

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»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Ставрополь, 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Волынкина Анна Сергеевна,**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Рудаков Николай Викторович,** доктор медицинских наук, профессор, директор Федерального бюджетного учреждения науки Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «___» _____ 2024 г. в ___ на заседании диссертационного ученого совета 64.1.006.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание доктора наук на базе Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://microbe.ru/disser/> Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46)

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 64.1.006.01
доктор медицинских наук

Бугоркова Светлана Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Систематический мониторинг за циркуляцией патогенных микроорганизмов на территории РФ — одна из основных задач государственного санитарно-эпидемиологического надзора. Важным направлением совершенствования эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в настоящее время является разработка тактики молекулярно-генетического мониторинга штаммов патогенных микроорганизмов, направленного на систематическое получение информации о генетических вариантах возбудителей инфекционных болезней, циркулирующих на определенной территории.

Методы молекулярного типирования, основанные на фрагментном и полногеномном секвенировании, могут использоваться для решения различных задач, главными из которых являются: эпидемиологическое расследование отдельных случаев и вспышек инфекционных заболеваний, мониторинг за эволюцией и распространением отдельных геновариантов патогенных микроорганизмов, прогнозирование наличия эпидемически значимых фенотипических признаков штаммов, таких как вирулентность, лекарственная устойчивость (Riley L.W., Blanton R., 2018; Tummler B., 2020).

Для совершенствования системы молекулярно-генетического мониторинга за возбудителями инфекционных болезней важным 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.).

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) (Василенко Н.Ф. и др., 2021). Данный регион, в силу его высокой значимости в качестве рекреационного центра страны, требует особого внимания при реализации мер по профилактике инфекционных болезней.

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. получены данные о MLVA-25 генотипах коллекционных штаммов *Francisella tularensis*, изолированных этой на территории в период с 1948 по 2003 гг. (Тимофеев В.С. и др., 2014). Сотрудниками Омского НИИ природно-очаговых инфекций (Шпыновым С.Н., Рудаковым Н.В. и др.) установлена циркуляция в Ставропольском крае отдельных видов риккетсий (*Rickettsia slovaca* и *R. aeschlimannii*) (Шпынов С.Н. и др., 2001). Информация о выявлении некоторых геновидов боррелий, в т.ч. *Borrelia*

miyamotoi в иксодовых клещах на территории субъектов юга европейской части России, представлены в работах Платонова А.Е. (Platonov A.E. et al, 2011). Данные о геновариантах вируса ЗН представлены в работах Батурина А.А. (2021) Волынкиной А.С., Лисицкой Я.В., Котеневым Е.С. проводились работы по изучению генетического разнообразия вируса ККГЛ в субъектах Южного и Северо-Кавказского федеральных округов (ЮФО и СКФО) (Волынкина А.С. и др., 2012).

В отчетных материалах референс-центров по мониторингу за возбудителями острых кишечных инфекций и сальмонеллезом представлены сведения о геновариантах возбудителей ОКИ вирусной этиологии и *Salmonella enterica*, серовар Enteritidis (*S. Enteritidis*), выделенных в отдельных субъектах РФ в 2012–2022 гг. В публикациях сотрудников ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» (Голицыной Л.Н., Новиковой Н.А. и др.) описаны генетические варианты энтеровирусов, циркулировавшие на территории ряда субъектов ЮФО и СКФО (Голицина Л.Н. и др., 2015).

Однако комплексное молекулярно-генетическое профилирование возбудителей природно-очаговых и других инфекционных болезней на территории Ставропольского края ранее не проводилось. Отсутствуют данные об особенностях территориального распространения и соотношении геновариантов возбудителей ПОИ в Ставропольском крае. 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.

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 эпидемиологического расследования случаев заболеваний людей, 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.». Разработаны методические рекомендации «Геномное профилирование ПБА отдельных регионов (на примере Ставропольского края)» (утверждены директором ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 2021).

Результаты работы используются при чтении лекций на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России. Лабораторные исследования проведены на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора в 2016–2022 гг.

При выполнении работы были использованы микробиологические, молекулярно-генетические методы, методы биоинформатического, статистического и картографического анализа.

Личный вклад соискателя в получение результатов, изложенных в диссертации

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 нуклеиновых кислот 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 ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Гнусаревой О.А. Видовую идентификацию изолятов ДНК боррелий на основе анализа последовательности участка гена 16s РНК выполняли в соавторстве с

младшим научным сотрудником лаборатории диагностики бактериальных инфекций 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 (российской подгруппы 2 генотипа), штаммов *R. raoultii*, *R. aeschlimanii*, *R. slovacica*, *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 определяется репрезентативностью выборки объектов исследования (охарактеризовано 350 штаммов и изолятов ДНК/РНК возбудителей ПОИ, а также 154 штамма и изолята РНК возбудителей ОКИ), длительным сроком наблюдений (сбор материала осуществлялся в период с 2016 по 2022 гг.), использованием методов, адекватных целям и задачам исследования, в т.ч. методов молекулярно-генетического типирования, полногеномного секвенирования, биоинформатической и статистической обработки полученных результатов. Статистическую оценку достоверности топологии филогенетических деревьев осуществляли в программе Mega 5 (метод Bootstrap-анализа).

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

Материалы работы представлены на II Всероссийской научно-практической конференции «Инфекционные болезни, общие для человека и животных» (Ставрополь, 2017), XI съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2017); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика-2017» (Москва, 2017); 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), 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).

Публикации

Основное содержание работы отражено 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 машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 191 источник, в т.ч. 99 отечественных и 92 зарубежных авторов. Работа содержит 14 таблиц, иллюстрирована 22 рисунками, включает 1 приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалом для идентификации генетических вариантов возбудителей ПОИ, циркулирующих на территории Ставропольского края, являлись культуры микроорганизмов (*F. tularensis*, вирус ККГЛ) и образцы полевого и клинического материала, содержащие геномную ДНК/РНК возбудителей, в т.ч. боррелий, риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ), *S. burnetii*, вирусов ККГЛ, ЗН, ортохантавирусов (Таблица 1).

