

*На правах рукописи*

**НИКИФОРОВ КОНСТАНТИН АЛЕКСЕЕВИЧ**

**НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА  
КОМПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ  
*YERSINIA PESTIS***

**1.5.11. – Микробиология**

**Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
доктора медицинских наук**

**Саратов – 2023**

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора).

**Научный консультант:**

**Ерошенко Галина Александровна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник

**Официальные оппоненты:**

**Мокроусов Игорь Владиславович**, доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики

**Бывалов Андрей Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук", заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов

**Миронова Лилия Валерьевна**, доктор медицинских наук, Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека, заместитель директора по научной и лабораторно-диагностической работе

**Ведущая организация:**

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета 64.1.006.01 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук при Федеральном казённом учреждении науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46. Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru> ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_.

Учёный секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук

С.А. Бугоркова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В современных социально-экономических и эпидемиологических условиях наблюдается тенденция к росту случаев появления новых опасных инфекционных нозологий, а также вновь возвращающихся заболеваний. Интенсивные миграционные и туристические потоки населения между государствами являются причиной перманентной угрозы глобального распространения инфекционных болезней, что диктует необходимость разработки новой стратегии противодействия чрезвычайным эпидемическим ситуациям, в основе которой должны лежать современные достижения по контролю над инфекционными болезнями и новейшие методы индикации, дифференциации и профилактики [Онищенко и др., 2006; Кутырев и др., 2006, 2022; Щуковская и др., 2009, 2011; WHO guidelines for plague management, 2021]. К основным направлениям совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекций относятся разработка и использование методов, имеющих в своей основе современные успехи в геномном, протеомном, биоинформационном анализе; повышение специфичности и чувствительности диагностических методик; стандартизация лабораторных исследований; подготовка квалифицированных кадров в областях диагностики, эпидемиологии и профилактики особо опасных инфекций [Онищенко и др., 2009].

К особо опасным инфекциям, способным вызывать чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения и не теряющим свою актуальность и в настоящее время, относится чума, возбудителем которой является бактерия *Yersinia pestis* [Онищенко и др., 2004; Кутырев и др., 2006, 2022]. Вирулентность *Y. pestis* – полидетерминантный признак, определяемый комплексом факторов патогенности, которые кодируются генами хромосомной и плазмидной локализации [Попов и др., 1980; Проценко и др., 1983; Kutyrev et al., 1992; Gao et al., 2020; Dewitte et al., 2020]. За всю историю человечества достоверно описано три пандемии чумы, унёсшие сотни миллионов жизней. Чума продолжает представлять угрозу мировому сообществу и сейчас. В настоящее время остаётся реальной опасностью угроза применения возбудителя чумы в качестве агента биотерроризма [Воробьёв и др., 2002; Yang, 2017; Rotem et al., 2021].

В ряде природных очагов Российской Федерации регистрируется эпизоотическая активность, которая может привести к заболеванию чумой. На территории Российской Федерации и сопредельных государств циркулируют штаммы *Y. pestis* разных подвидов, биоваров и филогенетических ветвей [Попов и др., 2022; Anisimov et al., 2004; Kutyrev et al., 2018]. Постоянно регистрируется эпизоотическая активность природных очагов чумы в Республике Казахстан, Республике Киргизстан. Тесные торгово-экономические и социокультурные связи с другими странами СНГ, со странами ближнего и дальнего зарубежья создают опасность заносов штаммов *Y. pestis* на территорию России. Кроме того, в Российской Федерации существуют природные очаги сочетанного типа, в которых циркулируют штаммы подвидов с различной вирулентностью и эпидемической значимостью. Распространение в таких очагах раз-

личных популяций чумного микроба осложняет дифференциацию и типирование *Y. pestis* в рамках проводимого эпидемиологического мониторинга.

**Степень разработанности проблемы.** Диагноз чумы ставится на основании эпидемиологических данных, характерной клинической картины и результатов лабораторного исследования. В РФ для лабораторной диагностики чумы применяются бактериоскопические, бактериологические, иммунологические, молекулярно-генетические методы [Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней», 2013]. В качестве медицинских изделий для индикации и идентификации возбудителя чумы в РФ зарегистрированы наборы реагентов: «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ», «Ген *Y. pestis* идентификация-РГФ» (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов) [Куклев, 2007], «АмплиСенс *Y. pestis*-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва), «ОМ-Скрин-Чума-РВ» («Синтол», Москва). Кроме того, разработаны экспериментальные комплекты праймеров и зондов для внутривидовой дифференциации подвидов, биоваров и филогенетических ветвей вида *Y. pestis*: основной подвид, средневековый биовар основного подвида (ветви 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3), восточный биовар основного подвида, кавказский, улегейский подвиды, алтайский, гиссарский и *microtus* биовары центральноазиатского подвида [Одинокоев и др., 2011, 2013; Никифоров и др., 2017; Носов и др., 2019; Motin et al., 2002]. Однако нерешёнными остаются вопросы по дифференциации многих других филогеографических популяций *Y. pestis*, таких как 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT античного биовара основного подвида; 2.MED4 средневекового биовара; 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3 восточного биовара; 1.IN1, 1.IN2, 1.IN3 биовара *intermedium*; а также ангольского (0.PE3) и тибетского (0.PE7) подвидов.

В связи с вышеизложенным актуальными являются исследования по разработке комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к определённым подвидам, биоварам и филогенетическим ветвям. Создание такой системы необходимо для повышения оперативности выполнения внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* при проведении эпидемиологического расследования вспышек и заносов чумы, а также при проведении молекулярно-генетической паспортизации очаговых территорий, при осуществлении паспортизации штаммов, проводимой в рамках коллекционной деятельности, что совокупно послужит оптимизации эпидемиологического надзора за чумой на территории Российской Федерации.

Помимо прикладной научной составляющей, значительный интерес для фундаментальной науки представляет изучение филогенетического разнообразия штаммов возбудителя чумы. В научной литературе представлены работы как по изучению общего филогенетического разнообразия штаммов чумного микроба [Anisimov et al., 2004; Morelli et al., 2010; Cui et al., 2013; Kutyrev et al., 2018], так и по исследованию отдельных филогеографических популяций штаммов с определённых территорий [Платонов и др., 2012, 2015; Куклева и др., 2015; Кисличкина и др., 2017; Ярыгина и

др., 2022; Riehm et al., 2012; Vogler et al., 2019; Valtueña et al., 2022]. Быстрыми темпами развивается палеомикробиология, по реконструкции древних геномов из различных частей Евразии [Bos et al., 2016; Valtueña et al., 2017; Spyrou et al., 2019, 2022; Eaton et al., 2023 Б]. Тем не менее, популяционные структуры некоторых филогеографических групп *Y. pestis* к настоящему времени остаются исследованы недостаточно. К ним относятся центральноазиатский (центральноазиатская зона природной очаговости чумы), кавказский (природный очаги Кавказа), улегейский (природные очаги Монголии) подвиды *Y. pestis* и популяция штаммов из природных очагов Социалистической Республики Вьетнам (СРВ). Исследование генетических особенностей штаммов рано дивергировавших неосновных подвидов *Y. pestis* – центральноазиатского, кавказского, улегейского подвидов необходимо для установления путей формирования и направлений эволюции возбудителя чумы, а поиск генетических причин их избирательной вирулентности имеет существенное значение для выяснения молекулярно-генетических основ патогенности *Y. pestis*. Многие аспекты распространения чумы во время прошедших пандемий чумы и особенно третьей пандемии, вызванной штаммами восточного биовара, остаются не выясненными. Поэтому изучение популяционной структуры и поиск генетических особенностей штаммов из СРВ, как представителей одной из наиболее эволюционно молодых ветвей *Y. pestis* – восточного биовара, представляет собой значительный интерес для понимания путей распространения и сопутствующих изменений генома возбудителя чумы.

В связи с вышеизложенным, свидетельствующим об актуальности обозначенных научных направлений, сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

**Цель исследования:** на основании данных филогенетического анализа штаммов возбудителя чумы провести научно-методическое обоснование и разработать комплексную систему молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* для повышения эффективности микробиологического мониторинга в очагах чумы.

**Задачи исследования:**

1. Провести филогеографический анализ популяционной структуры кавказского, улегейского и центральноазиатского подвидов *Y. pestis*, распространённых в природных очагах России и сопредельных государств. Усовершенствовать подвидовую классификацию *Y. pestis* с разделением подвидов по эпидемической значимости.
2. Обосновать необходимость расширения применения методов молекулярно-генетического анализа для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов (отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида) и предложить методологию решения вопроса.
3. Охарактеризовать филогенетическое разнообразие штаммов *Y. pestis* восточного биовара основного подвида из природных очагов чумы СРВ. Определить методологию подбора праймеров для SNP-типирования штаммов методом фрагментного секвенирования, позволяющую установить ареалы SNP-генотипов и направления распространения *Y. pestis* восточного биовара в СРВ в период третьей пандемии чумы.

4. Научно обосновать возможность и необходимость одновременной индикации, идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы и методологию выбора молекулярно-генетических методов для системного анализа патогена.
5. На основании данных глобального филогеографического разнообразия *Y. pestis* теоретически обобщить и предложить комплекс молекулярно-генетических методов на основе аллель-специфических ПЦР с учётом результатов в режиме реального времени для внутривидовой дифференциации штаммов основных филогенетических ветвей возбудителя чумы.
6. Научно обосновать и разработать комплексную систему молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* с использованием методов ПЦР-РВ, аллель-специфической ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке на основе разработанного алгоритма их применения в рамках микробиологического мониторинга, проводимого в природных очагах чумы.

**Научная новизна работы.** Получены новые данные о глобальном генетическом разнообразии *Y. pestis* с учётом филогеографических популяций из природных очагов чумы России и сопредельных государств. Определена популяционная структура центральноазиатского подвида *Y. pestis ssp. central asiatica*, который объединяет штаммы четырёх биоваров алтайского (0.РЕ4а), гиссарского (0.РЕ4h), таласского (0.РЕ4t), *microtus* (0.РЕ4m) из центральноазиатской зоны природной очаговости чумы в России, Монголии и Китае. Разработан эффективный способ дифференциации штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ. Впервые штаммы из провинции Цинхай (Китай) выделены в отдельный цинхайский подвид *ssp. qinghaica* и новую филогенетическую линию 0.РЕ10. На основе этого проведено уточнение внутривидовой классификации *Y. pestis*, согласно которой вид *Y. pestis* включает семь отдельных подвидов, отличающихся по эпидемической значимости: основной, кавказский (0.РЕ2), ангольский (0.РЕ3), центральноазиатский (0.РЕ4), улегейский (0.РЕ5), тибетский (0.РЕ7) и цинхайский (0.РЕ10). Впервые обнаружена уникальная для штаммов центральноазиатского подвида мутация в гене *ybtS*, которая может быть связана с их избирательной вирулентностью.

Получены новые данные о филогеографическом разнообразии штаммов кавказского подвида природных очагов Кавказа и Закавказья в России, Азербайджане, Армении и Грузии. Установлено наличие нескольких обособленных филогенетических ветвей *Y. pestis ssp. caucasica*, соотносящихся с распространением штаммов на территории природных очагов этих стран. Первая (I) из них образована штаммами Восточно-Кавказского высокогорного очага чумы; вторая (II) представлена штаммами Присеванского горного, Зангезуро-Карабахского горного и Приараксинского низкогорного очагов; а третья (III) – штаммами северо-западной части Кавказского нагорья (Гюмрийский и Джавахетско-Ахалкалакский очаги). Разработан способ определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям I, II (отдельно Ia, Ib,

IIc) и III кавказского подвида методом фрагментного секвенирования. Обнаружены специфические мутации в генах *astD*, *fyuA*, *hmsF*, *hmsT*, *yopH*, *yopT*, *uscG*, *uscU*, которые приводят к заменам кодируемых аминокислот и, как следствие, могут быть причиной избирательной вирулентности штаммов кавказского подвида.

Получены приоритетные данные по популяционной структуре штаммов *Y. pestis* ssp. *ulegeica* филогенетической линии 0.PE5, состоящей из двух ветвей эволюции: 0.PE5-1 из южных и центральных районов Монголии и 0.PE5-2 – из западных районов. Найдена специфическая замена единичного нуклеотида в гене фактора патогенности *uscQ*, которая может лежать в основе избирательной вирулентности штаммов этого подвида. Разработан способ определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям (0.PE5/1, 0.PE5/2-1, 0.PE5/2-2) улегейского подвида методом фрагментного секвенирования.

Научно обоснована методология и разработан способ определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к отдельным подветвям и кластерам алтайского биовара центральноазиатского подвида методом фрагментного секвенирования.

Впервые проведён молекулярно-генетический анализ популяционной структуры восточного биовара основного подвида *Y. pestis* (филогенетическая линия 1.ORI) из очагов чумы CPB по данным полногеномного секвенирования. Выявлено наличие специфической ветви 1.ORI2v, к которой относится большинство штаммов из природных очагов чумы Вьетнама. Два штамма составили отдельную ветвь 1.ORI2vi со штаммом из Индии в структуре ветви 1.ORI2, один штамм расположился обособленно в составе 1.ORI1. Ветвь 1.ORI2v делится с формированием десяти подветвей 1.ORI2v1-10, отличающихся по месту и времени выделения сформировавших их штаммов. Впервые представлена научно обоснованная теория циркуляции штаммов *Y. pestis* разных генетических ветвей в CPB и проведено районирование территории Вьетнама по распространению SNP-генотипов. Разработан комплекс праймеров для дифференциации штаммов из CPB по их принадлежности к генетическим подветвям 1.ORI2v, 1.ORI2vi, 1.ORI2v1-10, основанный на детекции маркерных SNPs методом фрагментного секвенирования.

На основании анализа полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* найдены ДНК-мишени – единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNPs), маркерные для различных филогенетических ветвей *Y. pestis* (0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT античного биовара; 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3, 2.MED4 средневекового биовара; 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3 восточного биовара; 1.IN1, 1.IN2, 1.IN3 биовара *intermedium* основного подвида; ангольского (0.PE3), тибетского (0.PE7) и цинхайского (0.PE10) подвида), и разработан комплекс аллель-специфических ПЦР-РВ, позволяющих проводить внутривидовую дифференциацию всех основных филогенетических групп *Y. pestis*. Приоритетность исследований подтверждена выдачей патента на изобретение «Способ определения филогенетической принадлежности штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени» № RU 2799415 C1.

По результатам анализа 18 ДНК-мишеней на примере использования 114 штаммов *Y. pestis*, относящихся к разным подвидам, биоварам и филогенетическим ветвям впервые научно обоснован и разработан способ индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию основных генов патогенности на основе системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке. Создан алгоритм автоматического анализа результатов, полученных с помощью системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке, для индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, реализуемый при использовании специально разработанной программы по учёту результатов мультиплексного анализа на биологическом микрочипе для выявления и дифференциации штаммов чумного микроба (патент № RU 2021612722). Научно обоснована возможность индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы по их принадлежности к виду *Y. pestis*, к подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям и по наличию генов основных факторов патогенности методом ДНК-чипа (патент № RU 2734636 С1).

Научно обоснована и разработана комплексная система молекулярно-генетической внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*, основанная на широком использовании методов ПЦР-РВ, АС-ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке для быстрого и надёжного анализа в рамках проведения микробиологического мониторинга.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость исследований обоснована тем, что: Проведено усовершенствование классификации штаммов *Y. pestis*, согласно которой выделяется семь подвидов, различных по эпидемической значимости: основной, *ssp. pestis*; тибетский, *ssp. tibetica*; кавказский, *ssp. caucasica*; ангольский, *ssp. angolica*; центральноазиатский, *ssp. central asiatica*; цинхайский, *ssp. qinghaica*; улегейский, *ssp. ulegeica*. На основе данных полногеномного секвенирования определена популяционная структура древних подвидов *Y. pestis* – кавказского, центральноазиатского, улегейского; выявлены отличия в генах факторов патогенности, что может быть использовано для анализа направлений эволюции и молекулярных основ отличий в вирулентности по сравнению с высоковирулентным основным подвидом возбудителя чумы. Сформулирована гипотеза о том, что штаммы алтайского биовара центральноазиатского подвида из Уландрыкского мезоочага представляют собой наиболее эволюционно раннюю ветвь эволюции *Y. pestis* этого биовара. Получены новые данные о генетических особенностях штаммов центральноазиатского подвида и найдены мутации в ряде генов, кодирующих факторы патогенности. Сделано предположение о том, что эти мутации могут быть причиной авирулентности штаммов филогенетической ветви 0.РЕ4 для человека. Полученные данные вносят значительный вклад в определение закономерностей пространственно-временной циркуляции и эволюции возбудителя



чумы в природных очагах России, стран ближнего и дальнего зарубежья; выявление филогеографического разнообразия *Y. pestis* основного и неосновных подвидов; уточнение ареалов различных филогеографических популяций возбудителя.

