

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

На правах рукописи

Дедков Владимир Георгиевич

**СИСТЕМА МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА
ДЛЯ ОПЕРАТИВНОГО РЕАГИРОВАНИЯ НА ВОЗНИКАЮЩИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ
УГРОЗЫ**

1.5.10. Вирусология

3.2.2. Эпидемиология

**Диссертация в виде научного доклада на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Санкт-Петербург – 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный консультант:

Попова Анна Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главный государственный санитарный врач Российской Федерации

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ	18
1. Материалы и методы исследования	18
1.1 Нарращивание вируса в культуре и выделение РНК.....	19
1.2 Создание положительных контрольных образцов.....	19
1.3 Пробоподготовка для секвенирования вируса <i>de novo</i>	20
1.4 Высокопроизводительное секвенирование	21
1.5 <i>In silico</i> анализ полученных последовательностей	21
2. Концепция научно-исследовательского комплекса своевременного реагирования на биологические угрозы инфекционной природы	21
3. Алгоритм экстренной разработки средств молекулярной детекции патогенных микроорганизмов.....	25
3.1 Разработка методики в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров вируса Эбола Заир.....	27
3.2 Разработка методики в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров филовирусов Эбола и Марбург	32
3.3 Разработка методики в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров SARS-CoV-2	38
4. Разработка подходов к изучению разнообразия и экологии вирусов позвоночных, обладающих эпидемическим потенциалом	45
4.1 Родоспецифическая ПЦР.....	46
4.2 Создание панелей праймеров для полногеномного секвенирования вирусных геномов	50
4.3 Применение методов амплификации для идентификации и полногеномного секвенирования вирусных геномов	52
4.3.1 Проведение полногеномного секвенирования двух изолятов вируса Эбола Заир из коллекции образцов, полученных из Республики Гвинея в 2014-2015 гг.	52
4.3.2 Секвенирование полных геномов вируса Парамушир из клещей вида <i>Ixodes uria</i> , собранных на острове Тюлений.....	57
4.3.3 Секвенирование полного генома вируса Вад Медани из клещей <i>Dermacentor nuttalli</i> , собранных в Республике Тыва.....	65
4.3.4 Ретроспективная диагностика двух случаев бешенства у людей методом высокопроизводительного секвенирования	70
5. Разработка критериев оценки эпидемического потенциала	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86

ВЫВОДЫ	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	87
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	88
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	89
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ВИДЕ НАУЧНОГО ДОКЛАДА	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Феномен глобализации, т.е. растущий и все более свободный поток информации, товаров, капитала и людей через политические и географические границы, позволяет быстро распространяться инфекционным заболеваниям, как новым, так и давно известным, по всему миру. Распространение болезней в глобальных географических масштабах – явление характерное для всей истории человечества. Примерами таких болезней являются чума, холера, сифилис, грипп различных типов и другие заболевания. На примере пандемии свиного гриппа H1N1 2009 года [1], тяжелого острого респираторного синдрома и ближневосточного респираторного синдрома, вызванных коронавирусами (SARS-CoV-1 и MERS-CoV) [2] и лихорадки Зика [3], а также массовой эпизоотии гриппа птиц в 2003-2004 гг. [4], было показано, что чрезвычайные ситуации, связанные с новыми инфекциями, могут представлять серьёзную угрозу для человечества, и подчёркивают необходимость новых подходов, к выявлению и мониторингу новых инфекционных заболеваний [5].

В зависимости от уровня социально-экономического развития, удельный вес смертности от инфекций варьирует от 5% в Европе до 62% в Африке (Всемирная организация здравоохранения, ВОЗ, 2023). В целом в структуре причин смерти на инфекционные болезни приходится около 18,8%.

Важнейшими факторами, усиливающими эпидемиологическую и социально-экономическую значимость инфекционных болезней, являются тенденции развития хозяйственной деятельности человека, которые характеризуются усиленным воздействием на окружающую среду вредных факторов промышленного производства и биологических отходов жизнедеятельности человека и сельскохозяйственных животных.

Мировые интеграционные процессы и глобализация мировой экономики облегчают миграцию населения из слаборазвитых государств с низким уровнем санитарно-эпидемиологической защиты в развитые страны. В результате этого увеличивается вероятность возникновения вспышек инфекционных болезней, ранее не регистрируемых в странах, принимающих иммигрантов. Ситуация еще более усложняется в связи с бурным развитием международного туризма и экотуризма, которые сопровождаются вторжением в сбалансированные экосистемы, возникновением контактов с животными и членистоногими, являющимися природными резервуарами новых вирусных инфекций.

Данные обстоятельства, в совокупности с резкими социально-экономическими изменениями в последние годы, не способствуют улучшению экологической и санитарно-эпидемиологической обстановки в мире. Наблюдается рост числа заболеваний неясной

этиологии на фоне падения напряженности коллективного иммунитета, особенно в условиях высокой плотности населения в мегаполисах.

Санитарно-эпидемиологический надзор за инфекционными болезнями включает систему методов и средств их лабораторной диагностики. Быстрое и точное выявление и характеристика возбудителя инфекционных заболеваний - определяющий фактор для своевременного проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Современная лабораторная диагностика инфекционных заболеваний основана на использовании прямых методов выявления возбудителей, их антигенов или нуклеиновых кислот, а также непрямых методов, направленных на выявление специфических факторов гуморального и клеточного иммунитета к патогену. В ряде случаев сходные по первоначальной симптоматике, но существенно различающиеся по смертности и тяжести течения, инфекционные болезни, вызываемые разными инфекционными агентами [6,7,8,9]. Часто возникает необходимость исключения патологических аллергических состояний, сходных по клиническим проявлениям с некоторыми инфекционными заболеваниями.

Оперативная дифференциальная лабораторная диагностика инфекционных заболеваний позволяет принимать адекватные, экономически целесообразные меры по предотвращению распространения инфекции. Об эффективности проводимых в Российской Федерации работ в этом направлении свидетельствуют примеры успешного мониторинга и предотвращения распространения завозимых из-за рубежа возбудителей инфекций, таких как холера, тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), грипп А H5N1, грипп А H1N1 и др.

В эпидемиологическом смысле чрезвычайно высокую опасность представляют собой вирусные инфекции, относящиеся к I группе патогенности и вызывающие высокую летальность: возбудители натуральной оспы, геморрагических лихорадок Марбург, Эбола, Ласса, аргентинской (вирус Хунин), боливийской (вирус Мачупо) и др. Данные патогены хотя и не циркулируют на территории Российской Федерации, но могут быть завезены как гражданами нашей страны после посещения эндемичных регионов, так и гражданами государств Африки и Южной Америки, прибывающих в нашу страну на учебу или с прочими целями.

Следует иметь в виду, что возросшая мобильность и активная хозяйственная деятельность населения в сочетании с отсутствием настороженности в отношении возникновения вспышек инфекционных заболеваний может приводить к возникновению эпидемий особо опасных инфекционных заболеваний. Так в декабре 2013 г. на территории республики Гвинея возникла вспышка лихорадки Эбола, вызванная вирусом Эбола Заир (ZEBOV), которая распространилась на пять стран, включая Гвинею, Либерию, Нигерию, Сенегал и Сьерра Леоне. Особенностью данной вспышки, переросшей в эпидемию, стало то обстоятельство, что территорией распространения инфекции стала Западная Африка, где ранее циркуляция вирусов рода

Orthoebolavirus не наблюдалась. По этой причине, и в силу плохого оснащения лабораторной службы, выявление возбудителя произошло с большой задержкой, что привело к запаздыванию соответствующих противоэпидемических мероприятий и распространению инфекции из сельской местности на городские территории с общим количеством населения около 25 миллионов человек. Суммарное количество пострадавших в результате эпидемии 2013-2016 составило 28652, при этом 11325 случаев закончилось летально (<https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/history/chronology>). Фактически, будучи занесенным в городскую черту, вирус распространялся как контактный антропоноз, при этом оценочное значение показателя базовой скорости репродукции составило около 1,8 [10].

Таким образом, крупнейшая за всю историю изучения семейства *Filoviridae* эпидемия в Западной Африке (2013-2016 гг.), вызванная вирусом ZEBOV, выявила не только недооценку эпидемического потенциала филовирусов, но и недостаточность имеющихся теоретических представлений об их географическом распространении и механизмах функционирования природных очагов [11,12,13].

Не меньшую опасность представляют собой относящиеся ко II группе патогенности вирусы (возбудители клещевого энцефалита, омской геморрагической лихорадки, японского энцефалита, лихорадки Западного Нила, желтой лихорадки, лихорадки Денге, лихорадки Зика, Крымской-Конго геморрагической лихорадки и др.) [8,14,15,16,17]. Инфекционные заболевания, вызываемые этими агентами, относятся к трансмиссивным зоонозам, и формируют в природной среде постоянно проявляющиеся очаги инфекции [16,18,19,20]. Часть из них циркулирует на территории Российской Федерации, часть эндемична в странах, пользующихся популярностью у российских туристов [21,22,23]. В этой связи наибольшее количество завозных случаев геморрагических лихорадок приходится на лихорадку Денге, общее количество случаев завоза которой в период с 2013 г. (начало регистрации) по 2023 г. составило 1577 случаев (данные Роспотребнадзора, 2024). С 2019 года и по настоящее время продолжается пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, обусловленная вирусом SARS-CoV-2. По состоянию на 02.03.2025 года подтверждено 777 594 331 случаев заболевания, при этом 7 089 989 случаев закончились смертельным исходом (ВОЗ). Несмотря на усилия мирового сообщества и объявленную ВОЗ чрезвычайную ситуацию остановить развитие пандемии долго не удавалось. Остается спорным и вопрос о происхождении вируса. При этом исследование вопроса о происхождении вируса фактически не ведется в виду беспрецедентной политизации [24,25]. Ситуация осложняется тем, что вирус продолжает активно изменяться, что позволяет ему изменять свои биологические свойства, ускользая от постинфекционного и поствакцинального иммунитета, что чрезвычайно затрудняет планирование противоэпидемических мероприятий и

требует постоянного широкомасштабного генетического мониторинга для адекватной оценки генетического разнообразия циркулирующих вариантов вируса [26].

В связи с выше сказанным, необходимость создания Национальной системы молекулярно-генетического мониторинга с целью оперативного реагирования на вновь возникающие угрозы является чрезвычайно важной проблемой, стоящей перед эпидемиологическим сообществом.