Таблица 1 — Количество штаммов микроорганизмов, образцов полевого и клинического материала, положительных на наличие ДНК/РНК 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.	полевой материал	49	2017–2021
<i>B. burgdorferii</i> s.l.	полевой материал	40	2019–2021
<i>S. burnetii</i>	полевой материал	4	2016
Вирус ККГЛ	полевой материал / клинический материал /штаммы	40/102/13	2016–2022
Ортохантавирусы	полевой материал	30	2016–2022
Вирус ЗН	полевой материал	3	2018
ИТОГО:		350	2012–2022

Штаммы *F. tularensis* и вируса ККГЛ получены из коллекции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Пробы полевого материала, содержащие целевую ДНК/РНК возбудителей ПОИ в достаточном количестве для проведения молекулярно-генетического типирования, получены при проведении лабораторного исследования методом ПЦР образцов, собранных на территории Ставропольского края в рамках планового эпизоотологического мониторинга за циркуляцией возбудителей ПОИ в 2016–2022 гг.

Пробы клинического материала (плазма крови) от больных в регионе в 2016–2022 гг., содержащие РНК вируса ККГЛ и ДНК *S. burnetii*, получены из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае».

Материалом для идентификации генетических вариантов возбудителей острых кишечных инфекций 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 2).

Таблица 2 — Количество штаммов *Salmonella Enteritidis* и образцов клинического материала, положительных на наличие РНК возбудителей острых кишечных инфекций, использованных для проведения генетического типирования патогенных микроорганизмов

Возбудитель	Материал для исследования		
	Вид материала	Кол-во образцов	Год выделения /сбора 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 бактериологических лабораторий лечебно-профилактических учреждений региона.

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 10⁹ 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 10⁹ м.к./мл. Обеззараживание микробных взвесей *F. tularensis* и *S. Enteritidis* осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

Молекулярно-генетические методы

Выделение ДНК из микробных взвесей культур *F. tularensis* и *S. Enteritidis* для проведения MLVA-типирования проводили с использованием набора реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Подготовку препаратов ДНК культур *F. tularensis* для выполнения полногеномного высокопроизводительного секвенирования осуществляли с применением набора реагентов D-cells для выделения ДНК из клеток животных и бактерий (Биолабмикс, Россия).

Для экстракции ДНК/РНК возбудителей ПОИ и ОКИ из образцов полевого и клинического материала, а также вируссодержащей культуральной жидкости

применяли набор реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Получение вирусной кДНК осуществляли с помощью набора реагентов «РЕВЕРТА-L 100» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Индикация ДНК/РНК возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекций в биологическом материале

Наличие специфической ДНК/РНК возбудителей ПОИ в образцах полевого и клинического материала подтверждали с использованием диагностических тест-систем: «АмплиСенс *Borrelia burgdorferii sensu lato*-FL», «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL», «АмплиСенс ССНФV-FL», «АмплиСенс WNF-FL» для выявления 16S РНК *B.burgdorferii* s.l., ДНК *C. burnetii*, РНК вирусов ККГЛ и ЗН. Присутствие ДНК риккетсий группы КПЛ в образцах полевого материала подтверждали методом ПЦР в соответствии с протоколом (Mediannikov et al., 2014). РНК ортохантавирусов в образцах выявляли в соответствии протоколом Klempa et al., (2009). Детекцию нуклеиновых кислот возбудителей ОКИ в клиническом материале осуществляли методом ПЦР с использованием тест-систем «АмплиСенс ОКИ-скрин-FL» «АмплиСенс Enterovirus-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Молекулярно-генетическое типирование возбудителей природно-очаговых инфекций

Генетическое типирование культур *F. tularensis* проводили методами MLVA и CanSNP типирования. MLVA анализ выполняли по схеме, предложенной Johansson, (2004). Точный размер VNTR-локусов определяли методом капиллярного секвенирования. CanSNP генотип штаммов *F. tularensis* проводили на основании поиска канонических SNP в полногеномной последовательности.

Субвидовое типирование изолятов *C. burnetii* осуществляли методом MLVA-10 по схеме, опубликованной в статье Nathalie Arricau-Bouvery, (2006).

Видовую идентификацию изолятов *Rickettsia* sp. осуществляли на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *gltA* (размером 552 п.н.) и *OmpB* (размером 720 п.н.).

Видовую принадлежность изолятов боррелий определяли на основании анализа последовательности участка гена *16s rRNA* (724 п.н.)

Идентификацию генетических вариантов вируса ККГЛ осуществляли методами секвенирования фрагментов генома вируса (участков S, M и L сегментов) и полногеномного секвенирования.

Генетическое типирование ортохантавирусов выполняли на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента L сегмента генома размером 347 н.о. (Klempa, 2009).

Субвидовое типирование РНК-изолятов вируса Западного Нила осуществляли на основании анализа нуклеотидной последовательности фрагмента генома, включающего участки 5'нетранслируемой области и гена С (217 н.о.) (Федорова, 2008).

Молекулярно-генетическое типирование возбудителей острых кишечных инфекций

Субвидовое типирование культур *S. Enteritidis* осуществляли методом MLVA-5 в соответствии с протоколом, разработанным Hopkins, (2011). 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 секвенирования фрагментов *VP7*, размером 884 н.о. и *VP4*, размером 664 н.о. Субвидовую характеристику изолятов РНК норовирусов 2 генотипа проводили методом секвенирования фрагментов генов нуклеокапсида вируса (ген *C*) и полимеразы (*RdRp*). Генотипирование РНК-изолятов энтеровирусов осуществляли путем анализа последовательности фрагмента гена *VP1*.