Филогенетический анализ штаммов, выделенных на территории СРВ, позволил получить новые данные по распространению и направлению эволюции *Y. pestis* восточного биовара в период третьей пандемии чумы. Предложена научно обоснованная теория циркуляции и распространения штаммов *Y. pestis* разных генетических ветвей восточного биовара основного подвида в СРВ. Разработан комплекс праймеров для дифференциации штаммов из СРВ по их принадлежности к основным генетическим ветвям и подветвям (1.ORI2v, 1.ORI2vi, 1.ORI2v1–10), основанный на детекции маркерных SNPs методом фрагментного секвенирования. Анализ полученных данных послужил основанием для предположения о том, что занос чумы в СРВ происходил несколько раз и обусловлен передачей инфекции синантропными крысами на кораблях преимущественно из Китая, а также сухопутным путём с территории близлежащего природного очага чумы в провинции Юньнань. Изучение популяционной структуры и поиск детерминированности избирательной вирулентности неосновных подвидов, распространённых на территории стран СНГ, расширили представления о структурно-функциональной организации геномов древних подвидов чумы. Полногеномное секвенирование и анализ полиморфизма единичных нуклеотидов (SNPs) центральноазиатского и других неосновных подвидов возбудителя чумы позволили установить популяционную структуру этих рано дивергировавших групп *Y. pestis* и уточнить ареалы их распространения в очагах Восточной Европы и Центральной Азии.

Практический аспект диссертации обусловлен тем, что: Теоретические разработки и обоснования реализованы в виде подобранных комплектов праймеров для дифференциации основных ветвей эволюции *Y. pestis* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени, востребованных для молекулярно-генетической идентификации штаммов из природных очагов чумы с определением их принадлежности к основным филогенетическим ветвям и оценки вирулентности. Применение данного методического подхода способствует повышению эффективности оперативного расследования случаев чумы в рамках проведения микробиологического мониторинга в природных очагах России, других стран СНГ и сопредельных государств.

Ряд научно-методических разработок в области расширения возможностей дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов, включая отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида, был реализован в виде регистрации Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения Российской Федерации медицинских изделий для *in vitro* диагностики: «Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов (отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида) методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени (ГенПест-подвид/алтай-РГФ)» для детекции ДНК штаммов *Y. pestis* в пробах биологического, клинического материала, объектов окру-

жающей среды с одновременным определением принадлежности к основному и неосновным подвидам и с отдельной дифференциацией алтайского биовара центрально-азиатского подвида методом ПЦР-РВ (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7338 от 19.09.2022); «Набор реагентов для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба методом мультилокусной ПЦР в формате биочипа (Пест-МЛ ПЦР-биочип)» для качественного выявления ДНК возбудителя чумы в пробах клинического материала, биологического материала, культур микроорганизмов с одновременным определением принадлежности к основному и неосновным подвидам, биоварам, а также дифференциации вирулентных изолятов от авирулентных (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15445 от 02.09.2022).

В рамках регистрационных досье указанных медицинских изделий разработаны нормативные документы – технические условия (ТУ 21.20.23-054-01898109-2017 – для «ГенПест-подвид/алтай-РГФ», ТУ 21.20.23-056-01898109-2020 – для «Пест-МЛ ПЦР-биочип») и инструкции по применению. В международной базе данных NCBI GenBank депонированы полногеномные последовательности 48 штаммов *Y. pestis*.

**Внедрение результатов и рекомендации по их использованию.** Результаты диссертационного исследования применяются в работе ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора, ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора, ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Роспотребнадзора и ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ Роспотребнадзора, что подтверждено актами внедрения. Материалы диссертационного исследования используются при чтении лекций на курсах специализации по программе «Бактериология. Инфекционные болезни, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации» и курсах «ПЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов» при ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Результаты диссертационного исследования рекомендованы для использования учреждениями, занимающимися индикацией и идентификацией возбудителя чумы.

**Методология и методы исследования.** Эксперименты, результаты которых представлены в диссертационной работе, выполнены на основе комплексного использования микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических, биоинформационных и статистических методов.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Многообразие штаммов *Y. pestis* состоит из семи подвигов с различной эпидемической значимостью: основной, *ssp. pestis*; тибетский, *ssp. tibetica*; кавказский, *ssp. caucasica*; ангольский, *ssp. angolica*; центральноазиатский, *ssp. central asiatica*; улегейский, *ssp. ulegeica*; цинхайский, *ssp. qinghaica*. Штаммы, выделенные в провинции Цинхай, не относятся к центральноазиатскому подвиду и образуют отдельный подвид – *ssp. qinghaica* и филогенетическую ветвь O.PE10. Кавказский подвид делится на три ветви эволюции (I, II, III), улегейский подвид сформирован из двух ветвей (O.PE5/2-1 и O.PE5/2-2). А центральноазиатский подвид включает 4

биовара: алтайский (0.PE4a), гиссарский (0.PE4h), таласский (0.PE4t) и *microtus* (0.PE4m). Найдены мутации в генах, кодирующих факторы патогенности, у штаммов кавказского (*astD*, *fyuA*, *hmsF*, *hmsT*, *yopH*, *yopT*, *uscG* и *uscU*), улегейского (*irp1* и *uscQ*) и центральноазиатского (*ybtS*) подвидов *Y. pestis*.

2. Научно обоснована необходимость эффективной дифференциации штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов с одновременной дифференциацией алтайского биовара центральноазиатского подвида и разработан способ проведения *in vitro* диагностики методом ПЦР (ПЦР-тест система «ГенПест-подвид/алтай-РГФ»), позволяющий выполнять детекцию и дифференциацию штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов, включая отдельно алтайский биовар центральноазиатского подвида. ПЦР-тест система «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» обладает аналитической чувствительностью не менее  $1 \times 10^3$  м.к./мл, диагностической специфичностью (99 %) и чувствительностью (98,6 %).

3. Штаммы из природных очагов СРВ разделяются с формированием трёх филогенетических ветвей восточного биовара *Y. pestis*, с преимущественной циркуляцией специфической ветви 1.ORI2v. Комплекс праймеров для дифференциации штаммов из СРВ, основанный на определении маркерных SNPs методом фрагментного секвенирования, обеспечивает установление их принадлежности к специфическим для СРВ генетическим подветвям 1.ORI2v, 1.ORI2vi и 1.ORI2v1–10. Определены исторические ареалы SNP-генотипов и проведена реконструкция направлений распространения штаммов восточного биовара в СРВ в период третьей пандемии чумы.

4. Реализован в виде системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке способ индикации и идентификации штаммов согласно их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов факторов патогенности, с использованием 18 ДНК-мишеней, включая набор реагентов для *in vitro* диагностики для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* методом мультилокусной ПЦР в формате биочип («Пест-МЛ ПЦР-биочип»), который характеризуется аналитической чувствительностью не менее  $1 \times 10^3$  м.к./мл, диагностической чувствительностью и специфичностью не менее 99,0 %.

5. На основе полногеномного анализа с целью проведения внутривидовой дифференциации штаммов филогенетических ветвей *Y. pestis* 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT, 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED4, 1.IN1, 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3 разработан комплекс аллель-специфических ПЦР-РВ, который вместе с разработанными тест-системами «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» и «Пест-МЛ ПЦР-биочип» обеспечивает проведение дифференциации штаммов *Y. pestis* из различных природных очагов мира.

6. Научно обоснована и разработана комплексная система молекулярно-генетической дифференциации штаммов возбудителя чумы, основанная на совокупности методов (ПЦР-РВ, аллель-специфической ПЦР-РВ и системе мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке),

обеспечивающих дифференциацию подвидов и биоваров *Y. pestis* с разной эпидемиологической значимостью: кавказского (0.PE2), улегейского (0.PE5) подвидов; алтайского (0.PE4a), гиссарского (0.PE4h), таласского (0.PE4t) и *microtus* (0.PE4m) биоваров центральноазиатского подвида; филогенетических ветвей 1.ANT, 2.ANT, 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT античного биовара основного подвида, 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED4 средневекового биовара основного подвида, 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3 восточного биовара основного подвида, 1.IN1 биовара *intermedium* основного подвида, а также разработан алгоритм их применения для быстрого и надёжного микробиологического мониторинга в природных очагах чумы.

**Степень достоверности и апробация работы.** Заключение и выводы основаны на полученных данных, достоверность которых подкреплена значительным объёмом проведённых исследований в повторяющихся экспериментах, законами биологии, физики и химии, применения современных диагностических методик, компьютерного и статистического анализа. Материалы диссертации были представлены на российских и международных научно-практических конференциях: «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов, 6–8 мая 2018 г.); XIV Межгосударственная научно-практическая конференция «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ», посвящённая 100-летию ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов, 20–21 ноября 2018 г.); XI Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора, 2019 «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 2–4 октября 2019 г.); 23-я международная научная конференция «Актуальные вопросы зоонозных инфекций» (Улан-Батор, 29 мая 2019 г.); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» (Москва, 19–20 марта 2020 г.); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы» посвящённая 100-летию со дня рождения академика И.Н. Блохиной (Нижний Новгород, 26–27 апреля 2021 г.); Всероссийский научно-практический конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2022» (Москва, 27–28 апреля 2022 г.); Международный симпозиум «*Yersinia* 14» (Санкт-Петербург 26–28 сентября 2022 г.); IX Международная конференция молодых учёных: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков «OpenBio» (Кольцово, 27–29 сентября 2022 г.).

**Публикации по теме диссертации.** По теме диссертационной работы всего было опубликовано 29 печатных работ, из них 13 – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК в журналах из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени доктора и кандидата наук», 1 публикация в зарубежном журнале, 12 публикаций в сборниках и материалах конференций, 2 патента

на изобретения РФ № RU 2734636 C1, RU 2799415 C1 и одна программа для ЭВМ 2021612722 RU. Материалы диссертации включены в коллективные монографии «Актуальные направления и перспективы Российско-Вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, 2019», «Специфическая профилактика чумы: состояние и перспективы, 2021», «Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств, 2022».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация представлена на 354 страницах текста, состоит из введения, главы обзора литературы, семи глав собственных исследований (в том числе, одной главы с описанием материалов и методов), заключения, выводов и 8 приложений. Работа иллюстрирована 31 таблицей и 45 рисунками. Библиографический указатель содержит 102 отечественных и 536 зарубежных источника.

**Место выполнения и личный вклад автора.** Работа выполнена в ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Автором самостоятельно сформулированы цель и задачи исследования, проведён анализ литературы, отработаны методические подходы и выполнены исследования по сравнительному анализу полногеномных последовательностей штаммов возбудителя чумы разных филогенетических ветвей с целью поиска маркерных мишеней для последующего проведения внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к конкретным филогенетическим ветвям на основе методов ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов и систем мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке. Автором сконструированы универсальные праймеры и зонды для быстрой и надёжной идентификации штаммов *Y. pestis* методами ПЦР-РВ и АС-ПЦР-РВ, мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке и фрагментного секвенирования. Эффективность и специфичность комплексной молекулярно-генетической системы дифференциации штаммов *Y. pestis* проверены автором лично на большой выборке природных и клинических штаммов *Y. pestis* и гетерологичных микроорганизмах. Совместно с Д.В. Уткиным были проведены эксперименты по разработке системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке и оптимизации методики выполнения анализа. Совместно с сотрудниками лаборатории геномного и протеомного анализа ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора было выполнено определение нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории природных очагов России и сопредельных стран. Совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной микробиологии и лаборатории диагностических технологий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора были проведены бактериологические исследования и проверка специфичности разработанных МИ и выполнена проверка специфичности разработанного комплекса аллель-специфических ПЦР с учётом результатов в режиме реального времени для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Глава 1 Обзор литературы

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что чума продолжает представлять проблему для международного здравоохранения, что диктует необходимость совершенствования эпидемиологического мониторинга природных очагов чумы. Для этого требуется разработка научно обоснованной комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к определённым подвидам, биоварам и ветвям эволюции. Обращает на себя внимание недостаточность литературных данных в отношении изучения филогенетических ветвей *Y. pestis*, популяционные структуры которых в настоящее время требуют более глубокого исследования – центральноазиатский, кавказский, улегейский подвиды, а также штаммы восточного биовара, выделенные из природных очагов Вьетнама. Проведённый анализ позволяет сделать вывод об актуальности проведения фундаментальных исследований в данном направлении, что позволит расширить представление о ходе эволюции вида *Y. pestis*.

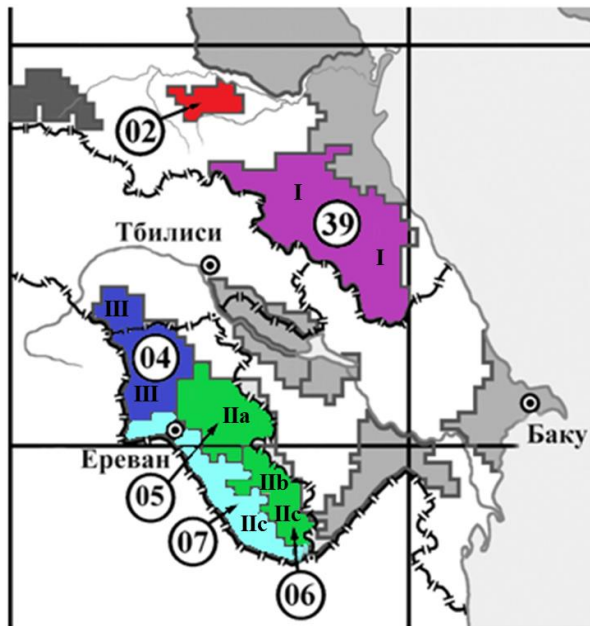
### Глава 2 Материалы и методы

В работе использовано 246 штаммов *Yersinia pestis* и 35 штаммов других микроорганизмов. Исследование культурально-морфологических и биохимических свойств штаммов проводили в соответствии с традиционными методами лабораторной диагностики [Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней», 2013], в полном соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Экстракцию ДНК штаммов *Y. pestis* осуществляли с использованием наборов «PureLink Genomic DNA Mini Kit» (Invitrogen, США). Для проведения ПЦР-РВ были использованы зонды с флуорофорами FAM/Green, JOE/Yellow и гасителем флуоресценции RTQ1. Чтобы увеличить дискриминацию мутантного аллеля, нами введено второе неспаренное нуклеотидное основание в -2 позиции от 3'-конца аллель-специфичного праймера, а также нуклеотиды, соответствующие маркерным SNPs, были заменены на LNA-олигонуклеотиды. Проведение ПЦР-РВ осуществляли с использованием амплификатора Rotor-Gene Q (Corbett Research, Австралия). Фрагментное секвенирование выполняли, используя генетический анализатор ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, США). Секвенирование полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* осуществляли с использованием системы Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США). Обработка данных и сборка коротких прочтений генома *de novo* проводились с использованием программ Ion Torrent Suite software package 5.12 (Thermo Fischer Scientific, США), Newbler gsAssembler 2.6 (454 Life Sciences, США), Unicycler v0.4.9 (URL: <https://github.com/rrwick/Unicycler/releases>). Зонды для системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке несли в своей структуре аминокислотную группу на 5'-конце для иммобилизации на слайде. Обратный праймер имел флуорофор – Cy5. Основные этапы анализа штаммов *Y. pestis* в системе

мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке осуществляли в соответствии с методиками, разработанным ранее [Tomioaka et al., 2005; Jin et al., 2007; Marcy et al., 2008]. В ячейку одномоментно вносили ПЦР продукты шести мультиплексных ПЦР-смесей. Регистрацию результатов анализа выполняли, используя сканер микрослайдов GenePix 4100A (Molecular Devices, США) и программы GenePix Pro 7.3 (Molecular Devices, США). Поиск маркерных indel-мутаций осуществляли с использованием программ Mauve 2.4.0 (the Darling lab, Австралия) и Mega 11 (URL: <http://www.megasoftware.net/>). Поиск маркерных SNPs осуществляли с использованием программы Wombac 2.0 (Victorian Bioinformatics Consortium, Австралия) на базе операционной системы BioLinux 8.0 (Victorian Bioinformatics consortium, Австралия) с последующей проверкой в программе Mega 11 (URL: <http://www.megasoftware.net/>). Расчёт праймеров выполняли с помощью программы Vector NTI 11.2 (URL: <http://www.thermofisher.com>). Построение дендрограммы Maximum Likelihood проводили с помощью программы PhyML 3.1 (URL: <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>) с использованием модели НКУ85 с использованием 500 бутстреп-реплик. Визуализацию дендрограммы выполняли в программе FigTree 1.4.4 (Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Шотландия). Построение дендрограммы Maximum Parsimony осуществляли с помощью программы Bionumerics 7.6.3 (Applied Maths NV, Бельгия) с использованием 500 бутстреп-реплик.

