

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-126-131

УДК 616.98:579.842.23

К.А. Никифоров¹, Е.Г. Оглодин¹, М.А. Макашова¹, А.Н. Балыкова¹, Д.В. Уткин², Л.М. Куклева¹,
Г.А. Ерошенко¹, В.В. Кутырев¹

Разработка комплексной системы молекулярно-генетической идентификации штаммов *Yersinia pestis*

¹ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов, Российская Федерация

В статье представлена разработанная комплексная система молекулярно-генетической идентификации штаммов *Yersinia pestis* в соответствии с их принадлежностью к подвидам, биоварам и филогеографическим популяциям, с помощью методов ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), аллель-специфической ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке. С использованием этой системы возможно установление принадлежности штаммов *Y. pestis* к следующим филогенетическим ветвям: 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT античного биовара основного подвида; 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3, 2.MED4 средневекового биовара основного подвида; 1.IN1, 1.IN2, 1.IN3 биовара *intermedium* основного подвида; 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3 восточного биовара основного подвида; 0.PE3 (ангольский подвид), 0.PE7 (тибетский подвид) и 0.PE10 (цинхайский подвид). Первый этап исследований в рамках разработанной системы – индикация возбудителя чумы с использованием зарегистрированных диагностических препаратов. Второй этап – установление принадлежности к отдельным подвидам методом ПЦР-РВ или методом системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке, позволяющей также определять принадлежность штаммов к биоварам основного подвида и основным филогенетическим линиям античного биовара. Третий этап – определение принадлежности штаммов к филогенетическим ветвям методом АС-ПЦР-РВ. Разработанная комплексная система молекулярно-генетической идентификации штаммов *Y. pestis* может быть применена на региональном и федеральном уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней Российской Федерации. Ее использование значительно облегчит и повысит оперативность проведения внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* в рамках эпидемиологического расследования вспышек или заносов штаммов возбудителя чумы на территорию Российской Федерации или при паспортизации штаммов в коллекционной деятельности.

Ключевые слова: возбудитель чумы, молекулярно-генетические методы, идентификация штаммов.

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

Для цитирования: Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Макашова М.А., Балыкова А.Н., Уткин Д.В., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Разработка комплексной системы молекулярно-генетической идентификации штаммов *Yersinia pestis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 1:126–131. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-126-131

Поступила 09.12.2022. Принята к публ. 14.12.2022.

К.А. Nikiforov¹, Е.Г. Oglodin¹, М.А. Makashova¹, А.Н. Balykova¹, D.V. Utkin², L.M. Kukleva¹,
G.A. Eroshenko¹, V.V. Kutyrev¹

Development of an Integrated System for Molecular-Genetic Identification of *Yersinia pestis* Strains

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

²Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky, Saratov, Russian Federation

Abstract. The paper describes a developed comprehensive system for molecular-genetic identification of *Yersinia pestis* strains according to their appurtenance to certain subspecies, biovars, phylo-geographic populations, using real-time PCR (RT-PCR), allele-specific RT-PCR, and multiplex PCR with hybridization fluorescent registration of results on a solid substrate. Application of this system makes it possible to establish the appurtenance of *Y. pestis* strains to the following phylogenetic branches: 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT of antique biovar of the main subspecies; 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3, 2.MED4 of medieval biovar of the main subspecies; 1.IN1, 1.IN2, 1.IN3 of *intermedium* biovar of the main subspecies; 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3 of oriental biovar of the main subspecies; 0.PE3 (*angolica* subspecies), 0.PE7 (*tibetica* subspecies) and 0.PE10 (*qinghaica* subspecies). The first stage of the studies within the frames of the developed system is indication of plague agent using registered diagnostic drugs. The second stage is the determination of belonging to individual subspecies through RT-PCR or by the method of multiplex PCR system with hybridization-fluorescent registration of results on a solid substrate, which also allows for establishing to which biovars of the main subspecies and the main phylogenetic lines of the ancient biovar the strains belong. The third stage is the identification of strain appurtenance to phylogenetic branches by the AS-RT-PCR method. The designed complex system for molecular-genetic identification of *Y. pestis* strains can be applied at the regional and federal levels of the laboratory network of the Russian Federation for diagnostics of infectious diseases. Its use will considerably facilitate and increase the efficiency of intraspecific differentiation of *Y. pestis* strains within the framework of the epidemiological investigation of outbreaks or importation of strains of plague pathogen into the territory of the Russian Federation or during the certification of strains in collection activities.