Степень разработанности темы

Быстрое появление и распространение SARS-CoV-2 продемонстрировало, насколько важно быть готовыми в будущем к любым случаям возникновения новых заболеваний. Необходимо уметь выявлять новые патогены на ранней стадии и устранять факторы риска, которые способствуют их появлению и распространению. Появление SARS-CoV-2 произошло на фоне роста числа случаев инфицирования патогенами, представляющими высокую угрозу. К таким патогенам следует отнести SARS-CoV-1, MERS-CoV, вирусы Ласса, Марбург, Эбола, Нипах, вирус птичьего гриппа и арбовирусы, такие как вирусы Денге, Зика и Чикунгунья. Существует не только необходимость в надёжном и всеобъемлющем наблюдении и принятии срочных мер для быстрого выявления и смягчения последствий, но и необходимость в надёжных и систематических процессах при организации исследований, необходимых для изучения появления новых патогенов и путей их передачи от естественных резервуаров к людям.

В этой связи расшифровка случаев инфекционных заболеваний неясной этиологии является актуальной проблемой общественного здравоохранения. К сожалению, лишь в весьма небольшой доле случаев таких заболеваний удается получить лабораторно подтвержденный диагноз. До недавнего времени этой проблеме не уделялось достаточного внимания в связи с тем, что бóльшая часть встречающихся в средних широтах инфекционных заболеваний имеет выраженную клиническую картину с хорошо различимой патогномичной симптоматикой. Однако в последние годы наблюдается рост случаев инфекционных заболеваний, не имеющих характерной клинической картины. В частности, большинство трансмиссивных заболеваний вирусной этиологии часто имеет сходное клиническое течение, особенно на начальном этапе заболевания. В качестве примера можно привести лихорадку Зика, сходную по клиническим проявлениям с лихорадкой Денге и лихорадкой Чикунгунья. Первые два заболевания обусловлены ортофлавивирусами, тогда как лихорадка Чикунгунья вызывается представителем рода *Alphavirus*. При этом природные очаги циркуляции, а также переносчики для всех трех вирусов одинаковы [27,28].

В структуре инфекционных заболеваний неясной этиологии ведущую роль играют инфекционные агенты вирусной природы [28,29]. Высокая изменчивость геномов вирусов и способность адаптироваться к новым хозяевам, в сочетании с климатическими изменениями, а

также, изменяющийся характер хозяйственной деятельности человека и процессы глобализации способствуют возникновению эмерджентных вспышек вирусных инфекций, обусловленных как вновь возникающими, так и редкими, либо нехарактерными для данной территории видами вирусов [28,29,30]. Вероятно, на сегодняшний день охарактеризован всего лишь один процент от всех вирусов [31]. Согласно данным математического моделирования существует не менее 320 000 видов вирусов млекопитающих, большая часть которых еще не описана [32]. Все они потенциально являются возбудителями инфекционных заболеваний человека и животных. В связи с этим выявление новых вирусов, мониторинг циркуляции известных вирусов и оценка путей их распространения являются одним из жизненно важных аспектов дозорного эпидемиологического надзора, проводимого с целью своевременного реагирования на вновь возникающие угрозы, прогнозирования и раннего выявления вспышек вирусных заболеваний человека и животных [28,29,33].

Не вызывает сомнения тот факт, что наиболее удобным, дешевым и результативным методом лабораторной диагностики инфекционных заболеваний является метод полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием специфических праймеров и ДНК-зондов [28,29]. Помимо ПЦР-РВ, в последнее десятилетие активно разрабатываются альтернативные методы молекулярной диагностики, основанные на различных подходах [34, 35]. Тем не менее, ПЦР-РВ все еще остается «золотым стандартом» молекулярной диагностики [28,29]. Этот подход уже довольно долго и успешно используется, как для исследования представителей отдельных вирусных родов, так и при анализе разнообразия вирусов в различных типах биологического материала [28,35,36,37,38]. В настоящее время описано значительное количество праймеров, предназначенных для обнаружения определенных вирусных видов [28,38,39,40]. Однако их невозможно использовать в мультиплексных реакциях из-за различных температур отжига праймеров, неспецифической амплификации и потенциальной самокомплементарности. Таким образом, для видового определения вирусов разных родов необходимо проводить большое количество разных ПЦР. Во многих случаях также бывает сложно очертить круг инфекционных агентов, которые могли послужить причиной данного заболевания. Таким образом, для проведения исследований методом специфической ПЦР требуется предварительная гипотеза о наличии конкретных вирусов в образце, в отсутствие которой процесс идентификации патогенов может занять значительное время, что накладывает ограничение на выбор тактики лечения и снижает эффективность противоэпидемических мероприятий. Кроме того, большинство диагностических лабораторий имеет довольно ограниченный спектр наборов, позволяющих выявлять лишь очень небольшое количество инфекционных агентов, наиболее часто встречающихся на данной территории [28,29].

Появление технологий массового параллельного секвенирования (или как их часто называют — NGS, Next Generation Sequencing) вызвало революцию в самых различных областях медицины и биологии [28,29]. Так, полногеномное секвенирование (WGS, Whole Genome Sequencing) вирусов становится все более важным не только для фундаментальных исследований, но и для клинической науки и, в перспективе, лабораторной диагностики [28].

В то время как полногеномное секвенирование бактериальных геномов является относительно простой задачей, изучение вирусных геномов, будь то выделенных из культуральных проб, или непосредственно из клинических образцов, практически всегда осложняется наличием ДНК-хозяина [31]. Чтобы решить эту проблему, изучение геномов вирусов проводится как путем ультраглубокого секвенирования, так и обогащением нуклеиновых кислот вирусов перед секвенированием [41]. Последнее может осуществляться либо напрямую, либо же путем концентрации вирусных частиц. При этом все эти подходы имеют собственные издержки и сложности [28,29].

Так, широко распространен метагеномный подход, позволяющий обнаруживать различные вирусные патогены с использованием так называемого «шот-ган» (англ. «shot-gun») секвенирования [28,42,43,44,45,46,47], который все более активно применяется для выявления патогенов и для характеристики микробного разнообразия в экологических и клинических образцах [48,49]. Прямое «шот-ган» секвенирование таких образцов приводит к генерации данных, преимущественно состоящих из последовательностей, относящихся к геномам хозяина и/или других организмов [28], и лишь с крайне незначительной долей последовательностей искомым вирусным патогенов, что заметно снижает чувствительность эксперимента [27].

Глубина покрытия, при такого рода экспериментах, недостаточна для обнаружения мутаций резистентности к лекарственным препаратам [50], а стоимость подобных исследований высока. Таким образом, метагеномное секвенирование обычно проводится только на небольшом количестве образцов, для исследовательских целей [28,51,52].

Альтернативой метагеномным подходам является целевое обогащение определенного вирусного генома(-ов), или их фрагментов перед секвенированием. Так, эффективность исследования может быть значимо увеличена за счет комбинирования родоспецифичной ПЦР и технологий NGS. ПЦР-амплификация вирусного генетического материала с использованием праймеров, которые являются комплементарными известной нуклеотидной последовательности, является наиболее распространенным подходом для обогащения небольших вирусных геномов, таких как ВИЧ и вирус гриппа. В качестве примера обогащения ПЦР-амплификацией, за которым следует секвенирование, можно привести филогенетический анализ вспышки вируса кори на зимних Олимпийских играх 2010 г. [30] и отслеживание эпидемий лихорадок Эбола и Зика [28,29]. С помощью секвенирования амплифицированных длинных (2,5–3 т.п.о.) фрагментов

была исследована вариабельность генома норовируса и возможность его нозокомиальной передачи среди пациентов нескольких госпиталей во Вьетнаме [53,54], что выявило независимые интродукции возбудителя в больницу и внутрибольничную передачу, несмотря на предпринимаемые меры по борьбе с инфекцией [28,29].

Известно, что ПЦР-амплификация более подходит для WGS образцов с низкой концентрацией вирусов, чем метагеномные методы [51]. Другие методы, такие как целевое обогащение вирусных последовательностей, могут тоже приводить к хорошим результатам [28].

Перекрывающиеся ПЦР-ампликоны в сочетании с NGS использовали для секвенирования целых геномов больших вирусов, таких как, например, цитомегаловирус человека [55]. Этот метод имеет ограниченную масштабируемость, так как требуется синтез множества праймеров и большое количество исходной ДНК. Этот факт ограничивает число подходящих образцов, а соответственно и геномов, которые могут быть получены с использованием такого подхода. Например, для амплификации генома вируса Эбола Заир потребовалось 8–19 продуктов ПЦР [56], а в двух исследованиях норовирусов было необходимо 14 и 22 продуктов ПЦР, соответственно [28,53,54]. Однако, для клинической диагностики такой подход является проблематичным из-за значительного объема лабораторной нагрузки, связанной с многочисленными ПЦР постановками, необходимости индивидуальной нормализации концентраций различных ПЦР-продуктов до смешивания, высокой вероятности отказа ПЦР-реакции из-за несоответствия праймера матрице [28]. Поэтому, несмотря на техническую возможность секвенирования вирусов размером вплоть до 250 тысяч н.т., пропорциональная взаимосвязь между длиной генома и технической сложностью делает секвенирование вирусных геномов более 50 тысяч н.т. на основе ПЦР нецелесообразным с использованием современных технологий, в частности для крупных исследований с большим числом образцов, или рутинной диагностики [28,29].

Целевое обогащение на зондах (также известное как гибридизация или специфическое обогащение) может быть использовано для секвенирования полных вирусных геномов непосредственно из клинических образцов без необходимости предварительного культивирования или ПЦР [57,58,59,60]. Эти методы обычно включают небольшие РНК- или ДНК-зонды, которые являются комплементарными к референсной последовательности патогенов (или панели эталонных последовательностей) [28]. В реакции гибридизации зонды, связанные с твердой подложкой (например, мечеными стрептавидином магнитными частицами), захватывают или «вытягивают» комплементарные последовательности ДНК из общего пула нуклеиновых кислот в образце [28,29]. Захват сопровождается последующим лигированием адаптеров, специфичных для секвенатора, и небольшим числом циклов ПЦР для обогащения успешно лигированных фрагментов. Этот подход был успешно использован для характеристики

клинически значимых вирусов разного размера, таких как вирус гепатита С [28,57], вирусы простого герпеса (HSV), вирус ветряной оспы (VZV) [58], вирус Эпштейна–Барр (EBV) [59], вирус герпеса человека 6 (HHV-6) [60] и вирус герпеса человека 7 (HHV-7) [61]. Целевое обогащение возможно, если имеется несоответствие между матрицей и зондом; однако, в то время как ПЦР-амплификация требует только знания фланкирующих областей целевой области, для целевого обогащения путем гибридизации необходима информация о всей внутренней последовательности для дизайна зондов [28]. Однако стоит отметить, что целевое обогащение не подходит для характеристики совершенно новых вирусов, которые имеют низкую гомологию с известными вирусами, и для которых метагеномика, а также и ПЦР с использованием вырожденных (смесь аналогичных, но вариативных) праймеров, может быть лучшим подходом [28,29].

