенно различаться среди штаммов одного и того же вида. Праймеры для амплификации VNTR-локусов комплементарны консервативным последовательностям, фланкирующим последовательности, содержащие tandemные повторы. На основании анализа размеров амплифицированных VNTR-локусов можно определить количество повторов в локусе. Данные о количестве повторов в определенных VNTR-локусах используются для внутривидовой дифференциации и типирования штаммов бактерий. Определение точных размеров VNTR-локусов с помощью капиллярного электрофореза позволяет стандартизировать протокол исследования и получать более воспроизводимые результаты [166; 171; 173]. Для обмена результатами MLVA-типирования между лабораториями определяется точное количество повторов в каждом VNTR-локусе, генотип штамма записывается в виде цифровой последовательности, отражающей количество повторов в наборе VNTR-локусов. Разработаны *on-line* ресурсы (MLVA-NET, MLVAbank), содержащие стандартизированные протоколы проведения типирования различных видов патогенных бактерий, а также результаты генетического типирования штаммов возбудителей, выделенных в различных странах. Разработка стандартизированных протоколов MLVA-типирования для большинства патогенных видов бактерий, применение фрагментного анализа для точного определения размеров VNTR-локусов, а также возможность получения и хранения результатов генотипирования в цифровом формате способствовали внедрению метода MLVA в лабораторную практику в качестве основного способа ПЦР-типирования. К недостаткам метода можно отнести невозможность проведения филогенетических и эволюционных исследований популяции микроорганизмов на основе данных о MLVA-генотипах штаммов, а также нестабильность отдельных VNTR-локусов и высокую скорость накопления

мутаций в данных областях, что может привести к изменению генотипа штамма микроорганизма при длительном культивировании [154; 166].

Подходы к генетической идентификации бактерий, основанные на секвенировании нуклеиновых кислот, включают типирование по нуклеотидной последовательности одного гена (Single-locus sequence typing, SLST), MLST и WGS [101; 106; 161; 166; 171; 173].

Анализ нуклеотидной последовательности одного локуса используется для видовой идентификации бактерий, например, риккетсий и боррелий. Субвидовое типирование бактерий методом SLST проводится на основе анализа нуклеотидных различий в отдельных высоко варьируемых генах, либо участках генома (например, ген *rhoB* бруцелл) [166; 171; 173].

Репрезентативным и наиболее широко используемым способом молекулярного типирования является MLST. Метод MLST основан на амплификации коротких фрагментов генома (размером 400-600 п.н.), кодирующих гены «домашнего хозяйства», их секвенировании и анализе различий нуклеотидных последовательностей секвенированных фрагментов. Для каждого MLST-локуса определяются уникальные нуклеотидные последовательности (аллели), которым присваиваются порядковые номера. На основании наличия в геномной ДНК бактериального штамма определенных сочетаний идентифицированных аллелей MLST-локусов — «аллельного профиля», определяется сиквенс-тип (ST) штамма. Количество нуклеотидных различий между аллелями при проведении анализа не учитывается. Главным преимуществом MLST-типирования является наличие международной стандартизированной номенклатуры сиквенс-типов, в связи с чем полученные результаты генотипирования являются однозначными и отличаются высокой воспроизводимостью. Данные MLST могут быть использованы для построения филогенетических деревьев, однако в результате филогенетического анализа результатов MLST не возможно определить истинное эволюционное происхождение штаммов, но дает возможность сделать предварительное заключение о генетическом родстве штаммов [161; 166; 171; 173].

Методы генотипирования на основе технологий NGS включают три основные категории: секвенирование целевых участков генома («таргетное» секвенирование), полногеномное секвенирование (WGS) и метагеномное секвенирование («глубокое секвенирование») [101; 106; 109; 150; 161].

Секвенирование целевых участков генома позволяет сравнить нуклеотидные последовательности определенных генов (например, последовательностей гена *16s rRNA*) для определения таксономической принадлежности и генетического родства штаммов. «Таргетное» секвенирование применяется, главным образом, для проведения филогенетических исследований, изучения молекулярной эволюции, оценки генетического и таксономического разнообразия бактерий. Данные, полученные в результате секвенирования целевых участков бактериальных геномов, могут быть использованы для решения некоторых эпидемиологических задач, в т.ч. эпидемиологического расследования случаев инфекционных заболеваний [106].

Полногеномное секвенирование — универсальный способ, позволяющий провести молекулярно-генетический анализ штамма любого бактериального возбудителя. В последние годы, в связи со снижением стоимости полногеномного секвенирования бактериальных геномов, внедрением автоматизированных протоколов пробоподготовки образцов к проведению полногеномного секвенирования, а также накоплением большого количества секвенированных полноразмерных геномных последовательностей в GenBank и других базах данных в открытом доступе метод WGS активно внедряется в лабораторную практику, в т.ч. при проведении генетического мониторинга за циркуляцией возбудителей, а также для расшифровки случаев и вспышек инфекционных заболеваний. Генетическое типирование бактериальных штаммов на основе результатов WGS осуществляется с помощью двух основных подходов: проведение филогенетического анализа секвенированных последовательностей на основе SNP, выявленных в геноме, и мультилокусное сиквенс-типирование на основе анализа последовательностей генов корового генома либо полного генома (cg/wgMLST) [106].

Полногеномный и коровый (wg/cg) MLST позволяет оценить разнообразие всех генов, содержащихся в полноразмерном/коровом геноме штаммов, принадлежащих к определенному виду или роду микроорганизмов. Секвенированные геномные последовательности анализируемых штаммов сравниваются с базой данных всех известных аллельных вариантов генов для оценки генетического родства штаммов бактерий. Разработан ресурс cgMLST.org Nomenclature Server для проведения *in silico* wg/cgMLST на основании данных полногеномного секвенирования. Сервер содержит данные о номенклатуре аллельных вариантов генов 21 вида бактерий, в т.ч. *F.tularensis*, *Esherishia coli*, *Bacillus anthracis*, *Brucella melitensis*, *S. enterica* и др. [106; 171]

Кроме типирования штаммов микроорганизмов результаты полногеномного секвенирования бактериальных геномов могут быть использованы для анализа и прогнозирования фенотипических свойств штамма, в т.ч.: выявления генов, кодирующих факторы патогенности и вирулентности, генов устойчивости к антибиотикам, генов, определяющих антигенные свойства штамма [100; 106].

Одним из основных ограничений использования технологии WGS является необходимость наличия чистой культуры микроорганизма для проведения секвенирования, что обеспечивает чистоту секвенированной ДНК. Метагеномный подход позволяет преодолеть это ограничение. Метагеномное секвенирование — мощный инструмент для изучения таксономического разнообразия микробных сообществ. Разработанные программные инструменты для анализа результатов метагеномного секвенирования позволяют получить данные о составе микробного сообщества на уровне видов. Однако, отдельные штаммы внутри вида бактерий могут существенно отличаться по генетическим характеристикам. В связи с этим, разрабатываются подходы для дифференциации штаммов в пределах определенного вида бактерий в метагеномных образцах, в т.ч. дифференциации различных генетических вариантов возбудителей, основанные на картировании последовательностей, полученных при проведении метагеномного секвенирования на референсные последовательности аллельных вариантов генов с целью проведения *in silico* MLST-типирования [106; 150; 166; 171; 173].

1.2.2 Методы молекулярно-генетического типирования вирусов

Для молекулярного типирования вирусов используют технологии гибридизации нуклеиновых кислот, ПЦР-типирования и сиквенс-типирования, включающие секвенирование участков генома по Сэнгеру и полногеномное секвенирование [160]

Методы гибридизации, в т.ч. технология гибридизации на чипах, используются для индикации, идентификации и молекулярного типирования известных вирусов. Разработаны протоколы гибридизации с использованием специфичных зондов-мишеней для выявления устойчивых к лекарственным препаратам вирусных штаммов, а также молекулярного типирования вирусов, в т.ч. на основе выявления однонуклеотидных замен в геноме вирусов. Неспецифическая гибридизация вирусной кДНК с зондами-мишенями и невозможность выявления и идентификации вирусов, для которых характерна высокая генетическая гетерогенность, ограничивают применение технологии гибридизации для молекулярного типирования вирусов. Микрочипы GreenChip и Virochip — наиболее часто используются для идентификации широкого спектра вирусов [150].

Способы ПЦР типирования вирусов включают методы праймер-независимой амплификации: сиквенс-независимую однопраймерную амплификацию генома вируса (Sequence-independent, single-primer amplification, SISPA), анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов вирусной кДНК (Virus discovery based on cDNA-AFLP, VIDISCA), многопраймерную амплификацию по типу катящегося кольца (Multiply-primed rolling-circle amplification, MPRCA). Кроме того, для генотипирования разработаны протоколы исследования вирусной геномной НК с использованием ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием флуоресцентных зондов, специфически связывающихся с участками генома вирусов, относящихся к разным генотипам [160].

Наиболее широкое применение для генетического типирования вирусов нашли методы, основанные на секвенировании генома.

Секвенирование фрагментов вирусного генома по Сэнгеру (ПЦР продуктов или амплифицированных фрагментов, клонированных в плазмидную ДНК) позволяет получить нуклеотидную последовательность высокого качества (с низким уровнем ошибок) коротких участков генома вируса. Сравнительный геномный и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей целевых участков вирусного генома используется для проведения генетического типирования вирусов, идентификации новых вирусов, выполнения эволюционного анализа. Секвенирование по Сэнгеру не пригодно для выявления и идентификации минорных вариантов вируса (квазивидов), присутствующих в образцах. Необходимость предварительного клонирования фрагмента генома в плазмидный вектор перед проведением секвенирования существенно увеличивает вероятность ошибок секвенирования. Метод секвенирования отдельных фрагментов генома вируса часто применяется для проведения мониторинга генетической структуры популяции возбудителей, т.к. позволяет за короткое время охарактеризовать большое количество изолятов вируса, также данный способ генотипирования может использоваться для эпидемиологического расследования случаев заболевания вирусными инфекциями [160].

Секвенирование генома вирусов с использованием технологии NGS позволяет получить полноразмерную геномную последовательность штаммов и РНК-изолятов вирусов, в т.ч. из полевого или клинического образца, без стадии выделения штамма вируса. Для проведения полногеномного секвенирования вирусов требуется проведение этапа обогащения геномной кДНК путем амплификации геномной последовательности в виде перекрывающихся фрагментов или с использованием различных протоколов праймер-независимой амплификации. Информация о геномных последовательностях вирусов, полученных при проведении полногеномного секвенирования, дает возможность полностью охарактеризовать выявленный генетический вариант вируса, выявить индивидуальные генетические особенности штамма вируса. С использованием

методов метагеномного секвенирования, возможно проведение одновременной идентификации и генетического типирования нескольких видов/геновариантов вирусов, содержащихся в исследуемом образце, в т.ч. вариантов вируса, присутствующих в образце в относительно низкой частоте (например, измененных вариантов, содержащих мутации устойчивости к лекарственным препаратам) [110; 160; 167; 182].

При проведении эпидемиологических исследований технологии NGS используется для идентификации этиологического агента, вызвавшего заболевание, в т.ч. применим для выявления и идентификации новых неизвестных вирусов. Филогенетический и эволюционный анализ, выполненный на основе полноразмерных геномных последовательностей вирусов, позволяет наиболее точно оценить генетическое родство между вирусными изолятами, установить время происхождения геновариантов, а также наиболее вероятные пути их распространения [113; 127; 134; 159; 167; 170; 182].

К факторам, ограничивающим использование WGS для эпидемиологического мониторинга и расшифровки случаев заболевания, относятся высокая стоимость анализа, а также сложность проведения биоинформатической обработки результатов анализа, в т.ч. сборки геномной последовательности. Также, нуклеотидные последовательности, секвенированные методом NGS, содержат больший процент ошибок, чем при секвенировании по Сэнгеру, что связано с особенностями технологии анализа и биоинформатической обработки результатов [182; 178].

1.2.3 Способы идентификации геновариантов возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекций, актуальных для территории Ставропольского края

На территории Ставропольского края циркулируют возбудители ряда ПОИ бактериальной и вирусной природы, в т.ч. *F. tularensis*, *C. burnetii*, *B. burgdorferii* s.l., *Rickettsia* sp., вирус ККГЛ, вирус ЗН, ортохантавирусы. Разработаны

различные протоколы субвидовой идентификации этих патогенов на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генома, а также полногеномных последовательностей.

Для генетической характеристики и субвидовой идентификации штаммов *F. tularensis* разработаны разные подходы на основе фрагментного секвенирования (анализ последовательности гена *16s pPHK*, IS-, MLVA-, INDEL-типирование) и полногеномного секвенирования (WGS, CanSNP типирование, wg/cgMLST). Наиболее часто для типирования штаммов возбудителя туляремии, в т.ч. с целью эпидемиологического расследования вспышек инфекции используются методы MLVA, CanSNP типирования и WGS [45; 85].

Разработаны различные схемы MLVA-типирования возбудителя туляремии: MLVA-25, а также созданные на ее основе схемы с включением в анализ меньшего количества VNTR-локусов: MLVA-17, MLVA-6 [45; 85]. По данным MLVA-25 и MLVA-17 типирования на территории РФ циркулируют штаммы *F. tularensis holarctica* генетических подгрупп В.І и В.ІІІ, в пределах которых выделяются «московская», «ставропольская» и «иркутская» группы штаммов. В Ставропольском крае, Краснодарском крае и Республике Дагестан циркулируют генетически близкие штаммы «ставропольской» подгруппы, различающиеся по размерам VNTR локуса Ft-M3 [85].

В настоящее время продолжается накопление полногеномных последовательностей штаммов возбудителя туляремии, изолированных в регионах РФ, а также информации о генетической гетерогенности популяций *F. tularensis* на основе данных CanSNP и WGS типирования. На основании анализа SNP, выделяют 4 основных генетических линии *F. tularensis*: В.4, В.6, В.12 и В.16. Филогенетическая группа В.12 включает штаммы, относящиеся к подгруппе В.І по данным типирования по схеме MLVA-25, группа В.4 — штаммы подгруппы В.ІІ, группа В.6 — штаммы подгруппы В.ІV, группы В.16 — штаммы подгруппы В.V. На территории РФ установлена циркуляция штаммов подгруппы В.12 [45].

В связи с увеличением количества секвенированных полногеномных последовательностей штаммов *F. tularensis* выявляют новые SNP, позволяющие

дифференцировать генетические варианты возбудителя (опубликовано более 320 CanSNP), классификация CanSNP генотипов возбудителя туляремии обновляется и дополняется [45]. Необходимо накопление информации о CanSNP генотипах *F. tularensis*, циркулирующих в различных регионах страны.

Для возбудителя лихорадки Ку — *C. burnetii* характерна низкая степень генетической гетерогенности, в связи с этим, для субвидового типирования штаммов патогена необходимо использовать методы, обладающие достаточной дискриминационной способностью. Для идентификации генетических вариантов *C. burnetii* существуют методы, основанные на фрагментном секвенировании отдельных генов (16s рНК, межгенного спейсера 16s-23s ррНК, *icd*, *com1* и др.), ПДРФ, IS, SNP-типирование, мультиспейсерное сиквенс типирование (MST) и MLVA [87]. Наиболее широко применяются для субвидового типирования штаммов *C. burnetii* методы MLVA (MLVA-6, MLVA-7, MLVA-10) и MST, позволяющие дифференцировать наибольшее количество генетических вариантов возбудителя [70; 87]. Штаммы *C. burnetii*, изолированные на территории РФ, охарактеризованы методами MLVA-7 и MST. Показано, что популяция возбудителя лихорадки Ку в РФ относительно гомогенна, большинство исследованные штаммы относились к VNTR-типам 1 (доминирующий) и 4 и MST типам 23 (доминирующий) и 7 [70; 87]. Молекулярно-генетические исследования вариантов *C. burnetii* на территории регионов юга европейской части России не проводили.

Видовую идентификацию боррелий осуществляют на основе анализа нуклеотидно последовательности генов *16s ррНК*, межгенного спейсера *rrf (5S)-rrl (23S)*, генов, кодирующих белки флагеллины (*flaA*, *flaB*), а также поверхностные антигены (*OspA*, *OspC*, *p66*) [88]. Наиболее часто для видовой идентификации боррелий выполняют секвенирование фрагментов гена *16s ррНК* и межгенного спейсера *rrf (5S)-rrl (23S)* [44; 82].

Для субвидового типирования боррелий также разработана схема на основе метода мультилокусного сиквенс-анализа MLSA, позволяющая идентифицировать сиквенс-тип штамма по последовательности 8 генов

«домашнего хозяйства»: *clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB*, и *uvrA* [146]. Для генетической идентификации боррелий методом MLSA необходимо наличие чистой культуры возбудителя, амплификация анализируемых участков 8 генов из образцов нативного материала, содержащего, как правило, низкую нагрузку целевой ДНК возбудителя, затруднена.

В результате генетической идентификации боррелий на основе анализа нуклеотидной последовательности гена *16s rRNA* и участка генома *rrf (5S)-rrl (23S)* показано широкое распространение на территории России *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*. Также повсеместное распространение имеет *B. miyamotoi* [44; 82; 163]. Опубликовано значительное количество информации о видовом разнообразии боррелий, циркулирующих в регионах Западной Сибири, Дальнего Востока, Урала, необходимо накопление данных о геновидах боррелий, циркулирующих в субъектах ЮФО и СКФО.

Генетическую идентификацию видов риккетсий выполняют методом секвенирования фрагментов и полноразмерных последовательностей генов: *16S rRNA*, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4*, *htrA*, *groESL* оперона и др. [40; 41; 80; 88]. Наиболее часто для установления видовой принадлежности риккетсий группы КПЛ выполняют секвенирование участков генов *gltA*, *ompA*, *ompB* и *sca4*. В РФ встречаются патогенные виды риккетсий группы КПЛ: *R. sibirica subsp. sibirica*, *R. conorii*, *R. heilonjiangensis*, *R. aeschlimannii*, *R. helvetica*, *R. slovacica*, *R. raoultii*, *R. sibirica subsp. BJ-90* [40; 41; 80].

Для генетической характеристики изолятов боррелий, риккетсий и коксиелл используются технологии высокопроизводительного секвенирования, однако для получения полногеномной последовательности необходимо наличие чистых культур возбудителей [129; 141]. Также в ряде работ опубликованы результаты генетической идентификации боррелий, риккетсий, коксиелл, содержащихся в образцах клинического и полевого материала с помощью метагеномного секвенирования, без изоляции культуры [108].

Для субвидового генотипирования штаммов вирусов ККГЛ, ЗН и ортохантавирусов используют фрагментное и полногеномное секвенирование.

Идентификацию геновариантов вируса ККГЛ проводят методом фрагментного секвенирования различных участков S, M, L сегментов генома (размером от 350 до 1200 п.н.) [66]. Полногеномное секвенирование позволяет точно идентифицировать геновариант вируса ККГЛ, а также выявить рекомбинационные изменения в геноме. Полногеномные последовательности штаммов вируса ККГЛ получают с использованием технологии капиллярного секвенирования по Сэнгеру и высокопроизводительного секвенирования, кДНК вируса ККГЛ обогащают путем амплификации перекрывающихся участков генома (размером 800-1350 п.н.) [66; 187].

Описано 8 генетических линий (генотипов) вируса ККГЛ: Африка-1, 2, 3, Азия-1, 2, Европа-1, 2, 3. В регионах юга европейской части России, эндемичных по КГЛ, в 2007-2016 гг. циркулировали варианты вируса ККГЛ генетических линий Европа-1, Европа-3, Африка-3. На дендрограммах российские штаммы генетической линии Европа-1 формируют 4 подгруппы: Va-Vd, штаммы каждой из подгрупп имеют определенный ареал распространения. Выявлены реассортантные варианты вируса ККГЛ, содержащие сегменты генома, относящиеся к разным подгруппам генетической линии Европа-1 [49; 66; 187].

Генотипирование вируса ЗН выполняют методом фрагментного секвенирования, наиболее часто анализируют последовательности участка генома 5'UTR-ProtC и генов NS3 и ProtE [2; 72; 78]. Выделяют 6 генетических линий вируса ЗН, в РФ циркулируют штаммы генетических линий 1, 2 и 4 [2; 78].

Для ортохантавирусов характерна высокая степень генетической гетерогенности. В пределах рода *Orthohantavirus* выделяют 38 видов вирусов, патогенных для человека, а также с неустановленной эпидемиологической значимостью [115]. На территории РФ встречаются патогенные для человека ортохантавирусы: Добрава, Пуумала, Сеул, Амур, Хантаан, в популяциях грызунов и насекомых выявлена циркуляция ортохантавирусов с неустановленной патогенностью для человека: Tula, вирус Топографов, вирус Хабаровск, Сивис, Алтай, Артыбаш, Кенкеме, Академ [1; 5; 36; 38; 181; 189].

Для первичной идентификации вирусов рода *Orthohantavirus* проводят секвенирование участка генома L сегмента (326 н.о.), амплифицированного с использованием родоспецифичных праймеров [136]. Для точной идентификации геноварианта ортохантавирусов дополнительно анализируют нуклеотидные последовательности участков S и M сегментов генома, с использованием олигонуклеотидов, специфичных для отдельных видов ортохантавирусов. Секвенирование полногеномных последовательностей ортохантавирусов осуществляют после специфического обогащения геномной кДНК путем амплификации перекрывающихся участков генома с использованием праймеров, подобранных для отдельных видов ортохантавирусов [179]. Анализ полногеномных последовательностей ортохантавирусов позволяет идентифицировать принадлежность штаммов и РНК-изолятов к генетической линии и генетической подгруппе, выявить реассортации и рекомбинационные изменения генома.

Среди возбудителей ОКИ наибольшее значение в регионе имеют *S. enterica*, биовар Enteritidis, ротавирусы, норовирусы и энтеровирусы.

Субвидовое типирование штаммов *S. Enteritidis* выполняют с использованием методов PFGE-типирования, MLVA и WGS [133; 191]. Метод PFGE, использующийся для определения подтипов сальмонелл метод PFGE, длительное время считался «золотым стандартом» генетической идентификации штаммов *S. Enteritidis*, однако, он трудоемок (длительность проведения анализа достигает 3 суток) и требует наличия приборной базы для проведения электрофореза в импульсном поле [103]. Метод WGS позволяет наиболее точно идентифицировать геноварианты сальмонелл и в настоящее время внедряется в практику лабораторий для рутинного субвидового типирования *S. Enteritidis* [120].

Метод MLVA-5 обладает высокой воспроизводимостью результатов и используется в странах Европы в качестве основного для мониторинга за циркуляцией геновариантов сальмонелл [143; 144]. MLVA-типирование штаммов сальмонелл используется при расследовании вспышек, позволяет устанавливать

взаимосвязь между отдельными спорадическими случаями заболеваний [153; 155]. В странах Евросоюза разработаны стандартные протоколы MLVA-типирования сальмонелл биоваров Enteritidis и Typhimurium [118].

В России субвидовое типирование *S. Enteritidis* выполняют методом PFGE, также используется метод MLVA. В 2011–2019 г. по данным PFGE типирования в России выявлены штаммы *S. Enteritidis*, принадлежащие к 102 PFGE-генотипам. Наибольшее количество изолятов, выделенных из образцов клинического материала (44 %) относились к субтипу JEG01/001/JECA26/001. Выявлены различия в соотношении PFGE-типов в отдельных административных субъектах [47; 48].

Идентификацию геновариантов ротавирусов, осуществляют с использованием методов фрагментного и полногеномного секвенирования. Разработана бинарная G[P] классификация ротавирусов, в соответствии с которой, генотип ротавирусов идентифицируют на основе секвенирования участков генов, кодирующих белки наружного капсида: гликопротеин VP7 (G-тип) и протеазочувствительный белок VP4 (P-тип). Выделяют 36 индивидуальных G-генотипов и 51 P-генотип [148; 172]. Генотипы G1[P]8, G2[P]4, G3[P]8, G4[P]8, и G9[P]8 наиболее широко распространены в мире и вызывают более 95 % случаев заболевания ротавирусной инфекцией. Соотношение геновариантов ротавирусов в отдельные промежутки времени и в разных регионах различается. В РФ наибольшее число случаев ротавирусов в 2011–2016 гг. вызваны генотипами: G4[P]8, G1[P]8, G3[P]8, G9[P]8, G2[P]4 [28].

Для дополнительной характеристики штаммов и изолятов РНК ротавирусов разработана схема генотипирования ротавирусов на основе анализа полногеномной последовательности. Индивидуально определяют аллельные варианты 12 генов, кодирующих белки VP1-VP4, VP6-VP7, NSP1-NSP6, генотип штамма/РНК-изолята ротавируса записывают в виде акронима: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx.

Субвидовое генотипирование норовирусов проводят на основе анализа двух участков генома, кодирующих белки VP1 (структурный белок капсида) и

RdRp (полимераза). На основании различий нуклеотидных и аминокислотных последовательностей белка VP1 выделяют 10 геногрупп (GI-GX) и 48 G-типов норовирусов (9 GI, 26 GII, 3 GIII, 2 GIV, 2 GV, 2 GVI, 1 GVII, 1 GVIII, 1 GIX и 1 GX). По нуклеотидным последовательностям полимеразы RdRp выделяют 1 геногрупп (P-групп) и 60 P-типов (14 GI, 37 GII, 2 GIII, 1 GIV, 2 GV, 2 GVI, 1 GVII и 1 GX) [111]. В 2022–2023 гг. в мире доминировали штаммы GII.4 Sydney[P16], GII.6 [P7] и GII.17[P17], вызвавшие большую часть эпидемических вспышек норовирусной инфекции [23].

Идентификацию геновариантов энтеровирусов выполняют методом секвенирования нуклеотидной последовательности фрагмента генома, кодирующего капсидный белок VP1 [21; 22; 158]. В субъектах ЮФО и СКФО в 2006–2020 гг. выявлены энтеровирусы, принадлежащие к 22 генотипам: Коксаки А1,2,4,5,6,9,10,16; Коксаки В1,2,3,4,5; ЕСНО 5,6,7,9,11,12,17,30; энтеровирус А 71 типа субгенотипа С4, доминировали энтеровирусы Коксаки В Коксаки А (1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 16) и Коксаки В (2,5), а также энтеровирусы ЕСНО (6, 9, 30) [21; 22; 42].

1.3 Применение методов молекулярно-генетического типирования при проведении микробиологического мониторинга

Методы молекулярно-генетического типирования и секвенирования геномов применяются для решения различных задач, в т.ч.:

- молекулярно-генетического мониторинга за состоянием популяций возбудителей инфекционных болезней (изучение генетической структуры популяции – соотношения циркулирующих геновариантов на отдельной территории; слежение за изменениями территориального распространения геновариантов как в отдельных регионах, так и в мире);

- моделирования эпизоотического и эпидемического процессов с использованием современных методов филогенетики;

— изучения микроэволюции патогенов с использованием современных методов филогенетики (оценка скорости эволюции отдельных генетических линий, выявление аминокислотных и нуклеотидных мутаций, закрепляющихся в популяции, выявление рекомбинационных изменений в геномах);

— характеристики свойств штаммов бактерий и вирусов (поиску в геномах факторов патогенности и вирулентности, генов антибиотикорезистентности, поиска аминокислотных и нуклеотидных мутаций, ассоциированных с изменением патогенных и вирулентных свойств, устойчивости к действию специфических антител — на основе *in silico* моделирования структуры отдельных белков микроорганизмов, поиска эпитопов связывания антител и др.);

— эпидемиологической расшифровки отдельных случаев и вспышек заболевания (установление источника инфекции, дифференциации местных/завозных случаев) [73; 100; 117; 123; 128; 154; 177; 178].

Для решения различных эпидемиологических задач необходимо использовать разные способы типирования и секвенирования.

Подходы к генетическому типированию патогенов на основе ПЦР и фрагментного секвенирования (MLVA, MLST, секвенирование отдельных генов), а также PFGE могут быть использованы для первичной генетической идентификации штаммов/изолятов ДНК/РНК возбудителей, в т.ч. при:

— эпидемиологической расшифровке случаев и вспышек инфекций (для установления источника инфекции и определения генетической идентичности/различий между штаммами, выделенными при вспышке);

— молекулярно-генетического мониторинга за состоянием популяций возбудителей (для более дешевого, быстрого и менее точного определения геноварианта возбудителей) — методы типирования, в особенности, основанные на фрагментном секвенировании, позволяют быстро исследовать большее количество образцов, в т.ч. напрямую из клинических и полевых образцов без выделения культуры микроорганизма [161].

Способы ПЦР-типирования и PFGE не подходят для проведения филогенетических исследований, анализа эволюции микроорганизмов. Данные

MLVA-типирования и PFGE не рекомендуется использовать для проведения филогенетических исследований и изучения эволюции патогенов, т.к. анализируется не нуклеотидная последовательность, а набор абстрактных генетических паттернов микроорганизма. Результаты MLST и фрагментного секвенирования могут быть использованы для филогенетического анализа, но полученный результат будет менее достоверный, чем при анализе полноразмерных геномных последовательностей [166].

Технологии типирования на основе анализа результатов полногеномного секвенирования (cgMLST, wgMLST) обладают более высокой дифференцирующей способностью относительно методов ПЦР-типирования и фрагментного секвенирования [106].

Достоверные филогенетические исследования с целью точного определения принадлежности штамма к генетической линии, моделирования эпизоотического и эпидемического процессов, отслеживания фактов заноса штаммов микроорганизмов из других регионов, изучения динамики эволюционных изменений возможно проводить только с использованием полноразмерных геномных последовательностей вирусов и бактерий [106].

1.4 Заключение по обзору литературы

Ставропольский край — важный рекреационный регион России, территории которого расположен уникальный курорт федерального значения — Кавказские Минеральные Воды. Значительная рекреационная нагрузка на территорию Ставропольского края увеличивает вероятность возникновения эпидемиологических осложнений в регионе, в т.ч. эпидемических вспышек ПОИ и ОКИ и требует проведения мероприятий по их профилактике.

Наиболее актуальные ПОИ для Ставропольского края — КГЛ, лихорадка Ку, туляремия и ИКБ. Также на территории региона выявлена циркуляция возбудителей других ПОИ, в т.ч.: ортохантавирусов, вируса ЗН, риккетсий

группы КПЛ. В структуре ОКИ преобладают сальмонеллезы, ротавирусная и норовирусная инфекции.

Для всех патогенных бактерий и вирусов разработаны протоколы генетического типирования. Генотипирование бактериальных патогенов в настоящее время проводят с использованием методов фрагментного секвенирования (MLVA, MLST, секвенирование отдельных генов). Способы ПЦР-типирования, использовавшиеся ранее (ПЦР со случайными праймерами, амплификация повторяющихся элементов), а также алгоритмы типирования, основанные на гибридизации, в настоящее время на практике не применяются, в связи с их низкой разрешающей способностью. Активно разрабатываются и внедряются в практику методы генетического типирования, основанные на высокопроизводительном секвенировании бактериальной геномной ДНК, в т.ч. типирование на основе анализа коровых SNP и коровых геномных последовательностей, разрабатываются новые способы и протоколы *in silico* типирования на основе анализа данных полногеномного секвенирования геномов: wgMLST, cgMLST, *in silico* MLVA, *in silico* поиск генов, ассоциированных с патогенностью и вирулентностью. Совершенствуются алгоритмы сравнительного анализа завершенных геномных последовательностей бактериальных патогенов. Для генетического типирования вирусов секвенирование полноразмерных геномных последовательностей становится основным методом, в связи с его высокой информативностью.

Существующие технологии генетического типирования подходят для решения различных задач. Для характеристики свойств штаммов микроорганизмов используются подходы, основанные на детекции и секвенировании нуклеотидных последовательностей отдельных генов, а также полногеномном секвенировании.

Для первичной генетической характеристики штаммов и изолятов НК бактерий и вирусов, выявления различий между штаммами, установления источника инфекции, мониторинга распространения и соотношения геновариантов в популяции применяются методы фрагментного секвенирования

— MLVA-, MLST-типирования (только для возбудителей бактериальных инфекций), а также секвенирование отдельных генов и фрагментов генома.

Для точной идентификации геноварианта возбудителя и дополнительной характеристики штаммов применяют полногеномное секвенирование (после выделения чистой культуры микроорганизма или специфического обогащения целевой геномной РНК/ДНК). Идентификацию геноварианта выполняют на основе анализа фрагментированной и завершенной сборки генома, в т.ч. методами *in silico* типирования. Данные, полученные при проведении полногеномного секвенирования, используют для филогенетических исследований, моделирования эпизоотических и эпидемических процессов, изучения микроэволюции.

Таким образом, для первичной оценки генетической гетерогенности популяций возбудителей ПОИ и ОКИ бактериальной и вирусной природы в Ставропольском крае целесообразным представляется использование методов, основанных на фрагментном секвенировании (MLVA-типирование и секвенирование отдельных генов (участков генома)), позволяющих идентифицировать генетические варианты возбудителей, характерные для региона. В дальнейшем, необходимо проведение полногеномного секвенирования для углубленной характеристики генетической гетерогенности возбудителей.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись штаммы и изоляты ДНК/РНК возбудителей ПОИ и ОКИ, выделенные на территории Ставропольского края из образцов полевого и клинического материала. Образцы клинического материала (сыворотки крови, суспензии фекалий) от больных ПОИ и ОКИ, использованные при выполнении работы, перед поступлением в лабораторию и проведением лабораторных исследований были обезличены и закодированы. При выполнении диссертационного исследования не проводился анализ персональной информации о больных ПОИ и ОКИ, а также анализ геномной ДНК человека.

При выполнении работы были использованы микробиологические, вирусологические, молекулярно-генетические методы (индикация НК возбудителей методом ПЦР, секвенирование ДНК по Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование (NGS)), а также методы биоинформатического, геоинформационного и статистического анализов.

2.1 Материал для идентификации генетических вариантов возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекций

В качестве материала для выполнения генетической идентификации вариантов возбудителей ПОИ, циркулирующих на территории Ставропольского края, использовали культуры микроорганизмов (*F. tularensis*, вирус ККГЛ) и образцы биоматериала, содержащие геномную ДНК/РНК возбудителей, в т.ч. *S. burnetii*, *B. burgdorferi* s.l., *Rickettsia* sp., ортохантавирусов, вирусов ККГЛ, ЗН, (таблица 3).

Культуры *F. tularensis*, изолированы из образцов полевого материала (суспензии клещей и проб органов грызунов), собранного при проведении планового эпизоотологического обследования территории Ставропольского края в 2016–2022 гг. (22 культуры), а также изолированы из объектов окружающей среды (вода, сено), образцов полевого материала (органы грызунов,

эктопаразиты), отобранных при проведении эпизоотологического обследования территории, где были выявлены больные туляремией в 2017 и 2022 г. (39 культур).