Key words: plague agent, molecular-genetic methods, identification of strains.

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

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

Citation: Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Makashova M.A., Balykova A.N., Utkin D.V., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutuyev V.V. Development of an Integrated System for Molecular-Genetic Identification of *Yersinia pestis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 1:126–131. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-126-131

Received 09.12.2022. Accepted 14.12.2022.

Nikiforov K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4115-9486>
Oglodin E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>
Makashova M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7713-7959>
Balykova A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>

Utkin D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5903-7700>
Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Kutuyev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

В настоящее время с учетом тесных торгово-экономических и социокультурных связей на фоне усиливающейся глобализации чума остается актуальной угрозой для санитарно-эпидемиологического благополучия населения мира. Чума является острой природно-очаговой инфекционной болезнью, вызываемой бактерией *Yersinia pestis*. Природные очаги чумы находятся на всех континентах, за исключением Австралии и Антарктиды, в горных, степных, полупустынных и пустынных зонах. Циркуляция штаммов *Y. pestis* в условиях разных природных ландшафтов послужила причиной различий в свойствах и в вирулентности штаммов этого вида.

Так, согласно усовершенствованной внутривидовой классификации внутри вида *Y. pestis* выделяются семь подвидов: основной (очаги мира), тибетский (филогенетическая ветвь 0.PE7) (природные очаги на территории Тибетского автономного округа и провинции Цинхай Китая), кавказский (0.PE2) (очаги Кавказа и Закавказья), ангольский (0.PE3) (представлен единственным штаммом, выделенным в Анголе), центральноазиатский (0.PE4) (центральноазиатская зона природной очаговости чумы), цинхайский (0.PE10) (провинция Цинхай Китая) и улегейский (0.PE5) (Монголия). Центральноазиатский подвид образован четырьмя биоварами: алтайским (0.PE4a) (Горный Алтай России и Монголии), гиссарским (0.PE4h) (Гиссарский высокогорный очаг Республики Таджикистан), таласским (0.PE4t) (Таласский высокогорный очаг Киргизской Республики) и microtus (0.PE4m) (Китай) [1]. Штаммы основного подвида вирулентны для человека и характеризуются высоким эпидемическим потенциалом, что отличает их от штаммов неосновных подвидов. Штаммы этого подвида в свою очередь делятся на четыре биовара: античный, средневековый, восточный и intermedium. В античном биоваре выделяют филогенетические линии 0.ANT (объединяет ветви 0.ANT1, 0.ANT2, распространенные в Китае; 0.ANT3, встречающуюся в Китае и Киргизской Республике, и 0.ANT5, характерную для Киргизской Республики), 1.ANT (штаммы которой выделяются в Центральной Африке), 2.ANT (характерна для нескольких очагов Китая, Монголии и Забайкальского степного природного очага чумы РФ), 3.ANT (характерна для ряда очагов Китая и Монголии), 4.ANT (эндемична для Горно-Алтайского горного и Сайлюгемского природных очагов РФ и Монголии) [2–4].

Потомками линии 1.ANT являются биовары intermedium (1.IN) и восточный (1.ORI). Штаммы биовара 1.IN характерны только для ряда природных очагов Китая и являются предшественниками восточного биовара. Среди многообразия штаммов биовара 1.IN к настоящему моменту описано пять ветвей эволюции. Штаммы ветви 1.IN1 выделяются на территории провинции Цинхай и Синьцзян-Уйгурского автономного района; штаммы 1.IN2 характерны для провинций Цинхай и Ганьсу, Тибетского автономного района; штаммы 1.IN3 специфичны для провинции Юннань; штаммы 1.IN4 получили распространение в Джунгарском бассейне в северной части Синьцзян-Уйгурского автономного района [5]; недавно описана новая ветвь 1.IN5 в провинции Юннань [6]. Штаммы восточного биовара распространились по всем континентам во время третьей пандемии чумы. Восточный биовар состоит из трех ветвей эволюции (штаммы ветви 1.ORI1 были занесены в США, 1.ORI2 – в Европу, Южную Америку, Африку и Юго-Восточную Азию, 1.ORI3 – на Мадагаскар) [3].