### **Глава 3 Изучение популяционной структуры штаммов кавказского, улегейского, центральноазиатского подвидов *Yersinia pestis*, распространённых в природных очагах России и сопредельных стран**

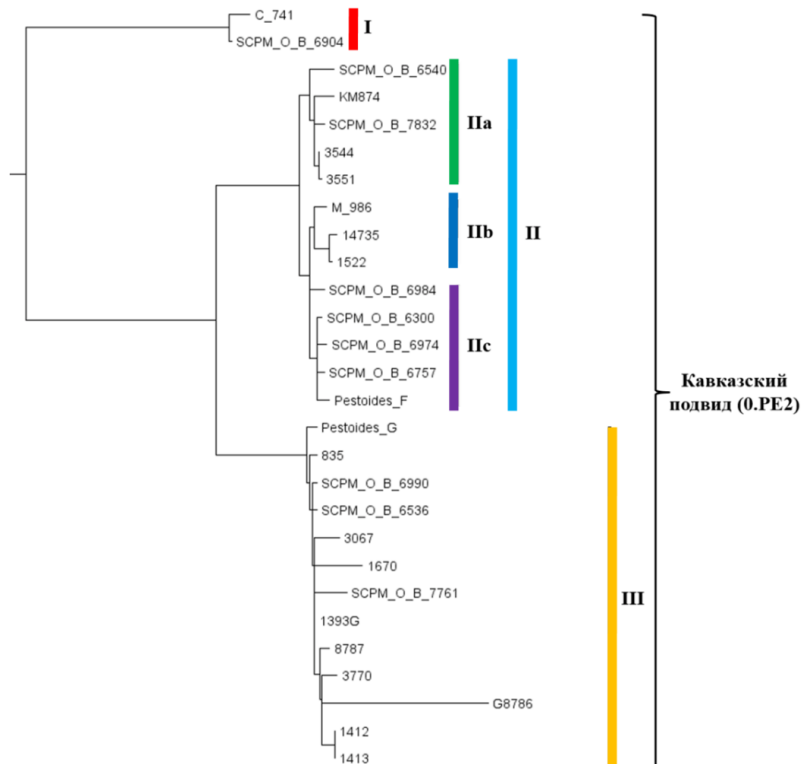
**3.1 Филогеография штаммов кавказского подвида *Y. pestis*.** К настоящему времени остаются недостаточно изученными популяционные структуры кавказского, центральноазиатского и улегейского подвидов. Несомненный интерес микробиологов, изучающих связь генотипа и фенотипа возбудителя чумы, представляет поиск причин избирательной вирулентности преимущественно для мелких грызунов и зайцеобразных штаммов этих филогенетических ветвей. Поиск детерминированности избирательной вирулентности кавказского, центральноазиатского и улегейского подвидов чумы имеет существенное значение для анализа основ высокой вирулентности *Y. pestis* в целом. Штаммы кавказского подвида относятся к древней филогенетической линии O.PE2 и распространены в природных очагах чумы Кавказа и Закавказья (Восточно-Кавказский высокогорный; Закавказский высокогорный с тремя входящими в него автономными очагами – Гюмрийский (бывший Ленинанканский) горный, Присеванский горный, Зангезуро-Карабахский горный; Приараксинский низкогорный), которые расположены на территории России, Армении, Азербайджана и Грузии (Рисунок 1). Штаммы кавказского подвида способны вызывать спорадические случаи чумы человека.



Природные очаги: Гюмрийский горный (04), Присеванский горный (05), Зангезуро-Карабахский горный (06), Приараксинский низкогорный (07), Восточно-Кавказский высокогорный (39). Римскими цифрами (I, II, III) обозначена принадлежность штаммов к разным филогенетическим ветвям кавказского подвида

Рисунок 1 – Распространённость штаммов *Y. pestis* кавказского подвида в природных очагах чумы Кавказа и Закавказья

Для определения современного популяционного разнообразия штаммов кавказского подвида были использованы полногеномные последовательности 28 штаммов кавказского подвида. Изучение филогенетического разнообразия штаммов кавказского подвида проводили методом полногеномного SNP-анализа путём выявления коровых SNPs в последовательностях штаммов, использованных в исследовании. Всего было найдено 1625 коровых SNPs, с учётом которых, построена дендрограмма на основе алгоритма Maximum Likelihood (Рисунок 2).



Фрагмент дендрограммы, содержащий ветви кавказского подвида  
Рисунок 2 – Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* кавказского подвида



Из анализа дендрограммы следует, что штаммы *Y. pestis* кавказского подвида образуют три отдельных ветви. Первая ветвь (I) представлена штаммами из Восточно-Кавказского высокогорного очага чумы. Очаг расположен в РФ, изолированно от очагов Закавказья, в которых также распространён кавказский подвид. Ветвь I достаточно давно отделилась от общего ствола эволюции кавказского подвида. Это можно предположить на основании наличия у штаммов этой ветви 80 уникальных SNPs.

Штаммы ветви II делятся с формированием трёх подветвей, в которых штаммы кластеризуются согласно их филогеографической принадлежности. Подветвь IIa образована штаммами из Зангезуро-Карабахского горного, Гюмрийского горного и Присеванского горного природных очагов, представляющие собой мезоочаги Закавказского высокогорного природного очага. К подветви IIb относится штамм M-986 из Зангезуро-Карабахского горного очага и два штамма из NCBI GenBank 14735 и 1522, выделенные на территории Армении, вероятно, из этого же очага. Подветвь IIc образована штаммами из Зангезуро-Карабахского и Приараксинского очагов. В результате исследований установлено, что в Закавказском высокогорном и Приараксинском низкогорном очагах распространены штаммы трёх филогенетических ветвей, кластеризующихся по филогеографическому принципу, которые можно обозначить как присеванская (IIa), зангезуро-карабахская (IIb) и зангезуро-карабахско-приараксинская (IIc). В основании ветви III расположены штаммы, выделенные на территории Гюмрийского горного очага чумы. Дендрограмма свидетельствует о последовательной смене генотипов штаммов Гюмрийского природного очага, которая привела к образованию грузинской ветви кавказских штаммов. Согласно последним изменениям номенклатуры природных очагов чумы, Ленинанканский очаг стал называться Гюмрийским, образующим единое целое с Джавахетско-Ахалкалакским очагом в Грузии. В итоге ветвь III образована штаммами кавказского подвида из северо-западной части Закавказского нагорья.

Таким образом, кавказский подвид включает в себя несколько филогенетических ветвей. Отдельную ветвь эволюции кавказских штаммов сформировали штаммы из Восточно-Кавказского высокогорного очага. Вторая ветвь кавказских штаммов (II) образована тремя подветвями. Подветвь IIa представлена преимущественно штаммами Присеванского горного очага, подветвь IIb – штаммами из Зангезуро-Карабахского очага, а подветвь IIc образована штаммами из двух юго-восточных очагов – Зангезуро-Карабахского горного и Приараксинского низкогорного. Отдельным направлением эволюции кавказского подвида чумы является ветвь III, штаммы которой выделены с северо-западной части Кавказского нагорья (современные Гюмрийский и Джавахетско-Ахалкалакский очаги).

Для создания способа дифференциации отдельных ветвей и подветвей кавказского подвида были отобраны специфические SNPs (для ветви I – в позициях 156202 и 227422 по геному CO92; для ветви IIa – в позициях 1565124 и 1795558; для ветви IIb – в позициях 741878 и 3848199; для ветви IIc – в позициях 1859698 и 2080132; для ветви III – в позициях 6103 и 90183; для ветви III – в позициях 37356 и 433408), на них

были рассчитаны праймеры для проведения ПЦР и последующего фрагментного секвенирования полученных ампликонов. В результате нами был разработан комплект праймеров для определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям I, II (отдельно Па, Пб, Пс) и III кавказского подвида методом фрагментного секвенирования.

Следующим этапом исследования был сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов факторов патогенности у штаммов кавказского подвида и штаммов других филогенетических ветвей возбудителя чумы. В анализ было взято 79 генов хромосомной и плазмидной локализации – область пигментации, гены, кодирующие капсульный антиген и мышинный токсин, систему секреции третьего типа плазминоген и пестицин. Большинство изученных генов не несло в своём составе мутаций, которые могли бы быть причинами избирательной вирулентности штаммов кавказского подвида. Исключением стали гены *astD* (G→C в позиции 847 – замена аланина на пролин), *fyuA* (A→G в позиции 1540 – замена аргинина на глицин), *hmsF* (T→A в позиции 779) [Булгакова и др., 2011, Платонов и др., 2012], *hmsT* (T→C в позиции 43 – замена фенилаланина на цистеин), *yopH* (G→T в позиции 199 – замена валина на фенилаланин), *yopT* (G→A в позиции 446 – замена серина на аспарагин), *uscG* (A→G в позиции 49 – замена треонина на аланин), *uscU* (G→T в позиции 81 – замена лизина на аспарагин). Возможно, найденные мутации служат причинами избирательной вирулентности штаммов кавказского подвида. Однако для подтверждения или опровержения этой гипотезы требуются дальнейшие исследования.

**3.2 Анализ популяционной структуры штаммов улегейского подвида *Y. pestis*.** Штаммы улегейского подвида эндемичны для Монголии. До сих пор не известны случаи чумы человека, вызванные штаммами улегейского подвида. Они способны вызывать эпизоотии среди мышевидных грызунов и мелких зайцеобразных. Согласно имеющимся литературным данным, филогенетический и молекулярно-генетический анализ штаммов *Y. pestis* улегейского подвида ранее не выполнялся.

Анализ филогенетической структуры улегейского подвида выполняли с использованием полногеномных последовательностей 12 штаммов улегейского подвида и девяти последовательностей штаммов *Y. pestis* других филогенетических ветвей. Филогенетический анализ осуществляли на основании обнаруженных 1581 коровых SNPs в полногеномных последовательностях исследуемых штаммов. После визуализации дендрограммы и анализа полученного филогенетического дерева было установлено, что штаммы улегейского подвида формируют две ветви, которые были обозначены нами как 0.PE5/1 и 0.PE5/2. Ветвь 0.PE5/1 сформирована штаммами, выделенными в аймаках Умнеговь, Уверхангай и Говь-Алтай на юге Монголии в период 1973-1986 гг. Ветвь 0.PE5/2 делится на две подветви 0.PE5/2-1 и 0.PE5/2-2 (Рисунок 3). Подветвь 0.PE5/2-1 образуют штаммы, выделенные с территории аймаков Баян-Улгий и Ховд в 1974–1986 гг.; подветвь 0.PE5/2-2 представлена штаммами из аймака Баян-Улгий в период 1972–1990 гг. В результате, ветвь 0.PE5/2 объединяет штаммы с территории западных аймаков Монголии, а в аймаке Баян-Улгий распространены

штаммы двух подветвей 0.PE5/2-1 и 0.PE5/2-2.

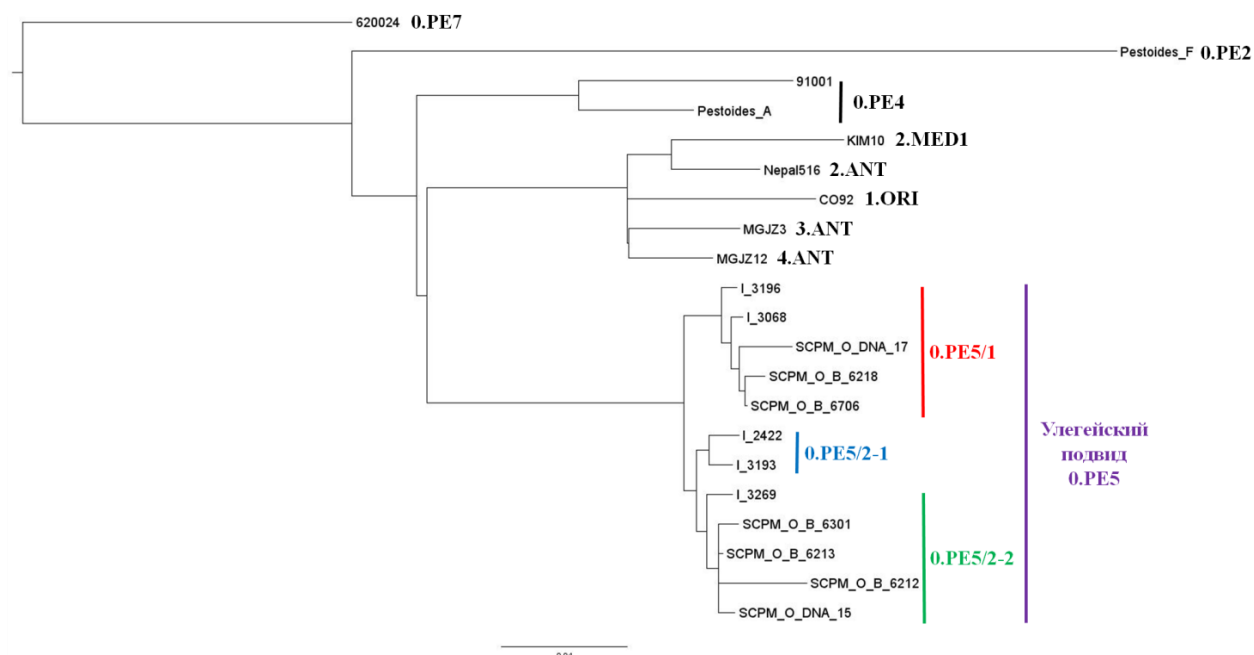


Рисунок 3 – Анализ популяционной структуры штаммов *Y. pestis* улегейского подвида

Следующим этапом исследования было проведение поиска SNPs, характерных для отдельных ветвей и подветвей улегейского подвида. В результате проведённого поиска SNPs было выбрано три маркерных SNPs для штаммов ветви 0.PE5/1. Первый SNP – 0.PE5/1<sub>1</sub> (замена Т→А) находится в гене *ligB* в позиции 54674 по номенклатуре генома референтного штамма CO92. Вторая специфичная замена нуклеотида (Т→G) 0.PE5/1<sub>2</sub> обнаружена в гене *susG* в позиции 172494. Третья маркерная мутация 0.PE5/1<sub>3</sub> (А→С) локализуется в гене *glgA* в позиции 4425839. У штаммов подветви 0.PE5/2-1 были найдены две маркерные нуклеотидные замены: первая (С→А) – 0.PE5/2-1<sub>1</sub> расположена в гене *sixA* (позиция 3081204), вторая (G→А) 0.PE5/2-1<sub>2</sub> находится в гене *argE* (позиция 4413306). Дифференциацию штаммов подветви 0.PE5/2-2 выполняли с использованием 2 уникальных SNPs: первая (Т→G) 0.PE5/2-2<sub>1</sub> обнаружена в гене *YPO0344* (позиция 353703), вторая (С→А) 0.PE5/2-2<sub>2</sub> – в гене *YPO2295* (позиция 2580558). На обнаруженные специфичные SNPs были рассчитаны праймеры, с помощью которых была определена принадлежность к конкретным филогенетическим ветвям и подветвям улегейского подвида ещё семи штаммов из ГКПБ ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. В результате анализа данных полногеномного и фрагментного секвенирования установлено, что ветвь 0.PE5/1 улегейского подвида образована штаммами, циркулировавшими на территории аймаков Умнеговь, Уверхангай и Говь-Алтай в период 1973–1986 гг., подветвь 0.PE5/2-1 объединяет штаммы, выделенные на территории аймаков Баян-Улгий и Ховд в период 1974–1986 гг., подветвь 0.PE5/2-2 сформирована штаммами, циркулировавшими на территории аймака Баян-Улгий в период 1972–1987 гг. После

этого был проведён сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов факторов патогенности у штаммов улегейского подвида и штаммов других ветвей эволюции возбудителя чумы. Подавляющее большинство исследованных генов не содержало мутаций в генах факторов патогенности, которые могли бы послужить причинами избирательной вирулентности штаммов улегейского подвида. Исключение составили два гена – *irp1* (С→А в позиции 7869 – нет замены аминокислоты) и *uscQ* (замены Т→А в позиции 296 – замена лейцина на глутамин). Белок *YscQ* участвует в регуляции синтеза белка *LcrV* и белков внешней мембраны (*Yops*) ССЗТ, являющейся обязательным фактором патогенности возбудителя чумы. Вероятно, эта замена аминокислоты может рассматриваться в качестве одной из причин избирательной вирулентности штаммов улегейского подвида. Для подтверждения или опровержения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования. Анализируя данные полногеномного и фрагментного секвенирования штаммов улегейского подвида *Y. pestis*, можно сделать вывод о распространённости на территории Монголии двух основных ветвей эволюции улегейского подвида. Ветвь 0.РЕ5/1 представлена штаммами, выделенными в южных аймаках Монголии – Умнеговь, Уверхангай и Говь-Алтай в 1973–1986 гг. Вторая ветвь 0.РЕ5/2 образована двумя подветвями: 0.РЕ5/2-1 объединяет штаммы 1977–1990 гг. из западных аймаков Баян-Улгий (его юго-восточные сомоны) и Ховд; 0.РЕ5/2-2 представлена только штаммами из аймака Баян-Улгий (северные и западные сомоны), выделенными в 1972–1987 гг. (Рисунок 4).