Таблица 3 — Количество штаммов микроорганизмов, проб полевого и клинического материала, содержащих нуклеиновые кислоты возбудителей природно-очаговых инфекций, использованных для проведения генетического типирования патогенных микроорганизмов

Возбудитель	Материал для исследования		
	Вид материала	Кол-во образцов	Год сбора
<i>F. tularensis</i>	штамм	69	2012–2022
<i>Rickettsia</i> sp.	полевого материала	49	2017–2021
<i>B. burgdorferii</i> s.l.	полевого материала	40	2019–2021
<i>C. burnetii</i>	полевого материала	4	2016
Вирус ККГЛ	полевого материала / клинический материал / штаммы	40/102/13	2016–2022
Ортоксантавирусы	полевого материала	30	2016–2022
Вирус ЗН	полевого материала	3	2018
ИТОГО:		350	2012–2022

Штаммы *F. tularensis*, изолированные из образцов полевого материала (селезенок грызунов, пулов иксодовых клещей), собранного при проведении эпизоотологического обследования территории Ставропольского края в 2012–2015 гг., получены из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (8 штаммов).

Культуры вируса ККГЛ (12 штаммов) изолированы из образцов клинического материала (сыворотки и плазмы крови) от больных КГЛ в Ставропольском крае в 2016–2022 гг.

Пробы полевого материала, с достаточной нагрузкой целевой ДНК/РНК возбудителей ПОИ для проведения молекулярно-генетического типирования, в т.ч. пулы иксодовых клещей, содержащие ДНК боррелий (40 пулов), ДНК риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ) (49 пулов), РНК вируса ККГЛ (39 пулов), пробы легкого грызунов и насекомоядных, положительные на

наличие РНК ортохантавирусов (30 проб), пробы головного мозга птиц, содержащие РНК вируса ЗН (3 пробы), проба печени, содержащая РНК вируса ККГЛ (1 проба), отобраны при проведении лабораторного исследования методом ПЦР образцов, добытых на территории Ставропольского края в рамках планового эпизоотологического мониторинга за циркуляцией возбудителей ПОИ в 2016–2022 гг.

Образцы клинического материала (сыворотка и плазма крови) от больных КГЛ и лихорадкой Ку в Ставропольском крае в 2016–2022 гг., положительные на наличие РНК вируса ККГЛ (102 пробы) и ДНК *S. burnetii* (4 пробы) получены из лаборатории особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае». Для проведения генетического типирования изолятов НК *S. burnetii* и вируса ККГЛ при выполнении исследования использовали биологический материал от больных, инфицирование возбудителем которых произошло на территории Ставропольского края (по данным, содержащимся в эпидкартах).

В качестве материала для идентификации генетических вариантов возбудителей ОКИ служили штаммы *S. enterica*, серовар Enteritidis (*S. Enteritidis*) и образцы суспензий фекалий больных ОКИ в Ставропольском крае, положительные на наличие РНК рота-, норо- и энтеровирусов (таблица 4).

Таблица 4 — Количество штаммов *Salmonella* Enteritidis и образцов биоматериала, содержащих РНК возбудителей острых кишечных инфекций, использованных для проведения генетического типирования патогенных микроорганизмов

Возбудитель	Материал для исследования		
	Вид материала	Кол-во образцов	Год выделения культуры/сбора нативных образцов
<i>S. Enteritidis</i>	штаммы	122	2016–2019
Ротавирусы	суспензии фекалий	19	2016–2018
Норовирусы	суспензии фекалий	10	2016–2018
Энтеровирусы	суспензии фекалий	3	2016
ИТОГО:		154	2016–2019

Штаммы *S. Enteritidis* и образцы суспензий фекалий от больных ОКИ, содержащие РНК возбудителей ОКИ вирусной этиологии получены из ГБУЗ СККИБ (г. Ставрополь), ГБУЗ СК «Минераловодская РБ» (г. Минеральные Воды), ГБУЗ СК «Кисловодская городская специализированная инфекционная больница» (г. Кисловодск), ГБУЗ СК «Ессентукская городская специализированная инфекционная больница» (г. Ессентуки).

Для проведения генетической идентификации возбудителей ОКИ использовали культуры *S. Enteritidis* и клинический материал от больных, инфицирование которых произошло на территории Ставропольского края.

2.2 Микробиологические методы

Штаммы *F. tularensis* культивировали на FT-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ) в течение 36–48 ч при температуре (37 ± 1) °С. Из выросших культур готовили суспензии в физиологическом растворе с концентрацией 10^9 м.к./мл, которые использовали для выделения ДНК.

Культивирование штаммов *S. Enteritidis* осуществляли на агаре Хоттингера в течение 18-24 ч при температуре (37 ± 1) °С. Видовую идентификацию культур сальмонелл проводили по ферментативной активности в отношении различных субстратов с использованием наборов реагентов для идентификации энтеробактерий — ММТЕ1 и ММТЕ2 (НПО «Аллерген» г. Ставрополь). Определение антигенной структуры штаммов выполняли в реакции агглютинации с сыворотками диагностическими сальмонеллезными адсорбированными к О- и Н- антигенам сальмонелл ПЕТСАЛ (производства СПБНИИВС Россия). Для выделения ДНК из бактериальной массы готовили суспензии микробных клеток *S. Enteritidis* в физиологическом растворе с концентрацией 10^9 м.к./мл.

Обеззараживание микробных взвесей *F. tularensis* и *S. Enteritidis* осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

2.3 Выделение ДНК и РНК

Изоляцию ДНК из микробных взвесей культур *F. tularensis* и *S. Enteritidis* для проведения генетического типирования методом MLVA осуществляли набором реагентов «ДНК-сорб-В» (производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ). Подготовку препаратов ДНК культур *F. tularensis* для выполнения полногеномного высокопроизводительного секвенирования осуществляли набором реагентов D-cells для выделения ДНК из клеток животных и бактерий (Биолабмикс, РФ).

Экстракцию ДНК/РНК возбудителей ПОИ и ОКИ бактериальной и вирусной природы из проб полевого и клинического материала и вирусодержащей культуральной жидкости выполняли с помощью набора реагентов «РИБО-преп» (производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ). Для получения вирусной кДНК использовали набора реагентов «РЕВЕРТА-L 100» (производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ).

2.4 Детекция НК возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекций

Наличие специфической ДНК/РНК возбудителей ПОИ в образцах полевого и клинического материала подтверждали с использованием диагностических тест-систем: «АмплиСенс *Borrelia burgdorferii* sensu lato-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ) — для выявления 16s РНК боррелий, «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ) — для выявления ДНК возбудителя лихорадки Ку, «АмплиСенс ССНФV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ) — для детекции РНК вируса ККГЛ, «АмплиСенс WNF-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ) — для выявления РНК вируса ЗН.

Присутствие ДНК риккетсий группы КПЛ в суспензиях иксодовых клещей подтверждали методом ПЦР, по протоколу, предложенному Mediannikov et al.,

(2014) [149], с использованием набора реагентов БиоМастер HS-qPCR (2×) (Биолабмикс, РФ), праймеров и зондов:

gltA-P: FAM-СТАТТАТГСТТГСГГСТГТСГГТТС-BHQ2;

gltA-p-F1: GTGAATGAAAGATTACAСТАТТТТАТ;

gltA-p-R1:GTATCTTAGCAATCATTTСТААТАGС [149]

РНК ортохантавирусов в образцах выявляли методом ПЦР с электрофоретической детекцией в соответствии с ранее опубликованным протоколом Klempa et al., (2009) [136], с использованием набора реактивов БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, РФ) и праймеров:

HAN-L-F1: ATGTAYGTBAGTGCWGATGC и

HAN-L-R1: AACCADTCWGTYCCRTCATC — для первого раунда ПЦР

HAN-L-F2: TGCWGATGCHACIAARTGGTC и

HAN-L-R2: GCRTCRTCWGARTGRTGDGCAA — для второго раунда ПЦР [136].

Детекцию РНК возбудителей ОКИ вирусной природы в клиническом материале выполняли методом ПЦР с использованием диагностических тест-систем «АмплиСенс ОКИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ) — для выявления РНК ротавирусов и норовирусов и «АмплиСенс Enterovirus-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ) — для выявления РНК энтеровирусов.

2.5 Идентификация геновариантов возбудителей природно-очаговых инфекций

Генетическое типирование культур *F. tularensis* проводили методами MLVA и CanSNP типирования. MLVA анализ выполняли по схеме, предложенной Johansson, 2004 г. [135], VNTR профиль определяли на основании установления количества tandemных повторах в локусах: Ft-M1–Ft-M25. Амплификацию VNTR-локусов выполняли с использованием ПЦР смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, РФ) и праймеров, опубликованных в статье [135]. Размер амплифицированных VNTR-локусов определяли методом капиллярного

секвенирования на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Постановку реакции секвенирования по Сэнгеру проводили с помощью набора реагентов для циклического секвенирования Big Dye Terminator Kit v. 3.1 (Thermo Fisher Scientific, США). Построение дендрограмм на основе данных MLVA-типирования, определение принадлежности изолята к MLVA-кластеру осуществляли в программе PHYLOVIZ 2.0, в качестве референсных генотипов использовали VNTR профили штаммов *F. tularensis*, содержащиеся в базе данных MLVAbank for Microbes Genotyping [152].

CanSNP генотип штаммов *F. tularensis* проводили на основании поиска канонических единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) в полногеномной последовательности. Полногеномное секвенирование культур возбудителя туляремии выполняли методом высокопроизводительного секвенирования на генетическом анализаторе Seq Studio S5 (Thermo Fisher Scientific, США). Для подготовки библиотек использовали набор NEBNext Fast DNA для Ion Torrent (NEB, Великобритания). Оценку качества данных, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования, осуществляли в программе FastQC v.0.11.3, риды с низким качеством отфильтровывали с использованием программы Trimmomatic v.0.33, сборку геномных последовательностей *de novo* проводили в программе Newbler assembler v 3.0. Принадлежность штамма к CanSNP типу определяли с использованием программы CanSNPer2 [140].

Субвидовое типирование изолятов *S. burnetii* осуществляли методом MLVA-10 по схеме, опубликованной в статье Nathalie Arricau-Bouvery, 2006 г. [102]. VNTR профиль определяли на основании анализа количества tandemных повторах в локусах: Cbu0033_ms01, Cbu0448_ms03, Cbu0988_ms07, Cbu1316_ms12, Cbu1941_ms20, Cbu1963_ms21, Cbu1980_ms22, Cbu0831_ms26, Cbu1351_ms30, Cbu1941_ms36. Праймеры для амплификации VNTR-локусов и условия проведения ПЦР опубликованы в статье [102]. ПЦР проводили с использованием готовой смеси БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, РФ). Точный размер аллелей VNTR-локусов определяли методом секвенирования по Сэнгеру. Для сравнения результатов MLVA типирования изолятов *S. burnetii*

использовали VNTR профили штаммов возбудителя лихорадки Ку, опубликованные в базе данных MLVAbank for Microbes Genotyping [151].

Для видовой идентификации изолятов *Rickettsia* sp. выполняли секвенирование и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей участков генов *gltA* (размером 552 п.н.) и *OmpB* (размером 720 п.н.). Амплификацию фрагмента гена *gltA* выполняли с использованием праймеров *gltA*-Fc: CGAACTTACCGCTATTAGAATG-3 и *gltA*-Rc: CTTTAAGAGCGATAGCTTCAAG [190]. Фрагмент гена *OmpB* нарабатывали с помощью праймеров 120-2788: AAACAATAATCAAGGTAAGTGT и 120-3599: TACTTCCGGTTACAGCAAAGT [188]. ПЦР проводили с применением реактивов БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, РФ). Фрагментное секвенирование ПЦР продуктов проводили на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Сборку секвенированных последовательностей фрагментов генов осуществляли в программе Vector NTI. Секвенированные последовательности фрагментов генов *gltA* и *OmpB* сравнивали с использованием алгоритма BLASTn с референсными последовательностями различных видов риккетсий группы КПЛ, содержащимися в базе данных GenBank.

Видовую идентификацию изолятов боррелий выполняли на основе анализа последовательности фрагмента гена *16s PNH* (724 п.н.) Амплификацию фрагментов генома для секвенирования осуществляли методом двухраундовой ПЦР с использованием готовой смеси для ПЦР БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, РФ) и пар праймеров: 16S1A СТАACGCTGGCAGTGCGTCTTAAGC и 16S1B AGCGTCAGTCTTGACCC AGAAGTTC (1 раунд), 16S2A AGTCAAACGGGATGTAGCAA TAC и 16S2B GGTATTCTTTCTGATATCAACAG (2 раунд) [169]. Секвенирование ПЦР продуктов проводили на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Сборку последовательности выполняли в программе Vector NTI. Построение филогенетического дерева выполняли в программе MEGA 11 с

использованием референсных последовательностей боррелий, относящихся к различным видам, содержащимися в базе данных GeneBank.

Идентификацию генетических вариантов вируса ККГЛ осуществляли методами секвенирования фрагментов генома вируса (участков S, M и L сегментов) и полногеномного секвенирования. Участки трех сегментов генома изолятов РНК вируса ККГЛ амплифицировали с использованием пар праймеров: S-100F: GATGAGATGAACAAGTGGTTTGA и S-680R: TGCSTTTGACAAATTCCTGCACCA — для амплификации фрагмента S сегмента (537 нуклеотидных оснований (н.о.)), 24F: CAGCCATGCCCAAACATC и 25R: CTRTCAGCTARTCTTTCACCRCAAG — для амплификации фрагмента M сегмента (435 н.о.) [71; 138] L100f: GATTGGACTCAGGTGATTGCTGGTC и L540r: GCCTCCCTCGTGTCTGTTTC — для амплификации фрагмента L сегмента (437 н.о.) [49]. Амплифицированные фрагменты генома вируса ККГЛ секвенировали по Сэнгеру на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Сборку секвенированных последовательностей выполняли в программе Vector NTI.

Полногеномное секвенирование культур вируса ККГЛ выполняли методом высокопроизводительного секвенирования на приборе SeqStudio S5 (Thermo Fisher Scientific, США). Целевую кДНК вируса ККГЛ обогащали методом ПЦР, праймеры для амплификации 20 перекрывающихся фрагментов генома вируса ККГЛ и условия проведения ПЦР опубликованы в статье [49; 187]. Полученные ПЦР фрагменты генома вируса ККГЛ использовали при подготовке библиотек для высокопроизводительного секвенирования. Библиотеки с длиной ридов 400 н.о. получали с помощью набора NEBNext Fast DNA для Ion Torrent (New England Biolabs, Великобритания). Картирование ридов на референсную последовательность генома вируса ККГЛ проводили в программе Newbler mapper v 3.0.

Генетический вариант вируса ККГЛ идентифицировали при проведении филогенетического анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей генома (частичных и полноразмерных) и референсных последовательностей

генома вариантов вируса ККГЛ, относящихся к разным генетическим линиям, содержащимся в базе данных GeneBank. Построение филогенетических деревьев осуществляли в программе MEGA 11 с использованием метода Neighbor-joining, алгоритма Kimura 2. Статистическую достоверность топологии филогенетических деревьев оценивали методом Bootstrap анализа, вычисления проводили для 1000 повторов.

Генетическую идентификацию ортохантавирусов проводили методом секвенирования нуклеотидной последовательности участка L сегмента генома размером 347 н.о. Амплификацию фрагмента L сегмента генома ортохантавирусов выполняли методом двухраундовой ПЦР с использованием праймеров: HAN-L-F1: ATGTAYGTBAGTGCWGATGC и HAN-L-R1: AACCADTCWGTGCCRTCATC – для первого раунда ПЦР HAN-L-F2: TGCWGATGCHACIAARTGGTC и HAN-L-R2: GCRTCRTCWGARTGRTGDGCAA — для второго раунда ПЦР [136]. Секвенированные нуклеотидные последовательности участков генома и референсные последовательности геномов ортохантавирусов, относящихся к разным геновидам, использовали для построения дендрограмм в программе Mega 11 и установления принадлежности исследуемых РНК-изолятов к генетическим линиям ортохантавирусов.

Субвидовое типирование РНК-изолятов вируса ЗН осуществляли методом фрагментного секвенирования нуклеотидной последовательности участка генома — фрагмента 5'нетранслируемой области и гена С, размером 217 н.о. Исследуемый участок генома амплифицировали с помощью праймеров: WNF8:CGCCTGTGTGAGCTGACAAACTTAG и WNF281: GTCGGAGCRATTGCWGTGAA [2; 72]. Секвенированные нуклеотидные последовательности сравнивали с референсными последовательностями геномов штаммов ЗН, относящихся к разным генетическим линиям, филогенетический анализ выполняли в программе Mega 11.

2.6 Субвидовое типирование возбудителей острых кишечных инфекций

Субвидовое типирование культур *S. Enteritidis* осуществляли методом MLVA-5 по протоколу, предложенному Hopkins, 2011 [132]. VNTR профиль определяли на основании анализа числа tandemных повторов в пяти локусах (SENTR7-SENTR5-SENTR6-SENTR4-SE3). Для амплификации VNTR-локусов использовали пары праймеров:

SENT7F: 6FAM-ACGATCACCCACGGTCACTTC и
 SENT7R: CGGATAACAACAGGACGCTTC,
 SENTR5F: 6FAM-CACCGCACAATCAGTGGAAC и
 SENTR5R: GCGTTGAATATCGGCAGCATG,
 SENTR6F: NED- ATGGACGGAGGCGATAGAC и
 SENT6R: AGCTTCACAATTTGCGTATTCG,
 SENTR4F: HEX-GACCAACACTCTATGAACCAATG и
 SENTR4R: ACCAGGCAACTATTCGCTATC,
 SE-3F: HEX-CAACAAAACAACAGCAGCAT и
 SE-3R: GGGAAACGGTAATCAGAAAGT [132].

Постановку ПЦР осуществляли с использованием ПЦР смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, РФ). Размер амплифицированных VNTR-локусов определяли методом капиллярного электрофореза (фрагментного анализа) на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Фрагментный анализ проводили в присутствии стандарта LIZ 600 (Thermo Fisher Scientific, США).

Геновариант ротавирусов идентифицировали методом фрагментного секвенирования генов *VP7* и *VP4*. Целевые участки генома ротавируса нарабатывали методом ПЦР с праймерами: VP7F: ATGTATGGTATTGAATATACCAC и VP7R: AACTTGCCACCATTTTTTCC — для амплификации участка гена *VP7*, размером 884 н.о., VP4F: TATGCTCCAGTNAATTGG и VP4R: ATTGCATTTCTTTCCATAATG — для амплификации участка гена *VP4*, размером 664 н.о., [125; 157; 176].

Нуклеотидную последовательность амплифицированных фрагментов генома ротавирусов определяли методом капиллярного секвенирования на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Секвенированные нуклеотидные последовательности участков генов *VP7* и *VP4* РНК-изолятов ротавирусов анализировали с помощью *on-line* платформы Rotavirus A Genotyping Tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/rotavirusa>) [145].

Субвидовую характеристику изолятов РНК норовирусов 2 генотипа проводили методом секвенирования фрагментов генов нуклеокапсида вируса (ген *C*) и полимеразы (*RdRp*). Нарботку участка гена нуклеокапсида РНК-изолятов норовирусов (размером 387 н.о.) выполняли методом ПЦР с использованием праймеров: G2SKF: CNTGGGAGGGCGATCGCAA и G2SKR: CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT [156; 185], участка гена полимеразы (размером 331 п.н.) — с использованием праймеров p290: GATTACTCCAGGTGGGAYTCMAC и p289: TGACGATTTTCATCATCMCCRTA [147; 165]. Амплифицированные участки генома секвенировали на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Секвенированные последовательности фрагментов генов нуклеокапсида и полимеразы РНК-изолятов норовирусов анализировали с помощью веб-сервиса Norovirus Typing Tool Version 2.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>) [137].

Генотипирование РНК-изолятов энтеровирусов осуществляли на основе анализа последовательности фрагмента гена *VP1*. Амплификацию целевого участка для секвенирования, размером 378 н.о., выполняли с использованием праймеров: AN89: CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG и AN88: TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT [158]. Капиллярное секвенирование фрагментов генома проводили на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Идентификацию генетических вариантов энтеровирусов проводили с применением *on-line* ресурса Enterovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus>) [137].

2.7 Биоинформатический и статистический анализ

Оценку качества .ab1 файлов и сборку секвенированных фрагментов генома микроорганизмов выполняли в программе Vector NTI. Качество данных, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования, оценивали в программе FastQC v.0.11.3, риды с низким качеством отфильтровывали с использованием программы Trimmomatic v.0.33, сборку геномных последовательностей *de novo* проводили в программе Newbler assembler v 3.0. Картирование ридов на референсные геномные последовательности выполняли в программе Newbler mapper v 3.0.

Построение дендрограмм на основе результатов MLVA типирования штаммов *F. tularensis* и изолятов ДНК *S. burnetii*, проводили в программе PHYLOVIZ 2.0, для сравнения использовали VNTR профили штаммов возбудителей туляремии и лихорадки Ку, опубликованные в базе данных MLVAbank for Microbes Genotyping [151; 152]. Филогенетический анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей генома микроорганизмов (*B. burgdorferii*, *Rickettsia sp.* вирусов ККГЛ, ЗН, ортохантавирусов) проводили в программе MEGA 11, для построения дендрограмм использовали метод Neighbor-joining, алгоритм Kimura 2. Статистическую достоверность топологии филогенетических деревьев оценивали методом Bootstrap анализа, вычисления выполняли для 1000 повторов.

Для идентификации геновариантов микроорганизмов использовали также программы CanSNPer2 (определение CanSNP типа *F. tularensis*), *on-line* ресурсы Rotavirus A Genotyping Tool, Norovirus Typing Tool Version 2.0, Enterovirus Genotyping Tool Version 1.0. (идентификация геновариантов рота-, норо- и энтеровирусов).

2.8 Картографический анализ

Построение карт распространения генетических вариантов возбудителей ПОИ выполняли в программе ArcMap 10. Координаты точек сбора образцов полевого материала, из которых были изолированы культуры и изоляты РНК/ДНК возбудителей ПОИ и мест предполагаемого инфицирования людей возбудителями ПОИ наносили на электронную карту Ставропольского края.

ГЛАВА 3 ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

3.1 Генетическое типирование штаммов *Francisella tularensis*

С целью определения спектра генетических вариантов *F. tularensis*, характерных для Ставропольского края, проводилась генетическая идентификация методами MLVA-25 и CanSNP типирования культур возбудителя туляремии, изолированных на территории региона в 2016-2022 гг., а также ретроспективное генотипирование коллекционных штаммов, выделенных в 2012-2015 гг. Результаты генотипирования культур *F. tularensis* представлены в таблице 5.

Выполнено MLVA-25 типирование 22 культур *F. tularensis*, изолированных от грызунов (полевки общественной — *Microtus socialis*, полевки обыкновенной — *M. arvalis*, мыши домовая — *Mus musculus*, мыши малой лесной — *Sylviaemus uralensis*), зайцеобразных (зайца русака — *Lepus europaeus*), насекомоядных (белозубки малой — *Crocidura suaveolens*, белозубки белобрюхой — *C. leucodon*, ежа южного — *Erinaceus roumanicus*) и иксодовых клещей (*Hyalomma marginatum*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus rossicus*), собранных эпизоотологическом обследовании региона в 2016-2022 гг.

Установлена принадлежность исследуемых штаммов возбудителя туляремии к 10 MLVA-генотипам, отличавшимся по размерам и количеству повторов в VNTR-локусах FT-M3 (10–13, 16–17, 20 повторов), FT-M6 (4–5 повторов). В соответствии предложенной ранее Johansson et al. (2004) классификацией генетических подгрупп *F. tularensis* [135], штаммы, циркулировавшие на территории Ставропольского края, принадлежали к MLVA-кластерам В.I и В.III. К подгруппе В.I относились 15 культур из 9 административных районов: Ипатовского (2017 г.), Новоалександровского (2018 г.), Александровского (2022 г.), Изобильненского (2022 г.), Красногвардейского

Таблица 5 — Результаты MLVA-25 и CanSNP типирования культур *Francisella tularensis*, изолированных из образцов полевого материала, собранных при проведении эпизоотологического обследования территории Ставропольского края

№ п/п	Год выделения	Административный район	Источник выделения	MLVA-кластер	VNTR-профиль	CanSNP-тип
1	2	3	4	5	6	7
1	2012	Грачевский	Клещи <i>Dermacentor marginatus</i>	В.І	3,2,16,4,2,6,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.215
2	2013	Красногвардейский	Клещи <i>Rhipicephalus rossicus</i>	В.І	3,2,14,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.215
3	2013	Туркменский	Клещи <i>Hyalomma marginatum</i>	В.І	3,2,9,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.215
4	2015	Апанасенковский	Заяц русак <i>Lepus europaeus</i>	В.ІІІ	3,2,16,4,2,4,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.77
5	2015	Курский	Еж южный <i>Erinaceus roumanicus</i>	В.І	3,2,10,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.170
6	2015	Петровский	Мышь малая лесная <i>Sylvaeemus uralensis</i>	В.ІІІ	3,2,11,4,2,4,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.203
7	2015	Шпаковский	Клещи <i>Dermacentor marginatus</i>	В.ІІІ	3,2,12,4,2,4,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.203
8	2015	Шпаковский	Мышь малая лесная <i>Sylvaeemus uralensis</i>	В.ІІІ	3,2,16,4,2,4,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.77
9	2016	Шпаковский	Клещи <i>Dermacentor reticulatus</i>	В.ІІІ	3,2,12,4,2,4,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.203
10	2017	Ипатовский	Общественная полевка <i>Microtus socialis</i>	В.І	3,2,11,4,2,4,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.79

1	2	3	4	5	6	7
11	2017	Курский	Мышь домовая <i>Mus musculus</i>	В.Ш	3,2,12,4,2,4,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.203
12	2017	Шпаковский	Зяц русак <i>Lepus europaeus</i>	В.Ш	3,2,11,4,2,4,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.203
13	2018	Новоалександровский	Мышь малая лесная <i>Sylvaemus uralensis</i>	В.І	3,2,20,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.170
14	2022	Александровский	Белозубка малая <i>Crocidura suaveolens</i>	В.І	3,2,10,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.79
15	2022	Александровский	Общественная полевка <i>Microtus socialis</i>	В.І	3,2,10,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.79
16	2022	Изобильненский	Белозубка малая <i>Crocidura suaveolens</i>	В.І	3,2,10,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.79
17	2022	Изобильненский	Зяц русак <i>Lepus europaeus</i>	В.І	3,2,20,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.170
18	2022	Изобильненский	Мышь малая лесная <i>Sylvaemus uralensis</i>	В.І	3,2,10,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.79
19	2022	Изобильненский	Мышь малая лесная <i>Sylvaemus uralensis</i>	В.Ш	3,2,13,4,2,4,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.203
20	2022	Красногвардейский	Белозубка белобрюхая <i>Crocidura leucodon</i>	В.І	3,2,10,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.79
21	2022	Красногвардейский	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i>	В.І	3,2,10,4,2,5,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.79

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7
22	2022	Красногвардейский	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i>	В.Ш	3,2,16,4,2,4,2,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.203
23	2022	Минераловодский	Заяц русак <i>Lepus europaeus</i>	В.І	3,2,20,4,2,5,2,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.170
24	2022	Новоселицкий	Общественная полевка <i>Microtus socialis</i>	В.І	3,2,17,4,2,5,2,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.181
25	2022	Петровский	Клеши <i>Rhipicephalus rossicus</i>	В.Ш	3,2,12,4,2,4,2,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.203
26	2022	Шпаковский	Белозубка малая <i>Crocidura suaveolens</i>	В.І	3,2,10,4,2,5,2,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.79
27	2022	Шпаковский	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i>	В.І	3,2,20,4,2,5,2,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.21
28	2022	Шпаковский	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i>	В.Ш	3,2,13,4,2,4,2,2,2,2,5,2,1,3,3,1,2,2,1,3,2,4,1,2,4	В.26

(2022 г.), Минераловодского (2022 г.), Новоселицкого (2022 г.), Петровского (2022 г.), Шпаковского (2022 г.). К подгруппе В.Ш относились 7 культур, выделенных на территории 5 административных районов: Шпаковского (2016, 2017, 2022 гг.), Курского (2017 г.), Петровского (2022 г.), Красногвардейского (2022 г.), Изобильненского (2022 г.). Дендрограмма, построенная по результатам MLVA-25 генотипирования штаммов возбудителя туляремии представлена на рисунке 1.

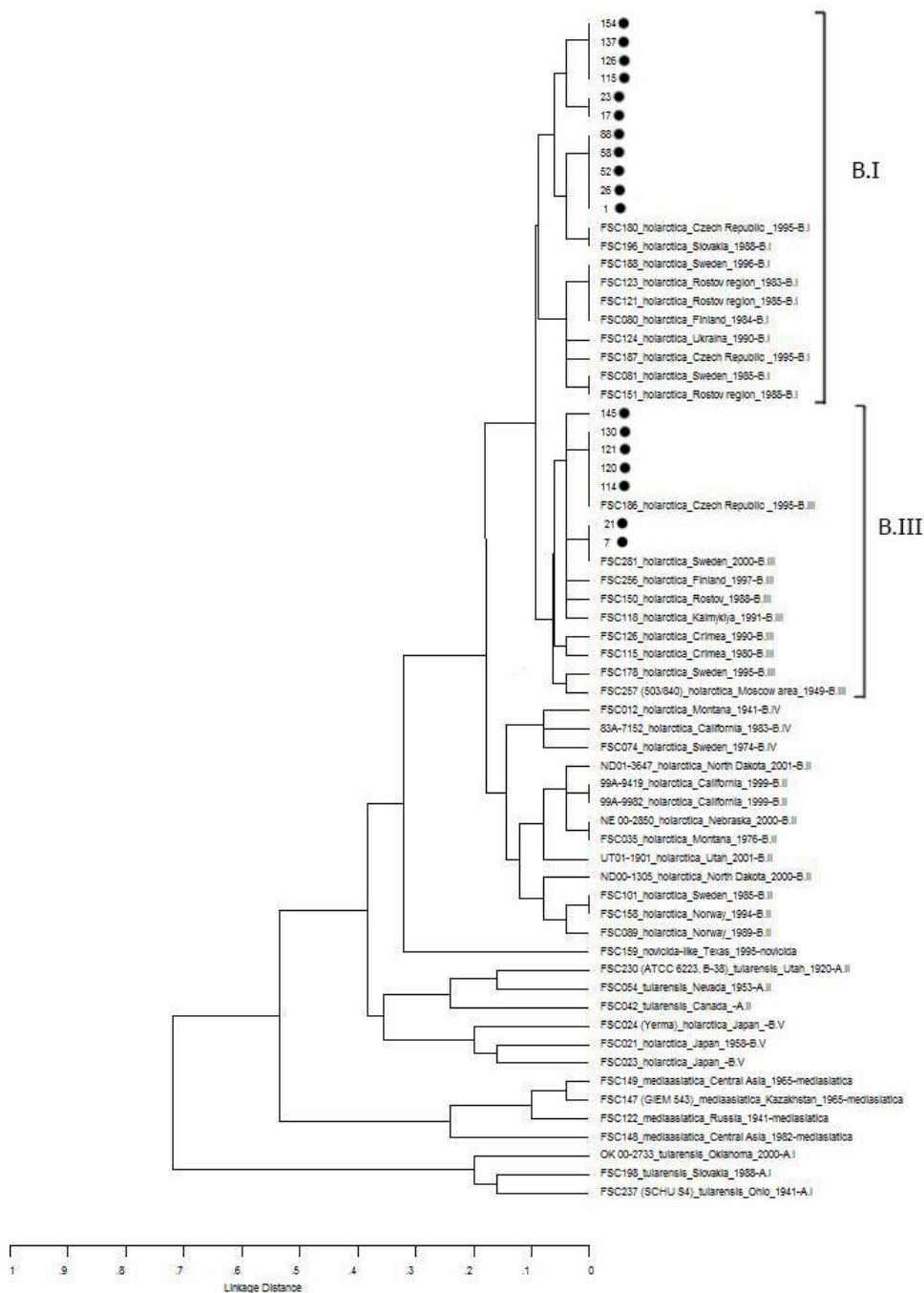


Рисунок 1 — Дендрограмма по данным MLVA-25 генотипирования штаммов *Francisella tularensis*

В результате CanSNP типирования на основе анализа полногеномных последовательностей культур *F. tularensis* в Ставропольском крае выявлены штаммы, относящиеся к 6 CanSNP генотипам: В.21 (1 культура, Шпаковский р-н — 2022 г.), В.26 (1 культура, Шпаковский р-н — 2022 г.), В.79 (10 культур, Ипатовский р-н — 2017 г., Александровский р-н — 2022 г., Изобильненский р-н — 2022 г., Красногвардейский р-н — 2022 г., Шпаковский р-н — 2022 г.), В.170 (3 культуры, Новоалександровский р-н — 2018 г., Изобильненский р-н — 2022 г., Минераловодский р-н — 2022 г.), В.181 (1 культура, Новоселицкий р-н — 2022 г.), В.203 (6 культур, Шпаковский р-н — 2016–2017 гг., Курский р-н — 2017 г., Изобильненский р-н — 2022 г., Красногвардейский р-н — 2022 г., Петровский р-н — 2022 г.).

Проведено ретроспективное MLVA-25 и CanSNP типирование 8 штаммов *F. tularensis*, изолированных из проб полевого материала: селезенок грызунов (мыши малой лесной — *S. uralensis*), зайцеобразных (зайца русака — *L. europaeus*), насекомоядных (ежа южного — *E. roumanicus*), а также иксодовых клещей (*D. marginatus*, *R. rossicus*, *H. marginatum*), собранного при обследовании административных районов Ставропольского края в 2012–2015 гг. Показано, что штаммы возбудителя туляремии, выделенные на территории Ставропольского края в 2012–2015 гг. относились к 7 MLVA-типам, относящимся к MLVA-кластерам: В.І (4 культуры, выделены в Грачевском р-не — 2012 г., Красногвардейском р-не — 2013 г., Туркменском р-не — 2013 г., Курском р-не — 2015 г.) и В.ІІІ (4 культуры выделены в Петровском р-не — 2015 г., Шпаковском р-не — 2015 г., Апанасенковском р-не — 2015 г.) и 4 CanSNP генотипам: В.170 (1 культура, выделена в Курском р-не — 2015 г.), В.215 (3 культуры, выделены в Грачевском р-не — 2012 г., Красногвардейском р-не — 2013 г., Туркменском р-не — 2013 г.), В.203 (2 культуры, выделены в Петровском р-не — 2015 г. и Шпаковском р-не — 2015 г.), В.77 (2 культуры, выделены в Апанасенковском р-не — 2015 г. и Шпаковском р-не — 2015 г.).