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 проводили в программе PHYLOVIZ 2.0. Филогенетические деревья на основе секвенированных нуклеотидных последовательностей генома микроорганизмов (вирусов ККГЛ, ЗН, ортохантавирусов, боррелий, риккетсий) строили в программе MEGA 11. Статистическую достоверность топологии филогенетических деревьев проверяли с помощью Bootstrap анализа, вычисления проводили для 1000 повторов.

Для идентификации геновариантов микроорганизмов использовали 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.

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.

Генетическое типирование возбудителей природно-очаговых инфекций

Генетическое типирование штаммов *Francisella tularensis*

С целью определения спектра генетических вариантов *F. tularensis*, циркулирующих на территории 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.

Выполнено MLVA-25 типирование 22 культур *F. tularensis holarctica* биовар II, егу, выделенных в 2016-2022 гг. от млекопитающих отловленных на территории региона. Исследуемые штаммы относились к 10 MLVA-генотипам, отличавшимся по числу тандемных повторов в локусах FT-M3 (10, 11, 12, 13, 16, 17, 20 повторов), FT-M6 (4, 5 повторов). В соответствии с классификацией генетических линий возбудителя туляремии, предложенной Johansson (2004), исследуемые штаммы *F. tularensis* принадлежали к MLVA-кластерам В.І (15 культур) и В.ІІІ (7 культур).

В результате CanSNP типирования на основе анализа полногеномных последовательностей культур возбудителя туляремии на территории Ставропольского

края выявлены штаммы, относящиеся к 6 CanSNP генотипам: В.21 (1 культура), В.26 (1 культура), В.79 (10 культур), В.170 (3 культуры), В.181 (1 культура), В.203 (6 культур).

Проведено ретроспективное MLVA-25 и CanSNP типирование 8 коллекционных штаммов возбудителя туляремии. Штаммы *F. tularensis*, циркулировавшие в регионе в 2012-2015 гг., относились к 7 MLVA-типам, относящимся к MLVA-кластерам: В.I (4 культуры) и В.III (4 культуры) и 4 CanSNP генотипам: В.170 (1 культура), В.203 (2 культуры), В.77 (2 культуры).

Территориальное распространение штаммов *F. tularensis*, относящихся к MLVA-кластерам В.I и В.III, представлено на рисунке 1. Распространение культур возбудителя туляремии, принадлежащих к различным CanSNP генотипам, отображено на рисунке 2.

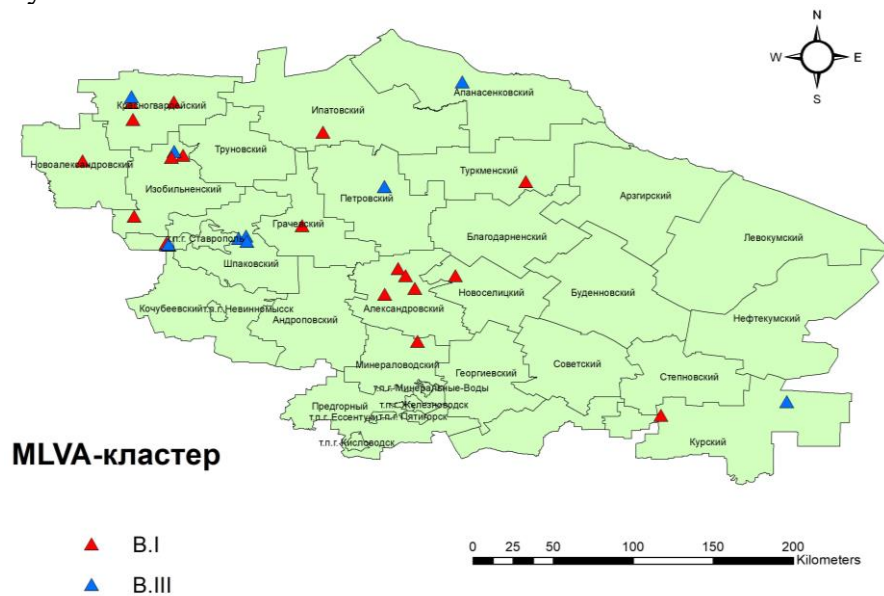


Рисунок 1 — Территориальное распространение генетических вариантов *Francisella tularensis* в Ставропольском крае (2012-2022 гг.)

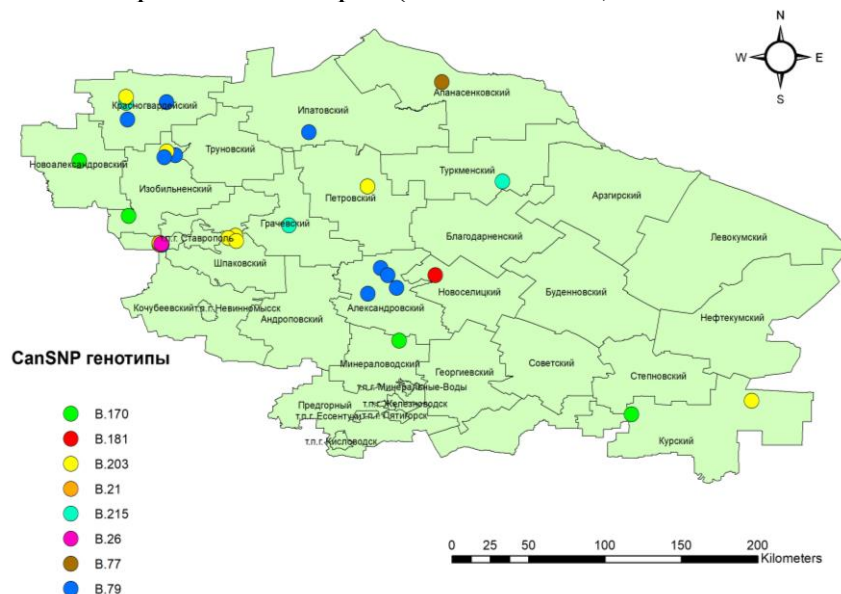


Рисунок 2 — Территориальное распространение CanSNP типов *Francisella tularensis* в Ставропольском крае (2012-2022 гг.)