Таким образом, разработка подходов к проведению молекулярно-генетического мониторинга является чрезвычайно актуальной проблемой общественного здравоохранения.

Цель исследования: создание системы непрерывного молекулярно-генетического мониторинга для оперативного реагирования на возникающие биологические угрозы.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи

1. Создать концепцию модульного научно-исследовательского комплекса оперативного реагирования на биологические угрозы.
2. Создать алгоритм экстренной разработки средств молекулярной детекции вирусов.
3. С помощью алгоритма разработать диагностические методики в формате ОТ-ПЦР/ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров актуальных и опасных инфекций вирусной этиологии.
4. Выработать подход к изучению разнообразия и экологии вирусов позвоночных, обладающих эпидемическим потенциалом.
5. С помощью разработанных подходов дать молекулярно-генетическую характеристику вирусов Эбола Заир, Парамушир, Вад Медани, бешенства, Дугбе.
6. Разработать критерии оценки потенциальной опасности существующих и вновь выявляемых вирусных агентов.
7. С помощью разработанных критериев оценить эпидемический потенциал возбудителей особо опасных инфекций I-II группы патогенности с трансмиссивным и нетрансмиссивным механизмами передачи.

Научная новизна

1. Получены 15 полногеномных последовательностей опасных вирусов Эбола Заир (*Orthoebolavirus*), Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*Orthonairovirus*), Нгари (*Orthobunyavirus*), а также вирусов Дугбе (*Orthonairovirus*), Парамушир (*Orthonairovirus*), Вад Медани (*Orbivirus*) – потенциальных возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных.
2. Оценено генетическое разнообразие вирусов Парамушир, Вад Медани, Дугбе, Нгари и механизмы его формирования.
3. Впервые показана способность множественной межсегментной внутривидовой реассортации вирусов Парамушир, Вад-Медани, Дугбе, Нгари.
4. Разработана концепция модульного научно-исследовательского комплекса своевременного реагирования на биологические угрозы.
5. Создан алгоритм экстренной разработки диагностических систем в формате ОТ-ПЦР-РВ с целью оперативного реагирования на вновь возникающие угрозы инфекционного характера.
6. Разработаны подходы использования высокопроизводительного секвенирования для оперативной расшифровки этиологии инфекционных заболеваний, а также для рутинного генетического мониторинга.
7. Предложена система оценки эпидемической опасности вновь выявляемых и редких инфекционных агентов вирусной этиологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработаны молекулярно-диагностические методики для выявления генетических маркеров вирусов рода Эбола и рода Марбург, вируса Ласса, вируса Луйо [64], вируса клещевого энцефалита [65], коронавируса SARS-CoV-2 [66], вируса оспы обезьян [67], нового вакцинного штамма (nOPV2) типа 2 вируса полиомиелита [68], вируса кори [69], вируса Нипах [70,71], вируса тяжелой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом (SFTSV) [72], вируса Хунин [73], вируса Хендра [74,75,76], вируса Гуанарито [77,78], вируса Мачупо [79], вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки [80].

Депонированы в международную базу GenBank NCBI 2 нуклеотидные последовательности вируса ортонайровируса Парамушир, 1 последовательность орбивируса Вад Медани, 2 последовательности вирусов бешенства, 2 последовательности ортобуньявируса Нгари, 2 последовательности ортонайровируса Дугбе, 2 последовательности вируса Эбола Заир.

Разработана методика высокопроизводительного секвенирования вирусов Эбола Заир, Парамушир, Дугбе.

Разработанные молекулярно-диагностические методики послужили основой для создания диагностических наборов АмплиСенс® EBOV-Zaire-F1 (ПУ РЗН 2014/2036), АмплиСенс® FiloA-screen-F1 (ПУ РЗН 2018/7265), АмплиСенс® FiloB-screen-F1, АмплиСенс® RABV-F1, АмплиСенс® LASV-F1 COVID-19Amp (ПУ РЗН 2020/10498), nOPV2-AmpPS (ПУ МИ-RUBY-000108), MPX-AmpPS, MV-AmpPS (ПУ МИ-RUBY-000105), NIPV- AmpPS, HENV-AmpPS, которые внедрены в практику.

Результаты работы представлены в 12 главах монографий [12,13,14,45,81-89,107].

При написании раздела 5 диссертации в форме научного доклада использованы материалы кандидатской диссертации Сафоновой М.В. «Оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово (*P. Orbivirus*, Сем. *Reoviridae*)» по специальности 03.02.02. Вирусология, 14.02.02. Эпидемиология, выполненной в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) под научным руководством и личным участием Дедкова В.Г. [90].

Методология и методы исследования

Методологическая основа работы построена в соответствии с поставленной целью исследования с учетом проведенного обзора научной литературы по теме диссертационного исследования. Исследование носило комплексный характер и осуществлялось с применением классических вирусологических, молекулярно-генетических, биоинформатических и эпидемиологических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Предложена концепция модульного научно-исследовательского комплекса своевременного реагирования на биологические угрозы, позволяющая адекватно и оперативно отвечать на возникающие угрозы биологического характера. Созданный алгоритм экстренной разработки средств молекулярной детекции вирусов позволяет разрабатывать диагностические наборы на основе метода ОТ-ПЦР/ПЦР-РВ.
2. Разработаны методики выявления генетических маркеров актуальных и особо опасных возбудителей вирусной этиологии.
3. Разработанные алгоритмы расшифровки этиологии инфекционных заболеваний, а также рутинного генетического мониторинга методами высокопроизводительного секвенирования позволяют оперативно выявлять циркулирующие (в том числе, редко встречающиеся), либо

неизвестные ранее патогены, в целях текущего и превентивного эпидемиологического надзора.

4. Генетическим анализом установлено, что происхождение западноафриканских штаммов вирус Эбола Заир, вызвавших эпидемию в Западной Африке в 2013-2015гг., не несет признаков какого-либо направленного воздействия на геном, и носит естественный характер; потенциальные возбудители заболеваний человека и животных, ортонайровирус Парамушир и орбивирус Вад Медани, способны к множественной межсегментной реассортации.
5. Предложенная концепция оценки эпидемического потенциала вновь выявляемых и редких инфекционных агентов вирусной этиологии позволяет эмпирически оценить их потенциальную опасность и объем дополнительных исследований, необходимых для предотвращения распространения выявленной инфекции.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов исследования основана на использовании современных методологических подходов при выявлении инфекционных агентов вирусной этиологии. В работе использован комплекс современных молекулярно-генетических исследований, объем которых позволил корректно провести статистическую обработку полученных данных.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих конференциях с международным участием: Международная научно-практическая конференция «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» -2015; The International Symposium System Biology and Biomedicine (SBioMed-2016), The 10th International Conference on bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology. 2016; The 1st International Conference on North East Asia Biodiversity-2018; Молекулярная диагностика 2017; Молекулярная диагностика 2018 (BGRS\SB-2018); The 11th International Conference; «Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2020». На всероссийских конференциях: «Эпидемиологическое благополучие-2021; «Профилактическая медицина-2022» к 100-летию государственной санитарно-эпидемиологической службы России; III Международная научно-практическая конференция по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям – 2022; XII Съезд Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов -2022; Международный симпозиум - научная конференция «100 лет с именем Пастера» - 2023, IV Международный форум «Дни вирусологии 2023», а также на международных конференциях: ISID Congress 2022 (Malaysia Kuala Lumpur) и 9th International Symposium on Filoviruses 2017 (Marburg, Germany).

Апробация диссертации состоялась на заседании Ученого Совета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора 18.12.2024 г.

Публикации по теме диссертации в виде научного доклада

По теме диссертационного исследования опубликовано 72 научные публикации, из них статей, опубликованных в Перечне рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора (Перечень ВАК), а также индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus – 52 (Квартиль WoS/Scopus Q1, Q2, ВАК: K1, K2), научных обзоров – 3, глав монографий – 14, получено патентов на изобретение РФ – 17.

Соответствие паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют специальностям 1.5.10. Вирусология и 3.2.2. Эпидемиология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 4, 6, 8, 10 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология и пунктам 5, 6, 8 паспорта специальности 3.2.2. Эпидемиология.

Личный вклад соискателя

Планирование исследования проводилось лично автором. Основной объём исследования проведён автором работы самостоятельно. Непосредственно автором разработан дизайн диагностических методик в формате обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) для выявления генетических маркеров филовирюсов, аренавирусов, вируса бешенства, вируса SARS-CoV-2. Автор лично участвовал в проведении клинической апробации разработанных методик, в том числе во время эпидемии лихорадки Эбола в 2014 г. выезжал с целью авторского надзора за использованием методики выявления вируса Эбола Заир в Республику Гвинея.

Непосредственно автором осуществлялась предварительная пробоподготовка для последующего секвенирования высокопроизводительными методами. Также автор осуществлял сборку геномов, сравнительный и филогенетический анализ полученных последовательностей, их аннотацию и депонирование в базу данных GenBank, систематизирование и эпидемиологическую оценку полученных данных.

Отдельные этапы работы выполнены на базе научной группы геномной инженерии и биотехнологии Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (ФБУН ЦНИИЭ), лаборатории молекулярной генетики патогенных микроорганизмов и лаборатории молекулярно-

генетического мониторинга Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора (ФБУН НИИЭМ им. Пастера). Концепция оценки эпидемической опасности вновь выявляемых и редких инфекционных агентов вирусной этиологии была разработана совместно с к.б.н. Сафоновой М.В. (ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора) и к.б.н. Долговой А.С. (ФБУН НИИЭМ им. Пастера). Помимо прочего Сафонова М.В. и Долгова А.С. внесли существенный вклад в отдельные этапы исследования, за что автор выражает им глубокую признательность.