Территориальное распространение штаммов *F. tularensis*, относящихся к MLVA-кластерам В.І и В.ІІІ, и CanSNP генотипам, представлено на рисунках 2 и 3.

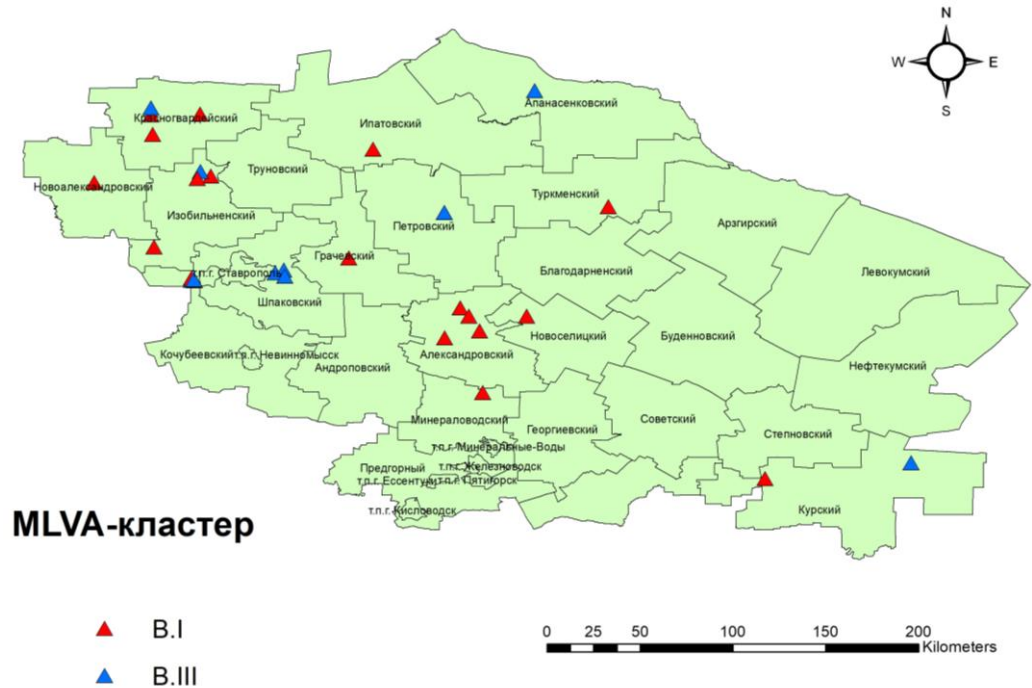


Рисунок 2 — Распространение штаммов *Francisella tularensis* MLVA-кластеров В.І и В.ІІІ на территории Ставропольского края (2012-2022 гг.)

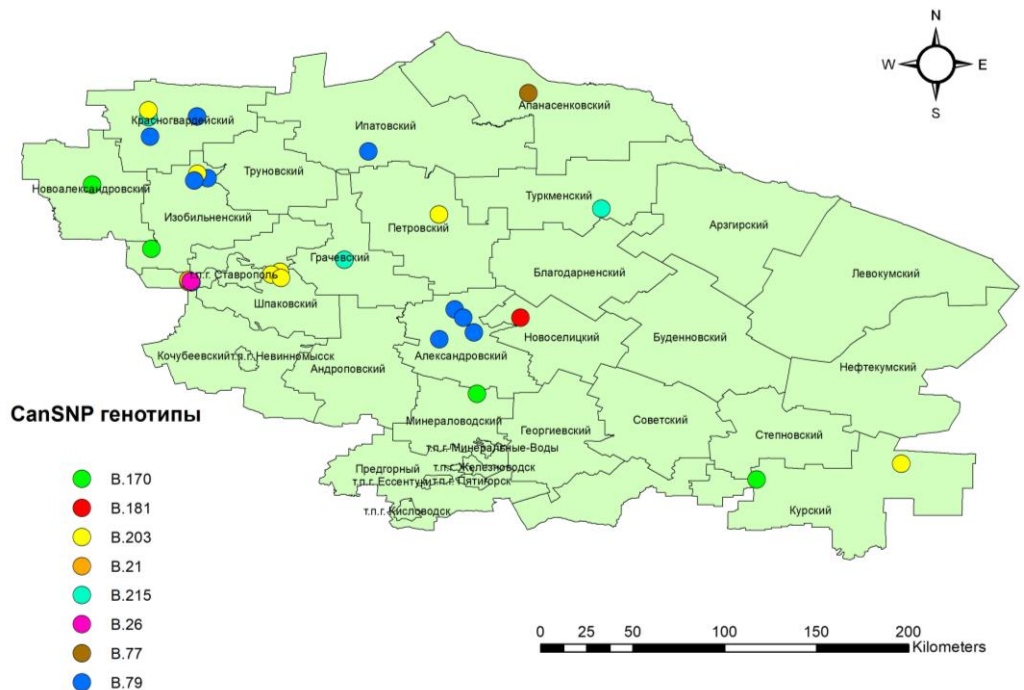


Рисунок 3 — Распространение штаммов *Francisella tularensis*, относящихся к разным CanSNP типам, на территории Ставропольского края (2012-2022 гг.)

В пределах Ставропольского края существуют локальные популяции возбудителя туляремии, в которых отмечается длительная циркуляция штаммов *F. tularensis*, принадлежащих к генетическим группам В.І (Ипатовский, Новоалександровский, Александровский, Туркменский, Минераловодский, Новоселицкий районы) В.ІІІ (Петровский, Апанасенковский районы). В Изобильненском, Красногвардейском, Курском и Шпаковском районах выявлены штаммы, относящиеся к разным генетическим подгруппам.

Штаммы возбудителя туляремии разных CanSNP типов распространены на территории региона мозаично, образуя разрозненные микропопуляции. Наиболее широко в Ставропольском крае распространены штаммы CanSNP типов В.79 и В.203: так, штаммы типа В.79 встречаются на территории четырех административных районов (Ипатовского, Изобильненского, Александровского и Красногвардейского); штаммы CanSNP типа В.203 выявлены в Петровском, Красногвардейском, Шпаковском и Курском районах, где образуют локальные популяции. Штаммы CanSNP типа В.170 изолированы в Новоалександровском, Изобильненском, Красногвардейском, Минераловодском и Курском районах, культуры типа В.215 — в Туркменском и Грачевском районах. Штаммы CanSNP типов В.181, В.26 и В.77 имеют локальное распространение: так, штаммы типа В.181 выявлены только в Новоселицком районе, типа В.26 — только в Шпаковском районе, типа В.77 — только в Апанасенковском районе.

В 2012–2013 гг. и 2018 г., в Ставропольском крае выделены штаммы возбудителя туляремии генетической подгруппы В.І, в 2016 г. — штаммы генетической подгруппы В.ІІІ. В 2015, 2017 и 2022 гг. были обнаружены штаммы, принадлежащие к двум генетическим подгруппам В.І и В.ІІІ (рисунок 4).

В результате анализа соотношения CanSNP типов возбудителя туляремии установлено, что в 2012–2013 гг. циркулировали штаммы CanSNP В.215, в 2016 г. — штаммы типа В.77, в 2018 — штаммы типа В.170. В 2015 г. наблюдалась одновременная циркуляция штаммов CanSNP типов В.170, В.203 и В.77. В 2017 г. — штаммов генотипов В.203 и В.79, в 2022 г. — штаммов 6 CanSNP типов: В.170, В.181, В.203, В.21, В.26 и В.79 (рисунок 5).

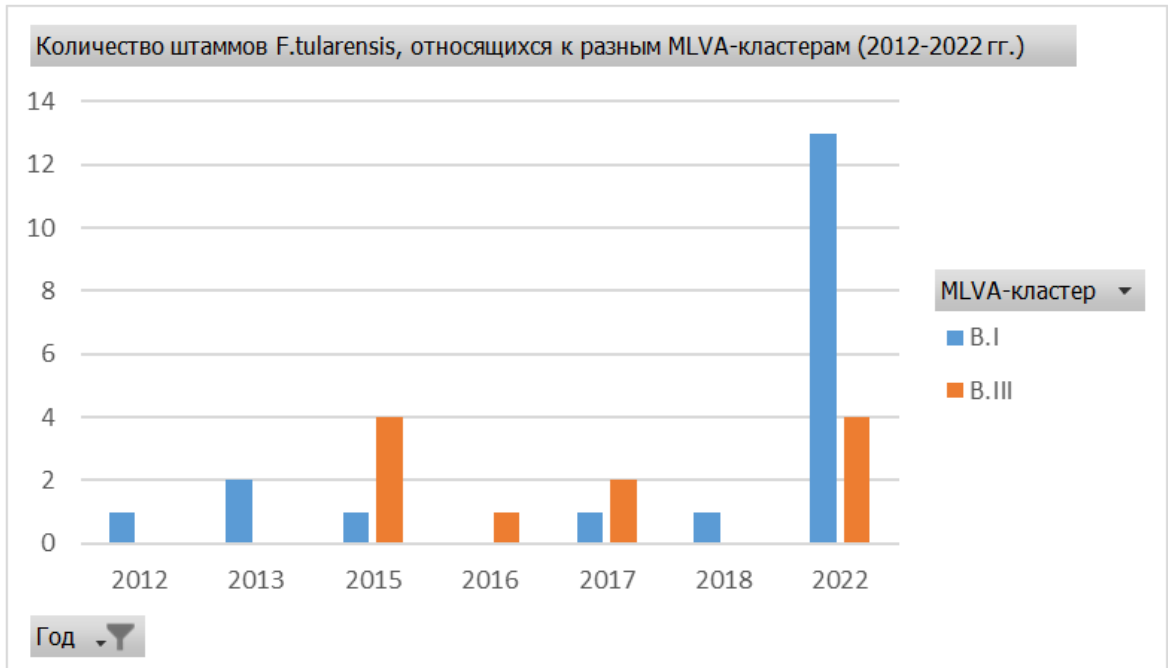


Рисунок 4 — Количество штаммов *Francisella tularensis*, принадлежащих к MLVA-кластерам B.I и B.III, изолированных в Ставропольском крае в 2012–2022 гг.

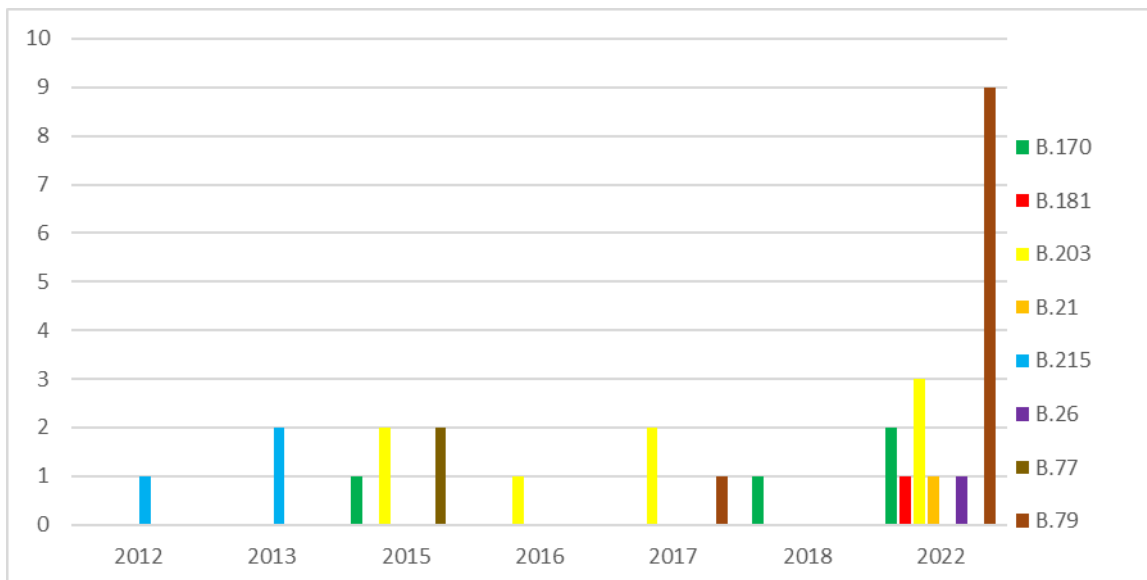


Рисунок 5 — Количество штаммов *Francisella tularensis*, изолированных в Ставропольском крае в 2012–2022 гг., принадлежащих к разным CanSNP типам.

Количество CanSNP генотипов возбудителя туляремии, выявленных в отдельные годы, коррелирует с интенсивностью регистрируемых эпизоотий туляремии в Ставропольском крае. В 2012–2013, 2016 и 2018 гг. в пределах Ставропольского края не наблюдалось интенсивных эпизоотий туляремии, единичные изолированные культуры возбудителя туляремии относятся к

доминирующим в определенные годы геновариантам. В 2022 г. отмечалась неблагоприятная эпизоотическая ситуация по туляремии, и была зарегистрирована наиболее масштабная эпизоотия, вызванная преимущественно штаммами CanSNP типов В.79, В.203 и В.170.

Штаммы *F. tularensis*, принадлежащие к MLVA-кластеру В.І, характерны для территории Ставропольского края, штаммы данной генетической подгруппы были выделены на территории региона ранее (в 2003–2010 гг.). Изоляты возбудителя туляремии подгруппы В.ІІІ выявлены очаге туляремии на территории Ставропольского края в 2012 г. К генетической подгруппе В.І относятся также штаммы, изолированные в регионах РФ (Ростовской области, 1983 г., 1985 г., 1988 г.), странах восточной Европы (Чехии, 1995 г., Украине, 1990 г., Словакии, 1988 г.), странах Скандинавского полуострова (1984-1985, 1996 гг.). К MLVA-кластеру В.ІІІ принадлежат штаммы, выделенные в субъектах европейской части России (Московской области, 1949 г., Республике Крым, 1980, 1990 гг., Ростовской области, 1988 г., Республике Калмыкия, 1991 г.), странах восточной и северной Европы (Чехии, 1995 г., Швеции, 2000 г., Финляндии, 1997 г.) [85].

Данных о распространении CanSNP типов возбудителя туляремии в РФ в настоящее время недостаточно. На территории РФ в период с 1928 по 2011 гг. изолированы штаммы CanSNP типов В.112, В.190, В.24, В.25, В.66, В.7, В.77, М.ІІ.2, М.ІІ.3. Штаммы CanSNP типа В.215 ранее были изолированы в Швеции (2009 г. от зайца русака), Франции (2009 г. от зайца русака), Германии (2016 г. от зайца русака), штаммы генотипа В.77 изолированы во Франции (2014 г. от больных туляремией) и Германии (2010 г.) [175].

3.2 Идентификация генетических вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки

3.2.1 Генетическая идентификация вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки на основе секвенирования фрагментов S, M и L сегментов генома вируса

Идентифицированы генетические варианты 141 РНК-изолятов вируса ККГЛ из 102 образцов клинического материала (сыворотка и плазма крови) от больных КГЛ в Ставропольском крае в 2016–2021 гг. и 39 проб полевого материала, собранных при эпизоотологическом обследовании административных районов Ставропольского края в 2016–2021 гг. (суспензий клещей *H. marginatum* и *R. turanicus* и пробы суспензии печени южного ежа (*E. roumanicus*)).

Филогенетический анализ секвенированных последовательностей S, M и L сегментов генома вируса позволил установить принадлежность РНК-изолятов вируса ККГЛ, циркулировавших в регионе, к генотипам Европа-1 и Европа-3 (рисунки 6, 7, 8).

Данные о выявленных геновариантах вируса и сведения об исследованных образцах содержатся в таблице 6.

Таблица 6 — Результаты идентификации геновариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки методом фрагментного секвенирования

№ п/п	Административный район	Год выделения	Вид материала	Геновариант	Количество РНК-изолятов	Доля геноварианта	
1	2	3	4	5	6	7	
1.	Апанасенковский	2016–2021	полевой материал (<i>H. marginatum</i>)	Va-Va-Va	12	100,0	
				сыворотка крови	Va-Va-Va	13	86,7
					Va-Vb-Va	2	13,3
2.	Арзгирский	2016–2021	сыворотка крови	Va-Va-Va	8	72,8	
				Vb-Va-Vb	1	9,1	
				Vb-Vb-Vb	2	18,2	
3.	Благодарненский	2016–2021	сыворотка крови	Va-Va-Va	5	100,0	
4.	Буденновский	2016–2018	сыворотка крови	Va-Va-Va	4	80,0	
				Vb-Vb-Vb	1	20,0	
5.	Грачевский	2016	сыворотка крови	Va-Va-Va	1	100,0	
6.	Изобильненский	2016	сыворотка крови	Va-Va-Va	1	100,0	
7.	Ипатовский	2016–2021	полевой материал (<i>H. marginatum</i>)	Va-Va-Va	1	100,0	
				сыворотка крови	Va-Va-Va	12	75,0
					Va-Vb-Va	3	18,8
					VII-VII-VII	1	6,2
8.	Кочубеевский	2018	полевой материал (<i>H. marginatum</i>)	Va-Va-Va	2	100,0	
9.	Красногвардейский	2016–2021	сыворотка крови	Va-Va-Va	3	75,0	
				Vb-Vb-Vb	1	25,0	
10.	Курский	2017	полевой материал (<i>H. marginatum</i>)	Va-Vb-Va	1	100,0	

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7
11.	Левокумский	2016–2019	полевой материал (<i>H. marginatum</i>)	Va-Vb-Va	4	100,0
			сыворотка крови	Va-Va-Va	3	75,0
				Va-Vb-Va	1	25,0
12.	Минераловодский	2019	сыворотка крови	Va-Vb-Va	1	100,0
13.	Нефтекумский	2016–2021	полевой материал (<i>H. marginatum</i>)	Va-Va-Va	9	90,0
			полевой материал (еж южный <i>Erinaceus roumanicus</i>)	Va-Vb-Va	1	10,0
			сыворотка крови	Va-Va-Va	2	28,6
				Va-Vb-Va	4	57,2
				Vb-Vb-Vb	1	14,3
14.	Новоалександровский	2016–2018	сыворотка крови	Va-Va-Va	2	100,0
15.	Новоселицкий	2019–2021	полевой материал (<i>H. marginatum</i>)	VII-VII-VII	9	100,0
			сыворотка крови	Va-Va-Va	1	100,0
16.	Петровский	2016–2021	сыворотка крови	Va-Va-Va	8	80,0
				Va-Vb-Va	1	10,0
				Vb-Vb-Va	1	10,0
17.	Степновский	2019	сыворотка крови	Va-Va-Va	1	100,0
18.	Труновский	2016–2021	сыворотка крови	Va-Va-Va	4	66,7
				Va-Vb-Va	1	16,7
				VII-VII-VII	1	16,7
19.	Туркменский	2017–2021	сыворотка крови	Va-Va-Va	6	75,0
				Va-Vb-Va	2	25,0
20.	Шпаковский	2017, 2019	сыворотка крови	Va-Va-Va	2	100,0
	г. Ставрополь	2020	сыворотка крови	Va-Va-Va	2	100,0
ИТОГО:					141	100,0

В 92,2 % исследуемых образцов выявлены РНК-изоляты вируса ККГЛ генетической линии Европа-1, в т.ч.: 100 пробах (98,0 %) клинического материала, 1 пробе печени насекомоядного и 29 пулах клещей (*H. marginatum* и *R. turanicus*). РНК-изоляты вируса ККГЛ генетической линии Европа-3 идентифицированы в 2 клинических образцах (1,9 % от всех исследованных клинических образцов) (Труновский район, 2016 г., Ипатовский район, 2019 г.), а также в 9 пулах иксодовых клещей (*H. marginatum*), собранных в 2021 г. в с. Журавское, Новоселицкого района с крупного рогатого скота (КРС).

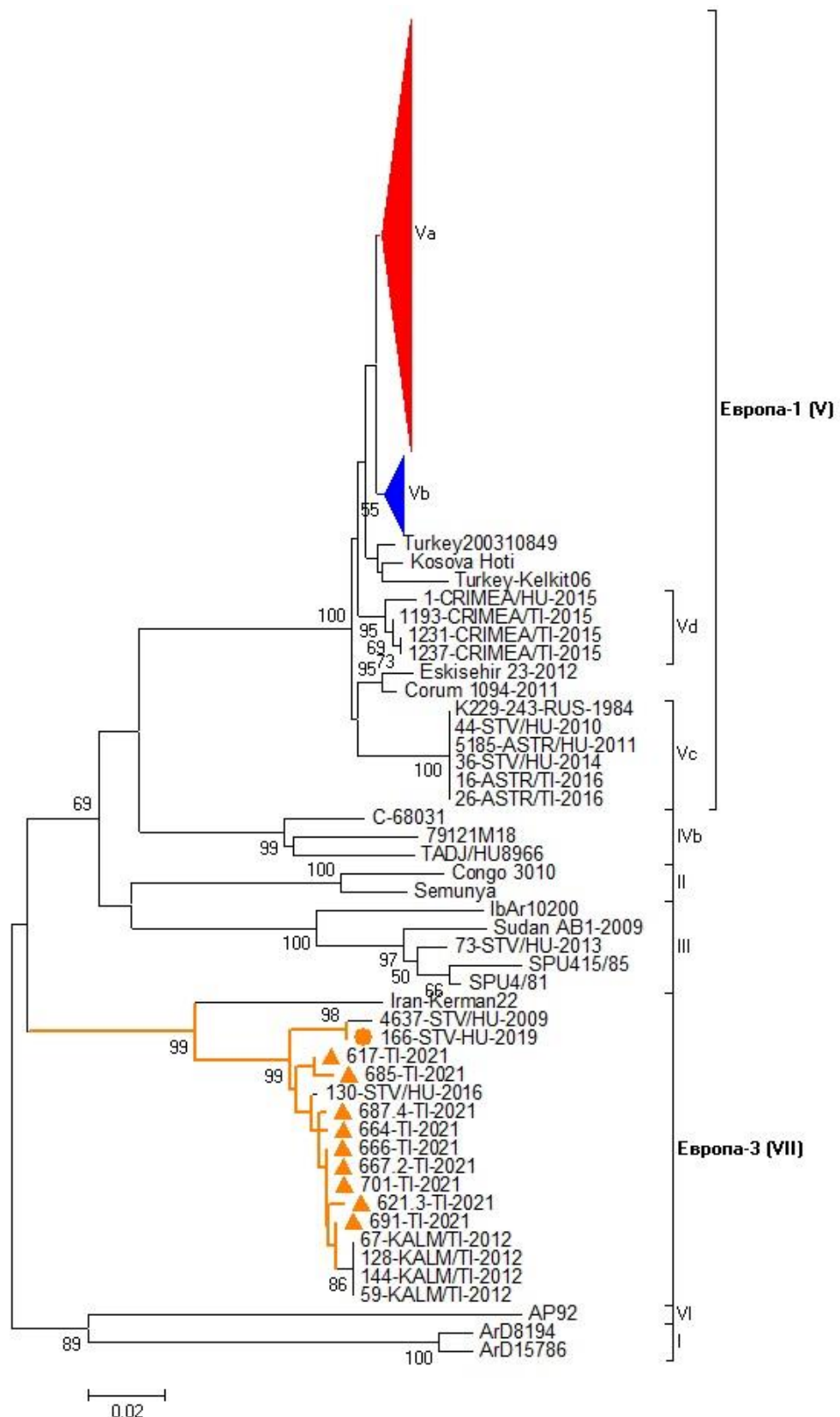


Рисунок 6 — Дендрограмма на основе нуклеотидных последовательностей S-сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (538 н.о.), маркерами отмечены образцы, изученные в рамках диссертационного исследования

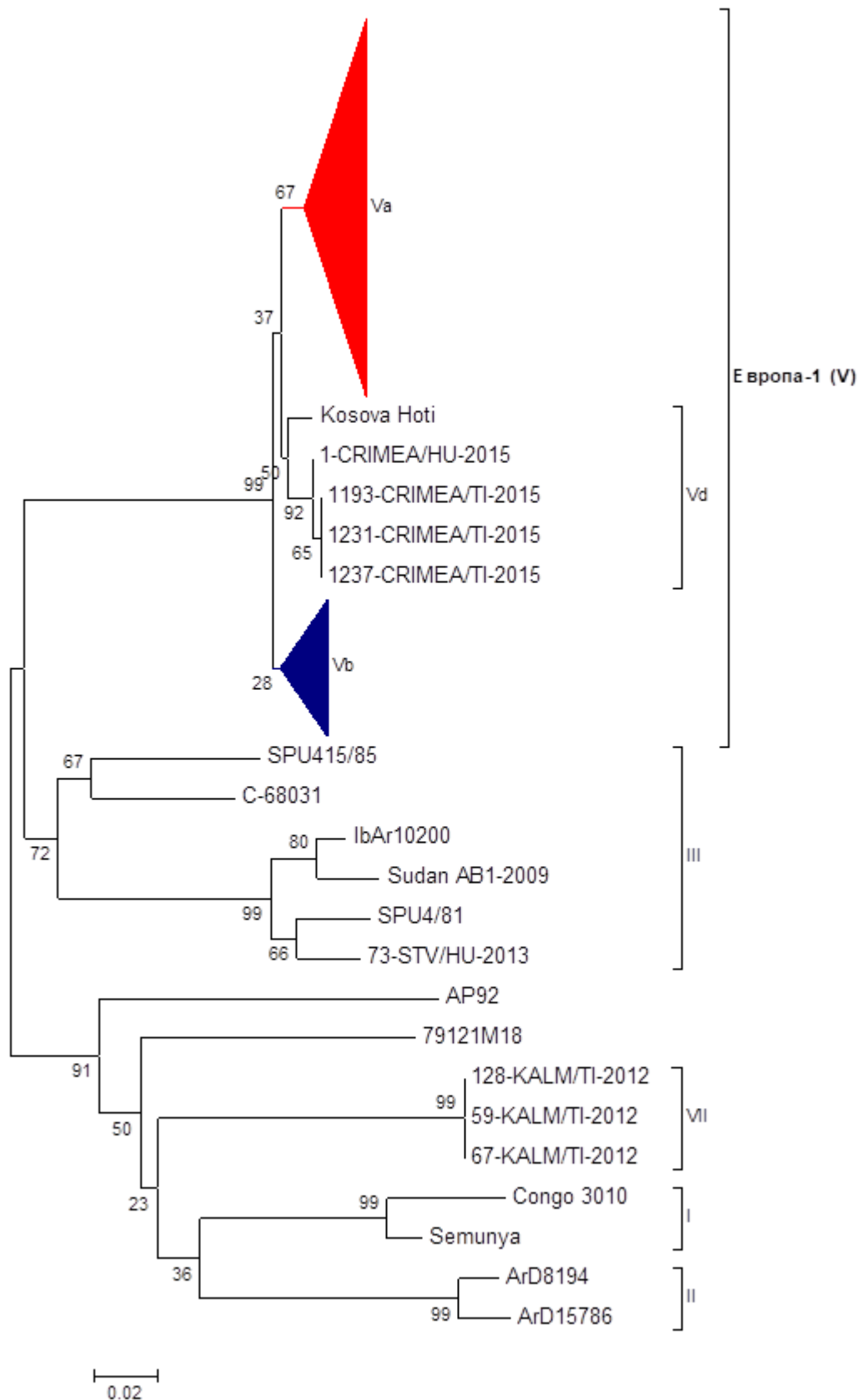


Рисунок 7 — Дендрограмма на основе нуклеотидных последовательностей М-сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (435 н.о.), маркерами отмечены образцы, изученные в рамках диссертационного исследования

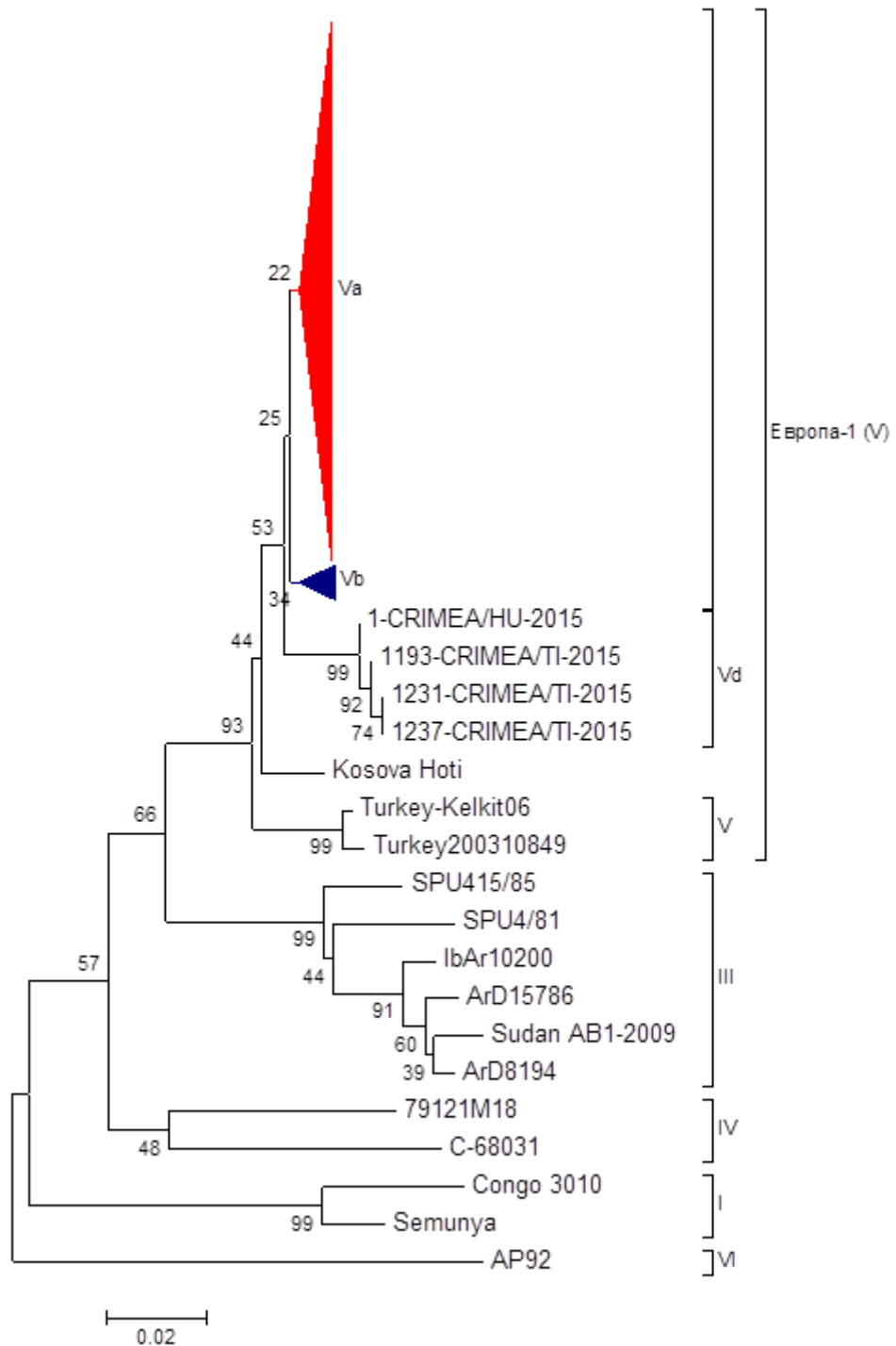


Рисунок 8 — Дендрограмма на основе нуклеотидных последовательностей L-сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (437 н.о.), маркерами отмечены образцы, изученные в рамках диссертационного исследования

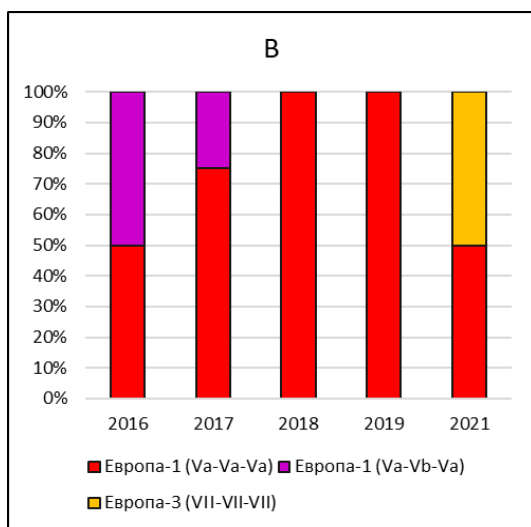
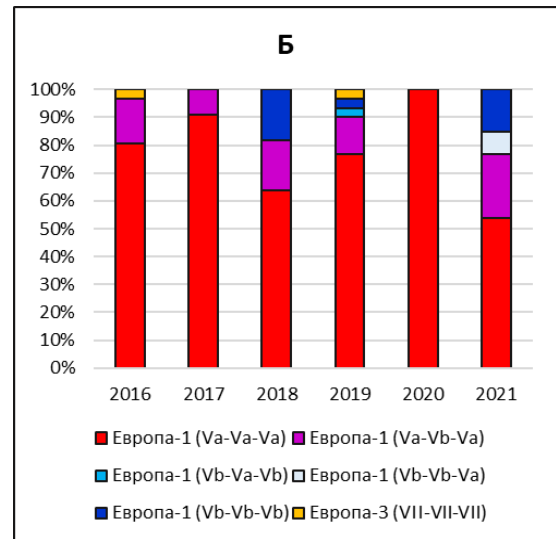
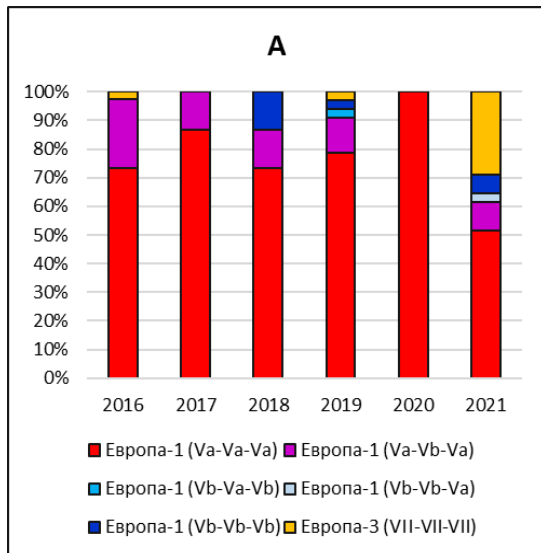
Процент нуклеотидных различий фрагментов генома РНК-изолятов генотипа Европа-1, циркулировавших в Ставропольском крае в 2016–2021 г. составили 1,3 %, 1,8 % 1,4 % по фрагментам S, M и L сегментов генома соответственно. Исследуемые РНК-изоляты генотипа Европа-3 различались по

нуклеотидной последовательности S-сегмента на 0–3,15 %, отличия от других штаммов линии Европа-3 составили 0,83–8,7 %.