Линия 2.ANT античного биовара является эволюционным предшественником средневекового биовара (2.MED), который в свою очередь представлен несколькими филогенетическими ветвями. В РФ циркулируют штаммы ветвей 2.MED0 (Центрально-Кавказский высокогорный очаг чумы) и 2.MED1 (большинство очагов РФ и других стран СНГ). Штаммы филогенетических ветвей 2.MED2 и 2.MED3 встречаются только в очагах Китая. Также недавно выделена филогенетическая ветвь 2.MED4, образованная штаммами начала XX в. на территории природных очагов Поволжья, Прикаспия и Кавказа.

На территории РФ и соседних государств распространены штаммы многих филогенетических ветвей возбудителя чумы, отличающихся по вирулентности и эпидемической значимости и, следовательно, по комплексу проводимых мероприятий в случае их обнаружения. Кроме того, некоторые природные очаги чумы РФ и соседних стран являются очагами смешанного типа, на территории которых одновременно циркулируют штаммы разных подвидов. В частности, в ряде очагов Кавказа встречаются штаммы кавказского подвида и средневекового биовара основного подвида, в Горно-Алтайском высокогорном очаге – штаммы алтайского биовара центральноазиатского подвида и штаммы ветви 4.ANT античного биовара основного подвида, в Таласском высокогорном очаге – штаммы таласского биова-

ра центральноазиатского подвида и средневекового биовара основного подвида, в природном очаге аймака Баян-Улгий Монголии – штаммы алтайского биовара центральноазиатского подвида, улегейского подвида и штаммы ветвей 3.ANT и 4.ANT античного биовара основного подвида. В связи с приведенными выше фактами возможны завозы штаммов других филогенетических ветвей *Y. pestis* на территорию Российской Федерации.

Традиционно для лабораторной диагностики чумы используются бактериологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы. Молекулярно-генетические методы дают возможность получить результат за несколько часов от поступления подозрительного материала, что очень важно для проведения противоэпидемических мероприятий. К числу наиболее применяемых относится полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Как медицинские изделия (МИ) зарегистрированы наборы реагентов: «Ген *Y. pestis* индикация – РГФ», «Ген *Y. pestis* идентификация – РГФ» (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов), «АмплиСенс *Y. pestis* – FL» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва), «ОМ-Скрин-Чума-РВ» (ООО «Синтол», Москва), – которые дают возможность проводить индикацию и идентификацию (оценка вирулентности и плазмидного профиля) штаммов *Y. pestis*. Также созданы экспериментальные праймеры и зонды, позволяющие выполнять дифференциацию некоторых филогенетических ветвей *Y. pestis*: средневекового биовара и восточного биовара основного подвида и ряда ветвей внутри средневекового биовара и ветви 4.ANT [7].

При этом нерешенными вопросами остаются дифференциация популяций 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*; ангольского (0.PE3), тибетского (0.PE7) и цинхайского (0.PE10) подвидов *Y. pestis*. Для решения этих вопросов необходима разработка системы оперативной и точной внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы с установлением их принадлежности к конкретным филогенетическим ветвям. Такая система будет способствовать повышению эффективности эпидемиологического мониторинга природных очагов чумы и эпидемиологического расследования вспышек или заносов штаммов *Y. pestis* в РФ.

Цель – представить разработку комплексной системы молекулярно-генетической идентификации штаммов *Y. pestis* в соответствии с их принадлежностью к определенным подвидам, биоварам, филогенетическим популяциям. Такая система может быть основана на быстрых и точных методах ПЦР-РВ и систем мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке по детекции маркерных делеций или инсерций (*indel*-мутации). Однако такие *indel*-мутации

обнаружены не для всех филогенетических ветвей *Y. pestis*. Для этих ветвей в качестве генетических маркеров возможно использование специфических единичных полиморфных нуклеотидов (SNPs), являющихся наиболее распространенными генетическими маркерами в геноме [8].

