

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95

УДК 616.98:579.842.23:616-07

К.А. Никифоров, Л.М. Куклева, Д.А. Ситмбетов, Н.А. Осина, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев

КОНСТРУИРОВАНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ГЕНПЕСТ-ПОДВИД/АЛТАЙ-РГФ»

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель – разработка набора реагентов, позволяющего проводить детекцию ДНК возбудителя чумы в пробах клинического и биологического материала, объектов окружающей среды с одновременным определением его принадлежности к основному и неосновным подвидам, дифференциацией отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида. **Материалы и методы.** На специфические генетические маркеры подобраны комплекты праймеров с помощью программы VectorNTI 10, определены оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции для приборов типа RotorGene. Для оценки специфичности и чувствительности разработанного набора реагентов использовано 44 штамма микроорганизмов, из которых 19 *Yersinia pestis* и 25 штаммов гетерологичных микроорганизмов. Диагностическая чувствительность «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» – не менее 98,6 % при доверительной вероятности 91 %. Диагностическая специфичность «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» – не менее 99 % при доверительной вероятности 91 %. **Результаты и обсуждение.** Разработано медицинское изделие «Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвигов (отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида) методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ГенПест-подвид/алтай-РГФ)». Набор реагентов прошел государственную регистрацию в установленном порядке. Применение разработанного набора реагентов является актуальным для Горно-Алтайского высокогорного очага чумы РФ и сопредельной части Монголии.

Ключевые слова: чума, возбудитель чумы, подвиговая дифференциация, алтайский биовар, центральноазиатский подвид, ПЦР-тест-система.

Корреспондирующий автор: Никифоров Константин Алексеевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ситмбетов Д.А., Осина Н.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ». Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 4:90–95. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95

Поступила 04.03.2021. Отправлена на доработку 25.10.2021. Принята к публ. 15.11.2021.

K.A. Nikiforov, L.M. Kukleva, D.A. Sitmbetov, N.A. Osina, G.A. Eroshenko, V.V. Kutyrev

Construction of the Reagent Panel “GenPest-subspecies/Altai-RGF”

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to develop a test system that allows for detecting plague pathogen DNA in clinical and biological samples, environmental objects with the simultaneous determination of its appurtenance to the main and non-main subspecies, differentiation of the altai biovar *central asiatica* subspecies separately. **Materials and methods.** Primer sets for specific genetic markers have been selected using the VectorNTI 10 software, optimal conditions for PCR were determined for RotorGene devices. To assess the specificity and sensitivity of the developed set of reagents, 44 strains of microorganisms were used, of which 19 were *Yersinia pestis* strains and 25 strains of heterologous microorganisms. The diagnostic sensitivity of “GenPest-subspecies/Altai-RGF” is 98.6 % with a confidence level of probability of 91 %. The diagnostic specificity of “GenPest-subspecies/Altai-RGF” is ≥ 99 % with a confidence level of 91 %. **Results and discussion.** A medical product “A set of reagents for the detection and differentiation of plague pathogen strains of the main and non-main subspecies (altai biovar, subspecies *central asiatica* exclusively) by the polymerase chain reaction with hybridization-fluorescent registration of results in real-time mode (GenPest-subspecies/Altai-RGF)” has been developed. The set of reagents passed the state registration in accordance with the established procedure. The use of the developed set of reagents is relevant for the Gorno-Altai high-mountain plague focus of the Russian Federation and the adjacent part of Mongolia.

Key words: plague, plague agent, subspecies differentiation, altai biovar, subspecies *central asiatica*, PCR test system.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Konstantin A. Nikiforov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sitmbetov D.A., Osina N.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Construction of the Reagent Panel “GenPest-subspecies/Altai-RGF”. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:90–95. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95

Received 04.03.2021. Revised 25.10.2021. Accepted 15.11.2021.

Nikiforov K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4115-9486>

Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>

Osina N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>

Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Чума представляет собой зооантропонозную бактериальную особо опасную инфекцию. Природные очаги чумы описаны в разнообразных ландшафтно-географических зонах. На территории

стран СНГ и ближнего зарубежья находятся 45 природных очагов чумы [1]. Штаммы *Yersinia pestis* отличаются по вирулентности, эпидемиологической значимости и биохимическим свойствам.