Штаммы возбудителя туляремии разных MLVA-кластеров и CanSNP типов распространены на территории региона мозаично, образуя разрозненные микропопуляции. Наиболее широко распространены штаммы CanSNP типов В.79 и В.203.

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. на территории региона 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.

Молекулярное типирование РНК-изолятов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки

Выполнено секвенирование участков S, M и L сегментов генома РНК-изолятов вируса ККГЛ, выявленных в 102 пробах сывороток крови от больных КГЛ в 2016-2021 гг. и 39 пробах полевого материала: 38 суспензиях клещей (*H.marginatum*, *R.turanicus*) и 1 пробе от южного ежа (*Erinaceus roumanicus*), собранных на территории региона в 2016-2021 гг.

Установлена принадлежность исследуемых РНК-изолятов вируса ККГЛ к двум генетическим линиям: Европа-1 и Европа-3. Варианты вируса ККГЛ генотипа Европа-1 выявлены в 92,2 % исследуемых образцов, в т.ч.: 100 пробах сыворотки крови от больных КГЛ (98 % от всех клинических образцов), 1 пробе печени ежа южного и 29 пулах клещей *H. marginatum* и *R. turanicus*. Варианты вируса ККГЛ генотипа Европа-3 обнаружены в 2 пробах сыворотки крови от больных КГЛ (1,9 %) (с. Безопасное, Труновский район, 2016 г. и с. Софиевка, Ипатовский район, 2019 г.), а также 9 пулах клещей *H. marginatum*, снятых с КРС (с. Журавское, Новоселицкий район, 2021 г.).

Изоляты вируса ККГЛ, изученные в рамках данной работы, относились к 5 генетическим вариантам линии Европа-1: VaVaVa (72,3 % образцов), VbVbVb (3,5 %), VaVbVa (14,9 %), VbVaVb (0,7 %) и VbVbVa (0,7 %).

Доминирующим генетическим вариантом вируса ККГЛ являлся вариант VaVaVa линии Европа-1 (73,2-86,7 % в 2016-2019 гг., 100 % - в 2020 г., 51,6 % - в 2021 г. среди всех РНК-изолятов). Среди реассортантных геновариантов преобладал вариант VaVbVa генетической линии Европа-1 (24,4 % в 2016 г., 12,1-13,3 % - в 2017-2019 гг., 9,7 % - в 2021 г. среди всех РНК-изолятов). Соотношение генетических вариантов вируса ККГЛ, циркулировавших на территории Ставропольского края, существенно не изменялось в 2016-2019 гг., в 2020 г. были выявлены только РНК-изоляты варианта VaVaVa генетической линии Европа-1. В 2021 г. наблюдалось увеличение доли РНК-изолятов генетической линии Европа-3, выявленных из образцов полевого материала.

Анализ территориального распространения генетических вариантов вируса ККГЛ показал, что вариант VaVaVa генетической линии Европа-1 циркулирует на большей части территории региона, остальные геноварианты вируса ККГЛ имеют локальное распространение (рисунок 3).

Выполнено секвенирование полноразмерной геномной последовательности 13 культур вируса ККГЛ, выделенных из клинического материала от больных КГЛ в

Ставропольском крае в 2016-2019 гг. Все 13 культур принадлежали к геноварианту VaVaVa генотипа Европа-1. Секвенированные полноразмерные геномные последовательности вируса ККГЛ могут использоваться для углубленного молекулярно-генетического анализа при эпидемиологической расшифровке спорадических случаев и вспышек КГЛ в регионах РФ.

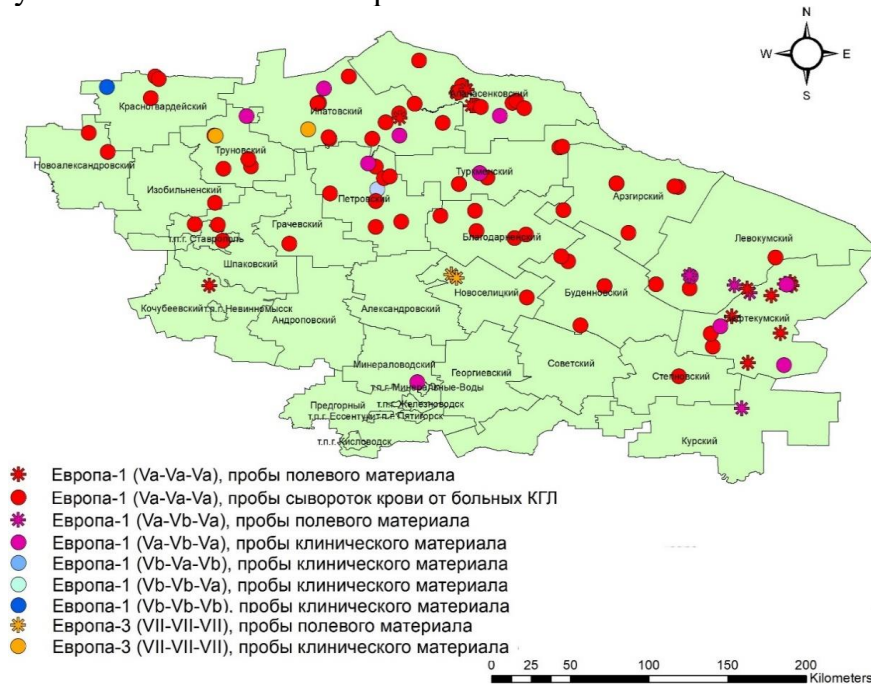


Рисунок 3 — Распространение геновариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки на территории Ставропольского края (2016-2021 гг.)