Структура и объем работы

Диссертационная работа в виде научного доклада включает введение, пять глав основной части, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список цитируемой литературы, список работ, опубликованных автором по теме диссертационной работы в виде научного доклада. Работа изложена на 126 страницах, содержит 23 рисунка, 18 таблиц, 184 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Материалы и методы исследования

Для оценки аналитических характеристик разрабатываемых диагностических методик использовали нуклеиновые кислоты следующих гетерологичных микроорганизмов (Таблица 1).

Таблица 1 - Перечень вирусов, использованных для оценки специфичности

Вид вируса	Сокращение	Семейство	Род	Тип нуклеиновой кислоты
Вирус Тягиня	TAHV	<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	кДНК
Вирус Батаи	BATV	<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	кДНК
Вирус Инко	INKV	<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	кДНК
Вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки	CCHFV	<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	кДНК
Вирус Дхори	DHOV	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Thogotovirus</i>	кДНК
Вирус гриппа А/Н1N3	FLUAV(H1N3)	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Alphainfluenzavirus</i>	кДНК
Вирус гриппа А/Н3N2	FLUAV(H3N2)	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Alphainfluenzavirus</i>	кДНК
Вирус гриппа В	FLUBV	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Betainfluenzavirus</i>	кДНК
Вирус желтой лихорадки	YFV	<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	кДНК
Вирус лихорадки Западного Нила	WNV	<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	кДНК
Вирус клещевого энцефалита	TBEV	<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	кДНК
Вирус Зика	ZIKV	<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	РНК
Вирус Синдбис	SNDBV	<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	кДНК
Вирус Чикунгунья	CHIKV	<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	кДНК
Вирус краснухи	RUBV	<i>Matonaviridae</i>	<i>Rubivirus</i>	кДНК
Вирус Кемерово, штамм 21/10	KEMV-21/10	<i>Sedoreoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	кДНК
Вирус Трибеч, штамм Tr19	TRBV-Tr19	<i>Sedoreoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	кДНК
Ротавирус А	RVA	<i>Sedoreoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	кДНК
ЕCHO-вирус, тип 11	ECHO11	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	кДНК
Вирус иммунодефицита человека, тип 1	HIV-1	<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	кДНК
Вирус бешенства	RABV	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	кДНК
Цитомегаловирус, тип 5	HCMV-5	<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	ДНК
Парвовирус B19	B19	<i>Parvoviridae</i>	<i>Erythroparvovirus</i>	ДНК
Респираторный коронавирус среднего востока	MERS-CoV	<i>Coronaviridae</i>	<i>Betacoronavirus</i>	кДНК
Коронавирус 229Е	CoV 229E	<i>Coronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	РНК
Коронавирус NL63	CoV NL63	<i>Coronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	РНК
Коронавирус OC43	CoV OC43	<i>Coronaviridae</i>	<i>Betacoronavirus</i>	РНК
Аденовирус 3 тип	AdV 3	<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	ДНК
Респираторно-синцитиальный вирус	RCV	<i>Pneumoviridae</i>	<i>Orthopneumovirus</i>	РНК
Вирус Эбола Заир	ZEBOV	<i>Filoviridae</i>	<i>Orthoebolavirus</i>	РНК
Вирус Эбола Судан	SUDV	<i>Filoviridae</i>	<i>Orthoebolavirus</i>	РНК
Вирус Марбург	MARV	<i>Filoviridae</i>	<i>Orthomareburgvirus</i>	РНК
Вирус Ласса	LASV	<i>Arenaviridae</i>	<i>Mammarenavirus</i>	РНК

РНК филовирсов Эбола Заир и Марбург, а также РНК вируса Ласса любезно предоставлены сотрудниками Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») (Коллекция микроорганизмов), панель клинических образцов (52 образца) от инфицированных вирусом Эбола Заир была собрана и охарактеризована в лаборатории госпиталя Донка университета Гамаль-Абдель Нассера (г. Конакри, респ. Гвинея), панель клинических образцов от инфицированных вирусом SARS-CoV-2 (34 образца) собрана от пациентов лечебно-профилактических учреждений г. Санкт-Петербурга в 2020 г.

В работе был использован штамм вируса Вад Медани из коллекции Федерального государственного автономного научного учреждения "Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита).

1.1 Нарращивание вируса в культуре и выделение РНК

Вирус Вад Медани размножали в суточной культуре клеток эмбриональной почки свиньи (СПЭВ), Vero или почек хомячка (ВНК) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Готовили поддерживающие среды, состоящие из среды 199 в растворе Эрла (для культуры клеток СПЭВ) или среды DMEM (для культуры клеток Vero и ВНК), дополненной 2% бычьей сывороткой (FBS, Gibco, USA) и антибиотиками (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). Супернатанты инфицированной культуры собирали сразу после появления цитопатического эффекта и использовали для выделения РНК.

РНК выделяли с использованием набора QIAmp (Qiagen, Germany) в соответствии с протоколом производителя. Очищенную РНК элюировали в 10 мкл воды, не содержащей РНКазы (Qiagen, Germany).

Комплементарную ДНК получали путем обратной транскрипции экстрагированной РНК с использованием набора Реверта-L (АмплиСенс®, Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

1.2 Создание положительных контрольных образцов

Ввиду отсутствия генетического материала вирусов родов Эбола и Марбург, а также SARS-CoV-2, создание положительных контрольных образцов (ПКО) осуществляли синтетическим методом на основе ампликона, включающего таргетную область и фланкирующие последовательности нуклеотидов. Ампликон получали методом «степ-аут» ПЦР.

Для этого синтезировали олигонуклеотиды прямой и обратной ориентации со средней длиной 65 н.т. и перекрытием 25 н.т. [81,82,86].

Для получения промежуточных продуктов амплификации готовили 25 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 мкл соответствующего ПЦР-продукта, по 50 пмоль прямого и обратного олигонуклеотидов, 2,5 мкл дНТФ (1,76 мМ, АмплиСенс®, Россия), 10 мкл ПЦР-смеси Blue2 (АмплиСенс®, Россия). Термоциклирование проводили в следующем режиме: 94°C – 45 с, 94°C – 20 с, 50°C – 30 с, n=5; 72°C – 10 мин. Реакцию проводили с использованием термоциклера Махуген II (Ахуген, USA). Результат амплификации контролировали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Конечный ПЦР-продукт очищали с помощью набора MiniElute gel extraction kit (Qiagen, Germany), лигировали в плазмидный вектор pGEM-T (Promega, USA) под контролем промотора T7 РНК полимеразы и трансформировали им *Escherichia coli* (штамм XL1 blue) [91]. Рекомбинантные плазмиды из индивидуальных клонов очищали с помощью набора Plasmid Mini prep kit (Ахуген, USA) и проверяли их на наличие правильной ориентации и отсутствие мутаций в области посадки праймеров и зонда. Проверку осуществляли методом Сэнгера с помощью прибора для автоматического капиллярного секвенирования ABI-Prism 3500 XL (Applied Biosystems, USA). Плазмиды с прямыми вставками использовали для получения рекомбинантной РНК на основе MS2 фага в защитной белковой оболочке [92]. Полученный продукт обрабатывали ДНКазой-I (Fermentas, Latvia) для удаления остатков ДНК, измеряли концентрацию, разбавляли в стабилизирующем растворе RNA-later (Life Technologies, USA) и использовали далее в качестве положительного защищенного РНК-контроля (ПКО). Отсутствие в препарате ПКО остаточной ДНК после обработки контролировали с помощью специфических праймеров и зонда в ходе проведения реакции ПЦР-РВ (без стадии обратной транскрипции). Измерение концентрации рекомбинантного контроля осуществляли на приборе QX100 system (Bio-Rad, USA) с помощью набора One-step ddPCR Super mix For Probes kit (Bio-Rad, USA) и специфических праймеров и зонда [87].

1.3 Пробоподготовка для секвенирования вируса *de novo*

РНК исследуемых изолятов/штаммов проходила специальную модификацию, включающую этапы очистки от балластной ДНК и однострессовой РНК, неспецифическую обратную транскрипцию с помощью специальных петлевых адаптеров и амплификацию полученных фрагментов кДНК.

1.4 Высокопроизводительное секвенирование

Высокопроизводительное секвенирование проводили на коммерческих платформах Illumina (Illumina Inc., USA) и Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher Scientific, USA).

1.5 *In silico* анализ полученных последовательностей

In silico анализ полученных последовательностей производили с помощью пакета специализированных программ. Оценку температуры плавления праймеров рассчитывали при помощи программы Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>). Термодинамические характеристики зонда и возможность образования вторичных структур оценивали с помощью программ Oligonucleotide Properties Calculator и MFOLD (<http://mfold.rna.albany.edu/>).

2. Концепция научно-исследовательского комплекса своевременного реагирования на биологические угрозы инфекционной природы

Осуществление молекулярно-генетического мониторинга диктует необходимость создания современного модульного научно-исследовательского комплекса своевременного реагирования на биологические угрозы для проведения генетических исследований, работ по молекулярной эпидемиологии и разработки современных систем диагностики вирусных и бактериальных инфекций на уровне ведущих мировых лабораторий, соответствующих стандартам работы и оснащенным необходимым и современным оборудованием. В модульном научно-исследовательском комплексе предполагается проводить весь цикл работ по изучению инфекций и разработки методов диагностики и лечения. Организация замкнутого цикла работ, основанного на базе одной организации, позволяет быстро и эффективно отвечать на возникающие угрозы с наименьшей зависимостью от сторонних организаций и коммерческих структур. Такая организация необходима и в периоды, свободные от эпидемических кризисов. За счет организации научной деятельности должна быть обеспечена эффективная система исследования инфекционных агентов, их циркулирования на территории Российской Федерации и создана возможность предсказания тех или иных биологических вызовов. Отдельные группы, работающие на базе одного из модулей комплекса, благодаря взаимной интеграции технологий и оптимальному трансферу результатов внутри комплекса могут максимально быстро систематизировать получаемые данные, вырабатывать общую стратегию и координировать направление работ (Рисунок 1).