Для точной идентификации генетических вариантов вируса ККГЛ генетической линии Европа-1, выявленных в исследуемых образцах, определяли принадлежность РНК-изолятов к генетическим подгруппам на дендрограммах, построенных по последовательностям S, M и L сегментов генома. Исследуемые изоляты входили в состав генетических подгрупп Va (Ставрополь-Ростов-Астрахань) и Vb (Волгоград-Ростов-Ставрополь) генотипа Европа-1 и относились к 5 геновариантам вируса: VaVaVa, VbVbVb, VaVbVa, VbVaVb и VbVbVa. В Ставропольском крае преобладали изоляты геноварианта Va-Va-Va (Европа-1), которые были выявлены в 72,3 % всех образцов, доля РНК-изолятов геноварианта Vb-Vb-Vb составила 3,5 % реассортантных вариантов Va-Vb-Va — 14,9 %, Vb-Va-Va и VbVbVa — 0,7 % каждого.

Графики, позволяющие визуализировать изменения генетической структуры популяции вируса ККГЛ (соотношения геновариантов) в Ставропольском крае в период с 2016 по 2022 гг., представлены на рисунках 9 А, Б, В.

В период с 2016 по 2021 гг. в регионе преобладали РНК-изоляты генотипа Европа-1 (70,9–100 % от всех исследуемых образцов, 96,7–100 % от в образцах сыворотки/плазмы крови от больных КГЛ, 50–100 % среди РНК-изолятов, выделенных от носителей и переносчиков вируса). Доминировал вариант VaVaVa генотипа Европа-1 (73,2–86,7 % в 2016–2019 гг., 100 % в 2020 г., 51,6 % в 2021 г. — от всех исследованных РНК-изолятов). Значительную долю в популяции составляли РНК-изоляты реассортантного варианта VaVbVa генотипа Европа-1 (24,4 % в 2016 г., 12,1–13,3 % в 2017–2019 гг., 9,7 % в 2021 г. — от всех исследованных РНК-изолятов). Суммарная доля остальных геновариантов генотипа Европа-1 в 2016–2021 гг. составляла от 3,0 до 13,3 %. РНК-изоляты вируса ККГЛ генотипа Европа-3 выявлены в 2,4–3,0 % образцов в 2016 и 2019 гг., их доля увеличилась и составила 29,0 % в 2021 г.



А — Геноварианты вируса ККГЛ в Ставропольском крае (2016–2021 гг.)

Б — Геноварианты вируса ККГЛ, (больные КГЛ люди)

В — Геноварианты вируса ККГЛ, (носители и переносчики вируса)

Рисунок 9 — Структура популяции вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в период с 2016 по 2021 гг. (Ставропольский край)

Соотношение геновариантов вируса ККГЛ в Ставропольском крае в период с 2016 по 2019 гг., значительно не изменялось. Отмечено увеличение доли вариантов вируса ККГЛ генотипа Европа-3 в пробах полевого материала.

Преобладающий в Ставропольском крае вариант VaVaVa генотипа Европа-1 широко распространен на большей части территории региона, остальные геноварианты вируса ККГЛ распространены локально (рисунок 10).

Таким образом, в Ставропольском крае в 2016–2021 гг. выявлены варианты генотипов Европа-1 (VaVaVa, VaVbVa, VbVbVb, VbVaVb, VbVbVa) и Европа-3 вируса ККГЛ, характерные для данного региона. Ареал распространения штаммов вируса ККГЛ генетической линии Европа-1 охватывает территорию стран Европы (Болгарии, Косово, Албании, Греции, Испании), Юго-Западной Азии (Турции,

Иране) и юга европейской части России [66; 187]. Штаммы вируса ККГЛ генотипа Европа-1, выделенные в России существенно отличаются по нуклеотидной и аминокислотной последовательности генома от штаммов из Турции, Ирана и европейских стран, и образуют на филогенетических деревьях четыре отдельные генетические подгруппы (Va — Ставрополь-Ростов-Астрахань-1, Vb — Волгоград-Ростов-Ставрополь, Vc — Астрахань-2, Vd — Крым), в состав которых входят штаммы, выделенные в разных регионах РФ, эндемичных по ККГЛ.

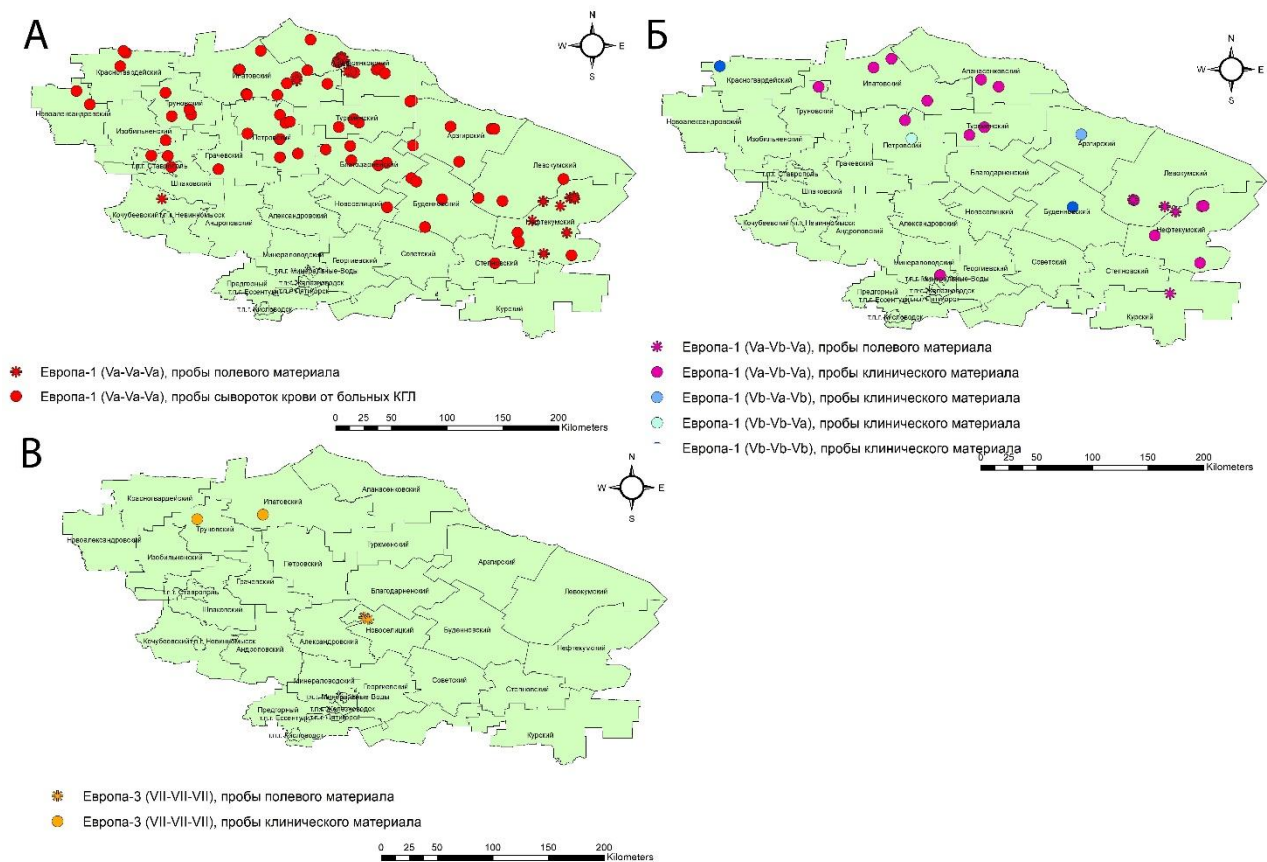


Рисунок 10 — Распространение геновариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (Ставропольский край, 2016–2021 гг.)

Подтверждено наличие реассортаций S, M и L сегментов между штаммами вируса ККГЛ основных генетических подгрупп генотипа Европа-1, встречающихся на территории природного очага ККГЛ в России [66; 187].

РНК-изоляты генотипа Европа-3 ранее были выявлены на территории отдельных субъектов ЮФО и СКФО из образцов клинического и полевого материала (Ставропольский край, 2009 г., Республика Калмыкия, 2012 г. [66], а

также в других странах, эндемичных по КГЛ (Иран, юго-восточная часть, 2012 г.) [112].

Соотношение геновариантов вируса ККГЛ в Ставропольском крае установленное, при проведении молекулярно-генетического мониторинга в период с 2016 по 2020 гг., соответствовало показателям, полученными в результате изучения генетической гетерогенности популяции вируса ККГЛ в регионе в 2007–2015 гг. — геноварианты VaVaVa и VaVbVa являлись преобладающими. Популяция вируса ККГЛ в Ставропольском крае сохраняет стабильность. Случаи заболевания КГЛ в Ставропольском крае вызваны, главным образом, штаммами вируса генотипа Европа-1 (98,0 %). РНК-изоляты генетической линии Европа-3 выявлены в образцах клинического материала от больных КГЛ со средне-тяжелым течением болезни, без геморрагических проявлений (2009, 2016 и 2019 гг.). В пробах полевого материала (пулах иксодовых клещей *H. marginatum*), собранных в регионе, РНК-изоляты генотипа Европа-1 были впервые выявлены в 2021 г., также было отмечено увеличение доли штаммов этого генотипа в популяции вируса ККГЛ в Ставропольском крае. Дальнейшие генетические исследования штаммов и РНК-изолятов вируса ККГЛ позволят уточнить ареалы распространения, а также эпидемиологическую значимость отдельных геновариантов вируса на территории Ставропольского края.

3.2.2 Полногеномное секвенирование штаммов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выделенных на территории Ставропольского края в 2016–2022 гг.

Выполнено секвенирование полноразмерной геномной последовательности 13 культур вируса ККГЛ, выделенных от больных КГЛ в Ставропольском крае в 2016–2019 гг.

Все 13 культур (28-STV/HU-2016 — Красногвардейский р-н, 2016 г., 41-STV/HU-2016 — г. Ставрополь, 2016 г., 172-STV/HU-2016 — Туркменский р-н,

2016 г., 133-STV/HU-2016 — Петровский р-н, 2016 г., 198-STV/HU-2016 — Грачевский р-н, 2016 г., KIZ-STV/HU-2016 — Ипатовский р-н, 2016 г., 73-STV/HU-2019 — Петровский р-н, 2019 г., 89-STV/HU-2019 — Петровский р-н, 2019 г., 56-STV/HU-2019 — Туркменский р-н, 2019 г., 69-STV/HU-2019 — Новоселицкий р-н, 2019 г., 192-STV/HU-2019 — Ипатовский р-н, 2019 г., 193-STV/HU-2019 — Арзгирский р-н, 2019 г., 129-STV/HU-2019 — Петровский р-н, 2019 г.) принадлежали к геноварианту VaVaVa генотипа Европа-1. Доля различий нуклеотидных последовательностей S, M и L сегментов (открытая рамка считывания) составила соответственно 0–1,22 %, 0–2,86 % и 0–0,7 %.

Дендрограммы, построенные по полноразмерным последовательностям S, M и L сегментов генома вируса ККГЛ представлены на рисунках 11, 12 и 13.

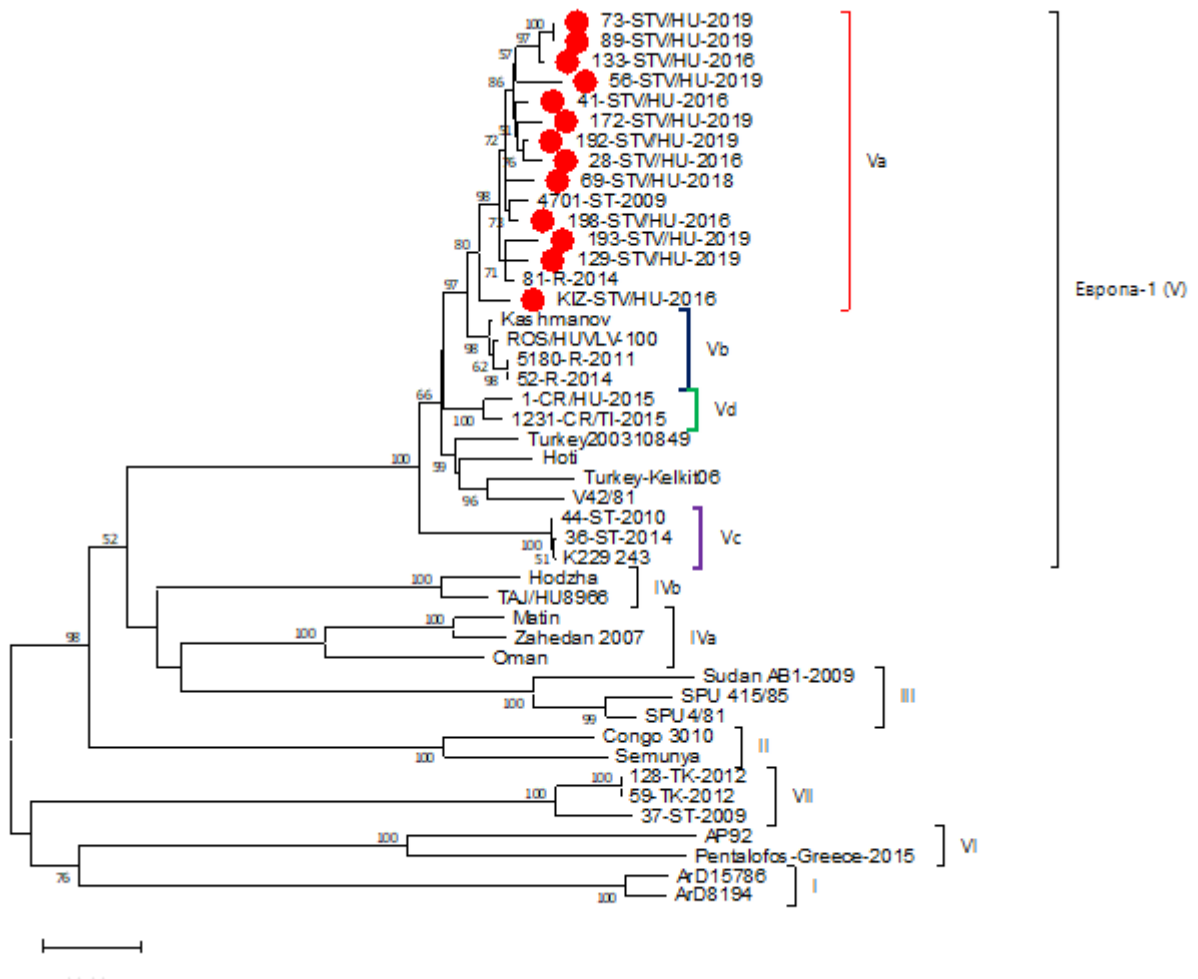


Рисунок 11 — Дендрограмма по полноразмерной нуклеотидной последовательности кодирующей области S сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, маркерами отмечены РНК-изоляты, исследованные при выполнении диссертационной работы

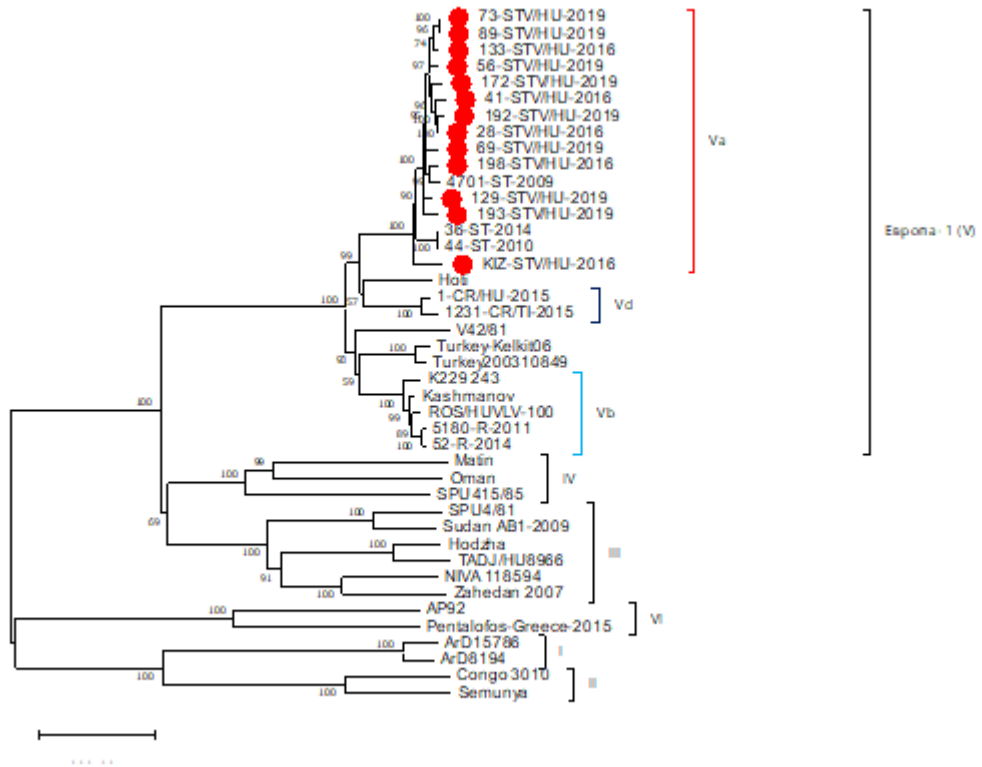


Рисунок 12 — Дендрограмма по полноразмерной нуклеотидной последовательности кодирующей области М сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, маркерами отмечены РНК-изоляты, исследованные при выполнении диссертационной работы

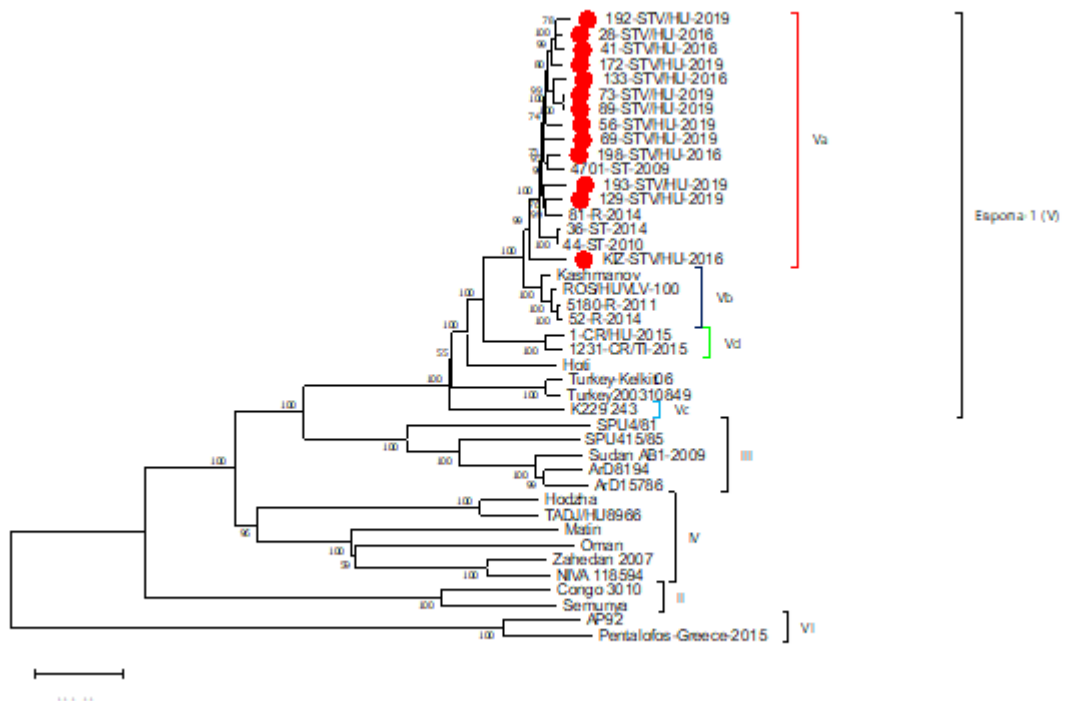


Рисунок 13 — Дендрограмма по полноразмерной нуклеотидной последовательности кодирующей области L сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, маркерами отмечены РНК-изоляты, исследованные при выполнении диссертационной работы

Секвенированные полноразмерные геномные последовательности вируса ККГЛ могут использоваться для углубленного молекулярно-генетического анализа при расследовании отдельных случаев и эпидемических вспышек КГЛ в Ставропольском крае и других регионах РФ.

3.3 Идентификация геновидов риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок

Выполнена видовая идентификация 49 изолятов ДНК *Rickettsia* sp. изолированных из пулов иксодовых клещей, принадлежащих к видам: *H. marginatum*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. punctata*, *I. ricinus*, *R. rossicus*, *R. turanicus*, собранных при эпизоотологическом обследовании территории административных районов Ставропольского края в период с 2017 по 2021 гг. В результате сравнительного анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей генов *gltA* и *OmpB* с референсными геномными последовательностями риккетсий, относящихся к разным видам, содержащимися в базе данных GenBank с помощью сервиса BLAST установлена принадлежность исследуемых изолятов риккетсий к 5 видам, в т.ч.: *R. raoultii* (24 образца), *R. aeschlimannii* (12 образцов), *R. slovaca* (10), *R. massiliae* (2), *R. helvetica* (1). Информация об исследованных изолятах ДНК и результаты видовой идентификации риккетсий группы КПЛ представлены в таблице 7.

Таблица 7 — Результаты видовой идентификации изолятов ДНК риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок, выявленных в пулах иксодовых клещей

№ п/п	Год выделения	Административный район	Вид клеща	Вид риккетсии	Количество изолятов ДНК
1	2	3	4	5	6
1	2017	Апанасенковский	<i>Hyalomma marginatum</i>	<i>R. aeschlimannii</i>	1
2	2017	Изобильненский	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. raoultii</i>	2
3	2017	Изобильненский	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. raoultii</i>	2
4	2017	Кочубеевский	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. slovaca</i>	1
5	2017	Кочубеевский	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. raoultii</i>	1
6	2017	Красногвардейский	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. slovaca</i>	1
7	2017	Красногвардейский	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. raoultii</i>	2
8	2017	Предгорный	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. raoultii</i>	2

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6
9	2017	Шпаковский	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. raoultii</i>	2
10	2017	Шпаковский	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. slovaca</i>	2
11	2018	Кочубеевский	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. slovaca</i>	2
12	2018	Кочубеевский	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. slovaca</i>	1
13	2018	Кочубеевский	<i>Hyalomma marginatum</i>	<i>R. aeschlimannii</i>	1
14	2018	Нефтекумский	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. slovaca</i>	1
15	2018	Нефтекумский	<i>Hyalomma marginatum</i>	<i>R. aeschlimannii</i>	1
16	2018	Нефтекумский	<i>Rhipicephalus rossicus</i>	<i>R. massiliae</i>	1
17	2018	Предгорный	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. helvetica</i>	1
18	2018	Шпаковский	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. raoultii</i>	1
19	2018	Шпаковский	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. raoultii</i>	1
20	2018	Шпаковский	<i>Haemaphysalis punctata</i>	<i>R. aeschlimannii</i>	1
21	2021	г. Кисловодск	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>R. aeschlimannii</i>	1
22	2021	Ипатовский	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. slovaca</i>	1
23	2021	Кочубеевский	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. raoultii</i>	1
24	2021	Краевой центр	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>R. raoultii</i>	1
25	2021	Краевой центр	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. raoultii</i>	8
26	2021	г. Ставрополь	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. slovaca</i>	1
27	2021	Нефтекумский	<i>Hyalomma marginatum</i>	<i>R. aeschlimannii</i>	7
28	2021	Нефтекумский	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	<i>Rickettsia massiliae</i>	1
29	2021	Предгорный	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>R. raoultii</i>	1
ИТОГО:					49

Разные виды риккетсий были выявлены в разных видах иксодовых клещей. Так, в пулах иксодовых клещей *D. reticulatus* и *D. marginatus* обнаружены риккетсии *R. raoultii*, *R. slovaca* и *R. helvetica* в клещах *H. marginatum*, *H. punctata*, *I. ricinus* выявлены риккетсии *R. aeschlimanii*, из клещей *R. turanicus*, *R. rossicus* — риккетсии *R. massiliae*.

Анализ распространения отдельных видов риккетсий на территории Ставропольского края представлен на рисунке 14.

В западной и южной части Ставропольского края (Красногвардейский, Изобильненский, Шпаковский, Кочубеевский районы) распространены риккетсии *R. slovaca* и *R. raoultii* и, на востоке края — *R. massiliae* и *R. aeschlimanii*. *R. helvetica* выделена в регионе КМВ (Предгорный район).

Виды риккетсий, выявленные в иксодовых клещах, собранных территории Ставропольского края, относятся к группе клещевых пятнистых лихорадок, и

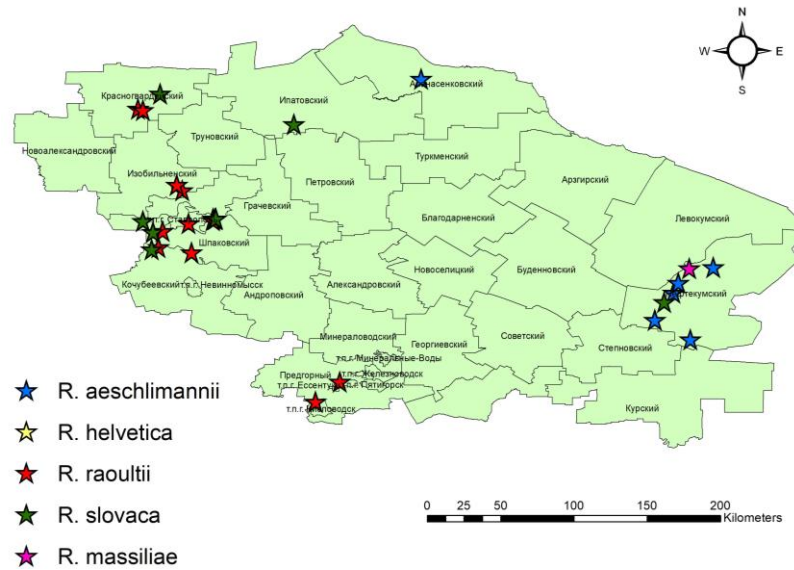


Рисунок 14 — Территориальное распространение риккетсий в Ставропольском крае (2016–2021 гг.)

способны вызывать заболевание человека. В России (Новосибирская область) описаны случаи заболевания человека вследствие инфицирования *R. raoultii*, *R. aeschlimanii* и *R. slovaca* [15], также в странах Европы (Швеции, Франции, Италии) и Южной Америки (Аргентине) были зарегистрированы случаи лихорадочных заболеваний людей, вызванных *R. helvetica* и *R. massiliae* [121; 186].

3.4 Генетическое типирование изолятов ДНК *Coxiella burnetii*

Выполнено генетическое типирование методом MLVA-10 четырех изолятов ДНК *C. burnetii*, выявленных в клинических образцах от больных лихорадкой Ку, зарегистрированных в 2016 г. в Советском, Благодарненском и Нефтекумском районах Ставропольского края. В результате анализа установлено, что исследуемые изоляты обладали идентичным VNTR-профилем 4-6-6-4-7-6-3-12-3-11, были наиболее генетически близки к штамму R1140 [151], выделенному в России, отличаясь от него по числу tandemных повторах в трех VNTR локусах (

ms30, ms31 и ms36). Информация о местах выделения исследованных изолятов ДНК *C. burnetii*, представлена на рисунке 15.

3.5 Идентификация геновидов боррелий

Выполнена видовая идентификация 40 изолятов ДНК боррелий, выявленных в пулах иксодовых клещей видов *I. ricinus*, *I. redikorzevi*, *D. marginatus*, собранных в 2017–2021 гг. На основании анализа нуклеотидной последовательности гена *16s rRNA* в исследуемых пулах клещей выявлены изоляты 6 видов боррелий: *B. afzelii* (23 изолята), *B. garinii* (4), *B. miyamotoi* (7), *B. bavariensis* (1), *B. lusitaniae* (4), *B. valaisiana* (1) (таблица 8).

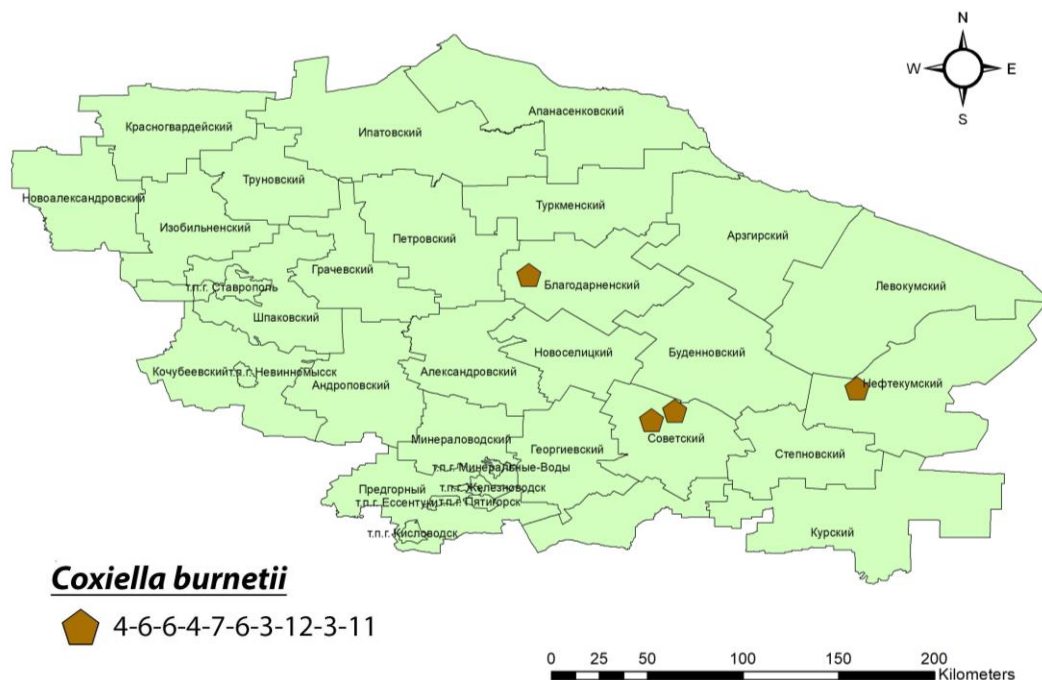


Рисунок 15 — Территориальное распространение MLVA типов *Coxiella burnetii* в Ставропольском крае (2016–2021 гг.)

Сведения об исследованных образцах и результаты идентификации видов боррелий представлены в таблице 8.

Наибольшее количество боррелий, выявленных на территории Ставропольского края принадлежали к виду *B. afzelii*, доля боррелий данного вида составляла от 50–52 % в 2017 и 2021 г. до 100 % в 2020 г.

Таблица 8 — Результаты видовой идентификации изолятов ДНК боррелий, выявленных в иксодовых клещах (Ставропольский край, 2017–2021 гг.)

№ п/п	Административный район	Год выделения	Вид клеща	Вид боррелий	Количество ДНК-изолятов	Доля изолятов, (%)
1	2	3	4	5	6	7
1.	Изобильненский	2017	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. afzelii</i>	3	50,0
				<i>B. garinii</i>	1	16,7
				<i>B. lusitaniae</i>	1	16,7
				<i>B. valaisiana</i>	1	16,7
2.	Шпаковский	2017	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>B. garinii</i>	1	16,7
			<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. afzelii</i>	5	83,3
3.	Предгорный	2017–2018	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. afzelii</i>	4	33,3
				<i>B. garinii</i>	1	8,3
				<i>B. lusitaniae</i>	1	8,3
				<i>B. miyamotoi</i>	6	50,0
4.	Апанасенковский	2020	<i>Ixodes redikorzevi</i>	<i>B. afzelii</i>	2	100,0
5.	Георгиевский	2020	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. afzelii</i>	1	100,0
6.	Советский	2020	<i>Ixodes redikorzevi</i>	<i>B. afzelii</i>	1	100,0
7.	г. Ставрополь	2020–2021	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. afzelii</i>	1	25,0
				<i>B. bavariensis</i>	1	25,0
				<i>B. garinii</i>	1	25,0
				<i>B. lusitaniae</i>	1	25,0
8.	Регион КМВ	2021	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. afzelii</i>	5	71,4
				<i>B. lusitaniae</i>	1	14,3
				<i>B. miyamotoi</i>	1	14,3
ИТОГО:					40	

Карта распространения геновидов боррелий в Ставропольском крае представлена на рисунке 16.

B. afzelii, *B. garinii* и *B. lusitaniae* встречаются на всей территории Ставропольского края. *B. miyamotoi* в исследуемый период выявлены только в регионе КМВ, *B. bavariensis* выявлены в г. Ставрополь, *B. valaisiana* – в Изобильненском районе.

B. afzelii, *B. garinii* и *B. bavariensis* — доминирующие виды боррелий в РФ, широко распространенные на территории страны, вызывающие подавляющее большинство случаев заболевания ИКБ [44]. Показано, что *B. miyamotoi* также повсеместно встречается в России, выявлены сочетанные природные очаги, в которых распространены как *B. miyamotoi*, так и другие виды боррелий группы *B. burgdorferii* s.l.

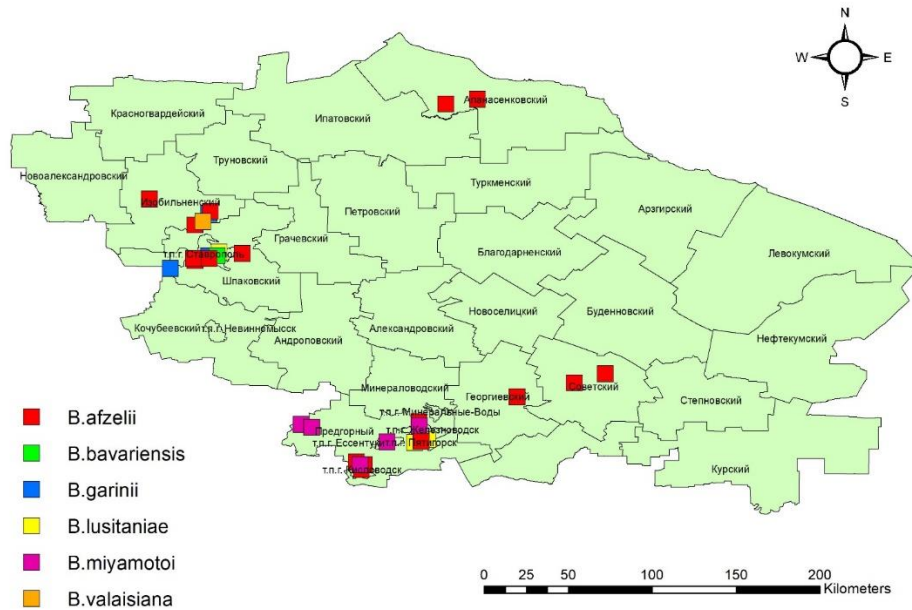


Рисунок 16 — Территориальное распространение геновидов боррелий в Ставропольском крае (2016–2021 гг.)