Генетическое типирование изолятов ДНК *Coxiella burnetii*

Проведено MLVA-10 типирование 4 изолятов *C. burnetii* из образцов плазмы крови от больных лихорадкой Ку в Ставропольском крае в 2016-2022 г. (рис.4). Все исследуемые изоляты обладали идентичным VNTR-профилем 4-6-6-4-7-6-3-12-3-11. Выявленный вариант *C. burnetii* имеет наибольшее генетическое родство со штаммом R1140, изолированным в России, отличаясь от него по 3 локусам: ms30, ms31 и ms 36.

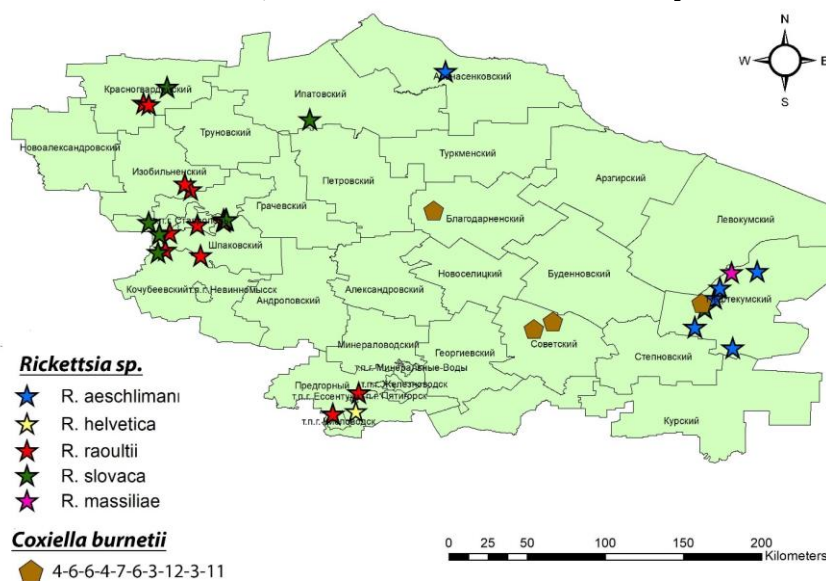


Рисунок 4 — Распространение геновариантов *Coxiella burnetii* и геновидов риккетсий на территории Ставропольского края (2016-2021 гг.)

Идентификация геновидов риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок

На основании анализа нуклеотидной последовательности 2 генов (*gltA*, *ompB*) проведена видовая идентификация 49 изолятов ДНК *Rickettsia* sp., выявленных в пулах иксодовых клещей (*Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus rossicus*, *R. turanicus*), собранных в 2017-2021 гг. (рисунок 4). В результате сравнения секвенированных последовательностей генов *gltA* и *OmpB* с данными из базы GenBank с использованием алгоритма BLAST определена принадлежность изолятов риккетсий к 5 видам: *R. raoultii* (24 образца), *R. aeschlimannii* (12 образцов), *R. slovaca* (10), *R. massiliae* (2), *R. helvetica* (1).

Идентификация геновидов боррелий

Проведено секвенирование участка гена *16s* РНК для 40 изолятов ДНК боррелий, выявленных в клещах *I. ricinus*, *I. redikorzevi*, *D. marginatus*, собранных в 2017-2021 гг. (рисунок 5). Установлена принадлежность исследуемых изолятов к 6 видам: *B. afzelii* (23 изолята), *B. garinii* (4), *B. miyamotoi* (7), *B. bavariensis* (1), *B. lusitaniae* (4), *B. valaisiana* (1).

Доминирующим видом боррелий в Ставропольском крае являлся *B. afzelii* (52 % от всех изолятов в 2017 г., 100 % — в 2020 г., 50 % — в 2021 г.). *B. afzelii*, *B. garinii* и *B. lusitaniae* распространены на всей территории субъекта. *B. miyamotoi* в период с 2017 по 2021 гг. встречалась только в регионе КМВ (Предгорном районе, г. Ессентуки, г. Железноводске, г. Кисловодске), *B. bavariensis* — в г. Ставрополе, *B. valaisiana* — в Изобильненском районе.

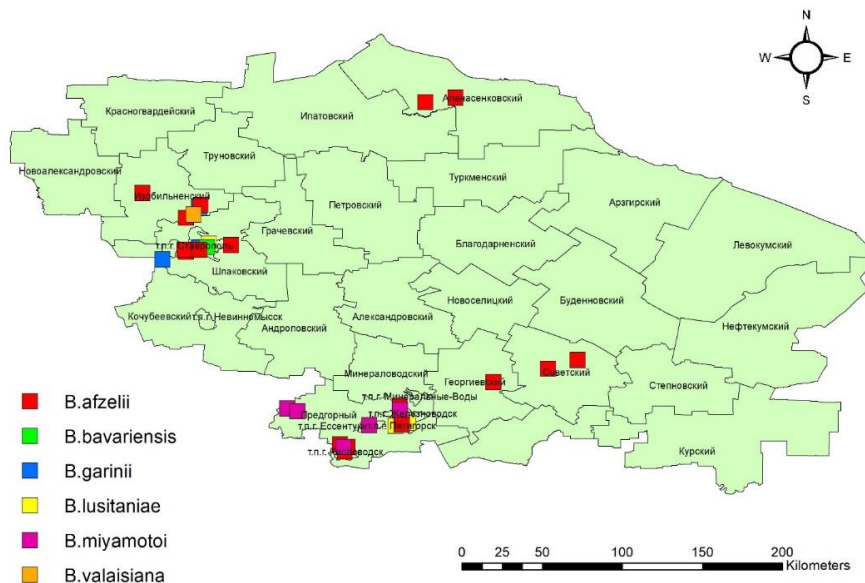


Рисунок 5 — Территориальное распространение геновидов боррелий в Ставропольском крае (2016-2021 гг.)

Генетическая идентификация ортохантавирусов

Выполнено секвенирование фрагмента L сегмента генома РНК-изолятов ортохантавирусов, выявленных в 30 пробах суспензий легкого грызунов и насекомых, отловленных в 2016-2021 гг.