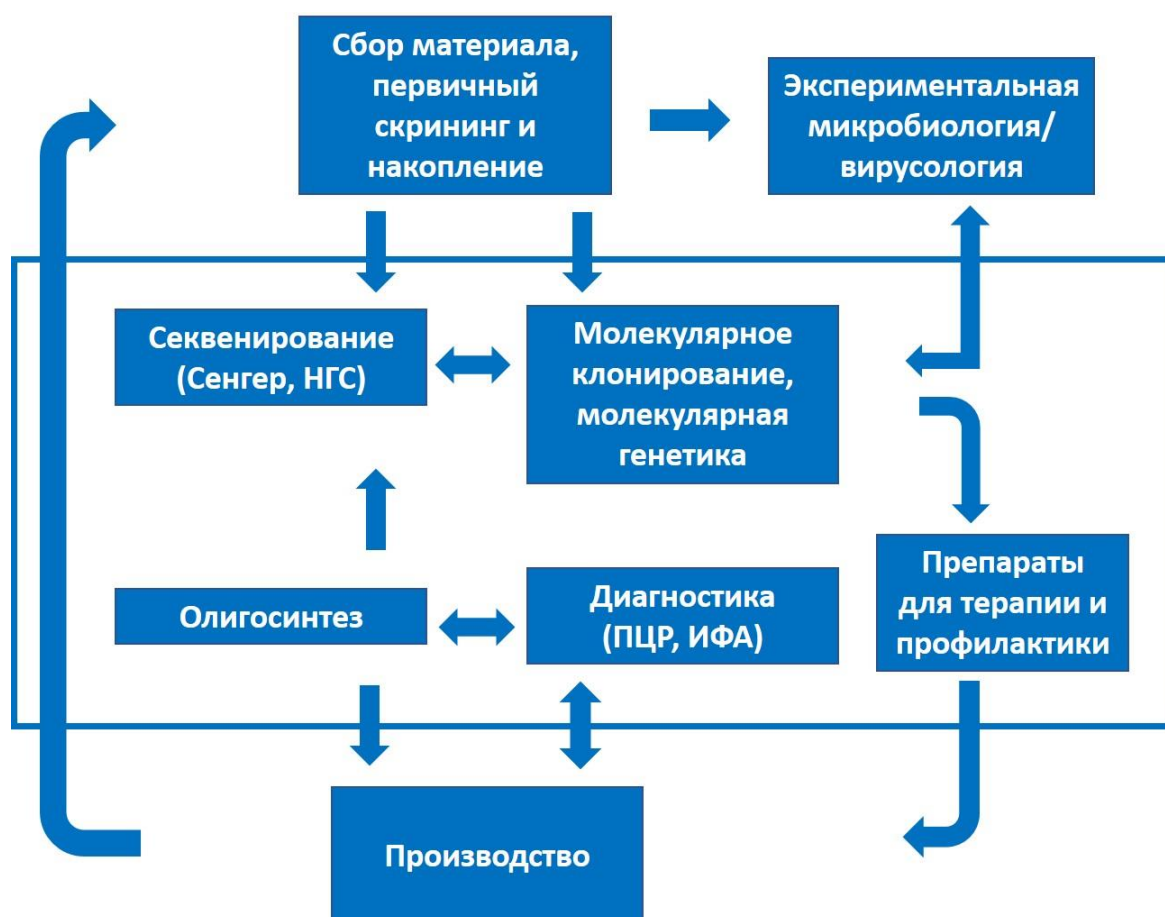


Рисунок 1 - Принципиальная схема организации модульного научно-исследовательского комплекса своевременного реагирования на биологические угрозы инфекционной природы

Для создания такой системы необходимо формирование следующих активных групп:

1. Группа синтеза олигонуклеотидов. Необходима для оперативного синтеза олигонуклеотидных праймеров и зондов при возникновении новых инфекций. Как показала вспышка COVID-19, в случае эпидемии срок синтеза олигонуклеотидов коммерческими фирмами увеличивается до 2-3 недель, для меченых олигонуклеотидов и того более. В результате это значительно снижает скорость разработки диагностических наборов, основанных на методах ПЦР.
2. Группа секвенирования по Сэнгеру. Проводить секвенирование на базе сторонних организаций в условиях вспышки и всеобщего карантина оказывается весьма затруднительно. В коммерческих организациях появляется очередь, а многие научно-исследовательские институты в условиях эпидемии переведены на дистанционный режим или вовсе не работают. Секвенирование необходимо для проведения следующих работ: создание контролей для ПЦР тест-систем, создание экспрессионных конструкций для получения компонентов (рекомбинантных белков или эпитопов) тест-систем на основе ИФА, создание рекомбинантных систем изучения вируса (например, минигеномов).

3. Группа молекулярного клонирования. Необходима для получения ДНК- и защищенных РНК-контролей для диагностического ПЦР/ОТ-ПЦР. Работа группы должна быть сфокусирована на потоковом клонировании поступающих от других групп амплифицированных фрагментов ДНК в утвержденные внутренним регламентом плазмиды для ДНК-контролей и конструкции для получения в дальнейшем защищенных РНК-контролей на основе измененных MS2 фагов, и производство таких контролей. Наличие методики производства таких контролей позволяет улучшить чувствительность и специфичность набора при его разработке и укомплектовать наборы для ПЦР-РВ Внутренними Контрольными Образцами (ВКО) и ПКО, что облегчает интерпретацию результатов при анализе клинических образцов.

4. Группа высокопроизводительного секвенирования. Использование технологии NGS необходимо для поиска новых потенциально опасных патогенов и изучения изменчивости существующих и циркулирующих на территории Российской Федерации, или в странах, из которых возможен завоз инфекций в нашу страну. Включение в лабораторный комплекс высокопроизводительного секвенирования позволяет оперативно получать полногеномные последовательности патогенов, вызывающих эпидемические вспышки, для дальнейшего их анализа, выбора целевых фрагментов для разработки ПЦР тест-систем, определения белковых последовательностей антигенов для систем на основе ИФА.

5. Группа молекулярной генетики. Для оперативного реагирования, как на вновь возникающие угрозы, так и на социально значимые инфекции, постоянно циркулирующие на территории Российской Федерации, необходимо подразделение, обладающее компетенциями для выполнения следующих задач.

- Разработка и создание вариантов ДНК и РНК контролей, выбранных согласно геномным данным, полученным методом NGS, или уже имеющимся в открытых базах, целевого патогена. Дизайн олигонуклеотидных праймеров для создания контролей и/или амплификации фрагмента генома целевого инфекционного агента или сборка последовательности *de novo*, если доступа к патогену нет. Наличие собранных *de novo* контролей при отсутствии доступа к патогену значительно упрощает последующую разработку ПЦР систем для диагностики, позволяя подбирать параметры реакции в условиях максимально приближенных к работе с реальным патогеном.

- Разработка экспрессионных конструкций, несущих в себе ген белка или отдельных эпитопов патогена. Необходимо проведение как дизайна самих антигенов (оптимизация кодонного состава, наличие или отсутствие сигнальных пептидов), так и экспрессионных кассет (подбор промотора и терминатора, регуляторные элементы, наличие фьюжн-белков и т.д.). Важно также, помнить, что для многих вирусных белков (флавивирусы, хантавирусы, лиссавирусы) экспрессия в *E. coli* не позволяет добиться правильного фолдинга белков из-за

отсутствия эукариотической системы гликозилирования и некоторых других особенностей. В таких случаях необходим дополнительный подбор системы экспрессии «сложных» белков. Полученные белковые субстанции можно использовать в качестве компонентов для наполнения диагностических систем на основе иммуноферментной или иммунохимической реакций, а также для получения рекомбинантных вакцин. В случаях возникновения эпидемий необходимо быстрое создание эффективных и безопасных вакцинных препаратов для формирования иммунной прослойки среди населения. Одним из направлений является создание субъединичных рекомбинантных вакцин, состоящих из отдельных антигенов микроорганизмов, способных индуцировать протективный иммунитет. Для формирования адекватного и устойчивого иммунитета для таких вакцин как правило необходимо конъюгировать белковые составляющие вируса с дополнительными адъювантами. Более того, как и в случае с получением белков для диагностических систем, для некоторых вирусов необходимы отличные от *E. coli* системы экспрессии. Также используемые биологические субстанции не должны быть токсичны, и не должны вызывать патологические аутоиммунные реакции. Все это необходимо учитывать еще на стадии разработки таких препаратов.

- **Дизайн и создание лекарственных препаратов.** При возникновении эпидемий, кроме вакцинации, важную роль играют также лекарственные средства, направленные на ингибирование жизнеспособности патогена. На данный момент существует лишь ограниченное количество противовирусных препаратов. Более того, такие препараты, в большинстве своем, специфичны к возбудителю и не подходят для использования в случае вновь возникающих инфекций. Однако в последнее время увеличивается количество фундаментальных исследований, позволяющих методами молекулярного дизайна конструировать лекарственные препараты, направленные непосредственно на определенную молекулярную мишень вируса, отсутствующую в клетке-хозяине [93]. При исследовании структуры вируса (его белкового состава) методом 3D моделирования полученных структур появляется возможность определять функционально значимые белки, или отдельные аминокислотные последовательности, для которых возможна разработка специфичных олигопептидных ингибиторов. Такие белки или пептиды также можно методами генетической инженерии получать в рекомбинантной форме или, в случае пептидов, синтезировать непосредственно из аминокислот.

6. **Группа молекулярной диагностики.** Эта группа необходима непосредственно для разработки и создания диагностических систем, основанных на реакции ПЦР (в основном ПЦР-РВ, так как этот подход широко используется в отечественных медицинских учреждениях, а значит легко распространяем для применения в критических ситуациях), либо на других молекулярных методах, например, основанных на принципах изотермической амплификации.

7. Группа экспрессии и очистки белков. Получение белков и пептидов для наполнения диагностических наборов или для разработки кандидатных вакцин и лекарственных препаратов требует правильной экстракции и дальнейшей очистки белковых субстанций. При получении белков важны такие факторы как метод лизиса, предварительная очистка лизата, способ и последовательность хроматографических очисток, подбор буферных растворов и колонок. Для получения белковых субстанций в кратчайшие сроки с необходимой конформацией и степенью очистки нужна группа специалистов, которая могла бы подобрать все условия.

8. Группа иммуноферментного анализа. Необходима для разработки и создания диагностических систем, основанных на иммуноферментном и/или иммунохимическом методах. Подбор оптимальной системы, выбор подложек, буферов для посадки и отмывки, конъюгатов, времени проведения каждого из этапов анализа, выбор метода детекции. Наличие интегрированной в комплекс группы по разработке ИФА/ИХА наборов позволит быстро создавать тест-системы для оценки иммунной прослойки населения.

3. Алгоритм экстренной разработки средств молекулярной детекции патогенных микроорганизмов

Апробация разработанного алгоритма происходила во время эпидемии лихорадки Эбола в Западной Африке в 2013-2015 годах и во время пандемии COVID-19.