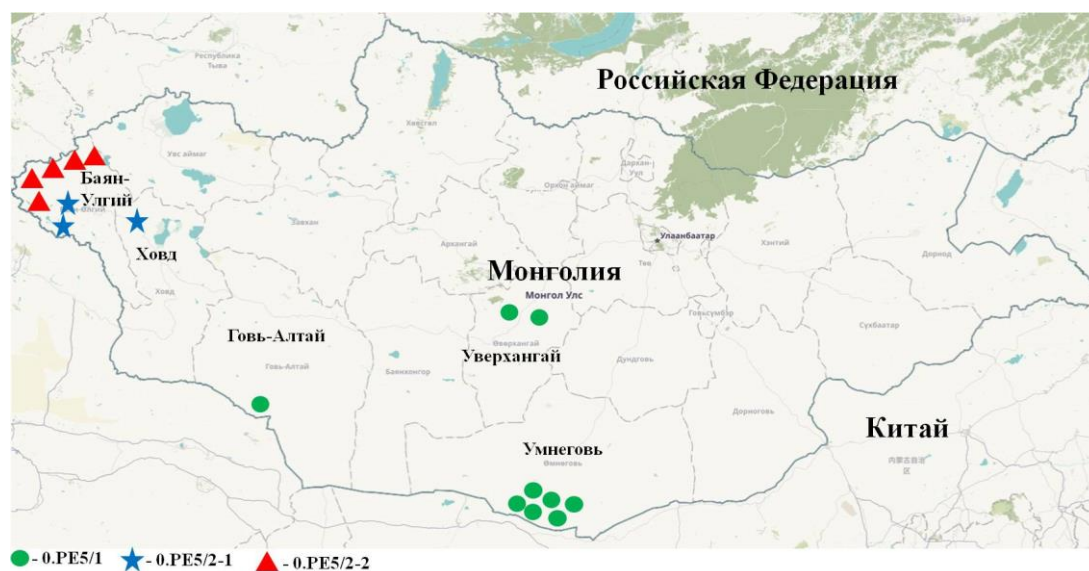


Рисунок 4 – Распространение штаммов улегейского подвида *Y. pestis* (филогенетическая ветвь 0.РЕ5) на территории Монголии

**3.3 Филогения штаммов центральноазиатского подвида *Y. pestis*.** В соответствии с новой классификацией вида *Y. pestis* центральноазиатский подвид (филогенетическая ветвь 0.РЕ4) образован штаммами, ранее относимыми к алтайскому и гиссарскому подвидам, штаммами из Таласского высокогорного очага Киргизской Рес-

публики, штаммами *microtus* из Китая и штаммами из провинции Цинхай (Qinghai) в Китае. Для проведения филогенетического анализа штаммов центральноазиатского подвида *Y. pestis* были использованы полногеномные последовательности 33 штаммов из NCBI GenBank, относящихся разным ветвям эволюции возбудителя чумы. Всего был найден 2221 SNPs, базируясь на которых, осуществлено построение дендрограмм Maximum Likelihood и Maximum Parsimony (Рисунок 5).

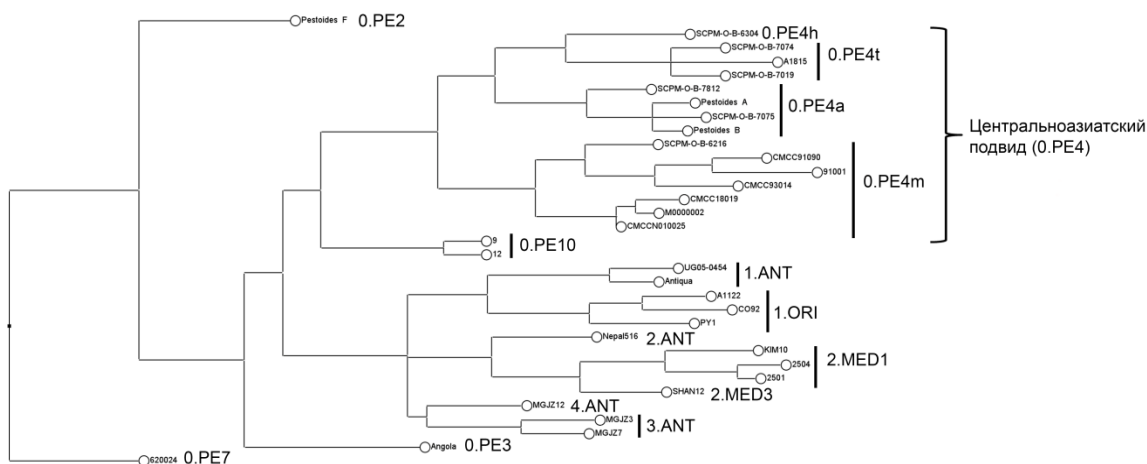


Рисунок 5 – Популяционная структура штаммов *Y. pestis* subspecies *central asiatica* (0.PE4)

Штаммы ветви 0.PE4 сформировали общий кластер, расположенный отдельно от штаммов других филогенетических ветвей. В кластере 0.PE4 штаммы разделились на два подкластера, первый из которых состоит из двух штаммов *Y. pestis* 9 и *Y. pestis* 12, полученных от больных из провинции Цинхай (Qinghai) в Китае в 2004 г. Штаммы этого подкластера получили обозначение 0.PE4q. Второй подкластер состоит из четырёх ветвей эволюции: алтайские штаммы (0.PE4a), гиссарские штаммы (0.PE4h), штаммы из Таласского высокогорного очага в Киргизской Республике – 0.PE4t; и штаммы *microtus* из Китая – 0.PE4m.

Обращает на себя внимание факт обособленного расположения в кластере 0.PE4 штаммов 0.PE4q. Штаммы 0.PE4a, 0.PE4h, 0.PE4t, 0.PE4m и 0.PE4q также обладают различной вирулентностью и биохимическими особенностями. Штаммы 0.PE4a, 0.PE4h, 0.PE4t и 0.PE4m не способны вызывать чуму у людей, в отличие от 0.PE4q, а также не обладают способностью к редукции нитратов и ферментации арабинозы. Изложенные выше факты ставят под сомнение правомочность отнесения штаммов 0.PE4q к ветви 0.PE4. Это даёт нам основание для вынесения штаммов 0.PE4q в отдельный подвид – *ssp. qinghaica*, цинхайский подвид или 0.PE10. Анализ дендрограмм, полученных с использованием алгоритмов Maximum Likelihood и Maximum Parsimony, свидетельствует о том, что штаммы 0.PE4a, 0.PE4h, 0.PE4t и 0.PE4m относятся к одной ветви эволюции чумного микроба – центральноазиатскому подвиду *ssp.*

*central asiatica* и представляют собой алтайский, гиссарский, таласский и *microtus* биовары центральноазиатского подвида.

Неизвестны случаи чумы человека, вызванные штаммами центральноазиатского подвида *Y. pestis*, в отличие от штаммов многих других филогенетических ветвей. Причины этого явления остаются невыясненными. Для поиска возможных причин авирулентности для человека штаммов центральноазиатского подвида был осуществлён сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 79 генов, связанных с патогенностью возбудителя чумы. Сравнительный анализ *ybt* генов показал наличие у всех штаммов центральноазиатского подвида в гене *ybtS* (кодирующий салицилат синтазу) замены единичного нуклеотида С→Т в позиции 661, что приводит к замене синтезируемой аминокислоты с пролина на серин в белке YbtS. М.С. Miller с соавторами доказали, что мутанты по гену *ybtS* не образуют молекулу иерсиниабактина, участвующего в утилизации железа [Miller et al., 2010]. Это даёт основание предположить возможность того, что найденная мутация может являться одной из причин авирулентности для человека штаммов центральноазиатского подвида.

При сравнении последовательностей геномов штаммов центральноазиатского подвида с геномами штаммов других ветвей эволюции *Y. pestis* обнаружено, что у первых отсутствуют участки генома, часть генов которого имеет фаговое происхождение. При этом они имеются у всех филогенетических ветвей *Y. pestis*, включая цинхайские штаммы 0.РЕ10. В предполагаемом профаге находятся в том числе два гена – *YPO2486* и *YPO2490*, продукты которых принимают участие в адгезии и в утилизации гемина. В гене *YPO2490* штаммы центральноазиатского подвида несут делецию первых 610 п.н. от начала гена, приводящую к нарушению функции гена; а в гене *YPO2486* обнаружены множественные замены нуклеотидов. Возможно, что повреждения этих генов вносят определённый вклад в явление авирулентности для человека штаммов центральноазиатского подвида для человека. Также нами обнаружена мутация, характерная только для штаммов центральноазиатского подвида, в гене *hutC* – регуляторе транскрипции, который фланкирует хромосомную область пигментации. В позиции 421 от начала этого гена найдена вставка инсерционной последовательности *IS100*, что ведёт за собой нарушение функции белка HutC, являющегося белком-регулятором семейства GntR. Для части генов, кодирующих факторы патогенности, нами были выявлены замены нуклеотидов, специфичные для отдельных биоваров центральноазиатского подвида. В гене *lcrE* сенсорного контролирующего белка LcrE (или YopN) системы секреции III типа у штаммов биовара *microtus* отмечена мутация (196, С→Т, лейцин→фенилаланин). У гиссарских и таласских штаммов найдена общая замена нуклеотида в гене *yopE* (185, G→A, аргинин→лизин). Также обнаружена уникальная для гиссарских штаммов замена нуклеотида в гене *yopH* (1180, G→A, аспарагиновая кислота→аспарагин). У таласских штаммов мутация имеет место в гене *psaC* (575, А→Т, глутамин→лейцин), кодирующем белок внешней мембраны PsaC. У штаммов алтайского биовара - делеция нуклеотида в позиции 820 от начала гена *yopJ*, что приводит к сдвигу рамки считывания и нарушению функции белка YopJ.

Для разработки способа дифференциации штаммов центральноазиатского подвида был проведён поиск специфических *indel*-мутаций, перспективных в качестве маркерных для этих штаммов. В результате, в гене *YPO2071*, кодирующем DEAD-бокс-хеликазу, у штаммов центральноазиатского подвида была обнаружена специфическая делеция 509 п.н. с координатами 2351984–2351475. На этот участок генома были рассчитаны праймеры и зонд в формате TaqMan. Эффективность этого комплекта праймеров и зонда была апробирована с использованием 85 штаммов *Y. pestis* разных филогенетических ветвей. Разработанный комплект праймеров может быть использован для проведения молекулярной идентификации эпидемически малозначимых штаммов центральноазиатского подвида.

**3.4 Анализ филогенетической структуры алтайского биовара центральноазиатского подвида *Y. pestis*.** Штаммы алтайского биовара центральноазиатского подвида распространены на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага РФ и Сайлюгемского природного очага Монголии. Согласно имеющимся литературным данным изучение популяционной структуры алтайского биовара проводили в основном, используя метод MLVA25 [Корзун и др., 2017; Ярыгина и др., 2019, 2021]. Анализ полиморфизма единичных нуклеотидов (SNP) в полногеномных последовательностях штаммов является более эффективным методом при решении этих задач. Для проведения филогенетического анализа алтайского биовара центральноазиатского подвида были использованы 18 полногеномных последовательностей штаммов алтайского биовара *Y. pestis*, секвенированных в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и 34 полногеномных последовательности штаммов разных филогенетических ветвей из NCBI GenBank. Согласно дендрограмме подветвь 0.PE4a делится с формированием двух кластеров. Первый, получивший обозначение 0.PE4a-1, представлен штаммами, циркулировавшими на территории Курайского и Тархатинского мезоочагов Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы. Штаммы с территории Уландрыкского мезоочага Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и монгольской части Сайлюгемского очага и один штамм из аймака Завхан Монголии образовали кластер 0.PE4a-2 (Рисунок 6).

В свою очередь, кластер 0.PE4a-1 делится с формированием двух субкластеров. Субкластер 0.PE4a-1-1, образован штаммами, выделенными в 2009–2019 гг. на территории Курайского мезоочага в Восточной и Центральной частях Курайского хребта. Второй субкластер, обозначенный 0.PE4a-1-2, сформирован штаммами, выделенными в 2012–2020 гг. на территории Тархатинского мезоочага. Исключением явился штамм 1139, выделенный в Курайском мезоочаге, вероятно, занесённый туда с территории Тархатинского мезоочага.

В кластере 0.PE4a-2 можно выделить субкластер 0.PE4a-2-1, который сформировали штаммы, выделенные на территории Монголии в аймаках Баян-Улгий и Завхан с 1964 по 1990 гг. Штаммы, циркулировавшие в Уландрыкском мезоочаге с 1965 по 2010 гг., сформировали субкластер 0.PE4a-2-2 (1 SNP) в кластере 0.PE4a-2. Эти результаты соотносятся с данными, полученными ранее о том, что для каждого мезо-

очага Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы (Уландрыкского, Тархатинского и Курайского) характерна своя ветвь эволюции возбудителя чумы, обладающая генетическим своеобразием [Горно-Алтайский природный очаг чумы, 2014; Балахонов и др., 2009; Ярыгина и др., 2019, 2021].

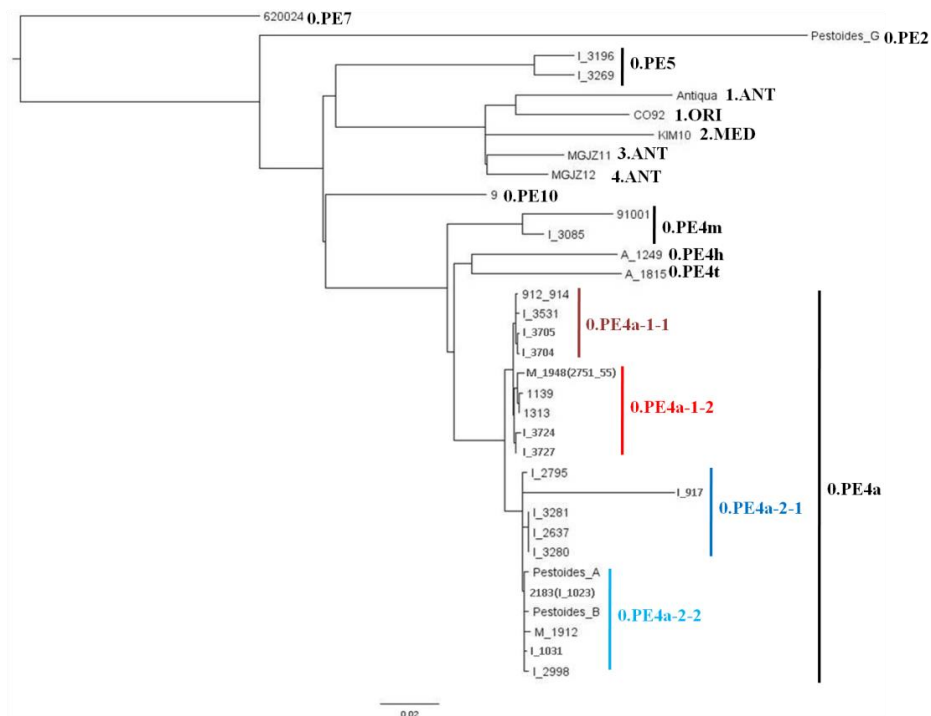


Рисунок 6 – Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида

Для создания способа дифференциации отдельных подветвей и кластеров алтайского биовара центральноазиатского подвида были отобраны следующие специфические SNPs: для подветви 0.PE4a-1 – 0.PE4a-1<sub>1</sub> в позиции 330713 и 0.PE4a-1<sub>2</sub> в позиции 1393685; для кластера 0.PE4a-1-1 – 0.PE4a-1-1 в позиции 959824; для кластера 0.PE4a-1-2 – 0.PE4a-1-2 в позиции 493535; для подветви 0.PE4a-2 – 0.PE4a-2<sub>1</sub> в позиции 41536 и 0.PE4a-2<sub>2</sub> в позиции 721592; для кластера 0.PE4a-2-2 – 0.PE4a-2-2 в позиции 3178225. На найденные специфичные SNPs были рассчитаны праймеры для проведения ПЦР и последующего фрагментного секвенирования полученных ампликонов. В результате был разработан комплект праймеров для установления принадлежности штаммов *Y. pestis* к отдельным подветвям и кластерам алтайского биовара центральноазиатского подвида методом фрагментного секвенирования.

#### Глава 4 Разработка способа детекции и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов (отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида) методом ПЦР-РВ

В 2013–2016 гг. на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Республике Алтай впервые были отмечены случаи чумы человека [Балахонов и др., 2013, 2016]. В настоящее время в Горно-Алтайском высокогорном



природном очаге отмечается циркуляция штаммов как алтайского биовара центральноазиатского подвида, так и основного подвида, различных по вирулентности и эпидемической значимости. В связи с этим стала актуальной задача по разработке оперативного и эффективного способа для разделения штаммов основного и неосновных подвидов с отдельным определением принадлежности к алтайскому биовару центральноазиатского подвида. Для решения этой задачи оптимальным методом является полимеразная цепная реакция с учётом результатов в режиме реального времени.