До недавнего времени в Российской Федерации применялась внутривидовая классификация возбудителя чумы, в соответствии с которой вид *Y. pestis* разделялся на пять подвидов – основной и неосновные: кавказский (штаммы которого уникальны для Кавказского региона, занимающего территорию РФ, Азербайджана, Армении и Грузии); алтайский (штаммы которого распространены в Алтайских горах РФ и Монголии); гиссарский (штаммы которого циркулируют только на территории Таджикистана); улегейский (штаммы которого описаны только на территории Монголии). В 2018 г. осуществлено усовершенствование внутривидовой классификации *Y. pestis*, согласно которой описываются семь подвидов: основной, ангольский (0.PE3), кавказский (0.PE2), тибетский (0.PE7), улегейский (0.PE5), центральноазиатский (0.PE4) и цинхайский (0.PE10). Центральноазиатский подвид объединяет четыре биовара: алтайский (0.PE4a), гиссарский (0.PE4h), таласский (0.PE4t) и *microtus* (0.PE4m) [2, 3]. Усовершенствованная классификация *Y. pestis* обсуждалась и получила одобрение на Межведомственном совещании по санитарной охране территории Российской Федерации в Саратове 12–13 декабря 2019 г. Штаммы основного подвида отличаются от штаммов неосновных подвида высокими вирулентностью и эпидемической значимостью.

В 2014–2016 гг. в Горно-Алтайском высокогорном очаге на территории Республики Алтай впервые официально подтверждены случаи чумы человека [4, 5]. Ранее в данном очаге отмечалась циркуляция только штаммов алтайского биовара центральноазиатского подвида (ранее – алтайский подвид), который, согласно имеющимся данным, никогда не вызывал случаев чумы у людей. Сейчас в Горно-Алтайском высокогорном очаге отмечается одновременная циркуляция как штаммов основного подвида, так и алтайского биовара центральноазиатского подвида, различных по вирулентности и эпидемической значимости. На основании перечисленных выше фактов актуальной становится задача по созданию быстрого и эффективного способа дифференциации основного и неосновных подвида, отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида.

Перспективным молекулярно-генетическим методом решения этой задачи является полимеразная цепная реакция с учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [6–9]. Метод ПЦР-РВ массово используется для выявления и ускоренной идентификации штаммов чумного микроба [7, 8, 10]. Разработаны и зарегистрированы в установленном порядке тест-системы для молекулярной диагностики чумы: набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени «Ген *Yersinia pestis* индикация-РГФ» (регистрационное удостоверение ФСР 2011/12106); набор реагентов для ускоренной идентификации штаммов *Y. pestis*

методом мультилокусной ПЦР в режиме реального времени «Ген *Y. pestis* идентификация – РГФ» (рег. уд. ФСР 2011/12105)»; набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* в биологическом материале от людей и животных, в блохах и клещах, погачках птиц и почве методом ПЦР-РВ «АмплиСенс *Yersinia pestis*-FL» (рег. уд. ФСР 2012/13303); набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителя чумы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «ОМ-Скрин-Чума-РВ» (рег. уд. РЗН 2015/2993). Однако данные препараты не позволяют одновременно выявить патоген и определить его принадлежность к основному подвиду или алтайскому биовару центральноазиатского подвида, что важно при проведении молекулярно-эпидемиологического мониторинга *Y. pestis* в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге.

Цель этого исследования заключалась в создании набора реагентов по детекции ДНК *Y. pestis* в пробах клинического и биологического материала, объектов окружающей среды параллельно с выяснением принадлежности к основному и неосновным подвидам и отдельной дифференциацией алтайского биовара центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ.