В рамках реагирования на данные чрезвычайные ситуации возникла необходимость в оперативном создании средств молекулярной диагностики, являющихся обязательным компонентом организации надзорных мероприятий. Для решения поставленной задачи был предложен следующий алгоритм (Рисунок 2).

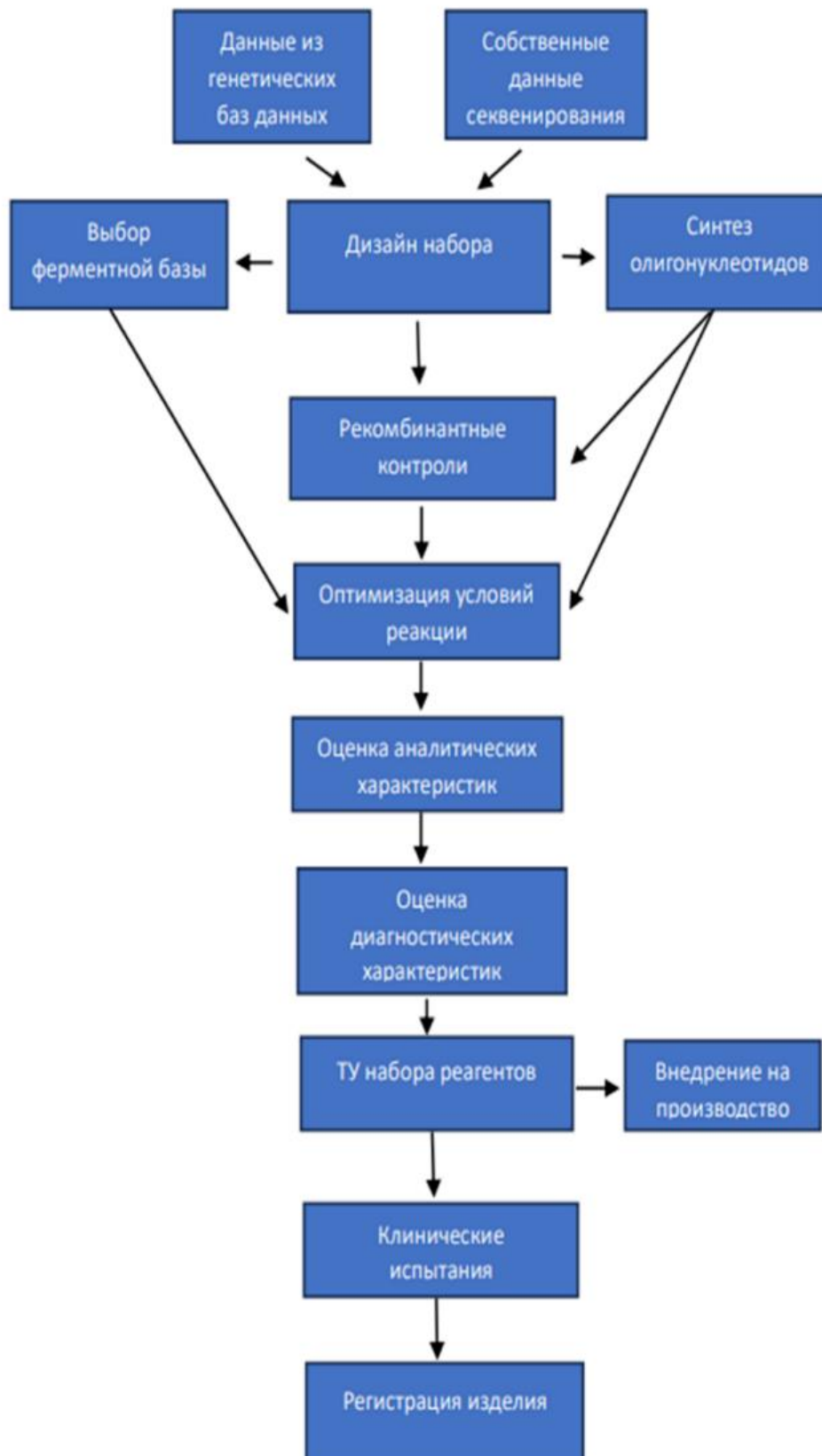


Рисунок 2 - Алгоритм экстренной разработки средств молекулярной детекции вирусов

3.1 Разработка методики в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров вируса Эбола Заир

Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зонда

В качестве мишени для олигонуклеотидных праймеров и зонда выбрали консервативный фрагмент первичной нуклеотидной последовательности гена полимеразы (L-ген) длиной 113 н.т. (позиции 13997-14110 н.т. референсного сиквенса ZEBOV, номер доступа в GenBank NCBI - HQ613402), выявленный путем выравнивания всех представленных в GenBank NCBI первичных нуклеотидных последовательностей вируса Эбола Заир (Рисунок 3).

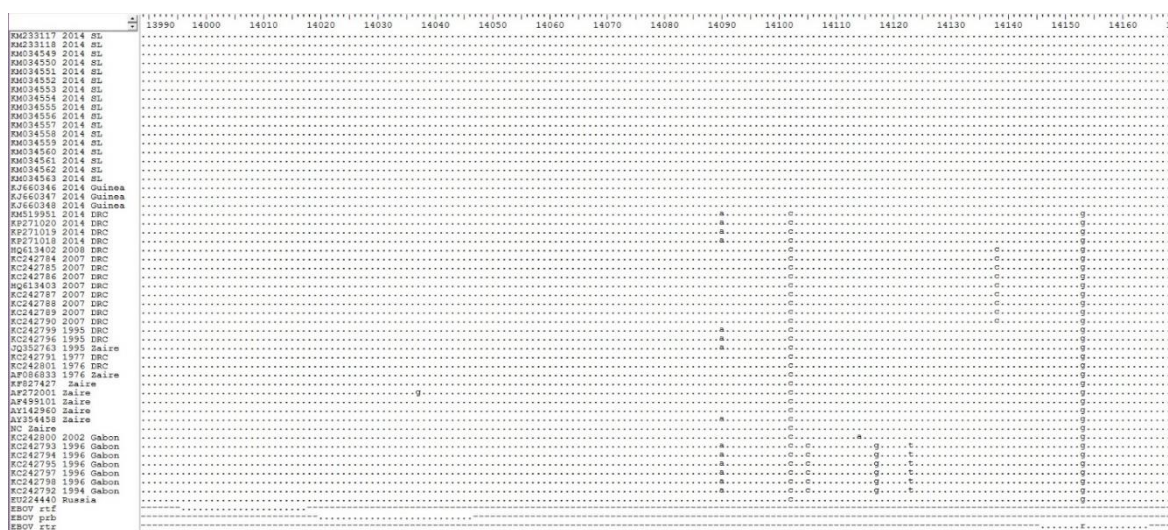


Рисунок 3 - Выравнивание первичных нуклеотидных последовательностей вируса Эбола Заир, представленных в GenBank NCBI. Построение проведено с помощью пакета программ BioEdit 7.2.5 software package (Ibis Biosciences, USA) с использованием алгоритма выравнивания CLUSTAL W [94]

Выравнивание проводили с помощью пакета программ BioEdit 7.2.5 software package (Ibis Biosciences, USA). Ретроспективный анализ показал 100% идентичность структур праймеров и зонда первичным нуклеотидным последовательностям изолятов из западной Африки [94,95], а также изолятов из Демократической Республики Конго (ДРК), полученных в 2014 г. [95].

Дизайн праймеров и зонда проводили с учетом общих требований, предъявляемых к олигонуклеотидным праймерам и зондам типа TaqMan при проектировании тест-систем в формате ПЦР-РВ [96,97,98]. Структуры праймеров и зонда представлены в Таблице 2 [85,86].

Таблица 2 - Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зонда

Праймер/зонд	Последовательность (5'-3')	Тип зонда	Размер ампликона
rt_ZEBOV-f	ATTTGAATGGGGTCCAATTGCC	TaqMan	113 п.о.
rt_ZEBOL-r	AGCTGCGGTTATYCTGCAAG		
ZEBOV_prb	R6G-AGTCCCTTAAAACGGCTACAAGAATGGgac-BHQ1		

Для снижения уровня фонового сигнала на 3'-конец зонда добавили искусственную последовательность из трех нуклеотидных остатков, что позволило сместить термодинамическое равновесие в сторону образования «шпильчатой» вторичной структуры (Рисунок 4), [84,85].

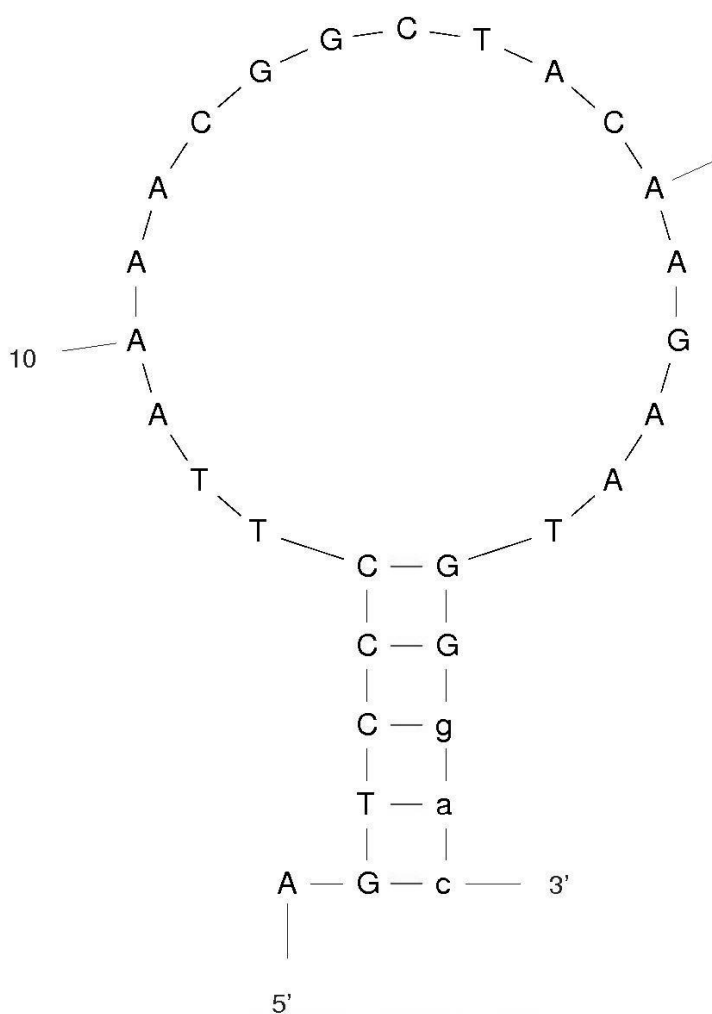


Рисунок 4 - Вторичная структура специфического зонда ZEBOV_prb. (по данным mfold). Три олигонуклеотидных остатка на 3' –конце введены искусственно для придания устойчивости вторичной структуре зонда [81,84,85]

При синтезе зонда в качестве флуорофора использовали R6G (родамин 6 Ж), а в качестве тушителя BHQ-1 (black hole quencher1).