Для проведения индикации ДНК *Y. pestis* в анализируемом материале наиболее эффективно было применение хромосомного видоспецифичного гена *yihN* [Куклев, 2007]. Для дифференциации штаммов основного подвида *Y. pestis* была выбрана специфичная делеция 89 п.н. в нуклеотидной последовательности гена *ilvN*, а для дифференциации алтайского биовара центральноазиатского подвида *Y. pestis* – характерная делеция 90 п.н., находящаяся в локусе АК38\_1327 [Никифоров и др., 2017]. Подобраны специфические праймеры и зонды для проведения амплификации фрагментов обозначенных выше генов в ПЦР-РВ. На основании экспериментальных данных было решено использовать две реакционные смеси: «РС (реакционная смесь)-вид» – для амплификации фрагмента гена *yihN* с последующей детекцией флуоресценции по каналу FAM; «РС-подвид» – для амплификации фрагментов генов *ilvN* и АК38\_1327 с последующей детекцией флуоресценции по каналам FAM и JOE. Экспериментальным путём подобрана оптимальная программа амплификации в ПЦР с рассчитанными праймерами и зондами на приборах типа RotorGene: денатурация – 95 °С – 5 мин; циклирование (10 циклов) – 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; циклирование 2 (35 циклов) – 95 °С – 15 с, 56 °С – 30 с, 72 °С – 15 с.

В качестве препарата сравнения было использовано медицинское изделие (МИ) «Набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени (ген *Yersinia pestis* индикация-РГФ)» (Рег. уд. № ФСР 2011/12106 – 14.10.11). Кроме того, штаммы дифференцировали по их биохимическим свойствам с учётом места выделения штамма. Во всех пробах для штаммов каждого подвида и биовара *Y. pestis* была характерна амплификация только соответствующих локусов. При постановке ПЦР-РВ с использованием ДНК штаммов микроорганизмов других видов не регистрировались положительные сигналы флуоресценции. Эти факты говорили о возможности разработки на основе предложенного выше подхода генодиагностического препарата. Базируясь на полученных данных, были разработаны ТУ 21.20.23-054-01898109-2017 для последующего проведения клинических испытаний и изготовлены две экспериментальные серии набора реагентов, получившего название «ГенПест-подвид/алтай-РГФ».

Клинические испытания двух экспериментальных серий разработанного медицинского изделия для *in vitro* диагностики «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» были выполнены с использованием 242 проб, с концентрацией клеток *Y. pestis*  $1 \times 10^3$  м.к./мл. После проведения клинических испытаний был получен положительный результат с

применением амплификаторов типа RotorGene в 99,3 % случаев. Также в клинических испытаниях для установления диагностической специфичности были использованы 70 проб с гетерологичными микроорганизмами в концентрации  $1 \times 10^4$  м.к./мл. В результате анализа этих проб был получен отрицательный результат для 100 % проб. При выполнении клинических испытаний была зафиксирована абсолютная внутри-, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость получаемых результатов. Уровень достоверности различий, наблюдавшихся в сигналах флуоресценции между положительными и отрицательными результатами ПЦР-РВ, был выше  $p < 0,001$  (вероятность 95 %). В итоге, продемонстрирована диагностическая эффективность разработанного МИ для *in vitro* диагностики «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» согласно ТУ 21.20.23-054-01898109-2017 на приборах типа RotorGene. Диагностическая чувствительность была не менее 98,5 % при доверительной вероятности 90 %, а диагностическая специфичность – не менее 99 % при доверительной вероятности 90 %. Разработанный набор реагентов успешно в установленном порядке прошёл государственную регистрацию, в результате которой Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения выдано регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7338 от 19.09.2022.

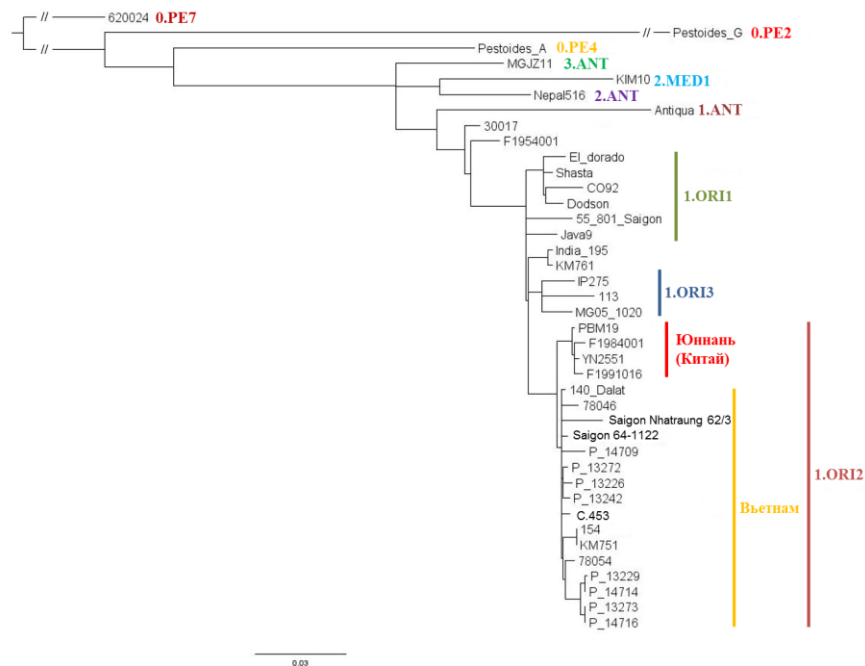
## **Глава 5 Изучение пространственно-временных закономерностей распространения и генетических особенностей штаммов *Y. pestis* линии эволюции 1.ORI**

### **5.1 Изучение филогенетического разнообразия штаммов восточного биовара основного подвида ветви 1.ORI2 из Социалистической Республики Вьетнам.** Сведения о штаммах *Y. pestis*, выделенных в Социалистической Республике Вьетнам (СРВ), до сих пор остаются довольно ограниченными. В связи с этим одной из задач настоящего диссертационного исследования было изучение распространения чумы по территории СРВ во время третьей пандемии, вызванной штаммами восточного биовара, и их филогенетического разнообразия, что представляет значительный интерес для лучшего понимания направлений эволюции возбудителя чумы, а также необходимо для разработки способа типирования штаммов из СРВ по филогеографическому принципу. В рамках решения задач данного этапа диссертационного исследования нами было исследовано 50 штаммов *Y. pestis*, циркулировавших в СРВ с 1962 по 1989 гг.

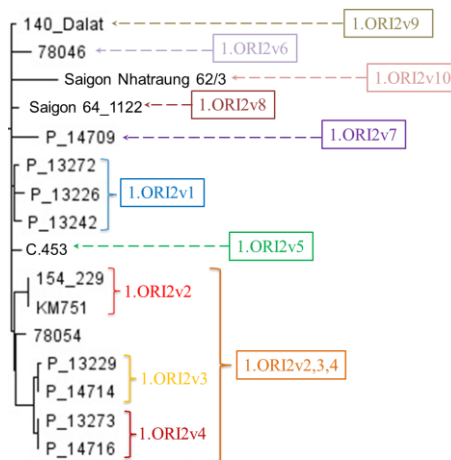
Проведение филогенетического анализа штаммов *Y. pestis*, выделенных в СРВ, выполняли на основании полногеномных последовательностей 18 штаммов, секвенированных в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, и 22 геномов штаммов различных ветвей эволюции *Y. pestis* из базы данных NCBI GenBank. В результате при проведении филогенетического анализа был обнаружен 1391 коровый SNPs, на основании которого была построена дендрограмма Maximum Likelihood (Рисунок 7 А, Б).

Согласно полученной дендрограмме, штаммы, выделенные в СРВ в разные годы, относились к разным ветвям эволюции восточного биовара основного подвида. Большинство штаммов из СРВ относилось к ветви 1.ORI2v, образованной штаммами, циркулировавшими в разных провинциях СРВ. Было выяснено, что эти штаммы эво-

люционно близки штаммам 1.ORI2, выделенным в китайской провинции Юньнань, что находится в соответствии с литературными данными о привнесении чумы на территорию СРВ из этой провинции Китая [Morelli et al., 2010].



А.



Б.

А. Дендрограмма с алгоритмом Maximum Likelihood, программа PhyML 3.1, модель HKY85; Б. Кластер 1.ORI2v

Рисунок 7 – Популяционная структура штаммов *Y. pestis*, выделенных в СРВ

Два штамма на дендрограмме находились вне ветви 1.ORI2v. Первый из них – *Y. pestis* KM761 (провинция Донгнай, 1971 г.) образовал самостоятельный кластер 1.ORI2vi вместе со штаммом India 195 (выделен в Индии в 1898 г.), что позволяет предположить занос морским путём из Индии. Второй штамм – *Y. pestis* 55-801 Saigon, выделенный в г. Хошимин в 1955 г., сформировал на дендрограмме восточного биоара отдельную ветвь 1.ORI1, обозначенную нами как 1.ORI1vi. Для кластеров

1.ORI2v и 1.ORI2vi нами были найдены специфические SNPs (в позициях 260529 и 1192040 – для ветви 1.ORI2vi, и в позиции 2133712 – для ветви 1.ORI2v) и рассчитаны праймеры для их детекции методом ПЦР и дальнейшего фрагментного секвенирования полученных ампликонов. С их помощью показано, что большинство штаммов, выделенных на территории СРВ за период 1964–1988 гг., принадлежали к филогенетическому кластеру 1.ORI2v. Исключение составил штамм KM762, выделенный в 1981 г. на территории провинции Донгнай, так как он несёт в своём геноме оба маркерных для ветви 1.ORI2vi SNPs и, следовательно, относится к ветви 1.ORI2vi.

Согласно полученной дендрограмме, вьетнамские штаммы ветви 1.ORI2v формируют несколько подветвей, из которых две (1.ORI2v1, 1.ORI2v2,3,4) образованы группами штаммов, а шесть (1.ORI2v5–10) представлены единичными штаммами. Был осуществлён поиск SNPs, маркерных для отдельных подветвей ветви 1.ORI2v. Выяснено, что ветвь 1.ORI2v1, сформированная штаммами P-13226, P-13272 и P-13242, обладает характерным SNP G→A в позиции 2896910 в гене *YPO2577*. На этот SNP были рассчитаны праймеры и получены ампликоны на матрице ДНК 31 штамма, в дальнейшем подвергнутые фрагментному секвенированию. В результате эта нуклеотидная замена была обнаружена у трёх штаммов, выделенных в городе Камрань в 1985–1986 гг. Базируясь на полученных данных, можно сделать вывод, что, ветвь 1.ORI2v1 сформирована преимущественно штаммами, циркулировавшими в портовых городах Камрань и Нячанг в 1985–1987 гг. Исключением стал штамм P-13272, выделенный на плато Тай Нгуен в 1986 году, что по нашему мнению, объясняется его заносом на эту территорию. Другая подветвь, образованная группой из семи штаммов – 1.ORI2v2,3,4, в свою очередь делится на три кластера. (Рисунок 8).

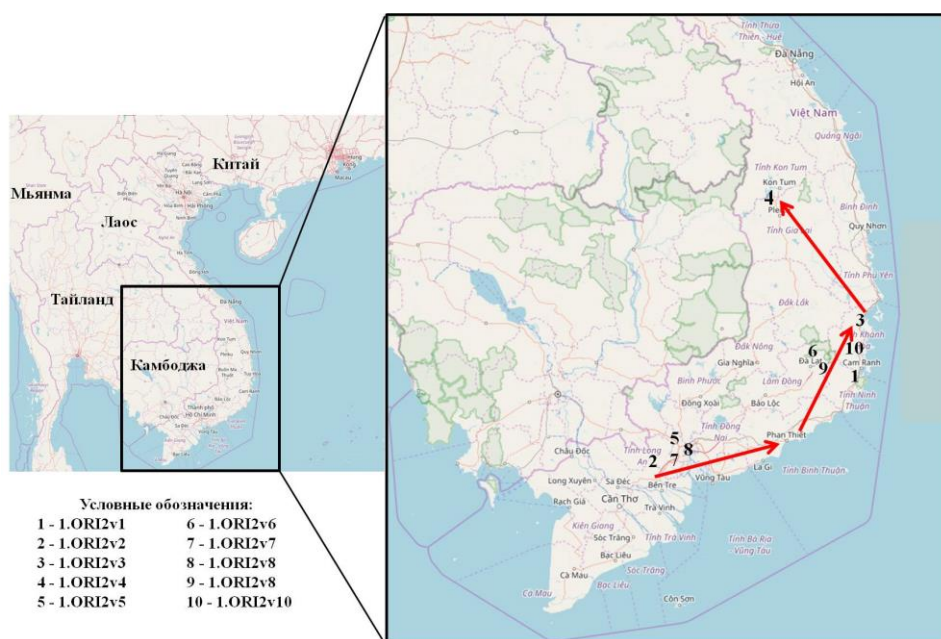


Рисунок 8 – Карта распространения штаммов *Y. pestis* разных генетических подветвей в СРВ. Стрелками указано предполагаемое направление диссеминации штаммов подветви 1.ORI2v2,3,4

В геномах штаммов этой подветви обнаружена маркерная мутация – замена G→A в позиции 2592628 в гене *YPO2305*. Фрагментное секвенирование показало наличие этой мутации в геномах 9 штаммов *Y. pestis*, выделенных в 1981–1982 гг. в городе Хошимин и провинции Донгнай. Со временем популяция 1.ORI2v2,3,4 распространилась на город Нячанг и плато Тай Нгуен, сформировав три кластера 1.ORI2v2, 1.ORI2v3 и 1.ORI2v4. Также к подветви 1.ORI2v2,3,4 относится штамм 78054, выделенный в городе Фантхьет в 1978 г.

Первый кластер подветви 1.ORI2v2,3,4 1.ORI2v2 представлен штаммами, выделенными на территории провинций Лонган и Донгнай в 1978 г. и 1981 г. соответственно. Штаммы этого кластера характеризуются 6 маркерными SNPs, два из которых (C→T в позиции 1723761 в гене *YPO1516* и T→G в позиции 3296601 в гене *YPO2949*) были отобраны для расчёта праймеров. Однако ни один из 31 исследованного штамма не обладал этими генетическими маркерами. Таким образом, кластер 1.ORI2v2 образован двумя штаммами KM751 и 154, выделенными в провинциях, граничащих с городом Хошимин (Лонган с юго-запада, Донг Най с востока). Вероятно, штаммы этого кластера были занесены из провинции Лонган в провинцию Донгнай. Для определения принадлежности штаммов к подветви 1.ORI2v3,4 были выбраны две специфичные нуклеотидные замены, находящиеся в позициях 2128697 (ген *YPO1890*) и 3409393 (ген *YPO3050*). В результате анализа было обнаружено наличие первой замены в геноме штаммов KM753 (Хошимин, 1979 г.) и P-14713 (Нячанг, 1988 г.), а вторая замена была найдена в геномах штаммов KM753, P-14713 и 79052 (Хошимин, 1979 г.). Таким образом, штаммы подветви 1.ORI2v3,4 были распространены в Хошимине, откуда распространились в Нячанг. Кластер 1.ORI2v3 представлен штаммами, выделенными в городе Нячанг в 1985-1989 гг. Штаммы этого кластера имеют в своих геномах одну специфическую замену нуклеотида G→A в позиции 1707224 (межгенное пространство *YPO1503-YPO1504*). Но среди 31 исследованного штамма ни один не имел SNP, отмеченный выше. В итоге кластер 1.ORI2v3 представлен двумя штаммами, выделенными с территорий провинций с крупными портовыми городами. Штаммы P-13273, P-14716, изолированные в 1986–1988 гг. от людей на территории плато Тай Нгуен и города Винь, сформировали кластер 1.ORI2v4, для которого был найден маркерный SNP, представляющий замену C→T в позиции 3974099 в межгенном пространстве *YPO3559-sspB*. Среди 31 изученного штамма, ни один не нёс в своём геноме этого специфичного SNP. Мы полагаем, что, эта ветвь эволюции была распространена на плато Тай Нгуен и в дальнейшем была занесена в провинцию Нгеан.