Материалы и методы

Штаммы. В исследовании применено 44 штамма микроорганизмов, из которых: 19 – *Y. pestis*, 2 – *Y. pseudotuberculosis*, 1 – *Y. enterocolitica*, 1 – *Enterobacter kobei*, 1 – *E. faecal*, 1 – *E. cloacae*, 1 – *Legionella pneumophila*, 3 – *Escherichia coli*, 1 – *Staphylococcus epidermidis*, 2 – *Listeria monocytogenes*, 1 – *E. aerogenes*, 1 – *Citrobacter braakii*, 1 – *C. youngae*, 1 – *S. aureus*, 1 – *Salmonella enteritidis*, 1 – *S. saprophyticus*, 1 – *Pseudomonas aeruginosa*, 1 – *Shigella flexneri*, 1 – *S. gallinarum*, 1 – *Proteus mirabilis*, 1 – *P. vulgaris*, 1 – *Klebsiella pneumoniae*. Все использованные штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Выращивание штаммов, определение их биохимических свойств выполняли согласно общепринятым методикам [11] в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Из культур микроорганизмов делали суспензии в растворе хлористого натрия согласно стандартному образцу мутности в 10 ед. ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ОСО 42-28-59-86П), что аналогично концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл. После этого получали 10-кратные разведения суспензий до итоговых концентраций $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^2$ м.к./мл. Количество клеток в этих разведениях определяли, проводя высевы на три чашки Петри с необходимой средой.

Оценку специфичности и чувствительности разрабатываемого набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» проводили с использованием имитации

проб клинического материала (кровь, ликвор, мокрота, моча и фекалии), биоматериалов (блохи, клещи, мазки и суспензии органов животных, погадки птиц, экскременты животных) и объектов окружающей среды (почва), искусственно контаминированных штаммами *Y. pestis* и гетерологичных микроорганизмов, соответственно в концентрациях $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

Обеззараживание проб и выделение ДНК.

Обеззараживание проб выполняли в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» путем добавления мертиолята натрия до достижения итоговой концентрации 0,01 %, затем инкубировали при 56 °С 30 мин. После этого вносили 100 мкл полученной суспензии в лизирующий буфер, содержащий 6 молей гуанидинизотиоцианата, и прогревали при 65 °С 15 мин. Выделение ДНК проводили с использованием набора «ДНК-сорбВ» в строгом соответствии с инструкцией.

Проведение ПЦР. ПЦР-РВ выполняли на амплификаторе типа RotorGene (Qiagen, Германия). Учет флуоресценции выполнялся во время отжига праймеров с порогом 0,05.

Расчет праймеров. Конструирование праймеров и зондов осуществляли с использованием программы VectorNTI 10 (<http://www.thermofisher.com>). Для оценки гомологии нуклеотидных последовательностей применяли алгоритм BLAST и базу данных GenBank NCBI.