Первоначально для создания системы внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* в соответствии с их принадлежностью к подвидам нами разработаны комплекты праймеров и зондов для ПЦР-РВ, основанные на определении наличия или отсутствия маркерных *indel*-мутаций, для разделения штаммов основного, кавказского (0.PE2), улегейского подвидов (0.PE5), а также алтайского (0.PE4a), гиссарского (0.PE4h), таласского (0.PE4t) и *microtus* (0.PE4m) биоваров центральноазиатского подвида [9]. Разработано также МИ «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)» (регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7338 от 05.07.2018). Этот набор позволяет проводить индикацию ДНК *Y. pestis* в пробах клинического и биологического материала, объектов окружающей среды с одновременным установлением принадлежности к основному и неосновным подвидам, с отдельной дифференциацией алтайского биовара центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ. Наиболее перспективно применение этого набора на региональном уровне системы лабораторной диагностики инфекционных болезней Роспотребнадзора в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы и прилегающей части Монголии, для которых свойственна одновременная циркуляция штаммов основного подвида *Y. pestis* ветви 4.ANT и алтайского биовара центральноазиатского подвида.

Следующей задачей было разделение подвидов, биоваров и ряда филогенетических линий *Y. pestis*. Для этого сконструирована система мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации, идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию основных генов вирулентности [10]. Выбор этого метода продиктован тем, что он является эффективным, многофакторным, быстрым и позволяющим детектировать большое количество маркеров.

Разработанная нами система мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке основана на определении наличия или отсутствия маркерных *indel*-мутаций и позволяет проводить установление принадлежности штаммов возбудителя чумы к основному, кавказскому (0.PE2), центральноазиатскому

(отдельно к алтайскому (0. PE4a), гиссарскому (0. PE4h), microtus (0. PE4m) и таласскому (0. PE4t) биоварам), улегейскому (0. PE5) подвидам, кроме того, к античному (с отдельным выделением ветвей 1. ANT (вместе с 1. IN) и 2. ANT), средневековому (с отдельным выделением ветви 2. MED0) и восточному биоварам основного подвида. Зарегистрировано МИ «Пест-МЛ ПЦР-биочип» для качественного выявления ДНК *Y. pestis* в пробах клинического материала, биологического материала, культур микроорганизмов с одновременным установлением принадлежности к основному и неосновным подвидам, биоварам, а также дифференциации вирулентных изолятов от авирулентных (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15445 от 04.10.2021). Применение МИ «Пест-МЛ ПЦР-биочип» перспективно на федеральном уровне системы лабораторной диагностики инфекционных болезней Роспотребнадзора при наличии соответствующего оборудования.

Заключительная задача состояла в решении вопроса дифференциации основных филогенетических ветвей *Y. pestis*. Для этого создан комплекс аллель-специфических ПЦР-РВ (АС-ПЦР-РВ), дающий

возможность проведения дифференциации филогенетических ветвей, для которых ранее не были подобраны эффективные маркерные indel-мутации [11]. Комплекс АС-ПЦР-РВ позволяет проводить дифференциацию филогенетических ветвей 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. IN1, 1. IN2, 1. IN3 биовара intermedium; 1. ORI1, 1. ORI2, 1. ORI3 восточного биовара и, кроме того, ангольского (0. PE3), тибетского (0. PE7) и цинхайского (0. PE10) подвигов. Разработанная система АС-ПЦР-РВ в перспективе может быть использована на региональном и федеральном уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней Роспотребнадзора, при наличии необходимого оборудования и персонала.

Таким образом, на основе полученных результатов мы предлагаем комплексную молекулярно-генетическую систему оперативной внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* методами ПЦР-РВ, АС-ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке (рисунок).