B. miyamotoi вызывает тяжелые лихорадочные заболевания человека [163]. Патогенность для человека *B. lusitaniae* и *B. valaisiana* к настоящему времени не доказана [81].

3.6 Генетическая идентификация ортохантавирусов

Проведена генетическая идентификация 34 РНК-изолятов ортохантавирусов, выявленных в пробах органов грызунов и насекомоядных, отловленных при плановом эпизоотологическом обследовании территории Ставропольского края в период с 2016 по 2022 гг. Геновид ортохантавирусов определяли на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка L сегмента генома.

Результаты генетической идентификации изолятов РНК ортохантавирусов представлены в таблице 9.

В двух образцах суспензий легкого крота кавказского (*Talpa caucasica*), (пробы № 90, 2016 г. и № 251, 2019 г.) идентифицирован ортохантавирус, генетически близкий к вирусу Camp Ripley — RLPV. Исследуемые РНК-изоляты

отличались по нуклеотидной последовательности от других штаммов вируса Camp Ripley на 15–19 %.

Таблица 9 — Результаты идентификации геновидов ортохантавирусов, выявленных в образцах полевого материала, методом фрагментного секвенирования

№ п/п	Номер пробы	Административный район	Адрес сбора	Год	Геновид ортохантавируса	Вид грызуна/насекомоядного
1.	16, 25, 27, 47	Шпаковский	пос. Приозерный	2016	Тула, подгруппа а	<i>Microtus arvalis</i>
2.	37	Шпаковский	пос. Приозерный	2016	Тула, подгруппа а	<i>Sylvaemus agrarius</i>
3.	4	Труновский	с. Безопасное	2016	Тула, подгруппа f	<i>Microtus arvalis</i>
4.	83	Красногвардейский	пос. Пролетарский	2016	Тула, подгруппа b	<i>Arvicola amphibius</i>
5.	113	Красногвардейский	пос. Медвеженский	2016	Тула, подгруппа f	<i>Microtus arvalis</i>
6.	74	Предгорный	г. Ессентуки	2018	Тула, подгруппа d	<i>Microtus arvalis</i>
7.	5, 8, 116, 123, 186	Кочубеевский	г. Невинномысск	2018	Тула, подгруппа с	<i>Microtus arvalis</i>
8.	387	Кочубеевский	г. Невинномысск	2019	Тула, подгруппа а	<i>Microtus arvalis</i>
9.	143, 145, 148, 150	Ипатовский	с. Ипатово	2019	Тула, подгруппа f	<i>Microtus arvalis</i>
10.	76	Кочубеевский	с. Надзорное	2020	Тула, подгруппа с	<i>Sylvaemus uralensis</i>
11.	89	Кировский	ст. Марьинская	2020	Тула, подгруппа d	<i>Microtus arvalis</i>
12.	91	Ипатовский	пос. Дружный	2020	Тула, подгруппа f	<i>Microtus socialis</i>
13.	102	Ипатовский	с. Бурукшун	2020	Тула, подгруппа f	<i>Microtus socialis</i>
14.	109	Кочубеевский	г. Невинномысск	2020	Тула, подгруппа с	<i>Microtus arvalis</i>
15.	235	Советский	с. Правокумское	2020	Тула, подгруппа d	<i>Microtus arvalis</i>
16.	266	Георгиевский	ст. Лысогорская	2020	Тула, подгруппа е	<i>Microtus arvalis</i>
17.	267	Александровский	с. Александровское	2020	Тула, подгруппа d	<i>Microtus arvalis</i>
18.	277	Георгиевский	с. Обильное	2020	Тула, подгруппа d	<i>Microtus arvalis</i>
19.	251	г. Ставрополь	г. Ставрополь	2019	Camp Ripley virus (RPLV)	<i>Talpa caucasica</i>
20.	90	г. Ставрополь	г. Ставрополь	2021	Camp Ripley virus (RPLV)	<i>Talpa caucasica</i>
21.	1047, 1091, 1099, 1100	Шпаковский	пос. Приозерный	2022	Kenkeme virus (KKMV)	<i>Crocidura suaveolens</i>

В 4 образцах суспензий легкого мышевидных грызунов (*Crocidura suaveolens* — № 1047, 1091, 1099, 1100 — 2022 г.) идентифицирован

ортохантавирус, Kenkeme — ККМV, различия нуклеотидной последовательности РНК-изолятов, выявленных в Ставропольском крае и других штаммов ККМV, депонированных в базу данных GenBank составили 10–12 %.

В 28 образцах суспензий легкого грызунов (*M. arvalis* — № 4, 16, 25, 27, 47, 113 — 2016 г., № 5, 8, 74 — 2018 г., № 116, 123, 143, 145, 148, 186, 387 — 2019 г., № 89, 109, 235, 266, 267, 277 — 2020 г.; *M. socialis* — № 91, 102 — 2020 г.; *A. agrarius* — № 37 — 2016 г.; *S. uralensis* — № 76 — 2020 г.; *A. amphibius* — № 83 — 2016 г.; *S. volnuchini* — № 150 — 2019 г.) выявлен ортохантавирус Тула.

На дендрограмме, построенной по нуклеотидным последовательностям L сегмента (рисунок 17) исследуемые РНК-изоляты ортохантавируса Тула формировали 6 подгрупп (a, b, c, d, e f).

РНК-изоляты ортохантавируса Тула отдельных подгрупп a-f отличались по нуклеотидной последовательности L сегмента на 5,2–14,7 %. Процент нуклеотидных различий исследуемых изолятов и других штаммов ортохантавируса Тула составлял 6,1–20,5 %.

В результате анализа территориального распространения геновариантов ортохантавирусов показано, что изоляты, относящиеся к подгруппам a-f ортохантавируса Тула, образуют на территории Ставропольского края локальные популяции, в которых отмечается длительная циркуляция генетически близких ортохантавирусов (рисунок 18).

Так, варианты ортохантавируса Тула, входящие в состав генетической подгруппы «с» выявлялись в Кочубеевском районе в период с 2018 по 2020 гг., РНК-изоляты подгруппы «d» — в 2018 и 2020 гг., в административных районах, расположенных на юге Ставропольского края (Предгорном, Александровском, Кировском и Советском районах), штаммы подгруппы «f» были выявлены в 2016, 2019–2020 гг. северо-западной части региона (Красногвардейском, Ипатовском, Труновском районах). РНК-изоляты ортохантавируса Camp Ripley циркулировали в популяции на территории г. Ставрополя (в 2016 и 2019 гг.), изоляты вируса Kenkeme — в Шпаковском районе (пос. Приозерный, 2022 г.).

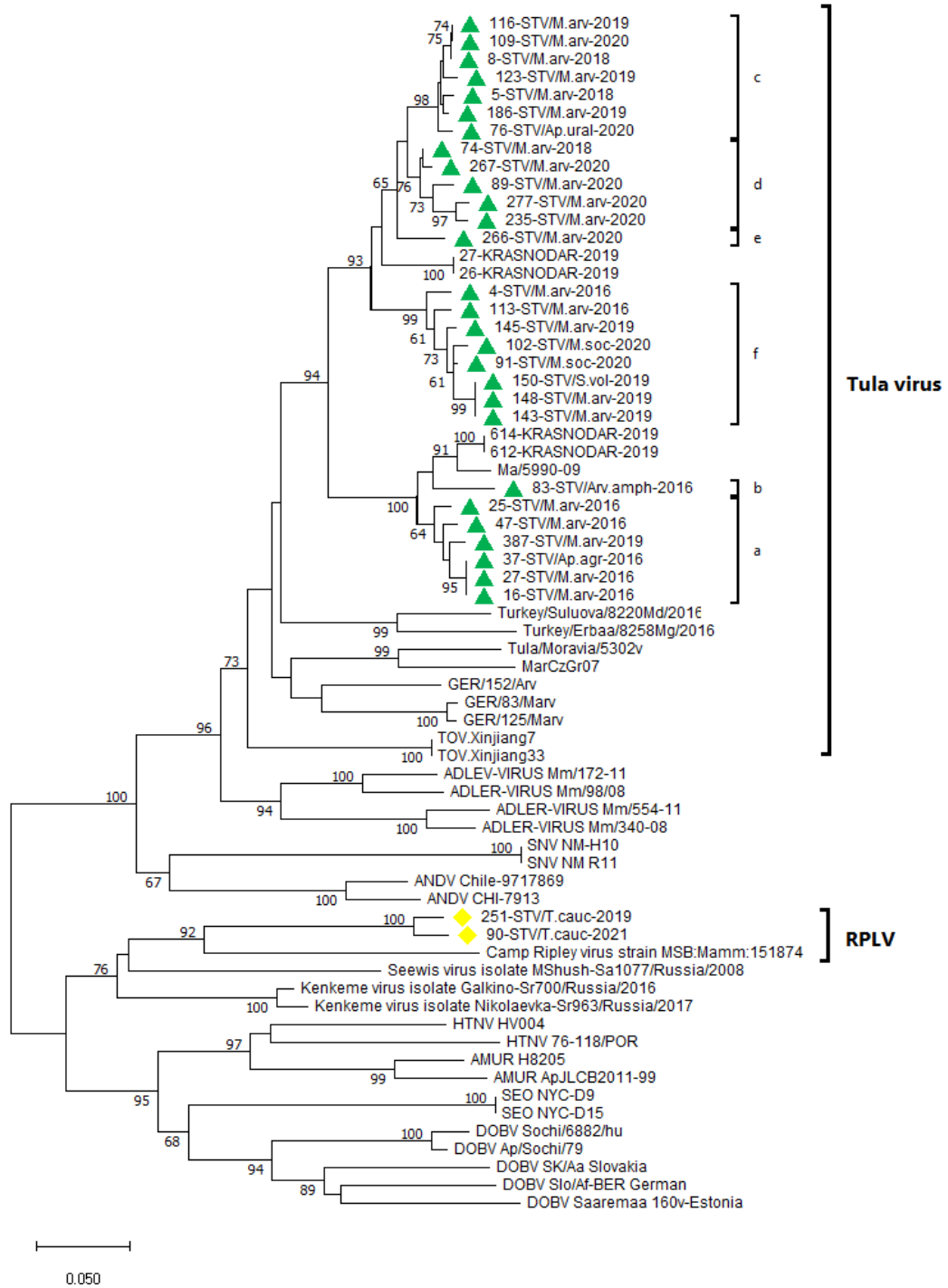


Рисунок 17 — Дендрограмма на основе нуклеотидных последовательностей L сегмента генома ортохантавирусов (347 н.о.), маркерами отмечены образцы, изученные в рамках диссертационного исследования

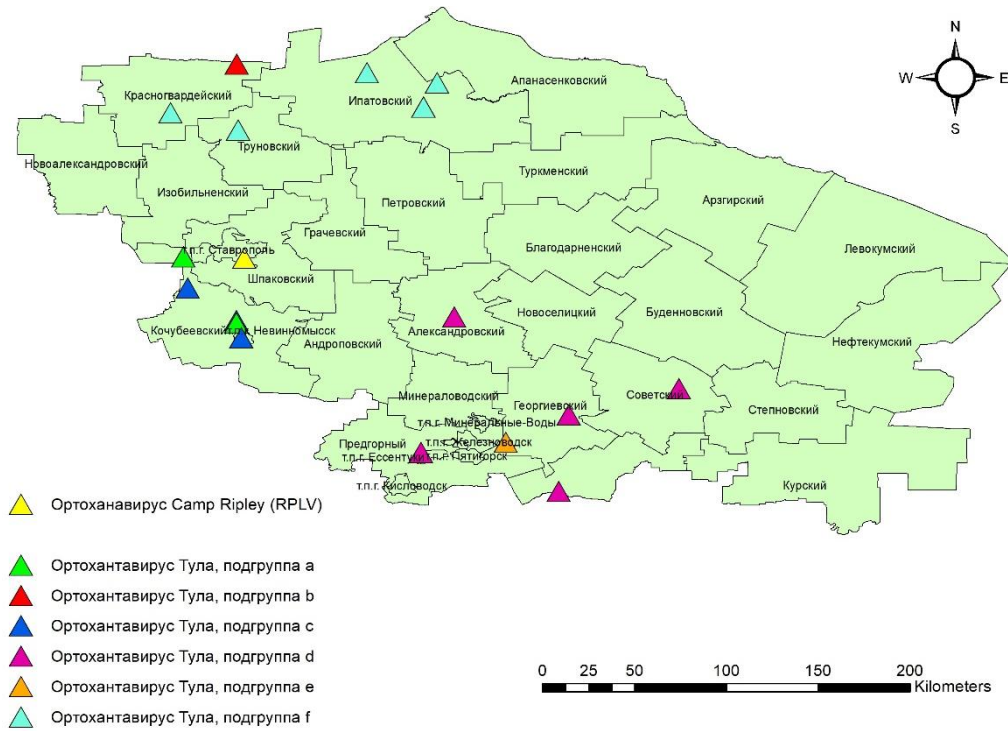


Рисунок 18 — Распространение ортохантавирусов (Ставропольский край, 2016–2021 гг.)

В 2016–2021 гг. в Ставропольском крае циркулировали штаммы ортохантавируса Тула. Основные природные резервуары и переносчики ортохантавируса Тула в Ставропольском крае — *M. arvalis* и *M. socialis*, другие виды грызунов также могут быть инфицированы вирусом.

Ортохантавирус Тула впервые обнаружен в Тульской области в пробах органов *M. arvalis* и *M. rossiaemeridionalis* (в 1994 г.), в дальнейшем варианты ортохантавируса Тула были выявлены на территории других регионов РФ (Краснодарского края, Омской области, Республики Крым), Казахстана, стран Восточной и Центральной Европы [90; 92; 164]. Вирус Тула обладает низким патогенным потенциалом для человека, однако, способен вызывать инфекционное заболевание людей. Описаны четыре случая заболевания человека ГЛПС в результате инфицирования ортохантавирусом Тула (в Германии, Чехии и Франции), в т.ч. случай ГЛПС с тяжелым течением болезни у пациента с иммунодефицитом [130].

Ортохантавирусы длительно циркулируют в популяциях грызунов и насекомых. Анализ геномных последовательностей ортохантавирусов, для

которых характерна высокая степень генетической гетерогенности, позволяет дифференцировать на обследуемой территории локальные микропопуляции, в которых распространены генетически близкие варианты ортохантавирусов. [174]. Так, варианты ортохантавируса Тула, выявленные в различных регионах Словении и Германии, на филогенетическом дереве формируют отдельные генетические подгруппы. На территории Ставропольского края также выявленные локальные популяции ортохантавируса Тула, в которых циркулируют генетически отличающиеся штаммы (подгрупп a-f).

В 2019 и 2021 гг. в окрестностях г. Ставрополя выявлены ортохантавирусы, Camp Ripley и Kenkeme. Ортохантавирус Camp Ripley впервые был выявлен в США (штат Миннесота) в 1998 г. от короткохвостой бурозубки, случаи инфицирования человека вирусом CampRipley не описаны [105]. Вирус KKMV впервые был выделен на территории Республики Саха в пробах легкого *Sorex roboratus*, позже был обнаружен в Китае, Республике Алтай, Еврейской автономной области, в насекомоядных этого же вида [90]. Генетическая идентификация ортохантавирусов, циркулирующих в популяциях грызунов и насекомоядных на территории Ставропольского края позволит уточнить видовой состав ортохантавирусов в регионе, а также оценить их патогенный потенциал.

3.7 Генетическая идентификация вируса Западного Нила

Идентифицирован геновариант трех РНК-изолятов вируса ЗН (30-STV/BB-2018, 32-STV/BB-2018 36-STV/BB-2018), выделенных из проб мозга птиц (сороки), отловленных в х. Максимокумский Левокумского района в 2018 г. При проведении филогенетического анализа установлена принадлежность исследуемых РНК-изолятов к генетической линии 2, российскому геноварианту (рисунок 19).

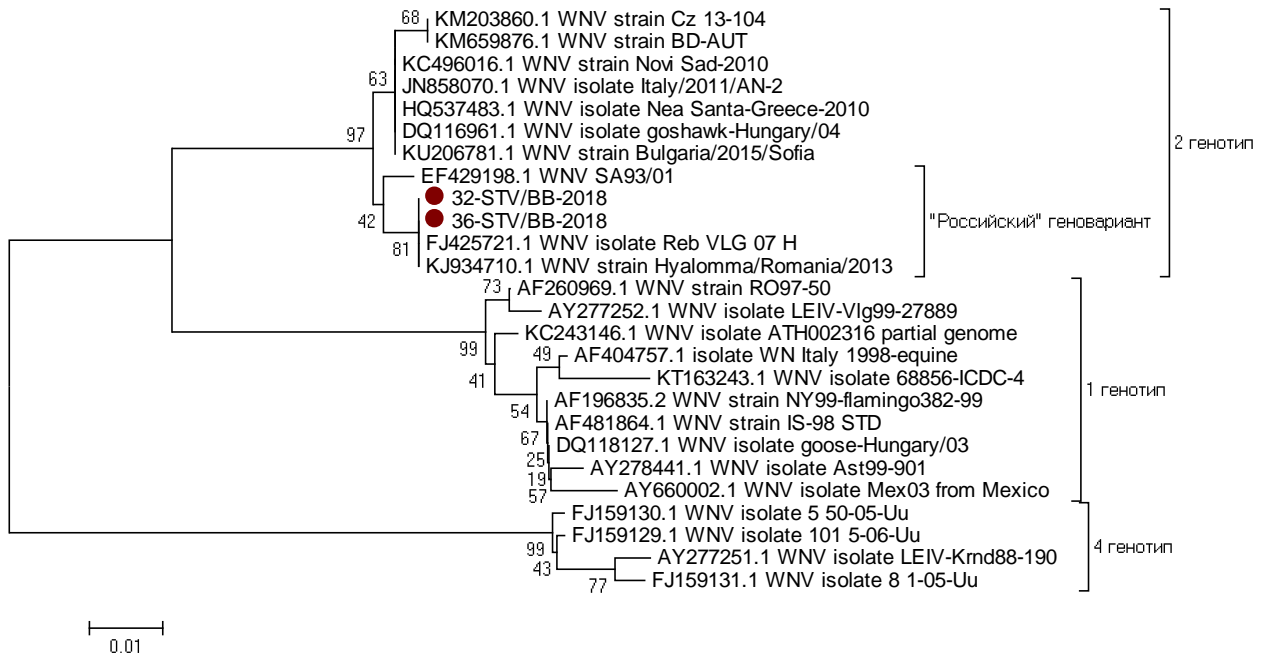


Рисунок 19 — Дендрограмма на основе нуклеотидных последовательностей участка генома 5'-НТР-белок С вируса Западного Нила (229 н.о.), маркерами отмечены образцы, изученные в рамках диссертационного исследования

Нуклеотидные последовательности исследуемых РНК-изолятов ВЗН были полностью идентичны последовательностям штаммов ВЗН VLG-580-2010-Н, VOLGOGRAD-01/918-2011, VORONEZH-01/845-2011, циркулировавших в Волгоградской и Воронежской областях РФ в 2010–2011 гг.

В 2018 г. на территории Ставропольского края установлена циркуляция вариантов вируса ЗН, относящихся к российской подгруппе 2 генотипа вируса. Штаммы ВЗН 2 генотипа преобладали в большинстве регионов РФ, эндемичных по ЛЗН, в период с 2010 по 2019 гг. Варианты вируса ЗН 2 генотипа также были выявлены в образцах клинического материала от больных ЛЗН, зарегистрированных в Ставропольском крае в 2018, 2019 гг. [2].

Таким образом, в результате работы выполнен комплексный геномный анализ штаммов и изолятов НК возбудителей ПОИ в популяции на территории Ставропольского края. Получены новые сведения о генетических вариантах возбудителей ПОИ (боррелий, риккетсий, *F. tularensis*, *S. burnetii*, ортохантавирусов, вирусов ККГЛ и ЗН) характерных для данного региона и особенностях их распространения. Оценена эпидемиологическая значимость отдельных геновариантов возбудителей ПОИ.

ГЛАВА 4 ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

4.1 MLVA-5 типирование штаммов *Salmonella enterica* серовар Enteritidis

С целью идентификации геновариантов *S. enterica*, серовар Enteritidis, вызвавших спорадические случаи заболевания сальмонеллезом в Ставропольском крае в период с 2016 по 2019 гг., проводилось MLVA-5 типирование культур сальмонелл, изолированных из клинических образцов.

Выполнено генотипирование методом MLVA-5 122 штаммов *S. Enteritidis*, выделенных от больных ОКИ в г. Ставрополе и регионе КМВ в период с 2016-2019 гг.

Культуры *S. Enteritidis* принадлежали к 25 MLVA-5 генотипам. Исследуемые культуры отличались по количеству tandemных повторов в VNTR локусах SENTR5 (выявлено 8 аллельных вариантов), SENTR6 (6 аллельных вариантов), SENTR4 (4 аллельных варианта), локусах SENTR7 и SE3 (по 2 аллельных варианта). Соотношение выявленных геновариантов *S. Enteritidis* в Ставропольском крае (2016–2019 гг.) представлено на рисунке 20.

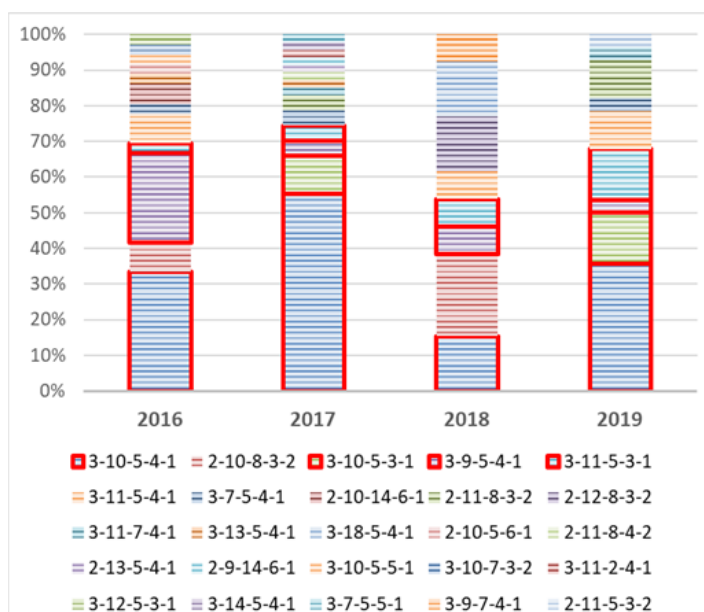


Рисунок 20 — Соотношение геновариантов *Salmonella enterica*, серовар Enteritidis в Ставропольском крае (2016–2019 гг.)

На территории г. Ставрополя выделены культуры *S. Enteritidis* принадлежащие к 24 MLVA типам (таблица 10). Наиболее распространенными (доминирующими) в г. Ставрополе в указанный период были семь MLVA-5 генотипов: 3-10-5-4-1 (40 культур, 44,4 %), 2-10-8-3-2 (6 культур, 6,7 %), 3-9-5-4-1 и 3-10-5-3-1 (по 5 культур, 5,6 %), 3-11-5-4-1 и 3-11-5-3-1 (по 4 культуры, 4,4 %), 3-7-5-4-1 (3 культуры 3,3 %). Кроме того, выявлены минорные геноварианты, доля каждого из данных геновариантов составляла 1,1–2,2 % от общего количества исследованных штаммов (доля всех выявленных минорных геновариантов в совокупности составила 25,6 %).

Таблица 10 — MLVA-5 генотипы *Salmonella Enteritidis* выявленные в г. Ставрополе в 2016–2019 гг.

MLVA-генотип	2016	2017	2018	2019	Всего
	абс. знач. (%)	абс. знач. (%)	абс. знач. (%)	абс. знач. (%)	абс. знач. (%)
3-10-5-4-1	8 (36,4)	23 (53,5)	2 (15,4)	7 (58,3)	40 (44,4)
2-10-8-3-2	3 (13,6)	0	3 (23,1)	0	6 (6,7)
3-10-5-3-1	0	5 (11,6)	0	0	5 (5,6)
3-9-5-4-1	2 (9,1)	1 (2,3)	1 (7,7)	1 (8,3)	5 (5,6)
3-11-5-3-1	1 (4,5)	2 (4,7)	1 (7,7)	0	4 (4,4)
3-11-5-4-1	0	0	1 (7,7)	3 (25)	4 (4,4)
3-7-5-4-1	1 (4,5)	2 (4,7)	0	0	3 (3,3)
2-10-14-6-1	2 (9,1)	0	0	0	2 (2,2)
2-11-8-3-2	0	2 (4,7)	0	0	2 (2,2)
2-12-8-3-2	0	0	2 (15,4)	0	2 (2,2)
3-11-7-4-1	0	1 (2,3)	0	1 (8,3)	2 (2,2)
3-13-5-4-1	1 (4,5)	1 (2,3)	0	0	2 (2,2)
3-18-5-4-1	0	0	2 (15,4)	0	2 (2,2)
2-10-5-6-1	1 (4,5)	0	0	0	1 (1,1)
2-11-8-4-2	0	1 (2,3)	0	0	1 (1,1)
2-13-5-4-1	0	1 (2,3)	0	0	1 (1,1)
2-9-14-6-1	0	1 (2,3)	0	0	1 (1,1)
3-10-5-5-1	1 (4,5)	0	0	0	1 (1,1)
3-10-7-3-2	1 (4,5)	0	0	0	1 (1,1)
3-11-2-4-1	0	1 (2,3)	0	0	1 (1,1)
3-12-5-3-1	1 (4,5)	0	0	0	1 (1,1)
3-14-5-4-1	0	1 (2,3)	0	0	1 (1,1)
3-7-5-5-1	0	1 (2,3)	0	0	1 (1,1)
3-9-7-4-1	0	0	1 (7,7)	0	1 (1,1)
ИТОГО:	22 (100)	43 (100)	13 (100)	12 (100)	90 (100)

В 2016–2019 гг. в г. Ставрополе ежегодно изолировали культуры *S. Enteritidis*, MLVA-генотипов: 3-10-5-4-1 и 3-9-5-4-1. В 2016 г. выявлены 11 генетических вариантов сальмонелл, наибольшее количество штаммов относилось к MLVA-генотипам 3-10-5-4-1 (36,4 %) и 2-10-8-3-2 (13,6 %). В 2017 г. выделены штаммы, относящиеся к 14 геновариантам, преобладали штаммы MLVA-типов 3-10-5-4-1 (53,5 %) и 3-10-5-3-1 (11,6 %). В 2018 г. выявлено 7 геновариантов *S. Enteritidis*, произошла смена доминирующего геноварианта: увеличилась доля штаммов MLVA-типа 2-10-8-3-2 (до 23,1 %), снизилась доля штаммов MLVA-типа 3-10-5-4-1 до 15,4 %, также выявлены штаммы, относящиеся к геновариантам 2-12-8-3-2 и 3-18-5-4-1 (по 2 штамма, 15,4 %). В 2019 г. исследованные штаммы принадлежали к 4 MLVA-типам, преобладали штаммы варианта 3-10-5-4-1 (58,3 %), доля штаммов варианта 3-11-5-4-1 возросла до 25,0 %.

В регионе КМВ в период с 2016 по 2019 гг. выявлены штаммы *S. Enteritidis* 7 MLVA-5 генотипов, преобладали штаммы, принадлежащие к MLVA-генотипам 3-10-5-4-1 (31,3 %) и 3-9-5-4-1 (25,0 %) (таблица 11).

Таблица 11 — MLVA-генотипы *Salmonella Enteritidis* выявленные в регионе КМВ в 2016–2019 гг.

MLVA-генотип	2016	2017	2018	2019	Всего
	абс. знач. (%)	абс. знач. (%)	абс. знач. (%)	абс. знач. (%)	абс. знач. (%)
3-10-5-4-1	4 (28,6)	3 (75)	3 (21,4)	10 (31,3)	4 (28,6)
3-9-5-4-1	7 (50)	1 (25)	0	8 (25)	7 (50)
3-11-5-4-1	3 (21,4)	0	2 (14,3)	5 (15,6)	3 (21,4)
3-10-5-3-1	0	0	4 (28,6)	4 (12,5)	0
2-11-8-3-2	0	0	3 (21,4)	3 (9,4)	0
2-11-5-3-2	0	0	1 (7,1)	1 (3,1)	0
3-7-5-4-1	0	0	1 (7,1)	1 (3,1)	0
Общий итог	14 (100)	4 (100)	14 (100)	32 (100)	14 (100)

В 2016 г. в городах-курортах КМВ выделены культуры *S. Enteritidis*, принадлежащие к трем MLVA-типам, наибольшее количество штаммов относилось к геноварианту 3-9-5-4-1 (50,0 %). В 2017 г. в регионе КМВ

доминировали штаммы MLVA-типа 3-10-5-4-1 (75,0 %). В 2019 г. выявлены штаммы шести геновариантов, культуры MLVA-типов 3-10-5-3-1, 3-10-5-4-1, 2-11-8-3-2 и 3-11-5-4-1 встречались в равном соотношении (14,3 — 28,6 %).

В результате MLVA-5 типирования культур, изолированных от больных ОКИ в Ставропольском крае 2016–2019 гг., показано, что большая часть штаммов (100 штаммов, 81,96 %) принадлежит к восьми наиболее распространенным в регионе генотипам. Выявленное соотношение генетических вариантов сальмонелл в Ставропольском крае имеет сходство со структурой геновариантов *S. Enteritidis* характерной для других регионов РФ и стран Евросоюза. Доминирующие в Ставропольском крае MLVA-типы (3-10-5-4-1, 3-9-5-4-1, 3-11-5-4-1 и 2-10-8-3-2), широко распространены в мире, обладают значительным эпидемическим потенциалом и связаны с крупными вспышками, вызванными *S. Enteritidis* PT-4 в Европе в 2012–2016 гг. Так, штаммы *S. Enteritidis*, относящиеся к MLVA-типам 3-10-5-4-1, 3-11-5-4-1, 2-10-7-3-2, 3-9-5-4-1, преобладали в структуре популяции сальмонелл в Португалии в период с 2012 по 2019 г. [120], Бельгии в 2007–2012 г. [144], Венгрии и Австрии в 2016–2017 гг. Штаммы MLVA-типа 2-11-8-3-2, вызвали рост заболеваемости *S. Enteritidis* PT-8 в странах Евросоюза в 2017 гг. [132; 162].

4.2 Молекулярное типирование РНК-изолятов рота-, норо-, энтеровирусов

Выполнено субвидовое генотипирование 19 изолятов РНК ротавирусов, 7 изолятов норовирусов и 3 изолятов энтеровирусов, выявленных в образцах клинического материала от больных ОКИ в Ставропольском крае в 2016–2018 гг. Сведения об исследованных РНК-изолятах и результаты идентификации геновариантов представлены в таблице 12.

РНК изоляты ротавирусов группы А, циркулировавшие на территории Ставропольского края в 2016-2018 гг., принадлежали к 4 генотипам: G4[P]8 — 6 (31,5 %), G9[P]8 — 7 (36,8 %), G3[P]8 — 2 (10,5 %), G2[P]8 — 4 (21 %).

Доминирующими геновариантами ротавирусов в период выполнения работы являлись G9[P]8 и G4[P]8.

Таблица 12 — Результаты идентификации геновидов ортохантавирусов, выявленных в образцах полевого материала, методом фрагментного секвенирования

№ п/п	Номер пробы	Возбудитель	Административный район	Год	Геновариант	Кол-во РНК-изолятов
1.	11, 16	Ротавирус	Минераловодский	2016	G4P[8]	2
2.	100	Ротавирус	Минераловодский	2016	G9P[8]	1
3.	10, 51	Ротавирус	г. Ставрополь	2016	G4P[8]	2
4.	207, 215, 218, 246, 264, 289	Ротавирус	г. Ставрополь	2018	G9P[8]	6
5.	203, 214, 217, 257	Ротавирус	г. Ставрополь	2018	G2P[4]	4
6.	210, 212	Ротавирус	г. Ставрополь	2018	G3P[8]	2
7.	268, 279	Ротавирус	г. Ставрополь	2018	G4P[8]	2
8.	109	Норовирус	Минераловодский	2016	GI.4-GII.P16	1
9.	105	Норовирус	Минераловодский	2016	GI.4-GII.P31 (GII.Pe)	1
10.	205	Норовирус	г. Ставрополь	2017	GI.4-GII.P16	1
11.	239, 278	Норовирус	г. Ставрополь	2018	GI.4-GII.P16	2
12.	210	Норовирус	г. Ставрополь	2018	GI.4-GII.P16	1
13.	281	Норовирус	г. Ставрополь	2018	GI.3-GII.P12	1
14.	116, 117	Энтеровирус	Минераловодский	2016	Echovirus 5	2
15.	115	Энтеровирус	Минераловодский	2016	Echovirus 3	1

По данным Референс-центра по мониторингу за возбудителями ОКИ, на территории РФ в 2011–2015 гг. (образцы из Ставропольского края не были включены в исследование) были наиболее распространены ротавирусы генотипов: G4[P]8 — 47,8 %; G1[P]8 — 22,9 %; G3[P]8 — 8,2 %; G9[P]8 — 7,2 %, G2[P]4 — 7 %. Отмечались различия в соотношении генотипов ротавирусов в отдельных субъектах РФ. Были выявлены регионы с высокой нестабильностью популяций ротавирусов и частой (практически ежегодной) сменой превалирующего генотипа [28]. Таким образом, на территории Ставропольского края доминировали генотипы ротавирусов G4[P8] и G9[P8] широко распространенные в РФ.

В Ставропольском крае в 2016–2019 гг. выявлено 5 генетических вариантов норовирусов GI.Pe-GII.4 — 1 (14 %), GII.P16-GII.4 — 1 (14 %), GII.P16-GII.13 — 3 (42 %), GII.P12-GII.3 — 1 (14 %), GII.P16-GII.2 — 1 (14 %).

Варианты норовирусов генотипа GII.4 доминируют в мире с 1990 г. Изоляты норовируса генотипа GII.4 обладают высоким эпидемическим потенциалом, более 80 % всех вспышек норовирусной инфекции связано с инфицированием вариантами норовируса генотипа GII.4. Генетический вариант GII.4 Sydney_2012, выявленный в клиническом материале от больных в Ставропольском крае, вызвал рост заболеваемости норовирусной инфекцией во многих странах, в т.ч: Великобритании, Нидерландах, Японии, Австралии, Франции, Новой Зеландии и Соединенных Штатах Америки [23].