Результаты и обсуждение

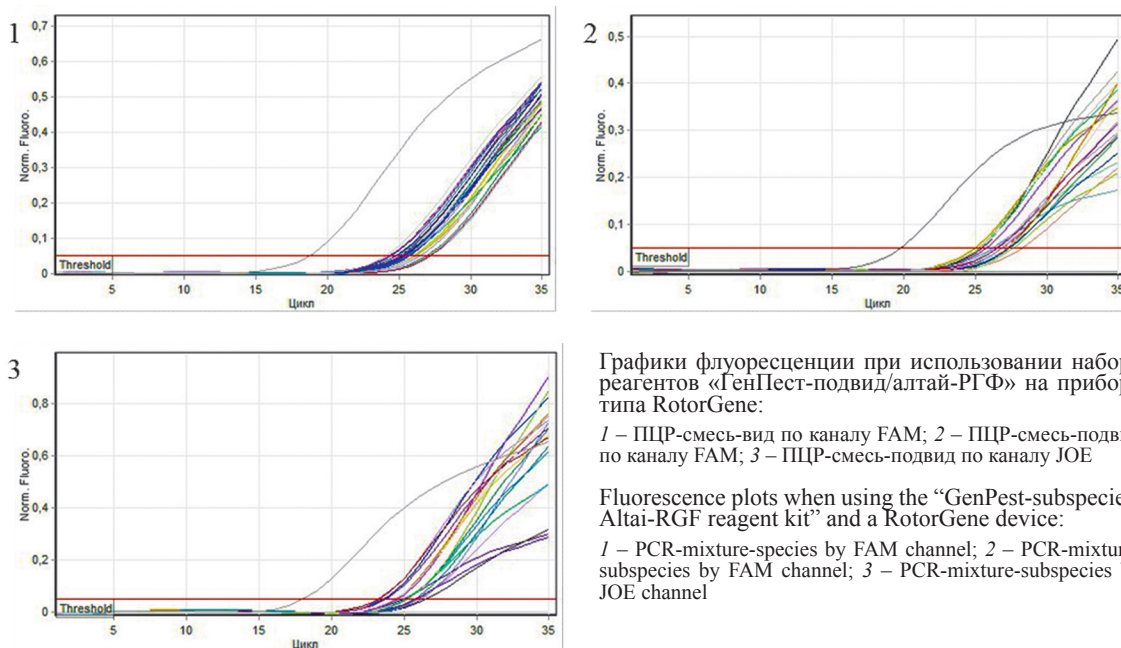
Первоначально осуществлен анализ нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis*, представленных в международной базе данных GenBank NCBI, публикаций отечественных и зарубежных коллег для поиска ДНК-мишеней, перспективных для проведения детекции и внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* в пробах клинического, биологического материала и объектов окружающей среды. Для индикации ДНК *Y. pestis* в исследуемом материале представляется перспективным использование хромосомного видоспецифичного гена *yihN* [11]. Дифференциация штаммов основного подвида *Y. pestis* возможна на основании выявления характерной для данного подвида делеции размером 89 п.н. в гене *ilvN*, а алтайского биовара центральноазиатского подвида *Y. pestis* – делеции размером 90 п.н. в локусе AK38 1327 [12]. Для осуществления амплификации фрагментов указанных генов в режиме реального времени подобраны специфические праймеры и зонды, причем в двух последних случаях последовательность зонда комплементарна области делеции. Для проведения исследований предложено использовать две реакционные смеси (РС): «РС-вид» для проведения амплификации фрагмента гена *yihN* с образованием флуоресценции по каналу FAM, «РС-подвид» – амплификация фрагментов генов *ilvN* и AK38 1327 с наличием флуоресцентного сигнала по каналам FAM и JOE соответственно (табл. 1).

Экспериментальным путем подобраны оптимальные условия для проведения ПЦР-РВ с вы-

Таблица 1 / Table 1

Интерпретация результатов проведения ПЦР-РВ с использованием реакционных смесей РС-вид и РС-подвид на приборах типа RotorGene
Interpretation of the results of RT-PCR using reaction mixtures RM-species and RM-subspecies on RotorGene devices

Значения порогового цикла (Ct) по каналам и реакционным смесям Cycle threshold (Ct) values by channel and reaction mixture			Результат анализа Results of analysis
РС-вид RM-species	РС-подвид RM-subspecies		
FAM/Green	FAM/Green	JOE/Yellow	
<i>yihN</i>	<i>ilvN</i>	AK38_1327	
<26	–	<25	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> основного подвида The sample contains the DNA of <i>Y. pestis</i> strain of the main subspecies
<26	<28	–	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> алтайского биовара центральноазиатского подвида The sample contains DNA of <i>Y. pestis</i> strain of the altai biovar, subspecies <i>central asiatica</i>
<26	<28	<25	В пробе выявлена ДНК штамма <i>Y. pestis</i> неосновных (кроме алтайского биовара центральноазиатского подвида) подвигов The sample contains DNA of <i>Y. pestis</i> strain of non-main subspecies (except for the altai biovar of the subspecies <i>central asiatica</i>)
–	<28 или – <28 or –	<25 или – <or –	В пробе ДНК чумного микроба не обнаружена Plague microbe DNA is not detected in the sample
При значении Ct по одному или нескольким каналам If the Ct value for one or more channels is			Результат невалидный. Недостаточно материала для проведения идентификации. Необходимо повторить исследование, также с использованием проб после обогащения The result is invalid. There is not enough material to carry out the identification. It is necessary to repeat the study, also using samples after enrichment
>26...<28	>28...<31	>25...<27	



Графики флуоресценции при использовании набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» на приборе типа RotorGene:

1 – ПЦР-смесь-вид по каналу FAM; 2 – ПЦР-смесь-подвид по каналу FAM; 3 – ПЦР-смесь-подвид по каналу JOE