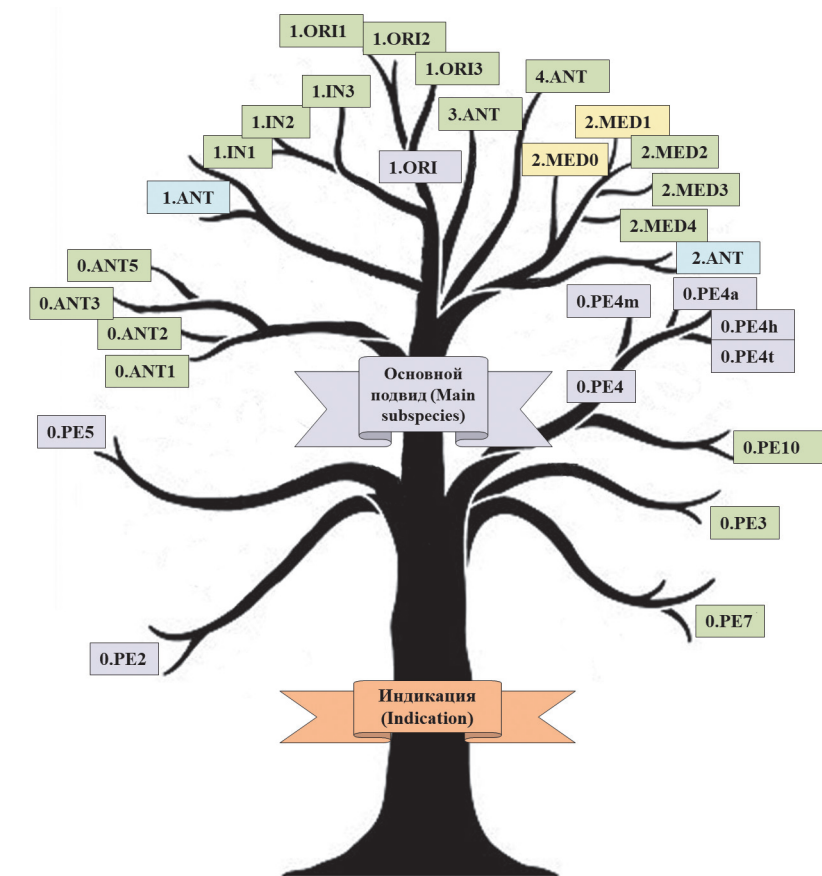


Схема применения комплексной молекулярно-генетической системы внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*

Scheme of application of the complex molecular-genetic system for intraspecific differentiation of *Y. pestis* strains

- ПЦР-РВ и система мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке (Real-time PCR and multiplex PCR system with hybridization-fluorescence registration of results on a solid substrate)
- Система мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке (Multiplex PCR system with hybridization-fluorescence registration of results on a solid substrate)
- АС-ПЦР-РВ и система мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке (AS-RT-PCR and multiplex PCR system with hybridization-fluorescence registration of results on a solid substrate)
- АС-ПЦР-РВ (AS-RT-PCR)

Первым этапом этой системы является проведение индикации ДНК возбудителя чумы с использованием зарегистрированных диагностических препаратов. После этого определяется принадлежность к отдельным подвидам (основному, кавказскому, улегейскому подвидам, алтайскому, гиссарскому, таласскому и *microtus* биоварам центральноазиатского подвида) методом ПЦР-РВ, основанном на детекции *indel*-мутаций. Либо с помощью системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке, детектирующей *indel*-мутации, устанавливается принадлежность штаммов к основному, кавказскому, улегейскому, центральноазиатскому (с отдельным выделением биоваров алтайского, гиссарского, таласского и *microtus*) подвидам, а также к античному (с отдельным выделением ветвей 1.ANT (вместе с 1.IN) и 2.ANT), средневековому (с отдельным выделением ветви 2.MED0) и восточному биоварам основного подвида. На последнем этапе методом АС-ПЦР-РВ проводится установление принадлежности штаммов 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.