РНК-изоляты энтеровирусов, выявленные в образцах клинического материала от больных в Ставропольском крае, принадлежали к виду энтеровирус В, генотипам: Echovirus 5 (2 образца) и Echovirus 3 (1 образец). По данным Референс-центра по мониторингу за энтеровирусами, наиболее эпидемически значимыми вариантами энтеровирусов на территории РФ являются Есно30, ЭВ71, Есно6, Есно11, СВ5, СА10, СА16, вызвавшими более 20 эпидемических вспышек энтеровирусной инфекции. Случаи спорадической и групповой заболеваемости серозными менингитами, как правило, связаны с энтеровирусами-В, среди которых преобладают генотипы Echo30, Echo6, Echo9; также встречаются генотипы Echo3 и Echo5, циркуляция которых установлена на территории Ставропольского края в 2016 г. Показано, что подъемы заболеваемости ЭВИ обусловлены не увеличением множества генотипов циркулирующих энтеровирусов, а появлением эпидемических вариантов [21; 22; 42].

Таким образом, в результате работы проведен комплексный геномный анализ штаммов и изолятов НК возбудителей ОКИ, циркулировавших на территории Ставропольского края в 2016–2019 гг. Получены новые сведения о соотношении генетических вариантов *S. Enteritidis*, рота-, норо-, энтеровирусов выявленных в данном регионе. На основании анализа литературных данных проведена оценка эпидемиологической значимости выявленных геновариантов возбудителей ОКИ.

ГЛАВА 5 ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПРИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ РАСШИФРОВКЕ СЛУЧАЕВ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ

5.1 Создание базы данных генетических профилей возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекций, выявленных в Ставропольском крае

Для накопления и хранения результатов генетической идентификации штаммов и изолятов НК возбудителей ОКИ и ПОИ на базе Microsoft Office Excell разработана структура базы данных «Результаты генетического типирования штаммов и РНК-изолятов возбудителей ОКИ и ПОИ, выделенных на территории Ставропольского края в 2016–2022 гг.». Результаты идентификации генетических вариантов штаммов и изолятов НК возбудителей ПОИ и ОКИ, полученные при выполнении диссертационного исследования, использовались для информационного наполнения базы данных. База данных зарегистрирована в ФИПС (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620152 от 12 января 2022 г.)

База данных «Результаты генетического типирования штаммов и РНК-изолятов возбудителей ОКИ и ПОИ» включает два раздела.

Раздел 1 «Результаты генотипирования штаммов и изолятов НК возбудителей ОКИ бактериальной и вирусной этиологии» содержит результаты молекулярно-генетического типирования штаммов и изолятов РНК возбудителей ОКИ, выделенных из образцов клинического материала от больных ОКИ и ПОИ в Ставропольском крае в 2016–2019 гг. (рисунок 21), в т.ч.:

— результаты молекулярно-генетического типирования методом MLVA-5 штаммов *Salmonella enterica* серотип Enteritidis (122 записи);

— результаты типирования РНК-изолятов ротавирусов на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагментов генов VP4 и VP7 (19 записей);

— результаты типирования РНК-изолятов норовирусов на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагментов генов нуклеокапсида и полимеразы (9 записей);

— результаты типирования РНК-изолятов энтеровирусов на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена VP1 (3 записи).

№	Sample ID	Region	District	City	Date	Genetic Data	Region	District	City	Date	Genetic Data	Region	District	City	Date	Genetic Data
1	42	Ставропольский край	Шпаковский	г. Михайловск	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Шпаковский	г. Михайловск	2016	45-SE-2016	Ставрополь	Шпаковский	г. Михайловск	2016	45-SE-2016
2	49	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	49-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	49-SE-2016
3	92	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	92-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	92-SE-2016
4	17	Ставропольский край	Минераловодский		2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Минераловодский		2016	17-SE-2016	Ставрополь	Минераловодский		2016	17-SE-2016
5	18	Ставропольский край	Минераловодский		2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Минераловодский		2016	18-SE-2016	Ставрополь	Минераловодский		2016	18-SE-2016
6	23	Ставропольский край	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	23-SE-2016	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	23-SE-2016
7	23	Ставропольский край	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	23-SE-2016	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	23-SE-2016
8	23	Ставропольский край	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	23-SE-2016	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	23-SE-2016
9	23	Ставропольский край	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	23-SE-2016	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	23-SE-2016
10	27	Ставропольский край	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	27-SE-2016	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Ессентуки	2016	27-SE-2016
11	30	Ставропольский край	Республика Калмыкия	г. Железноводск	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Железноводск	2016	30-SE-2016	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Железноводск	2016	30-SE-2016
12	46	Ставропольский край	Шпаковский	г. Михайловск	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Шпаковский	г. Михайловск	2016	46-SE-2016	Ставрополь	Шпаковский	г. Михайловск	2016	46-SE-2016
13	47	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	47-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	47-SE-2016
14	49	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	49-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	49-SE-2016
15	50	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	50-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	50-SE-2016
16	63	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	63-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	63-SE-2016
17	64	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	64-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	64-SE-2016
18	67	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	67-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	67-SE-2016
19	69	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	69-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	69-SE-2016
20	73	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	73-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	73-SE-2016
21	73	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	73-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	73-SE-2016
22	79	Ставропольский край	Республика Калмыкия	г. Кисловодск	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Кисловодск	2016	79-SE-2016	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Кисловодск	2016	79-SE-2016
23	79	Ставропольский край	Республика Калмыкия	г. Кисловодск	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Кисловодск	2016	79-SE-2016	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Кисловодск	2016	79-SE-2016
24	80	Ставропольский край	Республика Калмыкия	г. Кисловодск	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Кисловодск	2016	80-SE-2016	Ставрополь	Республика Калмыкия	г. Кисловодск	2016	80-SE-2016
25	83	Ставропольский край	Минераловодский	г. Минеральные воды	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Минераловодский	г. Минеральные воды	2016	83-SE-2016	Ставрополь	Минераловодский	г. Минеральные воды	2016	83-SE-2016
26	83	Ставропольский край	Минераловодский	г. Минеральные воды	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Минераловодский	г. Минеральные воды	2016	83-SE-2016	Ставрополь	Минераловодский	г. Минеральные воды	2016	83-SE-2016
27	84	Ставропольский край	Минераловодский	г. Минеральные воды	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь	Минераловодский	г. Минеральные воды	2016	84-SE-2016	Ставрополь	Минераловодский	г. Минеральные воды	2016	84-SE-2016
28	86	Ставропольский край		г. Ставрополь	2016	Salmonella/Enteritidis	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	86-SE-2016	Ставрополь		г. Ставрополь	2016	86-SE-2016

Рисунок 21 — Примеры реального наполнения раздела 1 базы данных «Результаты генетического типирования штаммов и РНК-изолятов возбудителей острых кишечных и природно-очаговых инфекций»

Раздел 2 «Результаты генотипирования штаммов и изолятов НК возбудителей ПОИ бактериальной и вирусной этиологии» содержит результаты молекулярно-генетического типирования штаммов и изолятов НК возбудителей ПОИ, выделенных из образцов клинического материала от больных в Ставропольском крае в 2016–2022 гг. и образцов полевого материала, собранного на территории Ставропольского края в 2016–2022 гг. (рисунок 22) в т.ч.:

— результаты молекулярно-генетического типирования методом MLVA-25 и CanSNP штаммов *Francisella tularensis* (69 записей);

— результаты типирования изолятов ДНК риккетсий группы КПЛ (*Rickettsia* sp.) на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагментов генов *gltA* и *ompB* (49 записей);

ПОИ и может использоваться как рабочий компонент программ геоинформационного анализа (например, ArcGis, QGis и др.) с целью визуализации информации на электронной карте Ставропольского края при проведении эпидемиологического и эпизоотологического анализа.

База данных содержит секвенированные нуклеотидные последовательности генома (частичные и полноразмерные), информацию о схеме идентификации генетических вариантов, эпидемиологически значимые данные об исследованных образцах и может использоваться при выполнении биоинформатической обработки результатов генетического типирования *S. Enteritidis*, ротавирусов, норовирусов, энтеровирусов, *F. tularensis*, *Rickettsia* sp., вирусов ККГЛ, ЗН, ортохантавирусов (эволюционный, филогеографический анализ).

5.2 Применение методов молекулярно-генетического типирования для эпидемиологической расшифровки вспышек и случаев заболевания ПОИ в Ставропольском крае

5.2.1 Молекулярно-генетическое типирование штаммов *Francisella tularensis*, изолированных в период вспышки туляремии в Петровском районе в 2017 г.

В Ставропольском крае в 2017 г. отмечалось ухудшение эпидемиологической обстановки по туляремии. В I квартале 2017 г. зарегистрировано 49 больных туляремией на территории 7 административных районов Ставропольского края (Петровском — 16 случаев заболевания, Ипатовском — 17, Красногвардейском — 6, Труновском — 2, Шпаковском — 1, Минераловодском — 1, Туркменском — 1) и в г. Ставрополе (5 случаев) [51].

Инфицирование людей происходило с реализацией контактного механизма передачи (при разделке зайцев, добытых на охоте в энзоотичных районах), у больных отмечалась бубонная и язвенно-бубонная форма заболевания, заражение также происходило алиментарным путем (при употреблении сырой

водопроводной воды), у больных наблюдалась ангинозно-бубонная и бубонная форма туляремии.

Наибольшее количество случаев заболевания туляремией в Ставропольском крае в 2017 г. выявлено в Ипатовском и Петровском районах (17 и 16 больных, соответственно, в т.ч. 2 детей до 14 лет). В Петровском районе отмечалась эпидемическая вспышка туляремии, связанная с употреблением сырой водопроводной воды. Больные зарегистрированы в с. Донская Балка, с. Константиновское, с. Николина Балка. Лабораторный диагноз туляремия подтвержден во всех случаях серологическими методами (РА, РНГА), у заболевших отмечалась ангинозно-бубонная форма заболевания.

В связи с регистрацией случаев заболевания туляремией в Петровском районе проводилось эпидемиологическое расследование с целью установления источника и путей передачи инфекции. В ходе эпидемиологического расследования в период с января по март 2017 г. выполнено эпизоотологическое обследование территории населенных пунктов Петровского района, где регистрировались больные с подозрением на туляремию, осуществлен сбор образцов полевого материала (пробы органов грызунов и насекомых) и объектов окружающей среды (пробы воды, сена).

В результате лабораторного исследования образцов объектов из окружающей среды изолировано 16 культур *Francisella tularensis*: в т.ч. 13 штаммов из проб воды системы водоснабжения в с. Донская Балка и с. Константиновское, 2 штамма от грызунов, отловленных в населенных пунктах Петровского района (с. Донская Балка и с. Николина Балка), 1 штамм из пробы сена, отобранной в с. Шведино. Информация о культурах *F. tularensis*, выделенных в период вспышки туляремии в Петровском районе в 2017 г., представлена в таблице 13.

Таблица 13 — Информация о культурах *Francisella tularensis*, изолированных в период вспышки туляремии в Петровском районе Ставропольского края в 2017 г.

№	Источник выделения	Населенный пункт	Результаты идентификации генетических вариантов				CanSNP-тип
			MLVA-25				
			FT- M3	FT- M6	MLVA-тип	MLVA-кластер	
1	Источник водоснабжения № 1, родниковый каптаж (до хлорирования)	с. Донская Балка	17	5	8	В.I	В.170
2	Источник водоснабжения № 1, вода из разводящей сети	с. Донская Балка	20	4	9	В.I	В.170
3	Источник водоснабжения № 1, вода из разводящей сети	с. Донская Балка	20	4	9	В.I	В.170
4	Источник водоснабжения № 1, родниковый каптаж (до хлорирования)	с. Донская Балка	20	5	10	В.I	В.170
5	Источник водоснабжения № 1, вода из разводящей сети	с. Донская Балка	20	5	10	В.I	В.170
6	Источник водоснабжения № 1, родниковый каптаж (до хлорирования)	с. Донская Балка	17	5	8	В.I	В.170
7	Источник водоснабжения № 2, родниковый каптаж	с. Константиновское	20	5	10	В.I	В.170
8	Источник водоснабжения № 2, родниковый каптаж	с. Константиновское	20	5	10	В.I	В.170
9	Источник водоснабжения № 2, резервуар чистой воды	с. Константиновское	12	4	3	В.III	В.203
10	Источник водоснабжения № 2, вода из разводящей сети	с. Константиновское	17	5	8	В.I	В.170
11	Источник водоснабжения № 3, вода из резервуара чистой воды	с. Константиновское	12	4	3	В.III	В.203
12	Источник водоснабжения № 3, родниковый каптаж	с. Константиновское	12	4	3	В.III	В.203
13	Источник водоснабжения № 3, родниковый каптаж	с. Константиновское	12	4	3	В.III	В.203
14	Общественная полевка — <i>Microtus socialis</i> (отловлена в окрестностях населенного пункта)	с. Донская Балка	17	5	8	В.I	В.215
15	Белозубка малая — <i>Crocidura suaveolens</i> (отловлена в окрестностях населенного пункта)	с. Николина Балка	11	4	2	В.I	В.79
16	Сено	с. Шведино	17	5	8	В.I	В.170

С целью установления источника инфекции и вероятных путей передачи возбудителя выполнено молекулярно-генетическое типирование и полногеномное секвенирование изолированных в период эпидемической вспышки культур туляремии. Идентификацию генетических вариантов штаммов туляремии выполняли методами MLVA-25 и CanSNP типирования на основе анализа полногеномной последовательности.

Проведено MLVA-25 и CanSNP типирование штаммов *F. tularensis*, выделенных в феврале-апреле 2017 г. из источника водоснабжения № 1 в с. Донская Балка Петровского района (6 штаммов), из источников водоснабжения № 2 и № 3 в с. Константиновское Петровского района (4 и 3 штамма), от грызунов, отловленных в с. Донская Балка и с. Николина Балка Петровского района, из пробы сена, отобранного в с. Шведино Петровского района.

Исследуемые штаммы относились к 5 MLVA-генотипам, отличавшимся по числу тандемных повторов в локусах FT-M3, FT-M6 и 4 CanSNP-типам (таблица 13).

Из трех образцов воды, отобранных из родникового каптажа источника водоснабжения № 1 в с. Донская Балка выделены культуры возбудителя туляремии, относящиеся к CanSNP типу В.170 и MLVA-генотипам 8 и 10, входящим в MLVA-кластер В.I. К CanSNP типу В.170 и MLVA-генотипу 8 относился также и штамм, выделенный от общественной полевки, отловленной в с. Донская Балка. Штаммы возбудителя туляремии, выделенные из проб воды, отобранных из разводящей сети источника водоснабжения № 1 в с. Донская Балка относились к MLVA-генотипам 9 и 10 (MLVA-кластер В.I) и CanSNP-типу В.170.

В пробах воды, отобранных из родникового каптажа источника водоснабжения № 2 в с. Константиновском Петровского района выявлен возбудитель туляремии MLVA-генотипа 10 (MLVA-кластер В.I) и CanSNP-типа В.170. В образце, отобранном из резервуара чистой воды выявлена культура MLVA-генотипа 3 (MLVA-кластер В.III) и CanSNP-типа В.203. В пробах, отобранных из разводящей сети водопровода, выделен штамм *F. tularensis* MLVA-генотипа 8 (MLVA-кластер В.I) CanSNP типа В.170.

В образцах воды из родникового каптажа и резервуара для накопления чистой воды источника водоснабжения № 3 в с. Константиновском Петровского района изолированы 3 генетически идентичные культуры возбудителя туляремии MLVA-генотипа 3 (MLVA-кластер В.III) и CanSNP-типа В.203.

Из образца сена, отобранного в с. Шведино, изолирована культура возбудителя туляремии, относящаяся к MLVA-генотипу 8 (В.I) CanSNP типу В.170.

При проведении лабораторного исследования проб органов грызунов, отловленных при эпизоотологическом обследовании территории Петровского района изолирована культура *F. tularensis* от белозубки малой (с. Николина Балка), принадлежащая к CanSNP-типу В.79, MLVA-генотипу 2 (подгруппа В.I).

В результате эпидемиологического расследования вспышки туляремии в Петровском районе Ставропольского края в I квартале 2017 г. установлено, что причиной ухудшения эпидемиологической обстановки явилась эпизоотия среди мелких мышевидных грызунов и контаминация воды трех источников водоснабжения возбудителем туляремии.

Результаты MLVA-анализа и CanSNP-типирования штаммов *F. tularensis*, выделенных в период вспышки туляремии, показали, что из образцов воды трех источников водоснабжения изолированы генетически отличающиеся штаммы, что позволяет предположить о независимом инфицировании родниковых каптажей и резервуаров чистой воды (контаминация воды происходила при попадании в воду грызунов, инфицированных возбудителем туляремии).

Таким образом, из образцов воды, отобранных из разводящей сети в с. Донская Балка (источник водоснабжения № 1), выделены штаммы возбудителя туляремии, относящиеся к генетической подгруппе В.I и CanSNP-типу В.170. Штамм CanSNP-типа В.170 также изолирован из органов полевки общественной, отловленной в с. Донская Балка. В пробах воды из источника водоснабжения № 3 в с. Константиновском обнаружены штаммы *F. tularensis*, относящиеся к генетической подгруппе В.III, и CanSNP-типу В.203. В образцах, отобранных из источника водоснабжения № 2 в с. Константиновском, изолированы культуры

возбудителя туляремии двух разных CanSNP-типов (B.170 и B.203), принадлежащие к разным MLVA кластерам B.I и B.III, что свидетельствует о многократном характере контаминации водопроводной воды.

Генетические варианты возбудителя туляремии, выявленные в период эпидемической вспышки в Петровском районе в 2017 г., являются характерными для территории Ставропольского края.

5.2.2 Генетическая идентификация культур *Francisella tularensis*, изолированных в период вспышки туляремии в Петровском районе в 2022 г.

В IV квартале 2022 г. в Петровском районе Ставропольского края вновь зарегистрирован рост числа случаев заболевания туляремией. В 2022 г. в Ставропольском крае выявлено 76 больных туляремией, из них 22 больных (в т.ч. 11 детей) в 1 населенном пункте — с. Сухая Буйвола Петровского района, где отмечалась эпидемическая вспышка туляремии, связанная с употреблением сырой водопроводной воды.

Проводилось эпидемиологическое расследование вспышки туляремии в с. Сухая Буйвола Петровского района с целью установления источника и путей передачи инфекции. Выполнено эпизоотологическое обследование территории Петровского района, в т.ч. окрестностей с. Сухая Буйвола, осуществлен сбор образцов полевого материала (пробы органов грызунов) и объектов окружающей среды (пробы водопроводной воды и воды открытых водоемов).

При лабораторном исследовании образцов воды и проб полевого материала изолировано 23 культуры *F. tularensis*: в т.ч. 4 штамма из проб воды, 17 штаммов от грызунов, отловленных на территории с. Сухая Буйвола Петровского района, 2 штамма из пулов эктопаразитов, снятых с отловленных грызунов. Информация о культурах *F. tularensis*, выделенных в период вспышки туляремии в с. Сухая Буйвола Петровского района в 2022 г., представлена в таблице 14.

Проведено MLVA-25 и CanSNP типирование штаммов *F. tularensis*, выделенных в октябре–декабре 2022 г. от грызунов, отловленных на территории

Таблица 14 — Информация о культурах *Francisella tularensis*, изолированных в период вспышки туляремии в с. Сухая Буйвола Петровского района Ставропольского края в 2022 г.

№	Источник выделения	Результаты идентификации генетических вариантов				CanSNP-тип
		MLVA-25				
		FT- M3	FT- M6	MLVA-тип	MLVA-кластер	
1	Родниковый каптаж № 1 белозубка белобрюхая — <i>Crocidura leucodon</i>	20	5	10	V.I	V.170
2	Родниковый каптаж № 1 белозубка малая — <i>Crocidura suaveolens</i>	23	5	12	V.I	V.170
3	Родниковый каптаж № 1 блохи <i>Nosopsyllus consimilis</i>	20	5	10	V.I	V.170
4	Родниковый каптаж № 1 клещи <i>Ixodes redikorzevi</i>	14	5	5	V.I	V.170
5	Родниковый каптаж № 1 обыкновенная полевка — <i>Microtus arvalis</i>	23	5	12	V.I	V.170
6	Родниковый каптаж № 1 обыкновенная полевка — <i>Microtus arvalis</i>	20	5	10	V.I	V.170
7	Родниковый каптаж № 2 белозубка малая — <i>Crocidura suaveolens</i>	24	5	13	V.I	V.170
8	Родниковый каптаж № 2 проба воды	20	5	10	V.I	V.170
9	Родниковый каптаж № 2 проба воды	20	5	10	V.I	V.170
10	Родниковый каптаж № 2 проба воды	20	5	10	V.I	V.170
11	Родниковый каптаж № 2 проба воды	24	5	13	V.I	V.170
12	Родниковый каптаж № 2 белозубка малая — <i>Crocidura suaveolens</i>	13	4	4	V.III	V.203
13	Родниковый каптаж № 3 обыкновенная полевка — <i>Microtus arvalis</i>	24	5	13	V.I	V.170
14	Родниковый каптаж № 3 обыкновенная полевка — <i>Microtus arvalis</i>	20	5	10	V.I	V.170
15	Родниковый каптаж № 3 обыкновенная полевка — <i>Microtus arvalis</i>	24	5	13	V.I	V.170
16	Белозубка малая — <i>Crocidura suaveolens</i> (отловлена в окрестностях с. Сухая Буйвола)	17	5	8	V.I	V.170
17	Белозубка малая — <i>Crocidura suaveolens</i> (отловлена в окрестностях с. Сухая Буйвола)	20	5	10	V.I	V.170
18	Белозубка малая — <i>Crocidura suaveolens</i> (отловлена в окрестностях с. Сухая Буйвола)	20	5	10	V.I	V.170
19	Белозубка малая — <i>Crocidura suaveolens</i> (отловлена в окрестностях с. Сухая Буйвола)	22	5	11	V.I	V.170
20	Белозубка малая — <i>Crocidura suaveolens</i> (отловлена в окрестностях с. Сухая Буйвола)	23	5	12	V.I	V.170
21	Обыкновенная полевка — <i>Microtus arvalis</i> (отловлена в окрестностях с. Сухая Буйвола)	20	5	10	V.I	V.170
22	Обыкновенная полевка — <i>Microtus arvalis</i> (отловлена в окрестностях с. Сухая Буйвола)	20	5	10	V.I	V.170
23	Обыкновенная полевка — <i>Microtus arvalis</i> (отловлена в окрестностях с. Сухая Буйвола)	20	5	10	V.I	V.170

родниковых каптажей № 1, № 2 и № 3 в с. Сухая Буйвола Петровского района, эктопаразитов, снятых с грызунов, проб воды из родникового каптажа № 2.

Выделенные культуры относились к 7 MLVA-генотипам, отличавшимся по числу тандемных повторов в локусах FT-M3, FT-M6 и 2 CanSNP-типам (таблица 14).

Из образцов воды, отобранных из родникового каптажа № 2 в с. Сухая Буйвола, выделены 4 генетически идентичные культуры возбудителя туляремии, относящиеся к CanSNP типу В.170 и MLVA-генотипу 10, принадлежащему к MLVA-кластеру В.I. От грызунов, отловленных в месте расположения родниковых каптажей № 1, № 2 и № 3, изолированы штаммы *F. tularensis* CanSNP типа В.170, относящиеся к MLVA-кластеру В.I по данным MLVA-25 типирования (10 культур) и CanSNP типа В.203, входящие в MLVA-кластер В.III (1 культура).

При проведении лабораторного исследования проб органов грызунов, отловленных в окрестностях с. Сухая Буйвола изолировано 8 культур *F. tularensis* от белозубки малой и полевки обыкновенной, принадлежащих к CanSNP-типу В.170, MLVA-генотипам 8, 10, 11, 12 (подгруппа В.I).

В результате расследования вспышки туляремии в с. Сухая Буйвола Петровского района в 2022 г. и генетической идентификации выделенных культур возбудителя туляремии установлено, что осложнение эпидемиологической обстановки вызвано эпизоотией среди мелких мышевидных грызунов и контаминацией воды родниковых каптажей возбудителем туляремии CanSNP генотипа В.170 при проникновении в каптаж инфицированных грызунов. Результаты MLVA-анализа и CanSNP-типирования штаммов *F. tularensis* показали, что вспышка вызвана штаммами, характерными для территории Ставропольского края (штаммы CanSNP типа В.170, MLVA-кластера В.I), которые циркулировали в Петровском районе в 2017 г.

5.2.3 Молекулярно-генетическая идентификация РНК-изолята вируса ККГЛ, вызвавшего летальный случай КГЛ в Андроповском районе в 2022 г.

В апреле 2022 г. в Андроповском районе Ставропольского края зарегистрирован летальный случай КГЛ. Больная (48 лет), инфицирование вирусом ККГЛ произошло при снятии клещей с КРС и их раздавливании руками, без использования средств индивидуальной защиты. Заболела 11.04.2022 г., госпитализирована 16.04.2023 г., летальный исход зарегистрирован 18.04.2023 г. Лабораторный диагноз КГЛ подтвержден методами ПЦР (выявлена РНК вируса ККГЛ) и ИФА (выявлены специфические антитела класса IgM к вирусу ККГЛ).

Выполнена генетическая идентификация РНК-изолята вируса ККГЛ 2-STV/HU-2022, выявленного в сыворотке крови от умершей от КГЛ в с. Султан Андроповского р-на Ставропольского края на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов S, M и L сегментов генома вируса.

Установлена принадлежность РНК-изолята вируса к геноварианту VaVaVa генетической линии Европа-1, доминирующей на территории Ставропольского края. В Андроповском районе ранее выявлен 1 РНК-изолят генетической линии Европа-3 (из клинического материала от больного КГЛ в 2009 г.) и 3 РНК-изолята геноварианта VaVaVa генетической линии Европа-1 (из клинического материала от больных КГЛ в 2009 и 2011 гг.). РНК-изолят 2-STV/HU-2022 отличался от штаммов вируса ККГЛ геноварианта VaVaVa линии Европа-1, секвенированных ранее на 0,4–1,1 % по нуклеотидной последовательности фрагмента S сегмента, на 0,22–1,6 % — по последовательности M сегмента, на 0,7–1,8 % — по последовательности L сегмента.

Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей фрагментов S, M и L показал, РНК-изолят вируса ККГЛ 2-STV/HU-2022 отличается от всех секвенированных в 2007–2021 гг. вариантов вируса и содержит в последовательности L сегмента аминокислотную замену G136D. РНК-изоляты вируса ККГЛ, наиболее генетически близкие к изоляту 2-STV/HU-2022, также содержащие аминокислотную замену G136D в

последовательности белка РНК-зависимой РНК полимеразы, были выделены в 2016 г. в Петровском и Буденновском районах, в 2013 г. в Нефтекумском районе, в 2007 г. в Арзгирском районе от больных КГЛ с тяжелым и среднетяжелым течением болезни.

Таким образом, установлено, что случай заболевания вызван штаммом вируса ККГЛ, характерным для территории Ставропольского края, подобные штаммы ранее вызывали случаи заболевания в крае, протекающие в средне-тяжелой и тяжелой форме.

В результате работы выполнена генетическая идентификация штаммов *F. tularensis*, изолированных в период эпидемических вспышек туляремии в Ставропольском крае в 2017 и 2022 гг. и РНК-изолята и вируса ККГЛ, вызвавшего летальный случай КГЛ в 2022 г. Показано, что вспышки туляремии вызваны штаммами *F. tularensis* CanSNP типов В.170 и В.203, широко распространенными на территории Ставропольского края. С использованием методов геномного анализа подтверждено, что источником инфекции явилась водопроводная вода, контаминированная возбудителем туляремии, при попадании в источник водоснабжения инфицированных грызунов. Атипичный случай КГЛ вызван геновариантом вируса ККГЛ VaVaVa генетической линии Европа-1, содержащим мутацию G136D в последовательности белка РНК-зависимой РНК полимеразы. Подобные штаммы ранее выделяли в Ставропольском крае от больных КГЛ со средне-тяжелым и тяжелым течением болезни.

Наличие информации о генетических вариантах возбудителей ПОИ, характерных для Ставропольского края, и проведение геномного анализа штаммов и изолятов НК патогенных микроорганизмов, выделенных при эпидемиологическом расследовании спорадических случаев и вспышек ПОИ, позволяет дифференцировать местные и завозные случаи, установить источник и пути передачи инфекции, выявить генетические особенности штаммов возбудителей ПОИ, вызвавших заболевание.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геномный анализ сегодня стал важным методом идентификации штаммов патогенных микроорганизмов и характеристики их свойств. Методы геномного анализа широко используются в микробиологии для выявления генетических особенностей отдельных штаммов и их связи с фенотипическими и вирулентными свойствами, а также для характеристики сообществ (популяций) патогенных бактерий и вирусов, мониторинга за циркуляцией генетических вариантов возбудителей инфекционных болезней человека на территории отдельных регионов РФ и мира.

Информация о генетических особенностях штаммов возбудителей патогенных микроорганизмов используется при эпидемиологических расследованиях для установления источника и путей передачи инфекции, выявления заносных случаев инфекционных заболеваний, характеристики эпидемиологической значимости изолятов, а также мониторинга популяций возбудителей с целью отслеживания территориального распространения генотипов, своевременного обнаружения новых генетических вариантов.

К настоящему времени охарактеризована генетическая структура популяций целого ряда возбудителей инфекционных болезней, в т.ч. особо опасных, природно-очаговых, острых кишечных и других инфекций, на территории ряда субъектов РФ. При этом, систематический молекулярно-генетический мониторинг штаммов возбудителей инфекционных болезней на территории страны не проводится. Получение информации о генотипах штаммов возбудителей инфекционных болезней, циркулировавших в разные годы в отдельных регионах РФ, позволит отслеживать особенности распространения и эволюции патогенных микроорганизмов и повысить эффективность эпидемиологического анализа случаев инфекционных заболеваний.

Ставропольский край входит в число крупнейших рекреационных регионов страны, поэтому обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в регионе КМВ — уникальном оздоровительном курорте, имеет особое значение.

К основным эпидемиологическим рискам на территории Ставропольского края относятся:

— наличие активных очагов ПОИ, наиболее актуальными из которых являются туляремия, лихорадка Ку, КГЛ, ИКБ;

— возможность заноса инфекций из других регионов и возникновения эпидемических вспышек (ОКИ и других инфекций), что связано с большим количеством лиц, посещающих регион с целью отдыха и туризма.

Основной целью данной работы являлось проведение комплексного молекулярно-генетического типирования штаммов и изолятов НК возбудителей ПОИ и ОКИ, циркулировавших на территории Ставропольского края, анализ выявленных геновариантов, в т.ч. особенностей их распространения и эпидемической значимости. В ходе выполнения настоящего исследования показано, что на территории Ставропольского края в 2016-2022 гг. регистрировались случаи заболевания и циркуляция возбудителей КГЛ, лихорадки Ку, туляремии, ИКБ. В отдельных районах также установлена циркуляция возбудителей других ПОИ: ортохантавирусов, вируса ЗН, риккетсий группы КПЛ. В структуре ОКИ преобладали сальмонеллезы, ротавирусная и норовирусная инфекции.

Проведено комплексное генетическое профилирование возбудителей ПОИ. В качестве материала для исследования использовали культуры микроорганизмов, образцы клинического и полевого материала, содержащие нуклеиновые кислоты возбудителей ПОИ в достаточном количестве для проведения молекулярно-генетического анализа и идентификации геноварианта.

Исследовано 30 культур *F. tularensis*, выделенных из образцов полевого материала и объектов окружающей среды в 2012-2022 гг. Идентификацию генетических вариантов проводили методами MLVA-25 и CanSNP типирования. В результате MLVA-25 типирования определена принадлежность исследуемых штаммов к 10 VNTR генотипам, входящим в 2 MLVA-кластера: В.І и В.ІІІ. Штаммы *F. tularensis* генетических подгрупп В.І и В.ІІІ имеют широкое распространение в странах Европы и Азии [45; 85]. На территории субъектов юга

европейской части России (Ростовская область, Республика Калмыкия, Республика Крым) циркулируют геноварианты, идентичные геновариантам, выявленным в Ставропольском крае.

Дополнительно проведено типирование штаммов *F. tularensis* методом CanSNP типирования на основе анализа полногеномных последовательностей. На территории Ставропольского края выявлены штаммы, относящиеся к 8 CanSNP генотипам: В.170, В.181, В.203, В.21, В.215, В.26, В.77, В.79, преобладали штаммы CanSNP генотипов В.79 и В.203. Штаммы CanSNP типов В.215 и В.77, выявленные на территории Ставропольского края, ранее были изолированы в странах Европы (Швеции, Франции и Германии, 2009-2010 гг.). Штаммы CanSNP типов В.203 и В.170 распространены также на территории Ростовской области, Донецкой и Луганской областей. Информации о распространении CanSNP генотипов возбудителя туляремии в РФ в настоящее время недостаточно. В связи с увеличением количества секвенированных полногеномных последовательностей штаммов *F. tularensis* классификация CanSNP генотипов возбудителя туляремии постоянно обновляются, появляются новые CanSNP типы. В РФ выявлены штаммы *F. tularensis* CanSNP типов В.112, В.190, В.24, В.25, В.66, В.7, В.77, М.П.2, М.П.3 (1928-2011 гг.), большинство из них на территории Ставропольского края не обнаружены.

Анализ территориального распространения штаммов возбудителя туляремии в Ставропольском крае показал, что штаммы разных CanSNP-типов и MLVA-кластеров распределены на территории региона мозаично, образуя разрозненные микропопуляции. Наиболее широко в Ставропольском крае распространены штаммы CanSNP типов В.79, В.203 (в центральной и северо-западной части края), В.170 (в западной, центральной и южной части) и В.215 (в центральной и северной части). Штаммы MLVA-кластера В.І распространены в центральной части края, в северо-западной и южной частях наблюдается одновременная циркуляция штаммов двух MLVA-кластеров (В.І и В.ІІІ).

В настоящее время отсутствуют данные о различиях биологических свойств, в т.ч. вирулентности, а также эпидемиологической значимости штаммов

возбудителя туляремии, относящихся к разным генетическим вариантам по данным CanSNP и MLVA-25 типирования. Все выявленные на территории Ставропольского края геноварианты возбудителя туляремии патогенны для человека.

Выполнено молекулярно-генетическое типирование 141 РНК-изолята вируса ККГЛ, в т.ч. 102 — из образцов клинического материала от больных КГЛ и 39 — из образцов полевого материала. Идентификацию генетических вариантов вируса ККГЛ проводили на основе анализа фрагментов S, M и L сегментов генома вируса. Исследуемые РНК-изоляты относились к двум генетическим линиям: Европа-1 (92,2 % образцов) и Европа-3 (7,8 %). Штаммы генетической линии Европа-1 преобладают на территории природного очага КГЛ в РФ, а также встречаются в Болгарии, Албании, Косово, Греции, Турции и Иране. Штаммы генетической линии Европа-3 ранее были выявлены в РФ (Ставропольский край и Республика Калмыкия) и Иране из образцов клинического и полевого материала [66; 187].