Fluorescence plots when using the “GenPest-subspecies/Altai-RGF reagent kit” and a RotorGene device:

1 – PCR-mixture-species by FAM channel; 2 – PCR-mixture-subspecies by FAM channel; 3 – PCR-mixture-subspecies by JOE channel

бранными праймерами и зондами на приборах типа RotorGene: этап денатурации – плюс 95 °C – 5 мин; этап первого циклирования (10 циклов) – плюс 95 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с; этап второго циклирования (35 циклов) – плюс 95 °C – 15 с, 56 °C – 30 с, 72 °C – 15 с. Учет уровня флуоресценции определялся при 56 °C (на этапе второго циклирования) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow.

Минимальный и максимальный уровни флуоресценции следующие: для канала FAM/Green – 10–20 FI, а для канала JOE/Yellow – 5–10 FI. В качестве значения Threshold выбран уровень флуоресценции 0,05 для обоих каналов. Оптимальными величинами функции «устранение выбросов» явились: для канала FAM/Green – 5 %, для JOE/Yellow – 10 %. Базируясь на проведенных экспериментах, выяснена максимальная величина порогового цикла (Ct): для канала FAM (Green) ПЦР-смеси-вид Ct равен 26; для канала FAM (Green) ПЦР-смесь-подвид – 28, для канала JOE (Yellow) ПЦР-смесь-подвид – 25 (табл. 1, рисунок).

Выяснено, что чувствительность ПЦР-РВ для каждого из использованных участков генома *Y. pestis* при проведении реакции в соответствии с подобранными оптимальными условиями была не менее 1·10³ м.к./мл, а специфичность соответственно – 100 %. Для штаммов каждого подвида и биовара *Y. pestis* отмечалась амплификация только специфичных локусов. При проведении ПЦР-РВ на матрице ДНК гетерологичных микроорганизмов положительного сигнала флуоресценции не отмечалось. Приведенные выше факты говорили о возможности разработки генодиагностического препарата на основе описанного подхода. Для этого изготовлены две экспериментальные серии набора реагентов, получившего название «Генпест-подвид/алтай-РГФ». Данный набор состоит из семи компонентов (табл. 2).

В дальнейшем проведено изучение стабильности свойств набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» при транспортировании и хранении. Условия хранения компонентов данного набора реагентов: для ПЦР-смесь-вид, ПЦР-смесь-подвид, ПЦР-смесь-РГФ, растворитель, ТЕ-буфер, ПКО ДНК *Y. pestis* – при температуре 2...8 °C; для Taq ДНК-полимеразы – при температуре от минус 16 до минус 20 °C. В результате установлено, что набор реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» сохраняет свои функциональные свойства в течение заявленного срока годности, составляющего 6 месяцев. Транспортировочные условия: при температуре 2...8 °C – не более 2 суток, при температуре от минус 16 до минус 20 °C – неограниченно.

Клинические испытания двух серий разработанного медицинского изделия «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» осуществлены с использованием 248 проб, содержащих клетки *Y. pestis* в концентрации 1·10³ м.к./мл (среди которых 38 проб чистых культур, 98 проб клинического материала и 112 проб биоматериала и объектов окружающей среды). В результате испытания получен положительный результат с использованием приборов типа RotorGene в 99,3 % случаев. Кроме того, в рамках этих клинических испытаний использованы 75 проб с гетерологичными микроорганизмами в концентрации 1·10⁴ м.к./мл (использованы штаммы *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *E. kobei*, *E. faecal*, *E. cloacae*, *L. pneumophila*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*, *E. aerogenes*, *C. braakii*, *C. youngae*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *S. saprophyticus*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *S. gallinarum*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*). По итогу их анализа получен отрицательный результат в 100 % случаев. При проведении клинических испытаний отмечена полная внутри-, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость результатов.