Применение разработанной комплексной молекулярно-генетической системы для быстрой и надежной дифференциации штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к определенным подвидам, биоварам и филогенетическим ветвям в перспективе дает возможность повысить эффективность и оперативность мониторинга природных очагов и выполнять молекулярное внутривидовое разделение штаммов *Y. pestis* на региональном и федеральном уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней Роспотребнадзора. Это значительно упростит проведение внутривидовой дифференциации при осуществлении молекулярно-эпидемиологического мониторинга в очагах и расследования вспышек или заносов штаммов *Y. pestis* в Российскую Федерацию или при проведении паспортизации штаммов в рамках коллекционной деятельности.

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

Список литературы

1. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.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.
2. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999; 96(24):14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.
3. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.

4. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
5. Zhang Y., Luo T., Yang C., Yue X., Guo R., Wang X., Buren M., Song Y., Yang R., Cao H., Cui Y., Dai X. Phenotypic and molecular genetic characteristics of *Yersinia pestis* at an emerging natural plague focus, Juggar Basin, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 98(1):231–7. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0195.
6. Shi L., Qin J., Zheng H., Guo Y., Zhang H., Zhong Y., Yang C., Dong S., Yang F., Wu Y., Zhao G., Song Y., Yang R., Wang P., Cui Y. New genotype of *Yersinia pestis* found in live rodents in Yunnan Province, China. *Front. Microbiol.* 2021; 12:628335. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628335.
7. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*gldD*). *J. Bacteriol.* 2002; 184(4):1019–27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002.
8. Soleimani V.D., Baum B.R., Johnson D.A. Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2003; 21:281–8. DOI: 10.1007/BF02772803.
9. 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, иммунологии.* 2017; 2:22–7. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-2-22-27.
10. Никифоров К.А., Уткин Д.В., Макашова М.А., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы. *Биотехнология.* 2020; 36(3):46–56. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-46-56.
11. Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Макашова М.А., Балькова А.Н., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование системы аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени для определения филогенетической принадлежности штаммов *Yersinia pestis*. *Биотехнология.* 2022; 38(3):82–91. DOI: 10.56304/S0234275822030073.

References

1. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.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.
2. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999; 96(24):14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.
3. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.
4. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
5. Zhang Y., Luo T., Yang C., Yue X., Guo R., Wang X., Buren M., Song Y., Yang R., Cao H., Cui Y., Dai X. Phenotypic and molecular genetic characteristics of *Yersinia pestis* at an emerging natural plague focus, Juggar Basin, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 98(1):231–7. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0195.
6. Shi L., Qin J., Zheng H., Guo Y., Zhang H., Zhong Y., Yang C., Dong S., Yang F., Wu Y., Zhao G., Song Y., Yang R., Wang P., Cui Y. New genotype of *Yersinia pestis* found in live rodents in Yunnan Province, China. *Front. Microbiol.* 2021; 12:628335. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628335.
7. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of struc-

tural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). *J. Bacteriol.* 2002; 184(4):1019–27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002.

8. Soleimani V.D., Baum B.R., Johnson D.A. Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2003; 21:281–8. DOI: 10.1007/BF02772803.

9. Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Germanchuk V.G., Devdariani Z.L., Kutuyrev V.V. [Subspecies differentiation of *Yersinia pestis* strains by PCR with hybridization-fluorescence detection]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology]*. 2017; (2):22–7. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-2-22-27.

10. Nikiforov K.A., Utkin D.V., Makashova M.A., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutuyrev V.V. [Designing a system of multiplex PCR with hybridization-fluorescent registration of results, on a solid substrate, for indication and identification of *Y. pestis* strains]. *Biotekhnologiya [Biotechnology]*. 2020; 36(3):46–56. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-46-56.

11. Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Makashova M.A., Balykova A.N., Eroshenko G.A., Kutuyrev V.V. [Construction of a real-time allele-specific PCR system for determining the phylogenetic affiliation of *Yersinia pestis* strains]. *Biotekhnologiya [Biotechnology]*. 2022; 38(3):82–91. DOI: 10.56304/S0234275822030073.

Authors:

Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Makashova M.A., Balykova A.N., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutuyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Utkin D.V. Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky. 83, Astrakhanskaya St., Saratov, 410012, Russian Federation.

Об авторах:

Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Макашова М.А., Балыкова А.Н., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Уткин Д.В. Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского. Российская Федерация, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83.