Другие подветви, входящие в состав ветви 1.ORI2v, образованы единичными штаммами. Подветвь 1.ORI2v5 была сформирована штаммом C.453, выделенным в Хошимине в 1981 г. Для дифференциации этой подветви были обнаружены два специфических SNPs: замена C→T в позиции 3087850 в гене *mmC* и замена G→A в позиции 3875199 в гене *YPO3469*. Эти SNPs были найдены у штамма *Y. pestis* 129 (Хошимин, 1981 г.), и штаммов, выделенных в провинции Донгнай. Таким образом, кла-

стер 1.ORI2v5 сформирован пятью штаммами, выделенными в городе Хошимин и на территории провинции Донгнай, расположенной восточнее него. Штамм 78046, выделенный в 1977 г. в городе Далат, в свою очередь, сформировал подветвь 1.ORI2v6. Для этой подветви характерно наличие двух специфических замен нуклеотидов: замена Т→G в позиции 1865245 в гене *YPO1639* и замена С→Т в позиции 2839029 в гене *menF*. Эти маркерные SNPs не были найдены ни у одного из штаммов, использованных в этом исследовании. Штамм P-14709, выделенный от человека в 1988 году в Хошимине, сформировал отдельный кластер 1.ORI2v7, характеризующийся тремя маркерными SNPs, находящимися в позициях 623437, 2956447 и 3968300 и представляющими собой замены Т→С, С→Т и С→Т соответственно. В результате фрагментного секвенирования было обнаружено наличие этих маркерных SNPs в геномах штаммов, выделенных в разных кварталах города Хошимин в 1987–1989 гг. В итоге, кластер 1.ORI2v7 объединяет более хронологически молодые штаммы, чем штаммы кластеров 1.ORI2v6 и 1.ORI2v2,3,4, распространённых в Хошимине ранее, соответственно в 1977 г. и 1985–1887 гг. Кластер 1.ORI2v8 представлен штаммом Saigon 64-1122, выделенным в Хошимине в 1964 году. Для этого кластера также были найдены маркерные мутации: замены С→Т в позициях 2418621 и 3074669 (соответственно гены *YPO2149*, *fadL*). Проведённый анализ не выявил в геноме ни у одного штамма этих маркерных замен нуклеотида. Кластер 1.ORI2v9 представлен штаммом *Y. pestis* 140 Dalat, выделенным на территории провинции Ламдонг. Для дифференциации этого кластера были обнаружены 2 маркерных полиморфных нуклеотида в позициях 129253 и 441176 (гены *glpR*, *YPO0421*), представляющих собой соответственно замены G→С и А→G. Установлено наличие этих генетических маркеров ещё у двух штаммов – *Y. pestis* 124 Dalat и RN-69, выделенных в провинции Ламдонг в 1981–1982 гг. Штамм Saigon Nhatraung 62/3, выделенный в 1962 г. в городе Нячанг, на дендрограмме образовал кластер 1.ORI2v10, для которого специфичны 3 маркерных SNPs – замены А→G, С→Т и С→G соответственно в позициях 83657, 883030 и 4189423 (гены *срхR*, *cheD*, *nudC*). Однако ни один из этих маркерных SNPs не был обнаружен у изученных штаммов.

Таким образом, в результате проведённого анализа 50 штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории СРВ в период с 1955 г. по 1989 г., для 18 из которых выполнено полногеномное секвенирование, а 32 изучены с помощью фрагментного секвенирования, выяснена их популяционная структура. Установлено, что штаммы из СРВ делятся на несколько филогенетических ветвей: большая часть штаммов формирует ветвь 1.ORI2v, два штамма образовали отдельную ветвь (1.ORI2vi) со штаммом из Индии в структуре ветви 1.ORI2, а штамм 55-801 Saigon находится обособленно в составе 1.ORI1. Ветвь 1.ORI2v делится с формированием десяти подветвей 1.ORI2v1–10, различных по месту и времени выделения сформировавших их штаммов. Некоторые ветви не обрели широкого распространения и были характерны для определённых географических регионов СРВ. На территории провинции Ламдонг со столицей Далат отмечена циркуляция двух подветвей 1.ORI2v6 (1977 г.) и 1.ORI2v9 (1981–1982

гг.), образованных соответственно одним и пятью штаммами. Кроме того, найдена подветвь из шести штаммов 1.ORI2v1, штаммы которой циркулировали в городе Камрань в 1985–1987 гг. В населённом пункте Нячанг установлена циркуляция двух подветвей: более старой 1.ORI2v10 (1962 г.) и более молодой 1.ORI2v3 (1985–1989 гг.). Для города Хошимин были характерны четыре подветви в разные временные интервалы: 1.ORI2v5 (1981 г.) – 6 штаммов, 1.ORI2v7 (1988 г.) – 5 штаммов, 1.ORI2v8 (1964 г.) – 1 штамм, 1.ORI2v2,3,4 (1981–1982 гг.) – 16 штаммов. Обращает на себя внимание филогенетическое родство подветвей 1.ORI2v2, 1.ORI2v3 и 1.ORI2v4 ветви 1.ORI2v2,3,4. Эта ветвь берет своё начало на территории провинции Лонган (1978–1981 гг.) и столице провинции Биньтхуан городе Фантхьет (1978 г.), в последующем распространяется в Хошимин (1981–1982 гг.), после чего – в столицу провинции Кханьхоа город Нячанг (1985–1989 гг.), а в дальнейшем – на плато Тай Нгуен (1986–1988 гг.) и на территорию провинции Нгеан (1988 г.).

Анализ полученных данных служит основанием для предположения, что занос чумы в СРВ происходил несколько раз и обусловлен передачей инфекции синантропными крысами на кораблях из Китая и сухопутным путём с территории близлежащего природного очага чумы в провинции Юньнань. Также, два вьетнамских штамма расположились на дендрограмме в одном кластере с индийским штаммом, что свидетельствует о возможном заносе чумы в СРВ в 1981 году из Индии. Таким образом, проведённый филогенетический анализ штаммов, выделенных на территории Вьетнама, позволил получить новые данные о диссеминации и направлении эволюции штаммов *Y. pestis* восточного биоценоза во время третьей пандемии чумы. На основании полученных результатов научно обоснована теория циркуляции штаммов *Y. pestis* разных генетических ветвей в СРВ. Сконструирован комплекс праймеров для дифференциации штаммов из СРВ по их принадлежности к найденным генетическим подветвям (1.ORI2v, 1.ORI2vi, 1.ORI2v1–10), основанный на детекции маркерных SNPs методом фрагментного секвенирования, который может быть применён при проведении эпидемиологического мониторинга территории СРВ и сопредельных стран Юго-Восточной Азии.

**5.2 Определение внутривидовой принадлежности штамма *Y. pestis* из Илийского межгорного очага.** Нами в рамках работы по внутривидовому типированию штаммов *Y. pestis* из ГКПБ ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора по их принадлежности к основным ветвям эволюции было установлено, что штамм 134(206), выделенный от человека в 1930 году в ауле на реке Или Панфиловского района Алматинской области, не относился к характерной для Илийского межгорного очага ветви эволюции 2.MED1. Целью данного этапа диссертационного исследования было выяснение филогенетической принадлежности штамма 134(206). Для проведения филогенетического анализа и установления принадлежности штамма 134(206) было использовано 58 полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis*. Филогенетический анализ и построение дендрограммы по алгоритму Maximum Likelihood выполняли на основе найденных 1730 коровых SNPs в

нуклеотидных последовательностях 58 штаммов *Y. pestis* (Рисунок 9). Как видно из полученной дендрограммы, штамм 134(206) вошёл в группу штаммов 1.IN1, характерную для провинции Цинхай и Синьцзян-Уйгурского автономного района Китая. Обращает на себя внимание тот факт, что штамм 134(206) образовал кластер со штаммом CMCC11001, выделенным в 1954 г. в провинции Цинхай, и относящимся к подветви 1.IN1a [Cui et al., 2013].

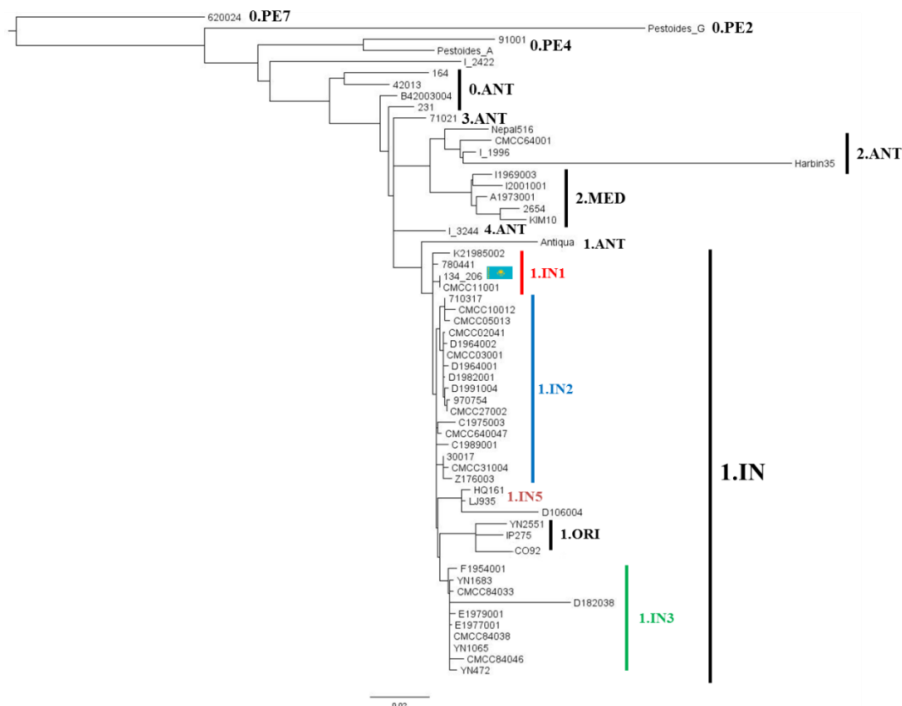


Рисунок 9 – Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* ветви 1.IN на основе найденных 1730 коровых SNPs 58 штаммов из природных очагов мира

Принадлежность штамма 134(206) из Илийского межгорного очага Казахстана к ветви эволюции 1.IN1a можно объяснить его заносом либо через восточную часть Кульджинской равнины, либо через Джунгарские ворота – горный проход между Джунгарским Алатау с запада и хребтом Барлык с востока, соединяющий Балхаш-Алакольскую котловину на территории Казахстана и Джунгарскую равнину в Китае.

**Глава 6 Создание способа индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов патогенности с помощью системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке**

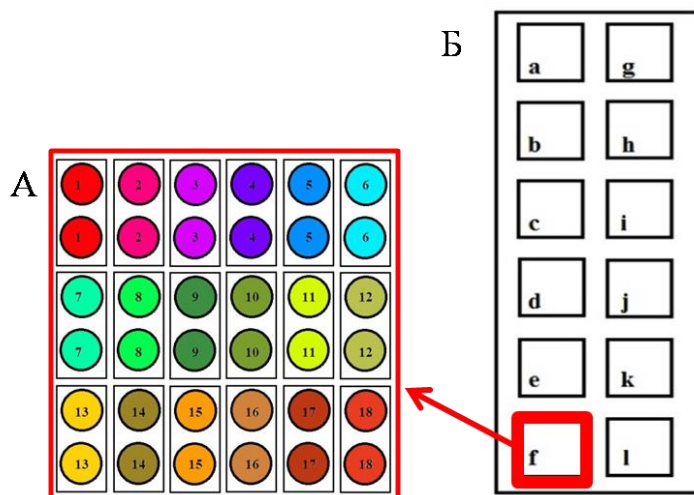
Задачей следующего этапа исследований явилась разработка способа индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов патогенности с помощью системы ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке, позволяющей определять принадлежность штаммов к под-



видам и биоварам: основному, кавказскому (0.PE2), улегейскому (0.PE5), центрально-азиатскому с установлением принадлежности к алтайскому (0.PE4a), гиссарскому (0.PE4h), таласскому (0.PE4t) и *microtus* (0.PE4m) биоварам, а также к античному с выделением ветвей 1.ANT (вместе с 1.IN), 2.ANT и средневековому с установлением принадлежности к филогенетической ветви 2.MED0 и восточному биоварам основного подвида. В начале исследования были отобраны ДНК-мишени, обнаруженные нами ранее или использованные в других работах. Установление принадлежности изучаемых штаммов к виду *Y. pestis* мы проводили с использованием ДНК-мишеней «За» и «yihN» [Куклев, 2007; Radnedge et al., 2001]. Задача по дифференциации штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвигов была решена нами путём использования мишени «45», находящейся в хромосоме в межгенном пространстве *ilvN-ilvB* [Одинокоев и др., 2010], где у штаммов основного подвида наблюдается специфическая делеция 45 п.н. Для дифференциации штаммов кавказского подвида характерна делеция 91 п.н. (мишень «Caucasic») в гене *YPO0445*. У штаммов улегейского подвида маркерной служит делеция 64 п.н. в гене *djIA* (мишень «Uleg»). Штаммы алтайского биовара центральноазиатского подвида несут в своих геномах специфическую делецию 90 п.н., локализованную в гене *YPO1226* (мишень «Alt»); штаммы гиссарского биовара, характеризуются наличием делеции 205 п.н. в гене *YPO2267* (мишень «His»); отличительной чертой штаммов таласского биовара является делеция 72 п.н. в гене *YPO2412* (мишень «Tal»); а особенностью штаммов биовара *microtus* служит делеция 112 п.н. в гене *araC* (мишень «Mict») [Никифоров и др., 2017]. Штаммы восточного биовара (1.ORI) имеют в своих геномах специфичную делецию 93 п.н. в гене *glpD* [Motin et al., 2002], в то время как типичные штаммы средневекового биовара обладают делецией 24 п.н. в межгенном пространстве *gcvT-visC* (мишень «Med24») [Одинокоев и др., 2013]. Штаммы ветви 2.MED0 имеют в своём геноме уникальную плазмиду рСКФ. Как ДНК-мишень (мишень «рСКФ»), специфичную для этой ветви эволюции *Y. pestis*, использовали ген *AIS36186.1*, локализованный на этой плазмиде [Оглодин и др., 2015]. Кроме этого, в разработанной нами системе мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке используются две ДНК-мишени, дающие возможность дифференциации штаммов по их принадлежности к филогенетическим ветвям 1 и 2 основного подвида. Штаммы филогенетической ветви 1 (1.ANT, 1.IN и 1.ORI) несут в своём геноме фаг *cusφ*, являющийся их специфическим маркером. В качестве ДНК-мишени «Phage» в рамках разработанной системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке был использован ген *YPO2273* фага *cusφ*. Штаммы ветви 2 (2.ANT и 2.MED) обладают специфической делецией 70 п.н. в гене *YPO2493* (ДНК-мишень «Med70») [Никифоров, 2016].

Для выяснения присутствия в геноме изучаемых штаммов *Y. pestis* генов основных факторов патогенности нами были использованы праймеры и зонды на ген *irp2* (мишень «irp2») острова высокой патогенности НРІ; ген *pla* (мишень «pla»), расположенный на плазмиде рPst; ген *lcrV* (мишень «lcrV») плазмиды рCad; ген *cafI*

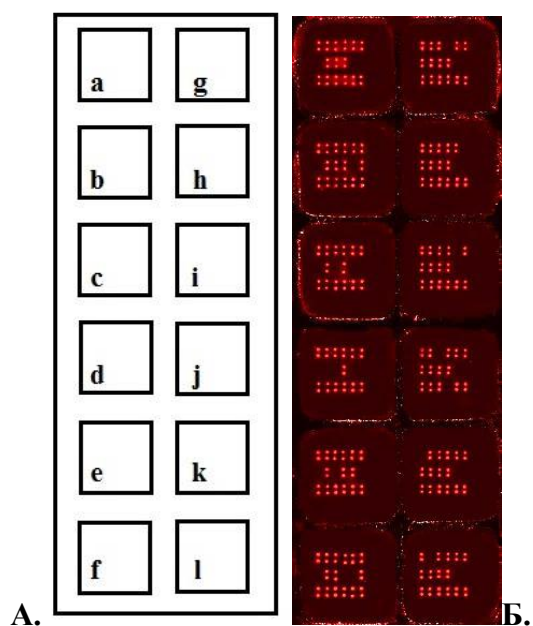
(мишень «caf»), локализованный на плазмиде pFra [Куклев и др., 2013]. (Рисунок 10).



А. Расположение ДНК-мишеней на эрреях: 1 – «Micr», 2 – «Tal», 3 – «Caucasic», 4 – «Alt», 5 – «Uleg», 6 – «His», 7 – «45», 8 – «Med24», 9 – «Med70», 10 – «glpD», 11 – «Pro», 12 – «Phage», 13 – «3a», 14 – «yihN», 15 – «irp2», 16 – «pla», 17 – «lcrV», 18 – «caf1» Б. Расположение эрреев на слайде: a-l – отдельные эрреи на слайде

Рисунок 10 – Организация слайда системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке

На вышеуказанные мишени были рассчитаны праймеры таким образом, чтобы обратный праймер имел в своём составе флуорофор Cy5, а зонд – аминокгруппу на 5'-конце. Синтезированные зонды наносили на поверхность аминослайдов GAPS II Coated Slides, используя миниplotтер «Хаст Microarrayer», как отдельные споты по вертикали в двух повторностях. Группа спотов образовывала эрреи, служащие для проведения анализа отдельных образцов и формирующие слайд (Рисунок 10). Ампликоны для последующей гибридизации получали в ПЦР с использованием шести мультиплексных смесей в отдельных пробирках (в первой смеси – праймеры на мишени «pla», «3a», «caf1», «yihN»; во второй смеси – «irp2», «lcrV»; в третьей смеси – «glpD», «Pro», «Med24», «45»; в четвертой смеси – «Med70», «Phage»; в пятой смеси – «Alt», «His», «Uleg»; в шестой смеси – «Caucasic», «Tal», «Micr»). Для всех смесей была использована единая программа амплификации: 1 цикл – 95 °C – 10 мин; 40 циклов: 95 °C – 25 с, 59 °C – 35 с, 72 °C – 30 с; 1 цикл 72 °C – 3 мин. Полученные ампликоны вносили в ячейки гибридизационной камеры и осуществляли гибридизацию в термошейкере в течение 5 ч при температуре 42 °C и скорости вращения платформы 250 об/мин. После этого выполняли отмывку и проводили учёт результатов с использованием сканера микрослайдов GenePix 4100A и программного обеспечения GenePix Pro 6.0. Анализ эффективности разработанной системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке был проведён с использованием 114 штаммов *Y. pestis*, относящихся к разным подвидам, биоварам и филогенетическим ветвям (Рисунок 11 А, Б). Была показана 100 %-ная специфичность.