Изоляты вируса ККГЛ в пределах генетической линии Европа-1 на филогенетических деревьях по фрагментам S, M и L сегментам генома вируса ККГЛ относились к генетическим подгруппам Va (Ставрополь-Ростов-Астрахань-1) и Vb (Волгоград-Ростов-Ставрополь) и принадлежали к 5 генетическим вариантам: VaVaVa (72,3 % образцов), VbVbVb (3,5 %), VaVbVa (14,9 %), VbVaVb (0,7 %) и VbVbVa (0,7 %).

Геновариант VaVaVa генотипа Европа-1 распространен на большей части территории Ставропольского края, остальные геноварианты генетической линии Европа-1 выявлены в северной и восточной части региона, РНК-изоляты генетической линии Европа-3 — в северо-восточной и центральной части края.

Проведен анализ структуры популяции вируса ККГЛ в 2016-2021 гг. Соотношение геновариантов вируса ККГЛ на территории региона существенно не изменялось в течение 2016-2019 гг., и сопоставимо с данными, полученными в 2007-2015 гг., что свидетельствует об относительной стабильности популяции вируса ККГЛ. В 2021 г. отмечалось увеличение доли штаммов генетической

линии Европа-3 в образцах полевого материала, необходимо проведение систематического генетического мониторинга популяции вируса ККГЛ в Ставропольском крае и других эндемичных по КГЛ регионах РФ для отслеживания дальнейшего распространения штаммов генетической линии Европа-3. Большинство случаев заболевания КГЛ в Ставропольском крае, в т.ч. все случаи с тяжелым течением болезни, вызваны штаммами генетической линии Европа-1 (98,0 %). РНК-изоляты вируса генотипа Европа-3 также были выделены из образцов клинического материала от больных КГЛ со средне-тяжелым течением болезни.

Выполнено полногеномное секвенирование 13 культур вируса ККГЛ, изолированных из сывороток крови от больных КГЛ Ставропольском крае, все они относились к геноварианту VaVaVa генотипа Европа-1. Полученные полноразмерные геномные последовательности могут использоваться для углубленной генетической характеристики штаммов, в т.ч. при проведении эпидемиологического анализа случаев заболевания КГЛ.

Изучен видовой состав риккетсий группы КПЛ, циркулирующих на территории Ставропольского края. На основании анализа нуклеотидной последовательности генов *gltA* и *ompB* идентифицирована видовой принадлежность риккетсий, выявленных в 49 пулах суспензий иксодовых клещей. Обнаружены риккетсии 5 видов: *R. raoultii* (48,9 %), *R. aeschlimannii* (24,5 %), *R. slovaca* (20,4 %), *R. massiliae* (4,1 %), *R. helvetica* (2,0 %). В западной части Ставропольского края встречаются *R. raoultii* и *R. slovaca*, в восточных районах – *R. aeschlimanii* и *R. massiliae*. *R. helvetica* выделена в регионе КМВ. Видовой состав риккетсий в субъектах ЮФО и СКФО изучен недостаточно. Большинство случаев заболевания человека клещевыми риккетсиозами на юге европейской части РФ вызваны *R. conorii* subsp. *caspia* — возбудителем Астраханской пятнистой лихорадки. Риккетсии, выявленные на территории Ставропольского края (*R. raoultii*, *R. aeschlimannii*, *R. slovaca*, *R. massiliae*, *R. helvetica*) также способны вызывать лихорадочные заболевания (синдром TIBOLA), однако обладают меньшей эпидемиологической опасностью. Случаи заболевания

риккетсиозами в Ставропольском крае не регистрируются, однако в регионе выявлена циркуляция патогенных видов риккетсий, в связи с чем целесообразно проведение скрининговых исследований клинического материала от лихорадящих больных, с укусом клеща в анамнезе, на наличие маркеров риккетсиозов.

Осуществлено типирование 4 изолятов *C. burnetii* методом MLVA-10, установлена их генетическая идентичность (VNTR-профиль 4-6-6-4-7-6-3-12-3-11) и близость к штамму R1140, изолированному в РФ. Для идентификации геновариантов *C. burnetii* используют методы MLVA и MST-типирования, полногеномного секвенирования. Данных о генетической гетерогенности возбудителя лихорадки Ку в РФ к настоящему времени накоплено недостаточно, методами MLVA и полногеномного секвенирования охарактеризованы единичные изоляты, с использованием MST-типирования охарактеризованы геноварианты в отдельных регионах РФ, показано, что популяции *C. burnetii* генетически консервативны, преобладают штаммы сиквенс-типов ST-23 и ST-7. Необходимо продолжение молекулярно-генетических исследований штаммов и изолятов ДНК возбудителя лихорадки Ку с использованием различных способов генетической идентификации для накопления информации о генетических особенностях возбудителя в Ставропольском крае и других регионах РФ, оценки эпидемиологической значимости отдельных геновариантов.

Охарактеризован видовой состав боррелий на территории Ставропольского края. На основании анализа фрагмента гена *16s PНК* идентифицированы 40 изолятов боррелий, установлена их принадлежность к 6 видам: *B. afzelii* (57,5 %), *B. garinii* (10 %), *B. miyamotoi* (17,5 %), *B. bavariensis* (2,5 %), *B. lusitaniae* (10,0 %), *B. valaisiana* (2,5 %). Наиболее широко распространены на территории региона *B. afzelii*, *B. garinii* и *B. lusitaniae*, *B. miyamotoi* выявлены только в регионе КМВ. Среди боррелий, циркулировавших в Ставропольском крае в 2016-2021 гг. к патогенным для человека относятся *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, широко распространенные на территории РФ и вызывающие большинство случаев заболеваний ИКБ, а также *B. miyamotoi*, способные вызывать тяжелые лихорадочные заболевания. Видовой состав боррелий в субъектах юга РФ, в т.ч.

Ставропольском крае, охарактеризован недостаточно, требуется продолжение исследований, в т.ч. генетическая характеристика изолятов боррелий, выделенных из образцов клинического материала от больных ИКБ.

Идентифицированы геноварианты 34 РНК-изолятов ортохантавирусов, выявленных в образцах суспензий легких грызунов и насекомоядных. Выявлены изоляты ортохантавирусов Тула (TULV) — 28, CampRipley (RPLV) — 2 и Kenkeme (KKMV) — 4. Исследуемые РНК-изоляты ортохантавируса Тула на филогенетическом дереве формировали 6 генетических подгрупп (a-f), представители которых формировали локальные популяции на территории региона. Подобные закономерности территориального распространения ортохантавирусов, в т.ч. возможность формирования отдельных микропопуляций генетически отличающихся вариантов вирусов, были выявлены в странах Европы. РНК-изоляты вирусов CampRipley и Kenkeme в Ставропольском крае выявлены впервые, патогенный потенциал данных вирусов не изучен. Ортохантавирус Тула обладает низким патогенным потенциалом для человека, однако, в редких случаях, способен вызывать случаи заболевания. Дальнейшее изучение циркуляции ортохантавирусов в популяциях мелких млекопитающих и насекомоядных на территории Ставропольского края позволит уточнить видовой состав ортохантавирусов в регионе, выявить новые для региона виды и оценить их патогенный потенциал.

Выполнена генетическая характеристика РНК-изолятов вируса ЗН, выявленных в Ставропольском крае, установлена их принадлежность к российскому геноварианту генотипа 2. Штаммы данного геноварианта доминировали в большинстве эндемичных по ЛЗН субъектов РФ в 2010-2019 гг., в т.ч. были изолированы из образцов клинического материала от больных ЛЗН в Ставропольском крае в 2018-2019 гг.

В рамках диссертационного исследования охарактеризованы генетические варианты возбудителей ОКИ (*S. enterica*, биовар Enteritidis, ротавирусов, норовирусов, энтеровирусов), выявленные на территории Ставропольского края в 2016-2019 гг.

Методом MLVA-5 проанализированы 122 штамма *S. Enteritidis*, выявлено 25 индивидуальных MLVA-генотипов. 81,96 % исследованных культур относились к восьми наиболее распространенным генотипам, также выявлены минорные геноварианты. Доминирующие на территории края MLVA-типы (3-10-5-4-1, 3-9-5-4-1, 3-11-5-4-1 и 2-10-8-3-2), обладают значительным эпидемическим потенциалом, широко распространены в мире и связаны с крупными вспышками, вызванными *S. Enteritidis* в Европе.

В Ставропольском крае выявлены ротавирусы, принадлежащие к 4 генотипам: G4[P]8 — 6 (31,5 %), G9[P]8 — 7 (36,8 %), G3[P]8 — 2 (10,5 %), G2[P]8 — 4 (21 %), 5 геновариантов норовирусов GII.Pe-GII.4 — 1 (14 %), GII.P16-GII.4 — 1 (14 %), GII.P16-GII.13 — 3 (42 %), GII.P12-GII.3 — 1 (14 %), GII.P16-GII.2 — 1 (14 %), 2 геноварианта энтеровирусов Echovirus 5 и Echovirus 3. Выявленные генетические варианты рота-, норо- и энтеровирусов широко распространены в РФ и обладают высоким эпидемическим потенциалом. Генетический мониторинг за циркуляцией возбудителей ОКИ в отдельных регионах необходим, для своевременного выявления изменений в соотношении циркулирующих геновариантов, т.к. смена доминирующего геноварианта как правило может вызвать рост заболеваемости ОКИ, а также определения завозных случаев инфекции.

Результаты идентификации генетических вариантов штаммов и изолятов НК возбудителей ПОИ и ОКИ, полученные при выполнении диссертационного исследования были внесены в базу данных «Результаты генетического типирования штаммов и РНК-изолятов возбудителей ОКИ и ПОИ, выделенных на территории Ставропольского края в 2016-2022 гг.» Созданная база данных содержит информацию об исследованных культурах микроорганизмов/образцах клинического и полевого материала, месте и времени сбора биоматериала, в т.ч. географические координаты точек сбора образцов, а также секвенированные нуклеотидные последовательности и определенные VNTR-профили. База данных может использоваться для визуализации данных о распространении геновариантов на территории с использованием геоинформационных систем и

проведения биоинформатической обработки секвенированных нуклеотидных последовательностей.

Накопленная информация о генетических вариантах возбудителей ПОИ и ОКИ, выявленных на территории Ставропольского края, применялась для эпидемиологического расследования случаев и вспышек инфекционных заболеваний.

Методы MLVA-25 и CanSNP типирования штаммов *F. tularensis* применяли для характеристики штаммов, выделенных в период вспышек туляремии в Петровском районе Ставропольского края в 2017 и 2022 гг. Субвидовая идентификация штаммов туляремии позволила установить источник и пути распространения инфекции.

При расследовании эпидемической вспышки туляремии в 2017 г. выполнена генетическая идентификация 16 культур *F. tularensis*, изолированных из проб воды трех источников водоснабжения в двух населенных пунктах и грызунов, отловленных в окрестностях населенных пунктов. Исследуемые штаммы относились к 5 MLVA-25 и 4 CanSNP генотипам. Из образцов воды источника водоснабжения № 1 и органов полевки общественной (с. Донская Балка), выделены штаммы, относящиеся к генетической подгруппе В.І и CanSNP-типу В.170. В пробах воды из источника водоснабжения № 3 (с. Константиновское) обнаружены штаммы *F. tularensis*, относящиеся к генетической подгруппе В.ІІІ, и CanSNP-типу В.203. В образцах из источника водоснабжения № 2 в с. Константиновском, изолированы культуры возбудителя туляремии двух разных CanSNP-типов (В.170 и В.203), принадлежащие к разным MLVA кластерам В.І и В.ІІІ, что свидетельствует о многократном характере контаминации водопроводной воды.

При расследовании эпидемической вспышки туляремии в 2022 г. выполнена генетическая идентификация 23 культур *F. tularensis*, изолированных из проб воды родникового каптажа и грызунов, отловленных в непосредственной близости от источников водоснабжения. Из образцов воды, отобранных из родникового каптажа № 2 выделены 4 генетически идентичные культуры

возбудителя туляремии, относящиеся к CanSNP типу В.170 и MLVA-генотипу 10, (подгруппа В.1). От грызунов в окрестностях населенного пункта выделены культуры CanSNP типов В.170 (MLVA-кластер В.1) и В.203 (MLVA-кластер В.11)

В результате расследования вспышек туляремии в Петровском районе Ставропольского края в 2017 и 2022 гг. показано, что обе эпидемические вспышки вызваны эпизоотией среди мелких мышевидных грызунов и контаминацией воды родниковых каптажей возбудителем туляремии при проникновении в каптаж инфицированных грызунов. Генетические варианты возбудителя туляремии, выявленные в период эпидемических вспышек в 2017 и 2022 гг. (В.170 и В.203), являются характерными для территории Ставропольского края и ранее циркулировали в Петровском районе.

Выполнена генетическая идентификация РНК-изолята вируса ККГЛ, выделенного из биологического материала от умершего от КГЛ в Андроповском районе Ставропольского края. Установлено, что летальный случай КГЛ вызван геновариантом VaVaVa генетической линии Европа-1, характерным для территории Ставропольского края, однако, отличающимся от всех секвенированных в 2007–2021 гг. вариантов вируса, и содержащим в последовательности L сегмента аминокислотную замену G136D. РНК-изоляты вируса ККГЛ, также содержащие аминокислотную замену G136D в последовательности белка РНК-зависимой РНК полимеразы, были выделены ранее в Петровском, Буденновском (2016 г.), Нефтекумском (2013 г.) и Арзгирском районе (2007 г.) от больных КГЛ с тяжелым и среднетяжелым течением болезни.

Таким образом, накопление данных о генетических особенностях штаммов возбудителей ПОИ, характерных для Ставропольского края и проведение геномного анализа штаммов и изолятов НК патогенных микроорганизмов, выделенных при эпидемиологическом расследовании спорадических случаев и вспышек ПОИ, позволяет дифференцировать местные и завозные случаи, установить источник и пути передачи инфекции, выявить уникальные особенности штаммов, вызвавших заболевание.

В рамках диссертационного исследования выполнено молекулярно-генетическое типирование штаммов и изолятов НК возбудителей ПОИ и ОКИ, выявленных на территории субъекта РФ — Ставропольского края. Получены новые данные о генетической гетерогенности, генетической структуре популяции возбудителей ОКИ и ПОИ в Ставропольском крае, ареалах распространения геновариантов.

Полученные сведения и база данных могут использоваться при эпидемиологическом расследования случаев и вспышек инфекционных заболеваний, этиологическим агентом которых являются возбудители ПОИ и ОКИ, а также микробиологическом и молекулярно-генетическом мониторинге за циркуляцией возбудителей ПОИ и ОКИ в регионе.

ВЫВОДЫ

1. Впервые осуществлено комплексное молекулярно-генетическое профилирование возбудителей ПОИ и ОКИ на территории субъекта РФ (на примере Ставропольского края). Получены актуальные данные о генетических профилях возбудителей природно-очаговых инфекций (ортохантавирусы, вирус ККГЛ, вирус ЗН, риккетсии группы КПЛ, боррелии, *C. burnetii*, *F. tularensis*) и острых кишечных инфекций (*S. Enteritidis*, рота-, норо- и энтеровирусы). Создана база данных результатов генетического типирования возбудителей инфекционных болезней с географической привязкой к местам выделения.
2. На территории Ставропольского края в 2016–2021 гг. выявлены штаммы *F. tularensis* генетических групп В.І, В.ІІІ, CanSNP типов В.170, В.181, В.203, В.21, В.215, В.26, В.77, В.79, варианты вируса ККГЛ генотипов Европа-1 и Европа-3, ортохантавирусы Тула, Kenkeme, Camp Ripley, варианты вируса вируса ЗН 2 генотипа, риккетсии, относящихся к 5 видам: *R. barbariae*, *R. raoultii*, *R. sibirica*, *R. aeschlimannii*, *R. helvetica*, боррелии: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. miyamotoi*, *C. burnetii* Получены новые сведения о распространении РНК-изолятов вируса ККГЛ, относящихся к генетической линии Европа-3, ортохантавирусов Тула, риккетсий группы КПЛ.
3. Впервые на юге европейской части России установлена циркуляция ортохантавирусов CampRipley (RPLV) и Kenkeme (KKMV), ранее выявленных в пробах суспензий легкого насекомоядных в США, Китае, регионах Сибири и Дальнего Востока России.
4. На обследованной территории в 2016–2019 гг. выявлены РНК-изоляты ротавирусов, относящихся к 4 генотипам: G4[P]8, G9[P]8, G3[P]8, G2[P]8, варианты норовирусов: GII.13, GII.2, GII.3, GII.4, два генотипа энтеровирусов: Echo5 и Echo3. Штаммы *S. Enteritidis* принадлежали к 25 MLVA типам, доминирующими являлись семь геновариантов, обладающих значительным эпидемическим потенциалом. В 2016–2019 гг. установлены изменения генетической структуры популяции возбудителей ОКИ бактериальной и вирусной

этиологии, отмечена смена доминирующих геновариантов *S. Enteritidis* 3-10-5-4-1 на 2-10-8-3-2 и ротавирусов G4[P8] на G9[P8].

5. Выявленные геноварианты ПОИ и ОКИ имеют различную эпидемиологическую значимость: низким эпидемическим потенциалом обладают – ортохантавирусы Тула, Kenkeme и Camp Ripley, все варианты риккетсий группы КПЛ, отдельные геновиды боррелий (*B. lusitaniae*, *B. valaisiana*); высокую эпидемическую значимость имеют все варианты вируса ККГЛ, возбудителя туляремии, отдельные MLVA-типы *S. Enteritidis*, геноварианты рота-, норо- и энтеровирусов.

6. Полученные данные о генетических профилях патогенов в Ставропольском крае использованы при проведении эпидемиологического расследования случаев и вспышек инфекционных болезней. Молекулярное типирование штаммов *F. tularensis*, выделенных при расследовании вспышек в 2017 и 2022 гг., позволило установить связь вспышки с сезонной эпизоотией среди грызунов и многократный характер контаминации воды штаммами CanSNP типов B.170 и B.203.

7. Молекулярное типирование РНК-изолята вируса ККГЛ при расследовании летального случая КГЛ в 2022 г. показало, что случай заболевания вызван штаммом вируса ККГЛ генотипа Европа-1 (вариант VaVaVa), характерным для территории Ставропольского края, подобные штаммы ранее вызывали случаи заболевания, протекающие в средне-тяжелой и тяжелой форме.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется осуществлять систематический молекулярно-генетический мониторинг за циркуляцией геновариантов возбудителей инфекционных болезней, актуальных для субъектов РФ с составлением баз данных геномных профилей. В перечень возбудителей для проведения систематического геномного мониторинга рекомендуется включить возбудители ООИ (*F. tularensis*, *C. burnetii*, вирус ККГЛ, вирус ЗН, ортохантавирусы), ПОИ (*B. burgdorferii s.l.*, *Rickettsia sp.*), ОКИ (*S. enterica*, рота-, норо-, энтеровирусы) и других патогенов, в соответствии с особенностями конкретных территорий. Разработанные базы данных рекомендуется использовать при эпидемиологическом расследовании вспышек и спорадических случаев инфекционных заболеваний в РФ;

2. Для проведения первичной идентификации геновариантов возбудителей инфекционных болезней, в т.ч. при эпидемиологическом анализе спорадических случаев и вспышек инфекционных заболеваний, а также плановом геномном мониторинге популяций возбудителей в регионе рекомендуется использовать методы идентификации геновариантов возбудителей, основанные на секвенировании фрагментов генома (MLVA, секвенирование фрагментов генома возбудителей). Для углубленной генетической характеристики штаммов и изолятов НК микроорганизмов, в т.ч. вызвавших случаи тяжелого/атипичного течения болезни, массовые эпидемические вспышки с целью выявления уникальных особенностей штаммов, в т.ч. по признакам вирулентности, устойчивым к антибиотикам, факторам окружающей среды, рекомендуется последующее проведение полногеномного секвенирования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОДОЛЖЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Продолжение исследований будет направлено на дальнейшее совершенствование системы молекулярно-генетического мониторинга за возбудителями инфекционных болезней, актуальных для регионов РФ. Перспективным является внедрение в практику для рутинной идентификации геновариантов возбудителей ПОИ и других инфекций методов высокопроизводительного секвенирования, позволяющих расшифровывать полноразмерные последовательности бактериальных и вирусных геномов, а также методов метагеномного секвенирования, направленных на поиск новых генетических вариантов возбудителей. С этой целью будут разработаны стандартизированные протоколы проведения полногеномного секвенирования геномов возбудителей ПОИ и других инфекционных заболеваний и биоинформатической обработки результатов. Необходима разработка *on-line* платформ для автоматизированной обработки нуклеотидных последовательностей и визуализации результатов молекулярно-генетических исследований.

Перспективным является практическое использование методов метагеномного секвенирования, позволяющих осуществлять одновременную детекцию и идентификацию всех микроорганизмов, содержащихся в образце, в т.ч. новых видов и геновариантов бактерий и вирусов. С целью внедрения этой технологии будут разработаны стандартизированные протоколы пробоподготовки образцов для метагеномного секвенирования и анализа полученных результатов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Вирус ЗН — вирус Западного Нила

Вирус ККГЛ — вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКБ — иксодовый клещевой боррелиоз

КГЛ — Крымская геморрагическая лихорадка

КМВ — Кавказские Минеральные Воды

КРС — крупный рогатый скот

ЛЗН — Лихорадка Западного Нила

н.о — нуклеотидные основания

НК — нуклеиновая кислота

ОКИ — острая кишечная инфекция

п.н. — пары нуклеотидов

ПОИ — природно-очаговые инфекции

ПЦР — полимеразная цепная реакция

Риккетсии группы КПЛ — риккетсии группы клещевых пятнистых лихорадок

РНК — рибонуклеиновая кислота

РФ — Российская Федерация

СКФО — Северо-Кавказский федеральный округ

ФБУЗ ЦГиЭ — федеральное бюджетное учреждение здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии»

ЮФО — Южный федеральный округ

COVID-19 – новая коронавирусная инфекция

cgMLST — core genome multilocus sequence typing, мультилокусное сиквенс типирование на основании последовательностей корового генома

MLSA — multilocus sequence analysis, мультилокусный сиквенс анализ

MLST — multilocus sequence typing, мультилокусное сиквенс типирование

MLVA — Multi Locus Variable number tandem repeat analysis, мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов

MPRCA — multiply-primed rolling-circle amplification, многопраймерная амплификацию по типу катящегося кольца

MST — multispacer sequencing typing, мультиспейсерное сиквенс типирование

NGS — next generation sequencing, секвенирование следующего поколения

PFGE — pulsed-field gel electrophoresis, электрофорез в пульсирующем электрическом поле

SISPA — Sequence-independent, single-primer amplification, сиквенс-независимая однопраймерная амплификация генома вируса

SLST — single locus sequence typing, сиквенс типирование по одному локусу

SNP — single nucleotide polymorphism, единичная нуклеотидная замена

ST — sequence type, сиквенс-тип

VIDISCA — virus discovery based on cDNA-AFLP, анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов вирусной кДНК

VNTR — Variable number tandem repeat, вариабельное число тандемных повторов

wg MLST — whole genome multilocus sequence typing, мультилокусное сиквенс типирование на основании последовательностей полного генома

WGS — whole genome sequencing, полногеномное секвенирование

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Абрамов, С.А. Новые данные о распространении хантавирусов в популяциях грызунов на территории Сибири / С.А. Абрамов, Л.Н. Яшина, Т.А. Дупал и др // Сибирский экологический журнал. — 2011. — Т. 18, № 4. — С. 547–553.
2. Батурин, А.А. Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010-2019 гг / А.А. Батурин, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева и др // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2021. — № 3. — С. 308–318.
3. Белова, О.А. Многолетняя динамика зараженности мелких млекопитающих туляремией в Ставропольском крае / О.А. Белова, В.М. Дубянский, А.Ю. Газиева // Принципы экологии. — 2022. — № 2 (44). — С. 15–23.
4. Белозеров, В. С. Экономическая и социальная география Ставропольского края : учебник 9 кл. общеобраз. шк / В. С. Белозеров. — Ставрополь :СКИПКРО, 1996. – 224 с.
5. Билько, Е.А. Результаты изучения генетической гетерогенности РНК-изолятов хантавирусов, выделенных на территории Саратовской области / Е.А. Билько, С.Б. Гаранина, Н.И. Миронова и др // Проблемы особо опасных инфекций. — 2014. — № 4. — С. 36–38.
6. Василенко, Н.Ф. Анализ заболеваемости природно-очаговыми инфекциями на юге европейской части России в 2017 году / Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, Т.В. Таран и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2019. — № 2. — С. 44–50.
7. Василенко, Н.Ф. Изучение циркуляции возбудителей трансмиссивных природно-очаговых инфекций на территории Кавказских минеральных вод / Н.Ф. Василенко, А.В. Ермаков, И.Н. Заикина и др. // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2, № 1–2. — С. 125–126.

8. Василенко, Н.Ф. Мониторинг природно-очаговых инфекций на юге европейской части России в 2016 году / Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, Е.А. Манин и др. // Здоровье населения и среда обитания. — 2018. — № 1 (298). — С. 30–32.

9. Василенко, Н.Ф. Причины обострения эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2016 году / Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, Е.А. Манин и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2017. — № 5. — С. 17–23.

10. Василенко, Н.Ф. Роль позвоночных в поддержании природно-очаговых инфекций на территории Ставропольского края / Н.Ф. Василенко, Д.А. Прислегина, Е.А. Манин и др. // Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе. — 2022. — С. 74–75.

11. Василенко, Н.Ф. Современное состояние популяций позвоночных животных и их роль в поддержании природных очагов зоонозов на территории Ставропольского края / Н.Ф. Василенко, Д.А. Прислегина, Н.В. Цапко и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 4. — С. 54–61.

12. Василенко, Н.Ф. Современное состояние природного очага Крымской геморрагической лихорадки в Российской Федерации / Н.Ф. Василенко, Е.А. Манин, О.В. Малецкая и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2019. — № 4. — С. 46–52.

13. Василенко, Н.Ф. Современное состояние природных очагов клещевых трансмиссивных инфекций на территории Ставропольского края / Н.Ф. Василенко, Д.А. Прислегина, Е.А. Манин и др. // Здоровье населения и среда обитания. — 2021. — № 12. — С. 72–78.

14. Василенко, Н.Ф. Эпизоотические проявления геморрагической лихорадки с почечным синдромом на территории Ставропольского края / Н.Ф. Василенко, Д.А. Прислегина, Е.А. Манин и др. // Национальные приоритеты России. — 2021. — № 3 (42). — С. 119–122.

15. Власов, В.В. Клещевые риккетсиозы в Западной Сибири. Первые российские случаи риккетсиозов, вызванных *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia raoultii* и *Rickettsia slovaca* / В.В. Власов, Я.П. Иголкина, В.А. Рар и др. // Национальные приоритеты России. — 2021. — № 3 (42). — С. 122–126.
16. Волынкина, А.С. Анализ заболеваемости Крымской геморрагической лихорадкой в Российской Федерации в 2017 г. и прогноз на 2018 г / А.С. Волынкина, Е.С. Котенев, Я.В. Лисицкая и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2018. — № 1. — С. 12–15.
17. Волынкина, А.С. Анализ эпидемиологической ситуации по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г / А.С. Волынкина, О.В. Малецкая, О.Н. Скударева и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 1. — С. 17–22.
18. Волынкина, А.С. Генетический мониторинг вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки на юге Европейской части России в 2011 г / А.С. Волынкина, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — № 4. — С. 80–85.
19. Волынкина, А.С. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулировавших на юге Европейской части России в 2011 г / А.С. Волынкина, Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, А.Н. Куличенко // Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера. — 2012. — С. 57–58.
20. Герасименко, Е.В. Эпизоотологический мониторинг природного очага туляремии в Ставропольском крае за 2010-2017 гг / Е.В. Герасименко, Н.В. Цапко, О.А. Гнусарева и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 4. — С. 109–112.

21. Голицына, Л.Н. Эпидемические варианты неполиомиелитных энтеровирусов в России / Л.Н. Голицына, В.В. Зверев, О.В. Парфенова, Н.А. Новикова // Медицинский альманах. — 2015. — № 5 (40). — С. 136–140.
22. Голицына, Л.Н. Этиологическая структура энтеровирусных инфекций в Российской Федерации в 2017-2018 гг / Л.Н. Голицына, В.В. Зверев, С.Г. Селиванова-Фомина и др // Здоровье населения и среда обитания. — 2019. — № 8 (317). — С. 30–38.
23. Елифанова, Н.В. Генотиповая структура популяции норовирусов, циркулирующих на территории Нижнего Новгорода в эпидсезоне 2022-2023 годов / Н.В. Елифанова, С.В. Опарина, О.В. Морозова и др. — 2023.
24. Елифанова, Н.В. Молекулярная диагностика, генетический мониторинг и перспективы специфической профилактики норовирусной инфекции: Аналитический обзор / Н.В. Елифанова, Н.А. Новикова — 2018. — 92 с. — Деп. в ВИНТИ РАН 08.08.2018, № 92-В2018.
25. Жебрун, А.Б. Генотипирование и молекулярное маркирование бактерий и вирусов в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями / А.Б. Жебрун, С.Л. Мукомолов, О.В. Нарвская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2011. — № 4. — С. 28–36.
26. Жебрун, А.Б. От молекулярной к геномной и метагеномной эпидемиологии / А.Б. Жебрун // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2014. — № 3. — С. 91–100.
27. Зайцев, А.А. Анализ динамики и прогноз интенсивности эпидемических проявлений туляремии в природном очаге степного типа на территории Ставропольского края / А.А. Зайцев, Д.С. Агапитов, А. Газиева и др. // Национальные приоритеты России. — 2021. — № 3 (42). — С. 161–165.

28. Зайцева, Е.В. Результаты мониторинга антигенных типов ротавирусов группы А на территории Российской Федерации в период 2011-2015 гг / Е.В. Зайцева, Т.А. Ольнева, К.В. Кулешов и др // Клиническая лабораторная диагностика. — 2016. — Т. 61, № 7. — С. 445–448.

29. Зайцева, О.А. Результаты эпизоотологического мониторинга природных очагов бактериальных трансмиссивных инфекций в регионе Кавказских Минеральных Вод Ставропольского края в 2018-2020 гг / О.А. Зайцева, О.А. Гнусарева, О.В. Васильева и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2022. — № 1. — С. 101–105.

30. Зайцева, О.А. Современная эпидемиологическая ситуация по иксодовому клещевому боррелиозу в Ставропольском крае (2016-2018 годы) / О.А. Зайцева, Д.А. Прислегина, В.М. Дубянский и др. // Актуальные вопросы изучения особо опасных и природно-очаговых болезней. — 2019. — С. 206–211.

31. Зайцева, О.А. Современная эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по иксодовому клещевому боррелиозу на юге европейской части России / О.А. Зайцева, Е.С. Котенев, Ю.С. Артюшина, Л.А. Кот, Л.И. Шапошникова, Т.И. Чишеньюк, О.А. Гнусарева, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 3. — С. 58–65.

32. Зайцева, О.А. Циркуляция возбудителей природно-очаговых бактериальных инфекций на территории Ставропольского края в 2021 г / О.А. Зайцева, О.В. Васильева, О.А. Гнусарева и др. // Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе. — 2022. — С. 84–85.

33. Зайцева, О.А. Эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по иксодовому клещевому боррелиозу в Ставрополе (2015-2019) / О.А. Зайцева, А.Н. Куличенко, Б.К. Котти // Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2022. — Т. 17, № 1. — С. 23–26.

34. Зайцева, О.А. Эпидемическая ситуация по иксодовому клещевому боррелиозу на территории Кавказских Минеральных Вод

Ставропольского края (2015-2019 гг.) / О.А. Зайцева, Д.А. Прислегина, Е.С. Котенев и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. — 2021. — Т. 11, № 1. — С. 12–17.

35. Зуева, Л.П. Молекулярная эпидемиология возбудителей инфекционных заболеваний: контуры будущего / Л.П. Зуева, А.Е. Гончаров // Медицина в Кузбассе. — Некоммерческое партнерство «Издательский Дом «Медицина и просвещение». — 2013. — № 2. — С. 9–13.

36. Иванова, А.В. Хантавирусные болезни: обзор эпидемиологической ситуации и эпидемиологических рисков в регионах мира / А.В. Иванова, Н.В. Попов, И.Г. Карнаухов, Е.А. Чумачкова // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 1. — С. 23–31.

37. Ивановский, В. А. География Ставропольского края : учеб. пособие / В. А. Ивановский. — Ставрополь : Издво СГУ, 1997. — 116 с.

38. Ишмухаметов, А.А. Характеристика хантавирусов — возбудителей зоонозных геморрагических лихорадок / А.А. Ишмухаметов, Т.К. Дзагурова, В.Г. Морозов и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2017. — № 23. — С. 26–32.

39. Кавказские Минеральные Воды (в вопросах и ответах) : метод. пособие / сост.: А. В. Трухачев [и др.] ; под общ. ред. А. В. Трухачева. — Ставрополь : АГРУС, 2012. — 144 с.

40. Карташов, М.Ю. Генетическое разнообразие риккетсий, выявленных в клещах на территории Западной Сибири / М.Ю. Карташов, Т.П. Микрюкова, В.А. Терновой, Н.С. Москвитина, В.Б. Локтев // Молекулярная диагностика 2017. — 2017. — С. 175–176.

41. Карташов, М.Ю. Генотипирование изолятов риккетсий, циркулирующих на территории полуострова Крым / М.Ю. Карташов, С.Н. Тихонов, Т.П. Микрюкова и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2018. — Т. 36, № 2. — С. 84–88.

42. Ковалёв, Е.В. Молекулярно-эпидемиологические и клинические аспекты энтеровирусной инфекции на юге России / Е.В. Ковалёв, Т.И. Твердохлебова, Э.Н. Симованьян // Медицинский вестник Юга России. — 2023. — Т. 14, № 1. — С. 83–92.

43. Ковальчук, И.В. К вопросу эпидемических проявлений туляремии в Ставропольском крае / И.В. Ковальчук, А.В. Ермаков, А.В. Сазонов и др. // Инфекция и иммунитет. — 2017. — № 5. — С. 447.

44. Коренберг, Э.И. Основные итоги генотипирования боррелий в России / Э.И. Коренберг, В.В. Нефедова, И.А. Фадеева, Н.Б. Горелова // Бюллетень сибирской медицины. — 2006. — Т. 5, № Приложение 1. — С. 87–92.