В результате филогенетического анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей в 2 образцах суспензий легкого насекомых (*T. caucasica* –

2016, 2019 гг.) идентифицирован ортохантавирус, генетически близкий к Camp Ripley Virus – RLPV. В 4 образцах суспензий легкого белозубки обыкновенной (*T. caucasica* – 2022 гг.) идентифицирован ортохантавирус Kenkeme. В регионе впервые выявлены РНК-изоляты ортохантавирусов, генетически близких к вирусам Camp Ripley и Kenkeme. Ортохантавирус Camp Ripley был впервые выявлен в пробах суспензий легкого обыкновенной короткохвостой бурозубки в США, штат Миннесота в 1998 г (Bennett SN, 2014). 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 насекомых этого же вида (Яшина, 2023). Патогенный потенциал вирусов RPLV и KKMV не установлен.

В 28 образцах суспензий легкого грызунов (*M. arvalis*, *M. socialis*, *A. agrarius*, *A. uralensis*, *A. amphibious*, *S. volnuchini*) выявлен ортохантавирус Тула.

Исследуемые РНК-изоляты ортохантавируса Тула принадлежали к 6 генетическим подгруппам (a, b, c, d, e f).

Анализ распространения ортохантавирусов показал, что РНК-изоляты ортохантавируса Тула, относящиеся к подгруппам a-f, формируют локальные популяции на территории субъекта, в которых варианты вируса циркулируют в течение нескольких лет (рисунок 6). РНК-изоляты Camp Ripley Virus выявлены в г. Ставрополе (2016, 2019 гг.), вируса Kenkeme — в Шпаковском районе (2022 г.).

Ортохантавирус Тула обладает низким патогенным потенциалом для человека, описаны 4 случая заболевания человека геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, вызванной вирусом Тула, в Германии, Чехии и Франции, в т.ч. случай тяжелого течения болезни у пациента с иммунодефицитом.

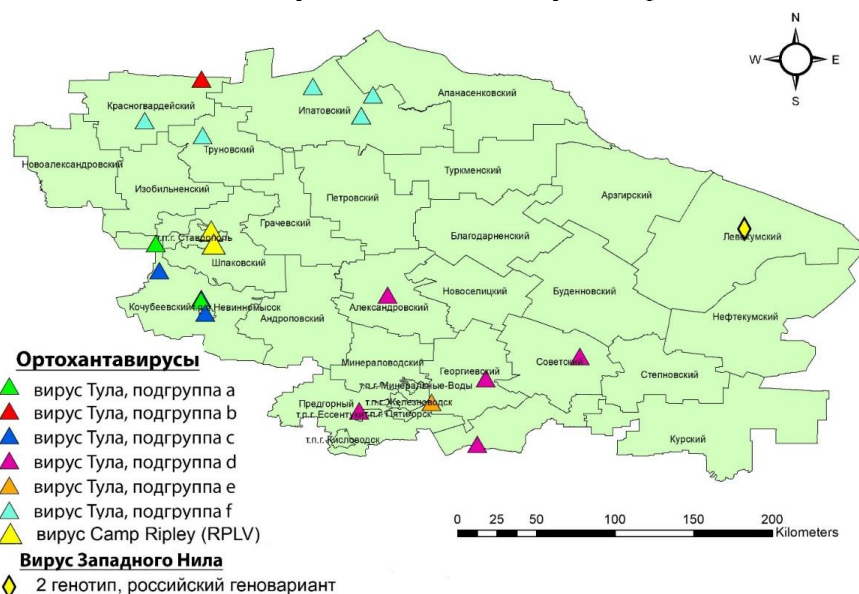


Рисунок 6 — Распространение геновариантов вируса Западного Нила и ортохантавирусов на территории Ставропольского края (2016-2021 гг.)

Генетическая идентификация вируса Западного Нила

Выполнено секвенирование участка генома 5'НТР-ген С 3 РНК-изолятов ВЗН, выявленных в пробах мозга сороки (Левокумский район, с Максимокумское, 2018 г.). Сравнение секвенированных последовательностей РНК-изолятов ВЗН показало их абсолютную идентичность с последовательностями изолятов ВЗН VLG-580-2010-Н, VOLGOGRAD-01/918-2011, VORONEZH-01/845-2011, циркулировавших в Волгоградской и Воронежской областях в 2010-2011 гг. В результате

филогенетического анализа установлена принадлежность исследуемых РНК-изолятов к российскому геноварианту генотипа 2.

Таким образом, в результате работы проведен комплексный геномный анализ популяции возбудителей ПОИ на территории Ставропольского края, идентифицированы генетические варианты *F. tularensis*, *C. burnetii*, вирусов ККГЛ, ЗН, ортохантавирусов, геновиды боррелий и риккетсий, характерные для региона, определена территориальная приуроченность генетических вариантов возбудителей ПОИ, в т.ч. в рекреационных зонах региона.

Генетическое типирование возбудителей острых кишечных инфекций Молекулярно-генетическое типирование штаммов *Salmonella enterica* серовар Enteritidis

Проведено MLVA типирование 122 штаммов *S. Enteritidis*, выделенных от больных ОКИ в Ставропольском крае с 2016 по 2019 гг. Исследованные штаммы отличались высокой генетической гетерогенностью и относились к 25 MLVA-генотипам (рисунок 7).

На территории г. Ставрополя выявлены штаммы *S. Enteritidis*, принадлежащие к 24 MLVA типам, 74,4 % штаммов, выделенных в г. Ставрополе за весь период наблюдений, относились к семи наиболее распространенным MLVA-генотипам. Также выявлены минорные геноварианты, доля которых составляла 1,1-2,2 % от общего количества исследованных изолятов (в совокупности 25,6 %).