Таблица 2 / Table 2

Состав набора реагентов «Генпест-подвид/алтай-РГФ»
The composition of the set of reagents "Genpest-subspecies/Altai-RGF"

Реактив Reagent	Описание Description	Объем, мл Volume, ml	Количество пробирок Number of vials
ПЦР-смесь-вид PCR-mixture-species	Смесь праймеров, зонда, дНТФ и азиды натрия – прозрачная розоватая жидкость Mix of primers, probe, dNTP and sodium azide – transparent pinkish liquid	0,25	1
ПЦР-смесь-подвид PCR-mixture-subspecies	Смесь праймеров, зондов, дНТФ и азиды натрия – прозрачная розоватая жидкость A mixture of primers, probes, dNTP and sodium azide – transparent pinkish liquid	0,25	1
ПЦР-смесь-РГФ PCR-mixture-RGF	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая Трис-НСl, хлорид калия, хлорид магния, Tween-20, азид натрия, глицерин Transparent colorless liquid containing Tris-HCl, potassium chloride, magnesium chloride, Tween-20, sodium azide, glycerin	0,5	2
Растворитель Solvent	Прозрачная жидкость, являющаяся водой, свободной от нуклеаз Clear liquid that is nuclease-free water	1,0	1
Taq ДНК-полимераза Taq DNA polymerase	Бесцветная жидкость – фермент с активностью 5 ед/мкл Colorless liquid – enzyme with an activity of 5 U/ μ L	0,04	1
ТЕ-буфер TE buffer	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая трис-НСl, Na ₂ -ЭДТА Clear colorless liquid containing Tris-HCl, Na ₂ -EDTA	1,0	2
ПКО ДНК <i>Y. pestis</i> PCS DNA <i>Y. pestis</i>	Препарат ДНК <i>Y. pestis</i> , сухой, в виде следа от высушенной капли на дне пробирки; после растворения – прозрачная бесцветная жидкость DNA preparation of <i>Y. pestis</i> , dry, in the form of a trace of a dried drop at the bottom of the test tube; after dissolution – clear colorless liquid	0,1	3

В результате показана диагностическая эффективность разработанного медицинского изделия «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» по ТУ 21.20.23-054-01898109-2017 на приборах типа RotorGene. Диагностическая чувствительность «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» – не менее 98,6 % при доверительной вероятности 91 %. Диагностическая специфичность «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» – не менее 99 % при доверительной вероятности 91 %. Набор реагентов прошел государственную регистрацию в установленном порядке, получено регистрационное удостоверение от 05.07.2018 № РЗН 2018/7338.

Таким образом, разработано медицинское изделие «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 учетом результатов в режиме реального времени (ГенПест-подвид/алтай-РГФ)», предназначенное для индикации ДНК возбудителя чумы в пробах клинического и биологического материала, объектов окружающей среды с параллельным выяснением его принадлежности к основному и неосновным подвидам, отдельной дифференциацией алтайского биовара центральноазиатского подвида методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Набор реагентов характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью и может быть использован в учреждениях, имеющих лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I–II групп патоген-

ности, в стационарных и мобильных лабораториях. Наиболее актуально использование разработанного набора реагентов на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и сопредельной части Монголии, для которых характерна одновременная циркуляция основного подвида *Y. pestis* и алтайского биовара центральноазиатского подвида.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 191 с.
2. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
3. Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Поршаков А.М., Ляпин М.Н., Курзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Аязбаев Т.З., Лопатин А.А., Ашибаков У.М., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по чуме в Российской Федерации и прогноз ее развития на 2020–2025 гг. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 1:43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-50.
4. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Шарова И.Н., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Михайлов Е.П., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Оглодин Е.Г., Куклев В.Е., Одинокоев Г.Н., Щербакова С.А., Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Витязева С.А., Шестопалов М.Ю., Климов В.Т. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 2. Особенности лабораторной диагностики и молекулярно-генетическая характеристика выделенных штаммов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2014; 4:43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-43-51.
5. Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Витязева С.А., Остяк А.С., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Косилко С.А., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе

Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 2. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика изолированных штаммов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4:51–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-51-55.

6. Rahalison L., Vololonirina E., Ratsitorahina M., Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):260–3. DOI: 10.1128/JCM.38.1.260-263.2000.