45. Кудрявцева, Т.Ю. Молекулярно-генетические основы различий подвидов возбудителя туляремии и типирования штаммов *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* / Т.Ю. Кудрявцева, А.Н. Мокриевич // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2022. — Т. 40, № 1. — С. 12–20.

46. Кулешов К.В. Филогеномный анализ изолятов *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серовар Enteritidis, ассоциированных со спорадической и групповой заболеваемостью в России / К.В. Кулешов, А.С. Павлова, А.Е. Егорова et al // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. — 2023. — Т. 13, № 2. — С. 76–82.

47. Кулешов, К.В. Разработка и апробация методики MLVA-анализа с целью субтипирования изолятов *S. enteritidis* / К.В. Кулешов, С.И. Браславская, А.Т. Подколзин // Молекулярная диагностика-2010. — 2010. — С. 350–353.

48. Кулешов, К.В. Сравнительная оценка молекулярно-генетических методов типирования изолятов *S. Enteritidis* в очагах групповой заболеваемости / К.В. Кулешов, А.Т. Подколзин, С.Ш. Рожнова // Молекулярная диагностика-2010. — 2010. — С. 353–357.

49. Куличенко, А.Н. Новый генетический вариант вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, выявленный в Крыму / А.Н. Куличенко, А.С. Волынкина, Е.С. Котенев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2016. — Т. 34, № 2. — С. 76–80.

50. Куличенко, А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2016 г. (Аналитический обзор) / А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Н.Ф. Василенко и др. — Ставрополь, 2017. — 104 с

51. Куличенко, А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2017 г. (Аналитический обзор) / А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина и др. — Ставрополь, 2018. — 112 с.

52. Куличенко, А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2018 г. (Аналитический обзор) / А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина и др. — Ставрополь, 2019. — 105 с.

53. Куличенко, А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2019 г. (Аналитический обзор) / А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина и др. — Ставрополь, 2020. — 96 с.

54. Куличенко, А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2020 г. (Аналитический обзор) / А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина и др. — Ставрополь, 2021. — 90 с.

55. Куличенко, А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2021 г. (Аналитический обзор) / А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина и др. — Ставрополь, 2022. — 96 с.

56. Куличенко, А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2022 г. (Аналитический обзор) / А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина и др. — Ставрополь, 2023. — 104 с.

57. Лисицкая, Я.В. Молекулярно-генетическое типирование изолятов вируса Западного Нила, циркулирующих на территории Ставропольского края / Я.В. Лисицкая, А.С. Волынкина, Е.С. Котенев // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. — 2017. — С. 253–255.

58. Лисицкая, Я.В. Молекулярно-генетическое типирование изолятов РНК возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом на территории Ставропольского края, Республики Абхазия и г.-к. Сочи / Я.В. Лисицкая, А.С. Волынкина, Е.С. Котенев // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. — 2017. — С. 256–257.

59. Лисицкая, Я.В. Циркуляция вируса Западного Нила на территории Ставропольского края в 2011-2015 гг / Я.В. Лисицкая, А.С. Волынкина, Е.С. Котенев и др // Здоровье населения и среда обитания. — 2017. — № 12 (297). — С. 47–50.

60. Лисицкая, Я.В. Эпизоотолого-эпидемиологические аспекты проявления лихорадки Ку на территории Ставропольского края / Я.В. Лисицкая, Е.С. Котенев, А.С. Волынкина и др. // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. — 2017. — С. 43–44.

61. Малецкая, О.В. Природно-очаговые вирусные лихорадки на юге европейской части России. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / О.В. Малецкая, Т.В. Таран, Д.А. Прислегина и др // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 4. — С. 79–84.

62. Малецкая, О.В. Природно-очаговые вирусные лихорадки на юге европейской части России. Крымская геморрагическая лихорадка / О.В. Малецкая, Т.В. Таран, Д.А. Прислегина и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 4. — С. 75-80.

63. Малецкая, О.В. Природно-очаговые вирусные лихорадки на юге европейской части России. Лихорадка Западного Нила / О.В. Малецкая, Д.А. Прислегина, Т.В. Таран и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 1. — С. 109-114.

64. Новикова, Н.А. Молекулярный мониторинг неполиомиелитных энтеровирусов на европейской территории России в 2008-2011 гг / Н.А. Новикова, Л.Н. Голицына, С.Г. Фомина, Е.И. Ефимов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2013. — № 1. — С. 75–78.

65. Новикова, Н.А. Молекулярный мониторинг циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов на территории России (2008-2015 гг.) / Н.А. Новикова, Л.Н. Голицына, В.В. Зверев и др // Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени МП Чумакова РАМН. Медицинская вирусология. — 2015. — Т. 29, № 2. — С. 110.

66. Онищенко, Г.Г. Крымская геморрагическая лихорадка / Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая и др.; под ред. Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко. — Воронеж: Фаворит, 2018. — 288 с.

67. Орлова, Т.Н. Изучение циркуляции возбудителя Лайм-боррелиоза в Ставропольском крае / Т.Н. Орлова, Н.Ф. Василенко, Е.Н. Афанасьев и др // Проблемы особо опасных инфекций. — 2008. — № 2. — С. 20–22.

68. Орлова, Т.Н. Распространение возбудителя Лайм-боррелиоза в Ставропольском крае и совершенствование методов его индикации / Т.Н. Орлова // Автореф. на соискание канд. биол. наук, Ставрополь. — 2009.

69. Оценка туристского потока (годовые данные, по числу поездок, 2022 г.) Доступно по ссылке: <https://rosstat.gov.ru/statistics/turizm> Ссылка действительна по состоянию на 03.01.2023.

70. Панферова, Ю.А. Применение панели локусов тандемных повторов переменной копийности для типирования штаммов *Coxiella burnetii* / Ю.А. Панферова, Н.К. Токаревич // Национальные приоритеты России. — 2011. — № 2 (5). — С. 158–159.

71. Петрова, И.Д. Исследование генетических особенностей вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего на Юге России: Дисс. канд. биол. наук / И.Д. Петрова. - Кольцово, 2003. - 125 с.

72. Платонов, А.Е. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты / А.Е. Платонов, Л.С. Карань, Т.А. Шопенская и др // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2011. — № 2. — С. 29–37.

73. Попова, А.Ю. Применение молекулярно-генетического анализа и геномного профилирования возбудителей инфекционных болезней региона Сочи в период подготовки и проведения чемпионата мира по футболу FIFA-2018 / А.Ю. Попова, А.Н. Куличенко, А.С. Волынкина и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2019. — № 3. — С. 54–59.

74. Попова, А.Ю. Эпидемиологические особенности болезни, вызванной вирусом Эбола, в странах Западной Африки в 2013-2015 гг / А.Ю. Попова, В.А. Сафронов, Е.В. Куклев и др // Проблемы особо опасных инфекций. — 2015. — № 3. — С. 42–48.

75. Прислегина, Д.А. Крымская геморрагическая лихорадка в Северо-Кавказском федеральном округе: обзор эпидемиологической

ситуации и совершенствование методики прогнозирования заболеваемости / Д.А. Прислегина, О.В. Малецкая, В.М. Дубянский, А.Е. Платонов // Инфекция и иммунитет. — 2022. — Т. 12, № 2. — С. 357–365.

76. Прислегина, Д.А. Крымская–Конго геморрагическая лихорадка в Ставропольском крае: современные клинико-эпидемиологические аспекты и новый подход к прогнозированию заболеваемости / Д.А. Прислегина, В.М. Дубянский, О.В. Малецкая и др. // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. — 2018. — Т. 7, № 3 (26). — С. 49–56.

77. Прислегина, Д.А. Природно-очаговые трансмиссивные инфекции в Северо-Кавказском федеральном округе: эпидемиологическая ситуация, совершенствование мониторинга и прогнозирования / Д.А. Прислегина, Н.Ф. Василенко, В.М. Дубянский и др // Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе. — 2022. — С. 49–50.

78. Прохватилова, Е.В. Оценка диагностической эффективности набора реагентов для *in vitro* диагностики лихорадки Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией / Е.В. Прохватилова, Г.А. Ткаченко, А.А. Батурин и др. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2023. — Т. 23, № 1. — С. 90–101.

79. Путинцева, Е.В. Лихорадка Западного Нила в Российской Федерации в 2022 г., прогноз заболеваемости на 2023 г / Е.В. Путинцева, С.К. Удовиченко, Д.Н. Никитин и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2023. — № 1. — С. 75–84.

80. Рудаков, Н.В. Алгоритмы выявления риккетсий и лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России / Н.В. Рудаков, И.Е. Самойленко, Л.В. Кумпан // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2015. — Т. 14, № 2 (81). — С. 6–9.

81. Рудаков, Н.В. Современное состояние проблемы риккетсиозов в России и новые подходы к классификации болезней, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, В.К. Ястребов и др // Acta Biomedica Scientifica. — 2012. — № 5-1 (87). — С. 109–113.

82. Рудакова, С.А. Генотипическое разнообразие боррелий в иксодовых клещах на территории юга Западной Сибири / С.А. Рудакова, О.Е. Теслова, Н.Е. Канешова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 4. — С. 92–96.

83. Сирица, Ю.В. Результаты эпизоотологического мониторинга территории Ставропольского края на лептоспироз (2019-2020 гг.) / Ю.В. Сирица, О.А. Зайцева, А.Ю. Газиева и др. // Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы. — 2021. — С. 201–203.

84. Соломащенко, Н.И. Этиологическая структура заболеваний людей лептоспирозами в Ставропольском крае в 2014-2018 годах / Н.И. Соломащенко, О.Г. Кириллова // Актуальные вопросы изучения особо опасных и природно-очаговых болезней. — 2019. — С. 194–197.

85. Тимофеев, В.С. Молекулярное типирование штаммов *Francisella tularensis* методом мультилокусного анализа вариабельности числа тандемных повторов / В.С. Тимофеев, Т.Ю. Кудрявцева, А.Н. Мокриевич и др // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2014. — № 1. — С. 8–15.

86. Ткаченко, Л.И. Вспышка туляремии в Ставропольском крае. Клинико-эпидемиологическая характеристика / Л.И. Ткаченко, И.В. Ковальчук — 2023.

87. Фрейлихман, О.А. Лабораторные методы диагностики кулихорадки и генотипирование *Coxiella burnetii* / О.А. Фрейлихман, Н.К. Токаревич, В.Д. Кондрашова // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. — 2017. — № 2 (19). — С. 49–60.

88. Хаснатинов, М.А. Роль генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита и других клещевых патогенов в обеспечении устойчивого существования их эпидемиологически значимых природных очагов в Восточной Сибири и Монголии / М.А. Хаснатинов // Дисс. докт. биол. наук. Кольцово. — 2019.

89. Шпынов, С.Н. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Российской Федерации в период с 1957 по 2019 год / С.Н. Шпынов, Н.В. Рудаков, С.Ю. Зеликман // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 3. — С. 141–146.

90. Якименко, В.В. Итоги изучения хантавирусов в Западной Сибири / В.В. Якименко, С.Б. Гаранина, М.Г. Малькова и др. // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2008. — № 2 (32). — С. 20–26.

91. Яшина, Л.Н. Вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулировавший в Ставропольском крае в 2011 г / Л.Н. Яшина, Б.С. Малышев, Н.А. Нетесова и др // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2014. — № 4. — С. 25–29.

92. Яшина, Л.Н. Хантавирус тула на территории Крыма / Л.Н. Яшина, А.В. Зайковская, Е.В. Протопопова и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2015. — Т. 33, № 4. — С. 38–40.

93. «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в СК в 2016 г.» Государственный доклад [Электронный ресурс].

94. «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в СК в 2017 г.» Государственный доклад [Электронный ресурс].

95. «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в СК в 2018 г.» Государственный доклад [Электронный ресурс].

96. «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в СК в 2019 г.» Государственный доклад [Электронный ресурс].

97. «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в СК в 2020 г.» Государственный доклад [Электронный ресурс].

98. «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в СК в 2021 г.» Государственный доклад [Электронный ресурс].

99. «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в СК в 2022 г.» Государственный доклад [Электронный ресурс].

100. Abat, C. Surveillance System to Detect Abnormal Events and Emerging / C. Abat, H. Chaudet, P. Colson et al. // *Emerging Infectious Diseases*. — 2015. — Vol. 21, № 8. — P. 1302–1310.

101. Adrian, E. Improving the quality and workflow of bacterial genome sequencing and analysis: Paving the way for a Switzerland-wide molecular epidemiological surveillance platform / E. Adrian, S. Blanc Dominique et al. // *Swiss Medical Weekly*. — 2018. — Vol. 148, № 49–50. — P. 1–10.

102. Arricau-Bouvery, N. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing / N. Arricau-Bouvery, Y. Hauck, A. Bejaoui et al // *BMC microbiology*. — 2006. — Vol. 6. — P. 38.

103. Bakker, H.C. den Rapid whole-genome sequencing for surveillance of *Salmonella enterica* serovar enteritidis / H.C. den Bakker, M.W. Allard, D. Bopp et al. // *Emerging infectious diseases*. — 2014. — Vol. 20, № 8. — P. 1306–1314.

104. Beek, J. van Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II. 4, late 2012 / J. van Beek, K. Ambert-Balay, N. Botteldoorn et al. // *Eurosurveillance*. — 2013. — Vol. 18, № 1. — P. 20345.

105. Bennett, S.N. Reconstructing the evolutionary origins and phylogeography of hantaviruses / S.N. Bennett, S.H. Gu, H.J. Kang et al. // *Trends in microbiology*. — 2014. — Vol. 22, № 8. — P. 473–482.

106. Besser, J. NGS and their Application to the Study and Control of Bacterial Infections / J. Besser, H.A. Carleton, P. Gerner-smidt et al. // *Clinical Microbiology and Infection*. — 2018. — Vol. 24, № 4. — P. 335–341.

107. Braks, M. Making Vector-Borne Disease Surveillance Work: New Opportunities From the SDG Perspectives / M. Braks, G. Giglio, L. Tomassone et al // *Frontiers in veterinary science*. — 2019. — Vol. 6. — P. 232.

108. Brinkmann, A. A cross-sectional screening by next-generation sequencing reveals *Rickettsia*, *Coxiella*, *Francisella*, *Borrelia*, *Babesia*, *Theileria* and *Hemolivia* species in ticks from Anatolia / A. Brinkmann, O. Hekimoğlu, E. Dinçer et al. // *Parasites & vectors*. — 2019. — Vol. 12, № 1. — P. 1–13.

109. Carriço, J.A. Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: Databases, tools and the next-generation sequencing revolution / J.A. Carriço, A.J. Sabat, A.W. Friedrich, M. Ramirez // *Eurosurveillance*. — 2013. — Vol. 18, № 4. — P. 1–9.

110. Casto, A.M. Prospective, Real-time Metagenomic Sequencing During Norovirus Outbreak Reveals Discrete Transmission Clusters / A.M. Casto, A.L. Adler, N. Makhsous et al. // *Clinical infectious diseases*. — 2019. — Vol. 69, № 6. — P. 941–948.

111. Chhabra, P. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes / P. Chhabra, M. de Graaf, G.I. Parra // *The Journal of general virology*. — 2019. — Vol. 100, № 10. — P. 1393–1406.

112. Chinikar, S. Genetic Diversity of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains from Iran / S. Chinikar, S. Bouzari, M.A. Shokrgozar et al. // *Journal of arthropod-borne diseases*. — 2016. — Vol. 10, № 2. — P. 127–140.

113. Choi, J. Web-based infectious disease surveillance systems and public health perspectives: a systematic review / J. Choi, Y. Cho, E. Shim, H. Woo // *BMC public health*. — 2016. — Vol. 16, № 1. — P. 1238.

114. Ciccozzi, M. The phylogenetic approach for viral infectious disease evolution and epidemiology: An updating review / M. Ciccozzi, A. Lai, G. Zehender et al // *Journal of medical virology*. — 2019. — Vol. 91, № 10. — P. 1707–1724.

115. Current ICTV Taxonomy Release. Доступно по ссылке <https://ictv.global/taxonomy> Ссылка действительна по состоянию на 03.10.2023.

116. Eppinger, M. Genomic epidemiology of the Haitian cholera outbreak: a single introduction followed by rapid, extensive, and continued spread characterized the onset of the epidemic / M. Eppinger, T. Pearson, S.S.K. Koenig et al // mBio. — 2014. — Vol. 5, № 6. — P. e01721.

117. European Centre for Disease Prevention and Control ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations – 2019–2021 / European Centre for Disease Prevention and Control. — 2019.

118. European Centre for Disease Prevention and Control. Laboratory standard operating procedure for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. Stockholm: ECDC; 2016 <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Salmonella-Enteritidis-Laboratory-standart-operating-procedure.pdf>

119. Faria, N.R. Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil / N.R. Faria, E.C. Sabino, M.R.T. Nunes et al // Genome medicine. — 2016. — Т. 8, № 1. — С. 1–4.

120. Ferrari, R.G. Phenotypic and Genotypic Eligible Methods for *Salmonella Typhimurium* Source Tracking / R.G. Ferrari, P.H.N. Panzenhagen, C.A. Conte-Junior // Frontiers in microbiology. — 2017. — Vol. 8. — P. 2587.

121. Fournier, P.-E. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France / P.-E. Fournier, F. Grunnenberger, B. Jaulhas и др. // Emerging infectious diseases. — 2000. — Vol. 6. — P. 389–392.

122. Gardy, J.L. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system / J.L. Gardy, N.J. Loman // Nature Reviews Genetics. — Nature Publishing Group. — 2018. — Vol. 19, № 1. — P. 9–20.

123. Gebreyes, W.A. Molecular Epidemiology of Infectious Zoonotic and Livestock Diseases / W.A. Gebreyes, D. Jackwood, C.J.B. de Oliveira et al.

// Microbiology spectrum. — 2020. — Vol. 8, № 2. — DOI: 10.1128/microbiolspec.AME-0011-2019.

124. Gire, S.K. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak / S.K. Gire, A. Goba, P.C. Sabeti // Science (New York, N.Y.). — 2014. — Vol. 345, № 6202. — P. 1369–1372.

125. Gómara, M.I. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype / M.I. Gómara, D. Cubitt, U. Desselberger, J. Gray // Journal of clinical microbiology. — 2001. — Vol. 39, № 10. — P. 3796–3798.

126. Grubaugh, N.D. Genomic insights into Zika virus emergence and spread / N.D. Grubaugh, N.R. Faria, K.G. Andersen, O.G. Pybus // Cell. — 2018. — T. 172, № 6. — C. 1160–1162.

127. Hadfield, J. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution / J. Hadfield, C. Megill, S.M. Bell et al. // Bioinformatics (Oxford, England). — 2018. — Vol. 34, № 23. — P. 4121–4123.

128. Halpin, A.L. Framing Bacterial Genomics for Public Health (Care) / A.L. Halpin, L.C. McDonald, C.A. Elkins // Journal of clinical microbiology. — 2021. — Vol. 59, № 12. — P. e0013521.

129. He, M. Complete genome sequencing and comparative genomic analyses of a new spotted-fever *Rickettsia heilongjiangensis* strain B8 / M. He, L. Zhang, H. Hu et al. // Emerging Microbes and Infections. — 2023. — Vol. 12, № 1. — DOI: 10.1080/22221751.2022.2153085.

130. Hofmann, J. Tula Virus as Causative Agent of Hantavirus Disease in Immunocompetent Person, Germany / J. Hofmann, S. Kramer, K.R. Herrlinger et al. // Emerging infectious diseases. — 2021. — Vol. 27, № 4. — P. 1234–1237.

131. Holmes, E.C. The evolution of Ebola virus: Insights from the 2013–2016 epidemic / E.C. Holmes, G. Dudas, A. Rambaut, K.G. Andersen // Nature. — 2016. — Vol. 538, № 7624. — P. 193–200.

132. Hopkins, K.L. Standardisation of multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for subtyping of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis / K.L. Hopkins, T.M. Peters, E. de Pinna, J. Wain // Euro surveillance. — Sweden, 2011. — Vol. 16, № 32.

133. Inns, T. Prospective use of whole genome sequencing (WGS) detected a multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis / T. Inns, P.M. Ashton, S. Herrera-Leon et al. // Epidemiology & Infection. — 2017. — Vol. 145, № 2. — P. 289–298.

134. Jian, S.W. Real-Time Surveillance of Infectious Diseases: Taiwan's Experience / S.W. Jian, C.M. Chen, C.Y. Lee, Di.P. Liu // Health Security. — 2017. — Vol. 15, № 2. — P. 144–153.

135. Johansson, A. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis / A. Johansson, J. Farlow, P. Larsson et al // Journal of bacteriology. — 2004. — Vol. 186, № 17. — P. 5808–5818.

136. Klempa, B. Hantavirus in African wood mouse, Guinea / B. Klempa, E. Fichet-Calvet, E. Lecompte et al // Emerging infectious diseases. — 2006. — Vol. 12, № 5. — P. 838–840.

137. Kroneman, A. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses / A. Kroneman, H. Vennema, K. Deforche et al. // Journal of clinical virology. — 2011. — Vol. 51, № 2. — P. 121–125.

138. Kuhn, J.H. Genetic analysis of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains involved in the recent outbreaks in Russia / J.H. Kuhn, S.V Seregin, S.P. Morzunov et al // Archives of virology. — 2004. — Vol. 149, N 11. — P. 2199-2213.

139. Kutyrev, V.V. Phylogeny and Classification of *Yersinia pestis* Through the Lens of Strains From the Plague Foci of Commonwealth of Independent States / V. V Kutyrev, G.A. Eroshenko, V.L. Motin et al // Frontiers in microbiology. — 2018. — Vol. 9. — P. 1106.

140. Lärkeryd, A. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens / A. Lärkeryd, K. Myrtenäs, E. Karlsson et al // *Bioinformatics*. — 2014. — Vol. 30, № 12. — C. 1762–1764.

141. Lemieux, J.E. Whole genome sequencing of human *Borrelia burgdorferi* isolates reveals linked blocks of accessory genome elements located on plasmids and associated with human dissemination / J.E. Lemieux, W. Huang, N. Hill et al. // *PLoS pathogens*. — 2023. — Vol. 19, № 8. — P. e1011243.

142. Li, X. The 2014 Ebola virus outbreak in West Africa highlights no evidence of rapid evolution or adaptation to humans / X. Li, J. Zai, H. Liu et al // *Scientific reports*. — 2016. — Vol. 6. — P. 35822.

143. Lienemann, T. Characterization of *Salmonella Typhimurium* isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA / T. Lienemann, A. Kyyhkynen, J. Halkilahti et al. // *BMC microbiology*. — 2015. — Vol. 15. — P. 131.

144. Liu, Y. The evaluation and application of multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for the molecular epidemiological study of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis infection / Y. Liu, X. Shi, Y. Li et al. // *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. — 2016. — Vol. 15. — P. 4.

145. Maes, P. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses / P. Maes, J. Matthijnsens, M. Rahman, M. Van Ranst // *BMC microbiology*. — 2009. — Vol. 9. — P. 238.

146. Margos, G. PubMLST.org-The new home for the *Borrelia* MLSA database // *Ticks and tick-borne diseases*. — 2015. — Vol. 6, № 6. — P. 869–871.

147. Mathijs, E. Novel norovirus recombinants and GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium / E. Mathijs, S.

Denayer, L. Palmeira et al. // *Virology Journal*. — 2011. — Vol. 8, № 1. — P. 310.

148. Matthijnsens, J. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments / J. Matthijnsens, M. Ciarlet, M. Rahman et al. // *Arch. Virol.* – 2008. – V. 153, N 8. – P. 1621-1629.

149. Mediannikov, O. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal / O. Mediannikov, G. Diatta, F. Fenollar et al // *PLoS neglected tropical diseases*. — 2010. — Vol. 4, № 9. — DOI: 10.1371/journal.pntd.0000821.

150. Michael Dunne, W. Epidemiology of transmissible diseases: Array hybridization and next generation sequencing as universal nucleic acid-mediated typing tools / W. Michael Dunne, H. Pouseele, S. Monecke et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. — 2018. — Vol. 63, № September. — P. 332–345.

151. MLVAbank for Microbes Genotyping. *Coxiella burnetii* database
Доступно по ссылке <https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/65/exportCSV> Ссылка активна на 24 августа 2023

152. MLVAbank for Microbes Genotyping. *Francisella tularensis* database
Доступно по ссылке <https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/45/exportCSV> Ссылка активна на 24 августа 2023.

153. Mughini-Gras, L. New paradigms for *Salmonella* source attribution based on microbial subtyping / L. Mughini-Gras, E. Franz, W. van Pelt // *Food microbiology*. — 2018. — Vol. 71. — P. 60–67.

154. Muthuirulandi Sethuvel, D. Current strategy for local- to global-level molecular epidemiological characterisation of global antimicrobial resistance surveillance system pathogens / D. Muthuirulandi Sethuvel, N. Devanga Ragupathi, Y. Bakthavatchalam, S. Vijayakumar, R. Varghese, C. Shankar, J. Jacob, K. Vasudevan, D. Elangovan, V. Balaji // *Indian Journal of Medical Microbiology*. — Indian Journal of Medical Microbiology 2019. — Vol. 37, № 2. — P. 147–162.

155. Muvhali, M. Investigation of *Salmonella* Enteritidis outbreaks in South Africa using multi-locus variable-number tandem-repeats analysis, 2013-2015 / M. Muvhali, A.M. Smith, A.M. Rakgantso, K.H. Keddy // BMC infectious diseases. — 2017. — Vol. 17, № 1. — P. 661.
156. Neo, F.J.X. Outbreak of caliciviruses in the Singapore military, 2015 / F.J.X. Neo, J.J.P. Loh, P. Ting et al. // BMC Infectious Diseases. — 2017. — Vol. 17, № 1. — C. 719.
157. Nirwati, H. Identification of Rotavirus Strains Causing Diarrhoea in Children under Five Years of Age in Yogyakarta, Indonesia / H. Nirwati, M.S. Hakim, S. Aminah et al // The Malaysian journal of medical sciences: MJMS. — 2017. — Vol. 24, № 2. — P. 68–77.
158. Nix, W.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens / W.A. Nix, M.S. Oberste, M.A. Pallansch // Journal of clinical microbiology. — 2006. — Vol. 44, № 8. — P. 2698–2704.
159. Oude Munnink, B.B. The next phase of SARS-CoV-2 surveillance: real-time molecular epidemiology / B.B. Oude Munnink, N. Worp, D.F. Nieuwenhuijse et al. // Nature Medicine. — 2021. — Vol. 27, № 9. — P. 1518–1524.
160. Parreira, R. Laboratory Methods in Molecular Epidemiology: Viral Infections / R. Parreira // Microbiology spectrum. — 2018. — Vol. 6, № 6. — DOI: 10.1128/microbiolspec.AME-0003-2018.
161. Pérez-Losada, M. Microbial sequence typing in the genomic era / M. Pérez-Losada, M. Arenas, E. Castro-Nallar // Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. — 2018. — Vol. 63. — P. 346–359.
162. Peters, T. Multi-laboratory validation study of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, 2015 / T. Peters, S. Bertrand, J.T. Björkman et al. // Eurosurveillance. — 2017. — Vol. 22, № 9. — P. 30477.

163. Platonov, A.E. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia / A.E. Platonov, L.S. Karan, N.M. Kolyasnikova et al // *Emerging infectious diseases*. — 2011. — Vol. 17, № 10. — P. 1816–1823.
164. Plyusnin, A. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles / A. Plyusnin, O. Vapalahti, H. Lankinen et al. // *Journal of virology*. — 1994. — Vol. 68, № 12. — P. 7833–7839.
165. Puustinen, L. Norovirus genotypes in endemic acute gastroenteritis of infants and children in Finland between 1994 and 2007 / L. Puustinen, V. Blazevic, L. Huhti et al. // *Epidemiology and infection*. — England, 2012. — Vol. 140, № 2. — P. 268–275.
166. Ranjbar, R. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide / R. Ranjbar, A. Karami, S. Farshad, G.M. Giammanco, C. Mammina // *The new microbiologica*. — Italy, 2014. — Vol. 37, № 1. — P. 1–15.
167. Rasmussen, A.L. Genomic Signatures of Emerging Viruses: A New Era of Systems Epidemiology / A.L. Rasmussen, M.G. Katze // *Cell Host and Microbe*. — 2016. — Vol. 19, № 5. — P. 611–618.
168. Rebaudet, S. Epidemiological and molecular forensics of cholera recurrence in Haiti / S. Rebaudet, S. Moore, E. Rossignol et al // *Scientific reports*. — England, 2019. — Vol. 9, № 1. — P. 1164.
169. Richter, D. Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards / D. Richter, F.-R. Matuschka // *Applied and environmental microbiology*. — 2006. — Vol. 72, № 7. — C. 4627–4632.
170. Riley, L.W. Advances in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Definitions, Approaches, and Scope of the Field / L.W. Riley, R.E. Blanton // *Microbiology spectrum*. — 2018. — Vol. 6, № 6. — DOI: 10.1128/microbiolspec.AME-0001-2018.
171. Riley, L.W. Laboratory Methods in Molecular Epidemiology: Bacterial Infections / L.W. Riley // *Microbiology spectrum*. — 2018. — Vol. 6, № 6. — DOI: 10.1128/microbiolspec.AME-0004-2018.

172. Rotavirus Classification Working Group

<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>

173. Sabat, A.J. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance / A.J. Sabat, A. Budimir, D. Nashev, R. Sá-Leão, J. m van Dijn, F. Laurent, H. Grundmann, A.W. Friedrich // Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. — Sweden, 2013. — Vol. 18, № 4. — P. 20380.

174. Schmidt-Chanasit, J. Extensive host sharing of central European Tula virus / J. Schmidt-Chanasit, S. Essbauer, R. Petraityte et al. // Journal of virology. — 2010. — Vol. 84, № 1. — P. 459–474.

175. Shevtsov, V. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan / V. Shevtsov, A. Kairzhanova, A. Shevtsov et al. // PLoS neglected tropical diseases. — 2021. — Vol. 15, № 5. — P. e0009419.

176. Simmonds, M.K. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains / M.K. Simmonds, G. Armah, R. Asmah et al // Journal of clinical virology. — 2008. — Vol. 42, № 4. — P. 368–373.

177. Sintchenko, V. The role of pathogen genomics in assessing disease transmission / V. Sintchenko, E.C. Holmes // BMJ (Clinical research ed.). — England, 2015. — Vol. 350. — P. h1314.

178. Tang, P. Infection control in the new age of genomic epidemiology / P. Tang, M.A. Croxen, M.R. Hasan, W.W.L. Hsiao, L.M. Hoang // American Journal of Infection Control. — 2017. — Vol. 45, № 2. — P. 170–179.

179. Taylor, M.K. Amplicon-based, next-generation sequencing approaches to characterize single nucleotide polymorphisms of orthohantavirus species / M.K. Taylor, E.P. Williams, T. Wongsurawat et al. // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. — 2020. — Vol. 10. — P. 565591.

180. Thézé, J. Genomic Epidemiology Reconstructs the Introduction and Spread of Zika Virus in Central America and Mexico / J. Thézé, T. Li, L. du Plessis et al // Cell host & microbe. — 2018. — Vol. 23, № 6. — P. 855-864.e7.

181. Tkachenko, E.A. Adler hantavirus, a new genetic variant of Tula virus identified in Major's pine voles (*Microtus majori*) sampled in southern European Russia / E.A. Tkachenko, P.T. Witkowski, L. Radosa et al // *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. — 2015. — Vol. 29. — P. 156–163.

182. Tran, A. Application of next-generation sequencing in public health epidemiology and outbreak investigation / A. Tran, M.-C. Rowlinson // *Advances in Molecular Pathology*. — 2019. — T. 2, № 1. — C. 89–97.

183. Tümmler, B. Molecular epidemiology in current times / B. Tümmler // *Environmental microbiology*. — England, 2020. — Vol. 22, № 12. — P. 4909–4918.

184. Vasylyeva, T.I. Integrating molecular epidemiology and social network analysis to study infectious diseases: Towards a socio-molecular era for public health / T.I. Vasylyeva, S.R. Friedman, D. Paraskevis, G. Magiorkinis // *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. — Netherlands, 2016. — Vol. 46. — P. 248–255.

185. Vicentini, F. Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espirito Santo State, Brazil / F. Vicentini, W. Denadai, Y.M. Gomes et al. // *PloS One*. — 2013. — Vol. 8, № 7. — P. e69348.

186. Vitale, G. *Rickettsia massiliae* Human Isolation / G. Vitale, S. Mansuelo, J.-M. Rolain, D. Raoult // *Emerging infectious diseases*. — 2006. — Vol. 12. — P. 174–175.

187. Volynkina, A. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia / A. Volynkina, Y. Lisitskaya, A. Kolosov et al // *PLOS ONE*. — 2022. — Vol. 17, № 5. — C. 1–11.

188. Wijnveld, M. Novel *Rickettsia raoultii* strain isolated and propagated from Austrian *Dermacentor reticulatus* ticks / M. Wijnveld, A.-M.

Schötta, A. Pintér et al // *Parasites & vectors*. — 2016. — Vol. 9, № 1. — P. 567.

189. Yashina, L.N. Geographic distribution and phylogeny of soricine shrew-borne Seewis virus and Altai virus in Russia / L.N. Yashina, S.A. Abramov, A.V. Zhigalin et al. // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13, № 7. — P. 1286.

190. Yin, X. Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Inner Mongolia, China, 2015-2016 / X. Yin, S. Guo, C. Ding et al // *Emerging infectious diseases*. — 2018. — Vol. 24, № 11. — P. 2105–2107.

191. Ziebell, K. Subtyping of Canadian isolates of *Salmonella enteritidis* using multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) alone and in combination with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and phage typing / K. Ziebell, L. Chui, R. King et al. // *Journal of microbiological methods*. — 2017. — Vol. 139. — P. 29–36.

Свидетельство о государственной регистрации БД

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2022620152

База данных «Генетические варианты штаммов и РНК-изолятов возбудителей острых кишечных и природно-очаговых инфекций, выделенных на территории Ставропольского края в 2016-2021 гг.»

Правообладатель: *Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU)*

Авторы: *Чекрыгина Елена Владимировна (RU), Волынкина Анна Сергеевна (RU), Лисицкая Яна Владимировна (RU), Алехина Юлия Александровна (RU), Зайцева Ольга Александровна (RU), Гнусарева Ольга Александровна (RU), Васильева Оксана Васильевна (RU), Василенко Екатерина Игоревна (RU), Тищенко Илья Викторович (RU), Ростовцева Дарья Владимировна (RU)*

Заявка № **2022620036**

Дата поступления **12 января 2022 г.**

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных **18 января 2022 г.**



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.И. Ивлиев