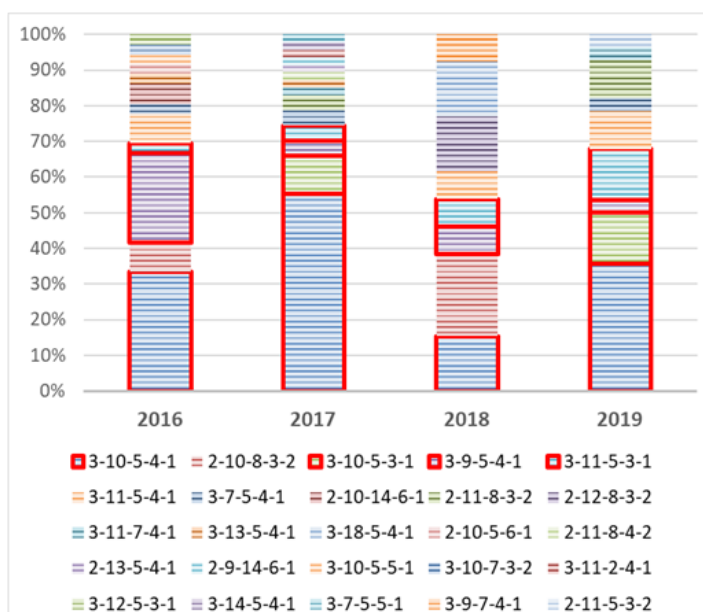


Рисунок 7 — Соотношение геновариантов *Salmonella enterica*, биовар Enteritidis в Ставропольском крае (2016-2019 гг.)

Доминирующим геновариантом в г. Ставрополе являлся 3-10-5-4-1, к которому относилось 40 штаммов сальмонелл (44,4 %), выделенных в 2016-2019 гг. В отдельные годы возрастал удельный вес других геновариантов: 2-10-8-3-2, 3-10-5-3-1, 3-11-5-4-1, 3-10-5-5-1, 2-10-14-6-1, 2-12-8-3-2 и 3-18-5-4-1.

В регионе КМВ в 2016-2019 гг. выявлены штаммы *S. Enteritidis* принадлежащие к 7 MLVA типам, большинство культур относилось к MLVA-генотипу 3-10-5-4-1 (31,3 %).

Встречающиеся 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) широко распространены в мире, обладают значительным эпидемическим потенциалом.

Молекулярное типирование РНК-изолятов рота-, норо-, энтеровирусов
Выполнено генетическое типирование 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.

РНК изоляты ротавирусов группы А, циркулировавшие на территории изучаемого региона 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. Определено 5 генетических вариантов 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%). Исследуемые изоляты энтеровирусов принадлежали к виду энтеровирус В, генотипам: Echovirus 5 (2 образца) и Echovirus 3 (1 образец).

На территории Ставропольского края обнаружены генотипы рота-, норо- и энтеровирусов, широко распространенные в РФ и обладающие значительным эпидемическим потенциалом.

Таким образом, в результате работы выполнен комплексный геномный анализ штаммов и РНК-изолятов возбудителей ОКИ бактериальной и вирусной природы, встречающихся на территории Ставропольского края, получены новые сведения о генетических вариантах возбудителей, характерных в данный период для региона.

Создание базы данных генетических профилей возбудителей ОКИ и ПОИ, выявленных в Ставропольском крае

Для накопления и хранения результатов молекулярно-генетического типирования штаммов и изолятов НК возбудителей острых кишечных и природно-очаговых инфекций 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.

Разработанная база данных содержит географические координаты точек сбора образцов полевого материала, мест инфицирования больных возбудителями ПОИ и может использоваться как рабочий компонент программ геоинформационного анализа (например ArcGis, QGis и др.) с целью визуализации информации на электронной карте 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 возбудителей.

Применение методов молекулярно-генетического типирования для эпидемиологической расшифровки вспышек и случаев заболевания природно-очаговых инфекций в Ставропольском крае

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

С целью установления источника инфекции и вероятных путей передачи возбудителя проведено молекулярно-генетическое типирование и полногеномное секвенирование изолированных в период эпидемической вспышки (февраль-апрель 2017 г.) штаммов возбудителя туляремии.

Проведено MLVA-25 и CanSNP типирование штаммов *F. tularensis*, выделенных 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.

Из образцов воды, отобранных из разводящей сети в с. Донская Балка (источник водоснабжения № 1), выделены штаммы возбудителя туляремии, относящиеся к генетической подгруппе В.І 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.ІІІ, и CanSNP-типу В.203. В образцах, отобранных 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.

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

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

Проведено MLVA-25 и CanSNP типирование штаммов *F. tularensis*, выделенных в октябре-декабре 2022 г. из проб воды родникового каптажа в с. Сухая Буйвола Петровского района, от грызунов, отловленных на территории родниковых каптажей и эктопаразитов, снятых с грызунов.

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

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 (MLVA-кластер В.І.0 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.І по данным MLVA-25 типирования (10 культур) и CanSNP типа В.203, входящие в MLVA-кластер В.ІІІ (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.1).

Установлено, что осложнение эпидемиологической обстановки вызвано эпизоотией среди мелких мышевидных грызунов и контаминацией воды родниковых каптажей возбудителем туляремии 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.1), которые циркулировали в Петровском районе в 2017 г.

Летальный случай Крымской геморрагической лихорадки в Андроповском районе Ставропольского края (2022 г)

С целью анализа летального случая КГЛ в Ставропольском крае выполнена генетическая идентификация РНК-изолята вируса ККГЛ 2-STV/HU-2022, выявленного в сыворотке крови от умершего от КГЛ в с. Султан Андроповского р-на 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 региона. 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, что 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, 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.

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 ге-

нетического 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 (ККМV), ранее выявленных в пробах суспензий легкого насекомых 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. Выявлены 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. выявлены 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 В.170 и В.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 высокопроизводительного секвенирования геномов возбудителей ПОИ и других инфекционных заболеваний и биоинформатической обработки результатов. Необходима разработка *online* 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные статьи:

1. Генетическое профилирование возбудителей природно-очаговых инфекций, циркулирующих на территории Ставропольского края / Е.В. Чекрыгина, А.С.