А. Схема внесения образцов штаммов *Y. pestis* в систему мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке:  
 a – 0.ANT, b – 1.ANT, c – 2.ANT, d – 2.MED,  
 e – 2.MED0, f – 1.ORI, g – 0.PE4a, h –  
 0.PE4h, i – 0.PE5, j – 0.PE2, k – 0.PE4m, l –  
 0.PE4t; Б. Результат идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, и по наличию основных генов патогенности

Рисунок 11 – Общая схема системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке и визуализация результата её применения

Был получен патент на изобретение «Способ индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям и по наличию генов основных факторов патогенности методом ДНК-чипа» № RU 2734636 С1. Кроме того, была разработана и запатентована «Программа по учёту результатов мультиплексного анализа на биологическом микрочипе для выявления и дифференциации штаммов чумного микроба» № 2021612722 RU, предназначенная для автоматического учёта и интерпретации результатов мультиплексного анализа использования разработанной системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке.

При анализе экспериментальных данных было установлено, что во всех пробах для штаммов каждого подвида и биовара *Y. pestis* была характерна амплификация только соответствующих локусов. На основании полученных данных были разработаны ТУ 21.20.23-056-01898109-2020 для последующего проведения клинических испытаний и изготовлены две экспериментальные серии набора реагентов, получившего название «Набор реагентов для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба методом мультилокусной ПЦР в формате биочипа (Пест-МЛ ПЦР-биочип)», который даёт возможность проводить индикацию возбудителя чумы, определять наличие основных плазмид и дифференцировать штаммы античного (с отдельным выделением ветвей 1.ANT (вместе с 1.IN) и 2.ANT)), средневекового (с отдельным установлением принадлежности к филогенетической ветви 2.MED0) и восточного биоварам основного подвида, и состоящего из 14 компонентов (биочипы, ПЦР-буфер, Taq ДНК-полимераза, ПЦР-смеси 1–4, блокирующий раствор, гибридационный раствор, отмывочные растворы 1 и 2, ТЕ-буфер, среда LB, ПКО ДНК *Y. pestis*). В качестве ДНК-мишеней в разрабатываемом МИ «Пест-МЛ ПЦР-биочип» были отобраны следующие мишени: «3a», «yihN», «irp2», «pla», «caf1», «lcrV», «45»,

«Med24», «Med70», «glpD», «Pro», «Phage». Исследование проб, подозрительных на наличие *Y. pestis*, с помощью набора реагентов «Пест-МЛ ПЦР-биочип» включает в себя следующие этапы: пробоподготовку, обогащение нативного материала в жидкой питательной среде, обеззараживание материала, выделение ДНК, проведение мультилокусных ПЦР, гибридизацию на ДНК-чипе, учёт результатов реакции, интерпретация данных. ПЦР для накопления специфических ампликонов проводили в 4 смесях в отдельных пробирках. Соответственно, в первой ПЦР-смеси использовали праймеры на мишени «3a», «yihN», «caf1», «pla»; во второй смеси – «irp2» и «lcrV»; в третьей – «45», «Med24», «glpD», «Pro»; в четвертой – «Med70» и «Phage».

Проведённые клинические испытания с использованием 156 проб, искусственно контаминированных штаммами возбудителя чумы, и 64 проб, искусственно контаминированных штаммами других видов бактерий, показали, что диагностическая чувствительность и специфичность составили не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90 %. Внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость результатов составили 100 %. Препаратом сравнения в клинических испытаниях был набор реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация-РГФ». Набор реагентов прошёл государственную регистрацию в установленном порядке, в результате чего Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения выдано регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15445 от 02.09.2022. Созданный способ индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов патогенности, и набор реагентов «Пест-МЛ ПЦР-биочип» могут быть применены для проведения молекулярно-генетической идентификации штаммов, выделенных в природных очагах чумы, с установлением их принадлежности к ключевым филогенетическим ветвям и оценки вирулентности.

### **Глава 7 Разработка способа внутривидовой дифференциации основных филогенетических ветвей *Yersinia pestis* методом аллель-специфической ПЦР-РВ**

Дифференциацию штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к основным филогенетическим ветвям можно выполнять путём обнаружения специфических генетических маркеров в их геноме. Метод ПЦР-РВ даёт возможность обнаружения маркерных indel-мутаций. К сожалению, не для всех ветвей эволюции *Y. pestis* обнаружены специфические делеции или вставки, и в связи с этим требуется детекция специфических SNPs, представляющих собой наиболее распространённые генетические маркеры [Soleimani et al., 2003]. Установление наличия характерного SNP возможно с использованием методов фрагментного секвенирования или аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР), однако, для первого требуется значительно больше времени для получения результата.

Целью этого этапа исследования была разработка способа внутривидовой дифференциации основных филогенетических ветвей *Y. pestis*, для которых ранее не было обнаружено эффективных маркерных indel-мутаций, методом аллель-специфических ПЦР-РВ. На основе сравнительного анализа полногеномных последовательностей

штаммов, относящихся к разным филогенетическим ветвям *Y. pestis* были обнаружены SNPs, специфичные для ветвей 0.ANT1 (2283467), 0.ANT2 (418282), 0.ANT3 (2003542), 0.ANT5 (121618), 3.ANT (4466107), 4.ANT (1610851) античного биовара основного подвида; 2.MED0 (574446), 2.MED1 (3596834), 2.MED2 (1458747), 2.MED3 (710418), 2.MED4 (117694) средневекового биовара основного подвида; 1.ORI1 (3244204), 1.ORI2 (42303), 1.ORI3 (1605152) восточного биовара основного подвида; 1.IN1 (общий с 1.ORI) (155747), 1.IN2 (общий с 1.ORI) (364515), 1.IN3 (4147095) биовара *intermedium* основного подвида; ангольского (0.PE3) (4817), тибетского (0.PE7) (35501) и цинхайского (0.PE10) (311386) подвигов (координаты приведены согласно геному референтного штамма CO92 NC\_003143.1). В связи с тем, что SNPs, уникальных для ветвей 1.IN1 и 1.IN2 обнаружено не было, дифференциацию штаммов этих ветвей выполняли с использованием следующего алгоритма. Сначала определяли наличие SNP, специфичного для ветвей 1.IN1 и 1.ORI или 1.IN2 и 1.ORI, затем устанавливали присутствие в гене *glpD* делеции, уникальной для штаммов восточного биовара (1.ORI). При обнаружении маркерного SNP и при отсутствии делеции в гене *glpD* штамм относили к ветви 1.IN1 или 1.IN2 соответственно.

С учётом полученных результатов на обнаруженные маркерные SNPs были рассчитаны праймеры и зонды с использованием программы Vector NTI 11.2. Праймеры были сконструированы таким образом, чтобы маркерный SNP соответствовал нуклеотиду позиции -1 от 3'-конца прямого праймера, который, кроме того, был заменён на LNA-олигонуклеотид. Также в -2 позиции от 3'-конца прямого аллель-специфичного праймера было добавлено неспаренное нуклеотидное основание, которое не было комплементарно ни одному варианту SNP [Li et al., 2004]. На каждый специфический SNP было рассчитано два прямых праймера, первый был комплементарен варианту мутантного типа, характерному для конкретных филогенетических ветвей *Y. pestis* (был обозначен как M), второй – варианту SNP, уникальному для штаммов дикого типа (был обозначен как W). Экспериментальным путём были подобраны оптимальные программы амплификации для проведения АС-ПЦР-РВ со сконструированными праймерами и зондами на приборах типа RotorGene. Специфичность сконструированных праймеров верифицирована с помощью 132 штаммов возбудителя чумы различных филогенетических ветвей.

В результате подтверждено, что экспоненциальный рост уровня флуоресценции в ПЦР-смеси с прямым праймером M, комплементарным последовательности ДНК искомой филогенетической ветви *Y. pestis*, обнаруживался только у штаммов этой ветви. И наоборот, экспоненциальный рост уровня флуоресценции в ПЦР-смеси с прямым праймером W, комплементарном последовательности ДНК, не характерной для искомой филогенетической ветви возбудителя чумы, отмечался у штаммов всех других ветвей эволюции. Поскольку в Государственной коллекции патогенных бактерий при ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора отсутствуют штаммы филогенетических ветвей 0.ANT1, 0.ANT2, 2.MED3, 1.IN2, 1.IN3, 0.PE3, 0.PE7, 0.PE10, проверку специфичности разработанных праймеров и

зондов для дифференциации этих ветвей выполняли на выборке штаммов других направлений эволюции *Y. pestis*, используя две ПЦР-смеси с двумя вариантами аллель-специфического праймера. В результате у всех этих штаммов регистрировался экспоненциальный рост уровня флуоресценции в ПЦР-смеси с прямым праймером W, и отсутствовал в ПЦР-смеси с прямым праймером M. Уровень достоверности наблюдавшихся различий в сигналах флуоресценции между положительными и отрицательными результатами АС-ПЦР-РВ превышал  $p < 0,001$  (вероятность 95 %). Приоритетность данных исследований подтверждена получением патента на изобретение «Способ определения филогенетической принадлежности штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени» № RU 2799415 С1.

Применение разработанного комплекса АС-ПЦР-РВ позволяет значительно повысить оперативность и эффективность эпидемиологического и микробиологического мониторинга природных очагов чумы и проводить молекулярную дифференциацию штаммов *Y. pestis* непосредственно в природных очагах чумы в мобильных лабораториях СПЭБ и лабораториях противочумных станций, что существенно ускорит проведение эпидемиологического расследования вспышек чумы или заносов штаммов *Y. pestis* на территорию Российской Федерации и оптимизирует проведение паспортизации штаммов в коллекционной деятельности.

### **Глава 8 Создание комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis***

В качестве медицинских изделий для *in vitro* диагностики Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения зарегистрированы следующие наборы реагентов: «Ген *Y. pestis* индикация-РГФ», «Ген *Y. pestis* идентификация-РГФ», «Ампли-Сенс *Y. pestis*-FL», «ОМ-Скрин-Чума-РВ», которые позволяют проводить индикацию и идентификацию штаммов *Y. pestis*. Ранее нами и нашими коллегами были проведены исследования по разработке методов молекулярного типирования возбудителя чумы, поиску специфических ДНК-мишеней и разработке способов дифференциации подвидов и биоваров *Y. pestis* с помощью методов ПЦР с электрофоретическим и гибридационно-флуоресцентным учётом результатов [Одиноков и др., 2011, 2013; Никифоров и др., 2017; Носов и др., 2019]. Кроме того в качестве экспериментальных комплектов сконструированы праймеры и зонды, позволяющие проводить дифференциацию ряда филогенетических ветвей *Y. pestis*: средневекового и восточного биовара основного подвида, некоторых ветвей средневекового биовара и филогенетической ветви 4.ANT [Одиноков и др., 2013; Оглодин и др., 2015; Носов и др., 2016; Motin et al., 2002]. Но эти разработки носили разрозненный характер. Отсутствовала комплексная молекулярно-генетическая система дифференциации штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к подвидам, биоварам, филогеографическим популяциям, обеспечивающая определение происхождения и эпидемической значимости штаммов возбудителя. Нерешённой задачей оставалось определение принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT антично-

го биовара, 2.MED4 средневекового биовара, 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3 восточного биовара, 1.IN1, 1.IN2, 1.IN3 биовара *intermedium*, ангольскому (0.PE3) и тибетскому (0.PE7) и цинхайскому (0.PE10) подвидам *Y. pestis*. Также в усовершенствовании нуждалась подвиговая классификация *Y. pestis*, которая лишь частично учитывала всё генетическое разнообразие *Y. pestis*, в том числе из природных очагов России и сопредельных государств. Отсутствовала детализация популяционных структур основных подвидов *Y. pestis*, циркулирующих в России в очагах Кавказа и Сибири и в очагах сопредельных государств.

Создание комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к определённым ветвям эволюции необходимо для обеспечения эффективного микробиологического мониторинга природных очагов чумы РФ, трансграничных очагов чумы и очагов стран ближнего и дальнего зарубежья в целях предотвращения завоза этой особо опасной инфекции и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия территории РФ. В настоящем диссертационном исследовании такая комплексная система была разработана с применением точных молекулярно-генетических методов ПЦР-РВ и систем мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке, обеспечивающих детекцию специфических протяжённых *indel*-мутаций или SNPs.

Первым этапом предлагаемой комплексной системы является индикация возбудителя чумы с использованием сконструированных ранее праймеров и зондов [Куклев, 2007]. Её выполнение возможно на региональном и федеральном уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ. После этого проводится определение принадлежности штаммов *Y. pestis* к определённым подвидам (основной, кавказский, улегейский, центральноазиатский подвиды, в том числе алтайский, гиссарский, таласский и *microtus* биовары центральноазиатского подвида) методом ПЦР-РВ, в основе которого лежит определение наличия *indel*-мутаций. Использование этого метода также возможно на региональном и федеральном уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ при наличии необходимого оборудования и специалистов. Также установление принадлежности штаммов *Y. pestis* к конкретным подвидам, биоварам основного и центральноазиатского подвидов и основным филогенетическим линиям основного подвида возможно с использованием системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке. С помощью разработанной системы появилась возможность проводить определение наличия *indel*-мутаций, указывающих на принадлежность исследуемого штамма возбудителя чумы к основному, кавказскому, улегейскому, центральноазиатскому (с дифференциацией биоваров алтайского, гиссарского, таласского и *microtus*) подвидам, а кроме того, к античному (с выделением ветвей 1.ANT (вместе с 1.IN) и 2.ANT), средневековому (с выделением ветви 2.MED0) и восточному биоварам основного подвида. Применение этой системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке возможно на федеральном уровне системы лабораторной диагностики инфекционных

болезней РФ при наличии необходимого оборудования и специалистов. На следующем этапе с помощью метода АС-ПЦР-РВ выполняется определение принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT, 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3, 2.MED4, 1.IN1, 1.IN2, 1.IN3, 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3, 0.PE3, 0.PE7 и 0.PE10. Этот комплекс АС-ПЦР-РВ перспективен для применения на региональном и федеральном уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ, при наличии соответствующего оборудования и специалистов

Использование разработанной комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* обеспечит повышение эффективности и оперативности мониторинга активности природных очагов чумы и проведения дифференциации штаммов *Y. pestis* на региональном и федеральном уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней Российской Федерации, а также значительно упростит выполнение внутривидовой дифференциации при осуществлении эпидемиологического расследования вспышек и заносов штаммов возбудителя чумы на территорию России, и при проведении паспортизации штаммов *Y. pestis* в рамках коллекционной деятельности.

Использование новейших молекулярно-генетических методов, таких как ПЦР-РВ, АС-ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке, обладающих высокой чувствительностью, информативностью и объективностью получаемых результатов, будет вносить свой вклад в усовершенствование применяемой в настоящее время системы методов и подходов осуществления всестороннего анализа и понимания эпидемиологической ситуации инфекционных болезней. Полученные при проведении диссертационного исследования результаты представляют значительный интерес для последующих фундаментальных исследований возбудителя чумы. Перспективными направлениями дальнейших исследований являются: анализ популяционной структуры других филогенетических ветвей вида *Y. pestis* (гиссарский, таласский, *microtus* биовары центральноазиатского подвида, ветви 1.ANT, 2.ANT и 3.ANT античного биовара основного подвида, более детальное изучение разнообразия штаммов средневекового биовара основного подвида); реконструкция распространения штаммов во время трёх пандемий с использованием большего числа палеогеномных последовательностей, которая обеспечит установление направлений эволюции возбудителя чумы; анализ влияния найденных в генах патогенности неосновных подвидов мутаций на вирулентность в экспериментах, в том числе с использованием сайт-направленных мутаций; внедрение новейших диагностических методов (цифровая ПЦР, изотермическая амплификация, аптамеры, биосенсоры, ДНК-оригами и ДНК-наномашинны, нейросети) в работу противочумной системы Российской Федерации для дальнейшего совершенствования системы внутривидовой дифференциации филогенетических ветвей *Y. pestis* и проведения молекулярно-эпидемиологического мониторинга природных очагов чумы.