Состав реакционной смеси и режим амплификации

Реакцию ОТ-ПЦР-РВ проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 10 мкл РНК-пробы, 1 мкл праймера rt_ZEBOV-f (5 пмоль /мкл), 1 мкл праймера rt_ZEBOV-r (5 пмоль /мкл), 1 мкл зонда ZEBOV_prb (5 пмоль /мкл), 2,5 мкл дНТФ (1,76 мМ, АмплиСенс®. Россия), 5 мкл смеси RT-PCR mix2 FEP/FRT (АмплиСенс®, Россия), 0,25 мкл MMLV-ревертазы (АмплиСенс®, Россия), 0,25 мкл RTG-mix2 (АмплиСенс®, Россия) и 0,5 мкл TaqF полимеразы (АмплиСенс®, Россия). Реакцию осуществляли в приборе для ПЦР-РВ RotorGene 6000 (Qiagen, Germany) в следующем режиме: 50°C - 15 мин; 95°C - 15 мин; 95°C - 10 с, 55°C - 20 с, 72°C - 15 с, n=45. Детекцию проводили при 55°C на канале Yellow [81,84,85].

Аналитическая чувствительность и специфичность

Специфичность диагностической системы оценивали с помощью кДНК из культур 33 видов вирусов (Таблица 1), а также 30 образцов клинического материала (плазма) от клинически здоровых людей. В результате исследования ложноположительных результатов не зафиксировано [81,82,85,86,87].

Для оценки аналитической чувствительности готовили с десятикратным шагом разведения ПКО известной концентрации в плазме, выделяли с помощью набора для экстракции нуклеиновых кислот Рибо-преп (АмплиСенс®, Россия) согласно рекомендациям производителя и исследовали с помощью диагностической системы для выявления минимального порогового разведения, при котором образец детектируется как положительный. По данным исследования аналитическая чувствительность системы составила 2×10^3 ГЭ (копий ПКО) в мл [81,84,85,86,87].

Также аналитическую чувствительность оценивали с помощью стандартного диагностического образца вируса Эбола Заир, предоставленного институтом Роберта Коха (Берлин, Германия). Препарат представляет собой инаktivированные и лиофилизированные вирусные частицы известной концентрации и рекомендован ВОЗ как тест-объект для оценки работоспособности систем, используемых для диагностики вируса Эбола Заир. Согласно прилагаемому паспорту, разведенный в 100 мкл стандартный диагностический образец содержал инаktivированные вирусные частицы в концентрации 2×10^7 ГЭ/мл. Из полученного раствора методом последовательных разведений готовили образцы стандартного препарата в концентрациях 5×10^3 , 10^3 , 10^2 ГЭ/мл. Для приготовления разведений использовали буфер TE (АмплиСенс®, Россия). Из полученных разведений выделяли вирусную РНК с помощью набора для выделения Viral RNA kit (Qiagen, Germany) согласно рекомендациям производителя, и исследовали с помощью разработанной системы для выявления минимального разведения, при котором стандартный образец детектируется как положительный. По данным исследования

аналитическая чувствительность системы, оцененная данным способом, составила 10^3 ГЭ в мл [80,83,85,86].

Нормализованные кривые флуоресцентного сигнала, полученные при оценке аналитической чувствительности диагностической системы, представлены на рисунке 5 (А, В).

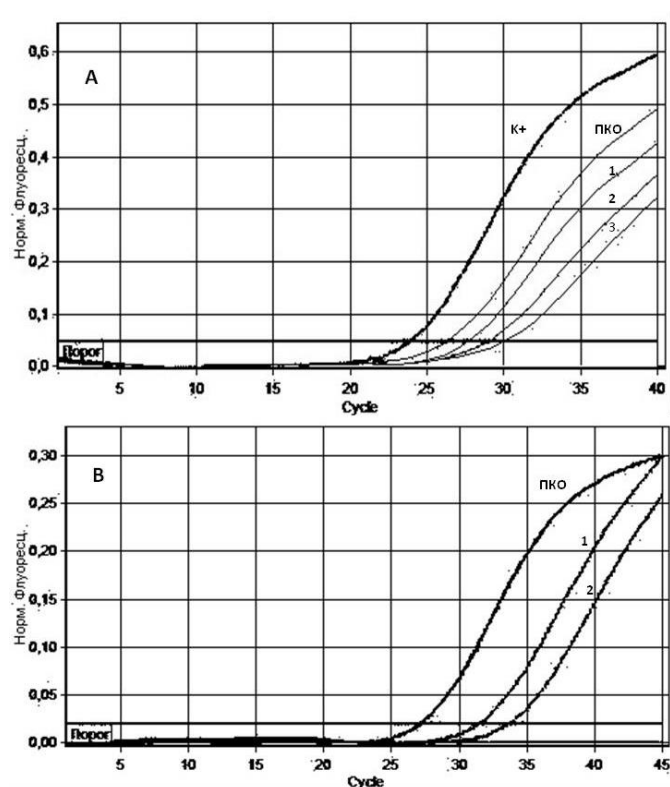


Рисунок 5 - Аналитическая чувствительность диагностической системы. Нормализованные кривые флуоресценции

А. Защищенный РНК-контроль (1 - 5×10^4 ГЭ/мл, 2 - 10^4 ГЭ/мл, 3 - 2×10^3 ГЭ/мл)

В. Стандартный контрольный образец (1 - 5×10^3 ГЭ/мл, 1 - 10^3 ГЭ/мл) [85]

Диагностическую чувствительность оценивали на панели образцов, охарактеризованных в лаборатории госпиталя Донка университета Гамаль-Абдель Нассера (г. Конакри, респ. Гвинея). Результаты тестирования диагностической системы EBOV(Zaire)-F1 представлены в Таблице 3.

Таблица 3 - Результаты ре-тестирования клинических образцов с помощью диагностической методики EBOV(Zaire)-Fl

№	ID госпиталя Донка	ID РПН	Дата поступления в госпиталь Донка	Вид материала	Дней от начала заболевания	Лаборатория госпиталя Донка, Ct	EBOV(Zaire) -Fl, Ct
1	635	0-13	26.08.2014	сыворотка	N/A	19.6	15.4
2	702	0-17	26.08.2014	сыворотка	N/A	20.6	15.9
3	722	0-18	26.08.2014	сыворотка	N/A	27.2	22.8
4	743	0-19	27.08.2014	сыворотка	N/A	33.8	29.1
5	744	0-20	27.08.2014	сыворотка	N/A	34.2	28.4
6	745	0-21	27.08.2014	мазок	Летальный исход	26.2	22.1
7	750	0-26	27.08.2014	сыворотка	3	41.7	36.4
8	751	0-27	27.08.2014	сыворотка	7	42.9	37.3
9	755	0-32	28.08.2014	кровь	Летальный исход	28.7	22.1
10	756	0-33	28.08.2014	кровь	Летальный исход	32.2	27.0
11	765	0-41	30.08.2014	мазок	Летальный исход	28.6	20.7
12	766	0-42	28.08.2014	мазок	Летальный исход	29.2	18.3
13	767	0-43	28.08.2014	сыворотка	4	27.3	21.5
14	769	0-45	28.08.2014	сыворотка	6	20.9	18.5
15	775	0-51	28.08.2014	сыворотка	8	23.6	18.9
16	776	0-52	28.08.2014	сыворотка	5	21.1	18.1
17	783	0-59	28.08.2014	мазок	Летальный исход	28.0	23.9
18	785	0-61	28.08.2014	кровь	Летальный исход	31.9	27.1
19	786	0-62	28.08.2014	сыворотка	7	20.3	17.2
20	787	0-63	28.08.2014	сыворотка	N/A	21.1	18.4
21	788	0-64	28.08.2014	сыворотка	N/A	24.5	19.2
22	789	0-65	29.08.2014	сыворотка	5	25.5	22.3
23	799	0-75	29.08.2014	сыворотка	N/A	33.4	29.8
24	803	0-79	29.08.2014	сыворотка	11	31.5	24.0
25	806	0-82	30.08.2014	сыворотка	2	22.7	16.1
26	807	0-83	30.08.2014	сыворотка	2	29.0	22.9
27	808	0-84	30.08.2014	сыворотка	4	21.3	19.6
28	809	0-85	30.08.2014	сыворотка	5	27.6	23.5
29	812	0-88	30.08.2014	сыворотка	1	27.3	22.9
30	813	0-89	30.08.2014	сыворотка	2	24.5	20.0
31	815	0-92	30.08.2014	кровь	Летальный исход	33.7	30.2
32	823	0-99	31.08.2014	кровь	Летальный исход	21.8	18.2
33	838	1-12	31.08.2014	сыворотка	1	42.9	38.3
34	842	1-17	02.09.2014	сыворотка	15	30.6	27.7
35	843	1-19	02.09.2014	сыворотка	5	29.7	24.6
36	845	1-21	03.09.2014	сыворотка	13	34.5	26.6
37	852	1-28	03.09.2014	сыворотка	4	26.8	24.3
38	856	1-32	03.09.2014	сыворотка	6	20.3	16.5
39	861	1-37	05.09.2014	мазок	Летальный исход	29.5	23.0
40	878	1-54	06.09.2014	сыворотка	6	39.1	35.5
41	887	1-63	08.09.2014	сыворотка	4	34.5	28.0
42	900	1-76	09.09.2014	сыворотка	5	29.0	23.1
43	917	1-92	10.09.2014	кровь	Летальный исход	21.1	17.3

Продолжение таблицы 3

44	919	1-94	10.09.2014	сыворотка	5	33.8	30.6
45	920	1-95	10.09.2014	кровь	Летальный исход	22.0	18.7
46	923	1-98	11.09.2014	сыворотка	N/A	28.0	24.3
47	926	2-01	11.09.2014	кровь	Летальный исход	29.0	25.8
48	929	2-04	11.09.2014	кровь	Летальный исход	19.7	14.6
49	930	2-05	11.09.2014	сыворотка	N/A	отрицательный	25.7
50	932	2-07	11.09.2014	сыворотка	N/A	отрицательный	30.6
51	933	2-08	11.09.2014	сыворотка	N/A	отрицательный	31.4
52	934	2-09	11.09.2014	сыворотка	N/A	отрицательный	33.5

Таким образом нами была разработана первая отечественная диагностическая методика в формате ОТ-ПЦР-РВ для диагностики вируса Эбола Заир. На основании разработанной методики была создана и зарегистрирована тест-система EBOV-Zaire-Fl (АмплиСенс®, Россия). Система содержит полный комплект реагентов для проведения анализа, включая реагенты для выделения РНК. Наличие защищенного положительного контрольного образца позволяет контролировать качество всех этапов проведения анализа, в том числе и этап выделения нуклеиновых кислот [82,83,85].