7. Bai Y., Motin V., Ensore R.E., Osikowicz L., Rosales Rizzo M., Hojgaard A., Kosoy M., Eisen R.J. Pentaplex real-time PCR for differential detection of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* and application for testing fleas collected during plague epizootics. *MicrobiologyOpen*. 2020; 9(10):e1105. DOI: 10.1002/mbo3.1105.

8. Kane S.R., Shah S.R., Alfaro T.M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis*. *J. Microbiol. Methods*. 2019; 162:21–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.05.005.

9. Raktov R.S., Rietveld M.H., Out-Luiting J.J., Kruihof-de Julio M., van Zuijlen P.P., van Doorn R., Ghalbzouri A.E. Exon skipping of TGFβRI affects signalling and ECM expression in hypertrophic scar-derived fibroblasts. *Scars Burn. Heal.* 2020; 6:2059513120908857. DOI: 10.1177/2059513120908857.

10. Mölsä M., Hemmilä H., Katz A., Niemimaa J., Forbes K.M., Huitu O., Stuart P., Henttonen H., Nikkari S. Monitoring biothreat agents (*Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*) with a portable real-time PCR instrument. *J. Microbiol. Methods*. 2015; 115:89–93. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.05.026.

11. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

12. Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Германчук В.Г., Девдариани З.Л., Кутырев В.В. Подвидовая дифференциация штаммов *Yersinia pestis* методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2017; 2:22–7.

References

1. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: “Medicine”; 2004. 191 p.

2. Kuttyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.

3. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Porshakov A.M., Lyapin M.N., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Ayazbaev T.Z., Lopatin A.A., Ashibokov U.M., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kuttyrev V.V. [Epidemiological and epizootic situation on plague in the Russian Federation and forecast for its development for 2020–2025]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-50.

4. Kuttyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Paksina N.D., Sharova I.N., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.K., Mikhailov E.P., Eroshenko G.A., Krasnov Y.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Oglodin E.G., Kuklev V.E., Odinkov G.N., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Afanas'ev

M.V., Vityazeva S.A., Shestopalov M.Yu., Klimov V.T. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2014. Communication 2. Peculiarities of laboratory diagnostics and molecular-genetic characterization of the isolated strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; (4):43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-43-51.

5. Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.K., Vityazeva S.A., Ostyak A.S., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Kosilko S.A., Korzun V.M. [A case of human plague in Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 2. Microbiological and molecular-genetic characteristics of the isolated strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):51–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-51-55.

6. Rahalison L., Vololonirina E., Ratsitorahina M., Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):260–3. DOI: 10.1128/JCM.38.1.260-263.2000.

7. Bai Y., Motin V., Ensore R.E., Osikowicz L., Rosales Rizzo M., Hojgaard A., Kosoy M., Eisen R.J. Pentaplex real-time PCR for differential detection of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* and application for testing fleas collected during plague epizootics. *MicrobiologyOpen*. 2020; 9(10):e1105. DOI: 10.1002/mbo3.1105.

8. Kane S.R., Shah S.R., Alfaro T.M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis*. *J. Microbiol. Methods*. 2019; 162:21–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.05.005.

9. Raktov R.S., Rietveld M.H., Out-Luiting J.J., Kruihof-de Julio M., van Zuijlen P.P., van Doorn R., Ghalbzouri A.E. Exon skipping of TGFβRI affects signalling and ECM expression in hypertrophic scar-derived fibroblasts. *Scars Burn. Heal.* 2020; 6:2059513120908857. DOI: 10.1177/2059513120908857.

10. Mölsä M., Hemmilä H., Katz A., Niemimaa J., Forbes K.M., Huitu O., Stuart P., Henttonen H., Nikkari S. Monitoring biothreat agents (*Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*) with a portable real-time PCR instrument. *J. Microbiol. Methods*. 2015; 115:89–93. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.05.026.

11. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: JSC “Shiko”; 2013. 560 p.

12. Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Germanchuk V.G., Devdariani Z.L., Kuttyrev V.V. [Subspecific differentiation of *Yersinia pestis* strains by PCR with hybridization-fluorescent registration of results]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2017; 2:22–7.

Authors:

Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sitmbetov D.A., Osina N.A., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ситмбетов Д.А., Осина Н.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.