- Волынкина, Е.С. Котенев, Я.В. Лисицкая, О.А. Гнусарева, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 4. – С. 81–88.
2. Молекулярно-генетическое типирование возбудителей острых кишечных инфекций бактериальной и вирусной этиологии, выявленных на территории Ставропольского края в 2016 году / Е.В. Чекрыгина, А.С. Волынкина, Е.С. Котенев, О.В. Васильева, А.Н. Куличенко // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – № 4. – С. 587–590.
 3. Генетическое профилирование штаммов *Salmonella* Enteritidis, выделенных на территории Ставропольского края в 2016–2019 гг. / Е.В. Чекрыгина, О.В. Васильева, А.С. Волынкина, Ю.А. Алехина, А.Н. Куличенко // Здоровье населения и среда обитания. – 2022. – № 6. – С. 66–71.
 4. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг возбудителей природно-очаговых инфекций в Ставропольском крае в 2016–2021 годах / Е.В. Чекрыгина, А.С. Волынкина, О.А. Зайцева, Я.В. Лисицкая, И.В. Тищенко, О.А. Гнусарева, Д.В. Ростовцева, Е.И. Василенко, Н.О. Ткаченко, О.В. Васильева, К.А. Пурмак, Н.И. Соломащенко, А.Н. Куличенко // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. — 2023. — Т. 22, №4. — С. 24-34.

Тезисы научных конференций:

1. Генетическое типирование возбудителей острых кишечных инфекций, циркулировавших в Ставропольском крае в 2016 г. / Е.В. Чекрыгина, А.С. Волынкина, Е.С. Котенев, О.В. Васильева, Я.В. Лисицкая, В.Н. Савельев // Молекулярная диагностика 2017: сб. тр. IX Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием : В 2-х т. / под ред. В.И. Покровского. Т. 1. – М.; Тамбов : Юлис, 2017. – С. 283–284.

3. Генетическое типирование возбудителей природно-очаговых инфекций, выявленных в Ставропольском крае в 2016–2017 гг. / Е.В. Чекрыгина, А.С. Волынкина, Е.С. Котенев, Я.В. Лисицкая, О.А. Гнусарева // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных [Электронный ресурс]: материалы II Всероссийской научно-практической конференции / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2017. – С. 288–290.

3. Генетическое профилирование штаммов возбудителей острых кишечных и природно-очаговых инфекций, актуальных для Ставропольского края : [по матер. XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения», Москва, 16–17 ноября, 2017 г.] / А.С. Волынкина, Е.В. Чекрыгина, О.А. Гнусарева, А.Н. Куличенко // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № S. – С. 990.

4. Циркуляция вируса Западного Нила на территории Ставропольского края в 2018 г. / А.С. Волынкина, Е.В. Чекрыгина, А.В. Колосов, Е.С. Котенев, Л.И. Заревина, Л.И. Шапошникова, А.Н. Куличенко // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: матер. III Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием (24-25 апр. 2019 г.) / [под ред. А.Н. Куличенко]. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2019. – С. 147-148.

5. Генетическая характеристика хантавирусов, циркулировавших на территории Ставропольского края в 2018 г. / Е.В. Чекрыгина, А.С. Волынкина, А.В. Колосов, Е.С. Котенев, Л.И. Заревина, Л.И. Шапошникова, А.Н. Куличенко // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: матер. III Всерос. науч.-практ. конф. с

международным участием (24-25 апр. 2019 г.) / [под ред. А.Н. Куличенко]. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2019. – С. 204.

6. Генетический мониторинг возбудителей вирусных природно-очаговых инфекций, циркулировавших на территории Ставропольского края в 2018 г. / Е.В. Чекрыгина, А.С. Волынкина, А.В. Колосов, Е.С. Котенев // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: материалы XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Уфа, 02-04 октября, 2019 г.) – Уфа: Башкирская энциклопедия, 2019. – С. 167-170.

7. Генетическое профилирование бактерий рода *Salmonella*, выделенных на территории Ставропольского края / Е.В. Чекрыгина, О.В. Васильева, Ю.А. Алехина, О.А. Зайцева, А.С. Волынкина, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе: материалы региональной научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию со дня основания ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2022. – С. 189-190.

8. Молекулярно-генетическое типирование возбудителей природно-очаговых инфекций, циркулировавших на территории региона Кавказских Минеральных вод в 2020-2021 гг. / Е.В. Чекрыгина, Д.В. Ростовцева, Я.В. Лисицкая, Ю.А. Алехина, О.А. Зайцева, И.В. Тищенко, А.С. Волынкина, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе: материалы региональной научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию со дня основания ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2022. – С. 191-192.

9. MLVA типирование *Salmonella enteritidis*, выделенных на территории Ставропольского края в 2016–2019 гг. [по материалам IV Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных»] / Е.В. Чекрыгина, А.С. Волынкина, О.В. Васильева, Ю.А. Алехина, О.А. Зайцева, А.Н. Куличенко // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы : сборник трудов XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, Москва, 24–26 мая 2021 года. – Москва: Медицинское маркетинговое агентство, 2021. – С. 223.

Благодарности

Автор выражает благодарность специалистам ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, предоставившим образцы полевого и клинического материала, содержащего ДНК/РНК возбудителей ПОИ и ОКИ для данного исследования: к.б.н. Лисицкой Я.В., Гнусаревой О.А., Зайцевой О.А., к.м.н. Васильевой.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю к.б.н. Волынкиной А.С. за осуществление общего руководства, помощь в планировании, проведении и интерпретации результатов исследования.

Особую благодарность автор выражает д.м.н., профессору, академику РАН Куличенко А.Н. за помощь в выборе темы, направления исследований, обсуждение результатов и всестороннюю поддержку.