## ВЫВОДЫ

1. По результатам филогенетического анализа штаммов *Y. pestis* кавказского и улегейского подвидов из очагов РФ и сопредельных государств определена их современная популяционная структура и установлено, что штаммы линии 0.PE2 кавказского подвида делятся на три независимые ветви: I из Восточно-Кавказского высокогорного; II из Присеванского горного, Зангезуро-Карабахского горного, Приараксинского низкогорного природных очагов; III из северо-западной части Кавказского нагорья. В составе линии 0.PE5 улегейского подвида выявлено две ветви эволюции: штаммы из южных аймаков Монголии Умнеговь, Уверхангай и Говь-Алтай и из западных аймаков Баян-Улгий и Ховд. Обнаружены мутации в генах, ассоциируемых с патогенностью *Y. pestis*, у штаммов кавказского (*astD*, *fyuA*, *hmsF*, *hmsT*, *yopH*, *yopT*, *uscG* и *uscU*) и улегейского (*uscQ*) подвидов, которые могут быть причиной их избирательной вирулентности. Разработаны способы определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям (0.PE5/1, 0.PE5/2-1, 0.PE5/2-2) улегейского подвида и филогенетическим ветвям I, II (отдельно IIa, IIb, IIc) и III кавказского подвида методом фрагментного секвенирования.

2. Установлено, что центральноазиатский подвид образован 4 биоварами – алтайским 0.PE4a, гиссарским 0.PE4h, таласским 0.PE4t и *microtus* 0.PE4m. Штаммы из китайской провинции Цинхай, ранее относимые к линии 0.PE4, выделены в самостоятельный цинхайский подвид – *spp. qinghaica* и в отдельную линию 0.PE10. В геномах штаммов центральноазиатского подвида найдена мутация в гене *ybtS*, ассоциируемым с патогенностью *Y. pestis*, которая может быть причиной их избирательной вирулентности. Разработан эффективный способ дифференциации штаммов центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ. В составе алтайского биовара выявлены 4 отдельные популяции – Курайская, Тархатинская, Уландрыкская и Монгольская. Разработан способ определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к отдельным подветвям алтайского биовара центральноазиатского подвида (0.PE4a-1 (отдельно к кластерам 0.PE4a-1-1 и 0.PE4a-1-2), 0.PE4a-2 (отдельно кластеру 0.PE4a-2-2)) методом фрагментного секвенирования. Предложено усовершенствование внутривидовой классификации вида *Y. pestis*, согласно которой выделяется семь подвидов: основной, *spp. pestis*; тибетский, *spp. tibetica* (0.PE7); кавказский, *spp. caucasica* (0.PE2); ангольский, *spp. angolica* (0.PE3); центральноазиатский, *spp. central asiatica* (в который входят штаммы четырёх биоваров: алтайского (0.PE4a), гиссарского (0.PE4h), таласского (0.PE4t) и *microtus* (0.PE4m)); цинхайский, *spp. qinghaica* (0.PE10); улегейский, *spp. ulegeica* (0.PE5).

3. Обоснована необходимость эффективной дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов с одновременной дифференциацией алтайского биовара центральноазиатского подвида, методически определён и разработан способ проведения *in vitro* диагностики методом ПЦР-РВ (ПЦР-тест система «ГенПест-подвид/алтай-РГФ»), позволяющий проводить детекцию и дифференциацию штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, включая отдельно

алтайский биовар центральноазиатского подвида. Созданная ПЦР тест-система характеризуется высокой специфичностью (99 %) и чувствительностью (98,6 %).

4. По результатам исследования филогенетического разнообразия штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы Социалистической Республики Вьетнам установлено, что они делятся на три основные филогенетические ветви 1.ORI1vi, 1.ORI2vi и 1.ORI2v (включает десять подветвей 1.ORI2v1–10). С помощью разработанного комплекта праймеров для дифференциации штаммов из СРВ, основанного на выявлении маркерных SNPs, определены ареалы SNP-генотипов и направления распространения *Y. pestis* восточного биовара в СРВ в период третьей пандемии чумы.

5. Реализован в виде системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке способ индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов патогенности, с использованием 18 ДНК-мишеней, включая набор реагентов для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба методом мультилокусной ПЦР в формате биочипа («Пест-МЛ ПЦР-биочип»), характеризующийся аналитической чувствительностью не менее  $1 \times 10^3$  м.к./мл, диагностической чувствительностью и специфичностью не менее 99,0 %.

6. Для проведения внутривидовой дифференциации штаммов филогенетических ветвей *Y. pestis* 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT, 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED4, 1.IN1, 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3 разработан комплекс аллель-специфических ПЦР с учётом результатов в режиме реального времени, а для дифференциации филогенетических ветвей 0.ANT1, 0.ANT2, 2.MED3, 1.IN2, 1.IN3, 0.PE3, 0.PE7, 0.PE10 сконструированы и частично апробированы праймеры и зонды для АС-ПЦР-РВ.

7. Научно обоснована и разработана комплексная система молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis*, основанная на совокупности методов (ПЦР-РВ, аллель-специфической ПЦР-РВ и системе мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке), обеспечивающих дифференциацию подвигов и биоваров *Y. pestis* с разной эпидемической значимостью: кавказского (0.PE2), улегейского (0.PE5) подвигов; алтайского (0.PE4a), гиссарского (0.PE4h), таласского (0.PE4t) и *microtus* (0.PE4m) биоваров центральноазиатского подвида; филогенетических ветвей 1.ANT, 2.ANT, 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT античного биовара основного подвида, 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED4 средневекового биовара основного подвида, 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3 восточного биовара основного подвида, 1.IN1 биовара *intermedium* основного подвида, а также разработан алгоритм их применения для быстрого и надёжного микробиологического мониторинга в природных очагах чумы.

#### **Список основных работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Куклева, Л.М. Молекулярно-генетические и фенотипические особенности штаммов возбудителя чумы, выделенных во Вьетнаме [Текст] / Л.М. Куклева,

**К.А. Никифоров**, Ж.В. Альхова, Н.И. Романов, Н.Ю. Носов, А.В. Фадеева, А.Н. Малахаева, Н.А. Шарапова, З.Л. Девдариани, Ю.А. Попов, Г.А. Ерошенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 4. – С. 45-49. (из «Перечня ВАК...»)

2. Kutyrev, V.V. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States [Text] / V.V. Kutyrev, G.A. Eroshenko, V.L. Motin, N.Y. Nosov, J.M. Krasnov, L.M. Kukleva, **К.А. Никифоров**, Z.V. Al'khova, E.G. Oglodin, N.P. Guseva // Front. Microbiol. – 2018. – № 9:1106.

3. **Никифоров, К.А.** Популяционная структура, таксономия и генетические особенности штаммов *Yersinia pestis* центральноазиатского подвида [Текст] / **К.А. Никифоров**, О.А. Морозов, Н.Ю. Носов, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Генетика. – 2018. – Т. 54, № 10. – С. 1142-1151. (из «Перечня ВАК...»)

4. **Никифоров, К.А.** Филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* кавказского подвида из очагов Кавказа и Закавказья по данным полногеномного секвенирования [Текст] / **К.А. Никифоров**, Ж.В. Альхова, Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, Е.Г. Оглодин, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Генетика. – 2019. – Т. 55, № 4. – С. 398-405. (из «Перечня ВАК...»)

5. **Никифоров, К.А.** Филогения и историко-географический анализ штаммов *Yersinia pestis* из Вьетнама [Текст] / **К.А. Никифоров**, Л.М. Куклева, Ж.В. Альхова, Е.Г. Оглодин, М.А. Макашова, Е.А. Нарышкина, Н.П. Гусева, Г.А. Ерошенко, Н.С. Dang, Т.М. Lyong, V.K. Vo, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 98-107. (из «Перечня ВАК...»)

6. **Никифоров, К.А.** Филогеографический анализ штаммов *Yersinia pestis* улегейского подвида [Текст] / **К.А. Никифоров**, Л.М. Куклева, Ж.В. Альхова, Е.А. Нарышкина, Н.П. Гусева, Г.А. Ерошенко, Е.Г. Токмакова, С.В. Балахонов, В.В. Кутырев // Генетика. – 2020. – Т. 56, № 7. – С. 783-791. (из «Перечня ВАК...»)

7. **Никифоров, К.А.** Конструирование системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке для индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы [Текст] / **К.А. Никифоров**, Д.В. Уткин, М.А. Макашова, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Биотехнология. – 2020. – Т. 36, № 3. – С. 46-56. (из «Перечня ВАК...»)

8. **Никифоров, К.А.** Конструирование набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» [Текст] / **К.А. Никифоров**, Л.М. Куклева, Д.А. Ситмбетов, Н.А. Осина, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 4. – С. 90-95. (из «Перечня ВАК...»)

9. Попов, Н.В. Эпидемиологическая ситуация по чуме в 2020 г. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации и других стран СНГ на 2021 г. [Текст] / Н.В. Попов, Г.А. Ерошенко, И.Г. Карнаухов, А.А. Кузнецов, А.Н. Матросов, А.В. Иванова, Е.Г. Оглодин, **К.А. Никифоров**, В.М. Корзун, Д.Б. Вержуцкий, Е.В. Чипанин, Т.З. Аязбаев, А.К. Джапарова, С.К. Бердиев, А.А. Лопатин, В.М. Дубянский, С.А. Щербакова, С.В. Балахонов, А.Н. Куличенко, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 1. – С. 52-62. (из «Перечня

ВАК...»)

10. **Никифоров, К.А.** Штаммы *Yersinia pestis* линии 1.ORI как этиологический агент III пандемии чумы [Текст] / **К.А. Никифоров** // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 3. – С. 23-37. (из «Перечня ВАК...»)

11. **Никифоров, К.А.** Современные молекулярно-генетические методы и перспективы их применения для индикации и идентификации штаммов *Yersinia pestis* [Текст] / **К.А. Никифоров** // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 4. – С. 29-40. (из «Перечня ВАК...»)

12. **Никифоров, К.А.** Анализ пространственной структуры популяции *Yersinia pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида по данным полногеномного секвенирования [Текст] / **К.А. Никифоров**, О.А. Морозов, Г.А. Ерошенко, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, Я.М. Краснов, В.М. Корзун, С.В. Балахонов, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 1. С. 122-129. (из «Перечня ВАК...»)

13. **Никифоров, К.А.** Конструирование системы аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени для определения филогенетической принадлежности штаммов *Yersinia pestis* [Текст] / **К.А. Никифоров**, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, М.А. Макашова, А.Н. Балыкова, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Биотехнология. – 2022. – Т. 38, № 3. – С. 82-91. (из «Перечня ВАК...»)

14. **Никифоров, К.А.** Разработка комплексной системы молекулярно-генетической идентификации штаммов *Yersinia pestis* [Текст] / **К.А. Никифоров**, Е.Г. Оглодин, М.А. Макашова, А.Н. Балыкова, Д.В. Уткин, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 1. С.126–131. (из «Перечня ВАК...»)

15. **Никифоров, К.А.** Пат. 2734636 РФ, МПК C12Q 1/68. Способ индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы по их принадлежности к виду *Yersinia pestis*, к подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям и по наличию генов основных факторов патогенности методом ДНК-чипа [Текст] / **К.А. Никифоров**, Д.В. Уткин, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев. Опубл. 21.10.2020, Бюл. № 30.

16. Уткин, Д.В. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ 2021612722. Программа по учёту результатов мультиплексного анализа на биологическом микрочипе для выявления и дифференциации штаммов чумного микроба [Текст] / Д.В. Уткин, Д.А. Ситмбетов, **К.А. Никифоров**, Н.А. Осина. Регистрация в Реестре программ для ЭВМ 19.01.2023 г.

17. **Никифоров, К.А.** Пат. 2799415 РФ, МПК C12N 1/00. Способ определения филогенетической принадлежности штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени [Текст] / **К.А. Никифоров**, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев. Опубл. 05.07.2023, Бюл. № 19.

18. Балыкова, А.Н. Разработка способов дифференциации штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара методами ПЦР-РВ и SNP-типирования [Текст] / А.Н.

Балыкова, Н.Ю. Носов, **К.А. Никифоров**, Ж.В. Альхова, Г.А. Ерошенко // Материалы XIV Межгосударственной научно-практической конференции, посвящённой 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб" «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» (Саратов, 20–21 ноября 2018 г.) – Саратов, 2018 – С. 38-40.

19. Носов, Н.Ю. Комплексное использование SNP-анализа и MLVA как точный инструмент молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов РФ и сопредельных государств [Текст] / Н.Ю. Носов, **К.А. Никифоров**, Н.А. Шарапова, Ж.В. Альхова // Материалы X Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Москва, 24–26 октября 2018 г.) – Москва, 2018 – С. 238-239.

20. Морозов, О.А. Разработка способа дифференциации *Yersinia pestis* основного и центральноазиатского подвидов и *Y. pseudotuberculosis* методом мультиплексной ПЦР с электрофоретическим и гибридационно-флуоресцентным учётом результатов [Текст] / О.А. Морозов, **К.А. Никифоров**, Е.Г. Оглодин // Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 02–04 октября 2019 г.) – Уфа, 2019 – С. 264-268.

21. Eroshenko, G.A. Phylogenetic diversity of *Yersinia pestis* strains in the plague foci of Russia and Mongolia [Text] / G.A. Eroshenko, Alkhova Zh.V., Kukleva L.M., **Nikiforov K.A.**, Kutuyev V.V. // 23-я Международная научная конференция "Актуальные вопросы зоонозных инфекций" (Улаанбаатар, 29 мая 2019 г.) – Улаанбаатар, 2019 – С. 19.

22. **Никифоров, К.А.** Создание системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis* [Текст] / **К.А. Никифоров**, Е.Г. Оглодин, Д.В. Уткин, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Молекулярная диагностика и биобезопасность-2020" (Москва, 19–20 марта 2020 г.) – Москва, 2020 – С. 80.

23. Балыкова, А.Н. Молекулярно-генетический анализ штаммов *Yersinia pestis* филогенетической ветви 2.MED4 средневекового биовара [Текст] / А.Н. Балыкова, Ж.В. Альхова, **К.А. Никифоров**, Г.А. Ерошенко // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Молекулярная диагностика и биобезопасность-2020" (Москва, 19–20 марта 2020 г.) – Москва, 2020 – С. 46.

24. **Никифоров, К.А.** Разработка системы аллель-специфических ПЦР в режиме реального времени для дифференциации штаммов *Yersinia pestis* античного и средневекового биоваров разных филогенетических линий [Текст] / **К.А. Никифоров**, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, М.А. Макашова, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Всероссийская научно-практическая конференция «Национальные приоритеты России» – Омск, 2021 – № 3(42). – С. 222-225.

25. **Никифоров, К.А.** Популяционная структура штаммов улегейского под-

вида *Yersinia pestis* [Текст] / **К.А. Никифоров**, Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 100-летию академика И.Н. Блохиной «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы» (Нижний Новгород, 26–27 апреля 2021 г.) – Нижний Новгород, 2021 – С. 167-170.

26. **Никифоров, К.А.** Популяционная структура штаммов кавказского подвида *Yersinia pestis* [Текст] / **К.А. Никифоров**, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Г. А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 100-летию академика И.Н. Блохиной «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы» (Нижний Новгород, 26–27 апреля 2021 г.) – Нижний Новгород, 2021 – С. 170-172.

27. **Никифоров, К.А.** Система молекулярной идентификации штаммов *Yersinia pestis* из очагов чумы России и других стран СНГ [Текст] / **К.А. Никифоров**, Д.В. Уткин, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Сборник материалов конгресса с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022» (Москва, 27–28 апреля 2022 г.) – Москва, 2022 – С. 94.

28. **Nikiforov, K.A.** Improvement of the Complex Molecular Genetic System of Rapid Intraspecific Differentiation of *Y. pestis* strains [Text] / **К.А. Nikiforov**, D.V. Utkin, E.G. Oglodin, L.M. Kukleva, G.A. Eroshenko, V.V. Kutyrev // Proceedings of the International Symposium «Yersinia 14» (Санкт-Петербург, 26–28 сентября 2022 г.) – Санкт-Петербург, 2022 – С. 61.

29. **Никифоров, К.А.** Обнаружение штамма *Yersinia pestis* биовара *intermedium* на территории республики Казахстан [Текст] / **К.А. Никифоров** // Сборник тезисов IX Международной конференции молодых учёных: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков «OpenBio» (Кольцово, 27–29 сентября 2022 г.) – Кольцово, 2022 – С. 606-607.

30. Актуальные направления и перспективы Российско-Вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия: коллективная монография / Под редакцией д.м.н. проф. А.Ю. Поповой и д.м.н., доц. А.В. Топоркова. – Волгоград.: «Волга-Пресс», 2019. – 400 с.

31. Специфическая профилактика чумы: состояние и перспективы: монография / Под редакцией д.м.н. проф. А.Ю. Поповой и академика РАН, д.м.н., проф. В.В. Кутырева. – Саратов.: ООО «Амирит», 2021. – 304 с.

32. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств: коллективная монография / Под редакцией д.м.н. проф. А.Ю. Поповой и академика РАН, д.м.н., проф. В.В. Кутырева. – Калининград.: РА «Полиграфычъ», 2022. – 348 с.



Подписано к печати 25.09.2023  
Формат 60 x 80 1/16. Печать лазерная. Бумага офисная  
Объем 2,0 усл. п. л. Тираж 150 экз.  
Отпечатано на полиграфическом оборудовании ФКУН РосНИПЧИ «Микроб»  
Роспотребнадзора  
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46