Аналитическая чувствительность системы, оцененная двумя способами, совпадает в пределах погрешности измерения методом ПЦР-РВ и составляет $1-2 \times 10^3$ ГЭ в мл. Полученное пороговое значение чувствительности соответствует таковым для зарубежных аналогов и является стандартом для диагностических систем в формате ОТ-ПЦР-РВ [80,81,84,85].

За счет удачного выбора таргетной области для амплификации разработанная система способна одинаково успешно выявлять изоляты, циркулирующие как в западной, так и в центральной Африке [79,80,83,84].

Таким образом впервые была показана возможность успешной оперативной разработки диагностической тест-системы в формате ОТ-ПЦР-РВ с использованием синтетических методов при отсутствии реального патогена.

3.2 Разработка методики в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров филовирюсов Эбола и Марбург

Идентификация консервативных сайтов и дизайн методики

Для выбора мишени все доступные в GenBank NCBI сиквенсы филовирюсов SUDV, MARV, BDBV, RESTV и TAFV были выровнены с целью выявления консервативных фрагментов, пригодных для детекции методом ОТ-ПЦР-РВ. Выравнивание осуществляли с помощью пакета программ BioEdit 7.2.5 software package (Ibis Biosciences, USA).

Фрагмент 135 н.т. гена NP (1199 н.т.-1334 н.т. референс сиквенса MARV, GenBank KR063674) (Рисунок 6), фрагмент 130 н.т. гена VP30 (9012 н.т.-9142 н.т. референс сиквенса SUDV, GenBank KT878488) (Рисунок 7а), фрагмент 97 н.т. гена VP40 gene (4733 н.т. – 4830 нт референс сиквенса TAFV, GenBank KU182910) (Рисунок 7b), фрагмент 85 н.т. гена NP (87 н.т. – 172 н.т. референс сиквенса BDBV, GenBank KU182911) (Рисунок 7c), и фрагмент 86 н.т. гена L (12896 н.т. – 12959 н.т. референс сиквенса RESTV, GenBank JX477166) (Рисунок 7d) были выбраны в качестве мишеней для амплификации.

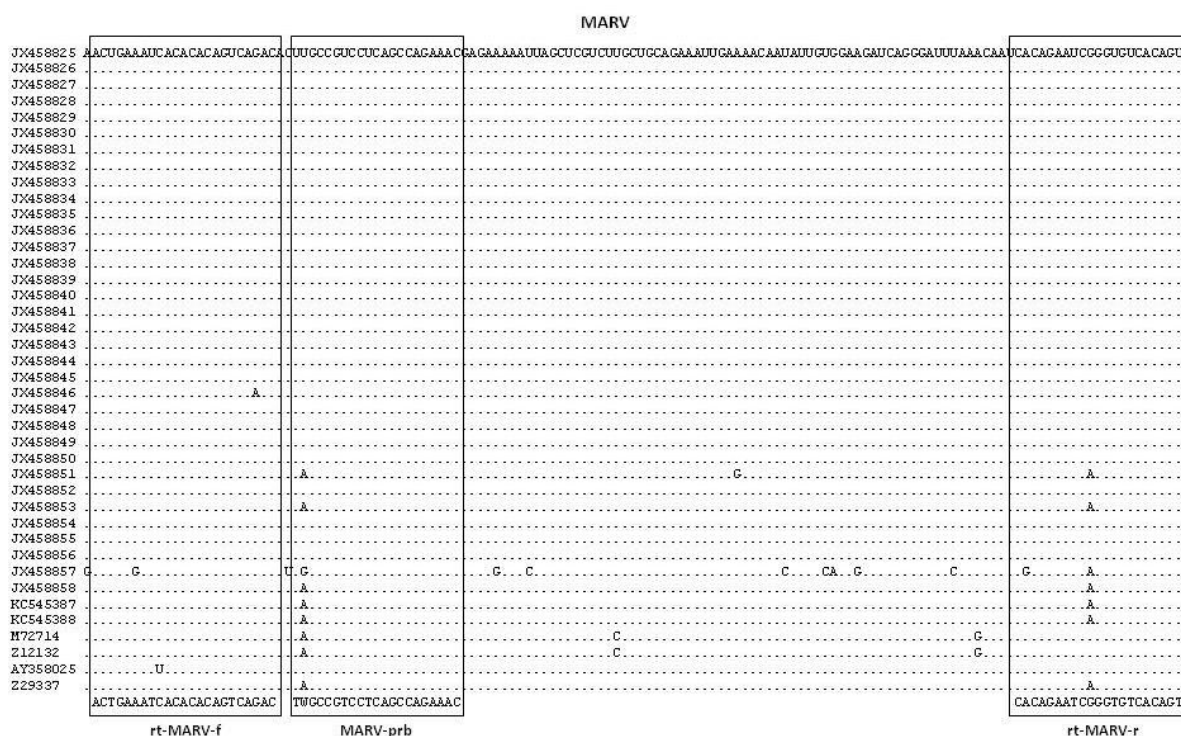


Рисунок 6 - Фрагмент выравнивания сиквенсов вируса *Marburg* (L-ген)

Фрагменты сиквенсов вируса *Marburg* (MARV): JX458825-JX458858, Z12132, Z29337, AY358025, KC545387-KC545388, M72714. Рамками показаны последовательности праймеров и зонда для детекции таргетного фрагмента.

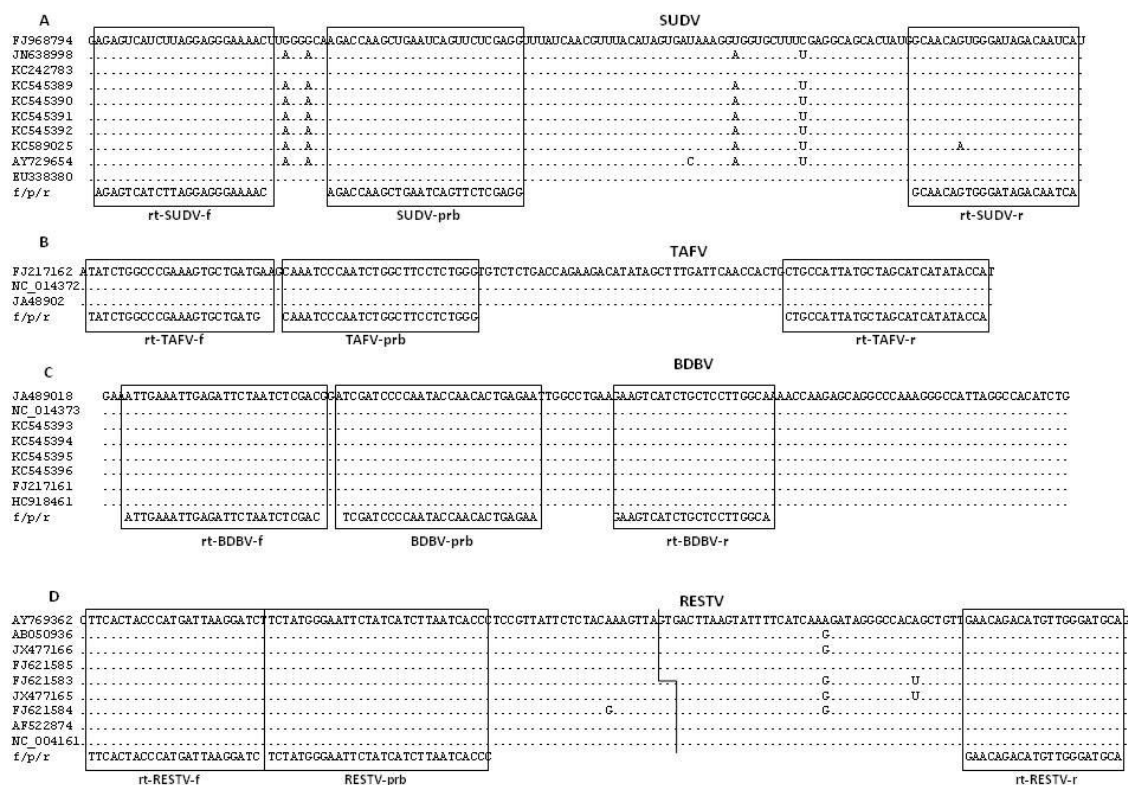


Рисунок 7 - Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей филовирюсов

А – *Sudan ebolavirus* (VP30-ген). Фрагмент выравнивания последовательностей *Sudan ebolavirus* (SUDV): KC242783, KC545383, KC545389-KC545392, KC589025, AY729654, EU338380, FJ968794, JN638998

В – *Tai Forest ebolavirus* (VP40-ген). Фрагмент выравнивания последовательностей *Tai Forest ebolavirus* (TAFV): FJ217162, NC_014372, JA48902

С – *Bundibugyo ebolavirus* (NP-ген). Фрагмент выравнивания последовательностей *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV): JA489018, KC545393-KC545396, FJ217161, NC_014373, HC918461

Д – *Reston ebolavirus* (L-ген). Фрагмент выравнивания последовательностей *Reston ebolavirus* (RESTV): AY769362, AB050936, JX477166, FJ621585, FJ621583, JX477165, FJ621584, AF522874, NC_004161

Рамками показаны последовательности праймеров и зондов для детекции соответствующих фрагментов [99].

Кроме того, фрагмент 113 н.т. гена L, описанный выше, был использован в качестве мишени ZEBOV [94,99].

В виду ограниченного количества оптических каналов регистрации флуоресцентного сигнала (максимальное количество каналов в существующих приборах для проведения ПЦР-РВ ограничено шестью), разрабатываемый диагностикум был разделен на две части. Первая часть -

FiloA-FI предназначена для выявления молекулярных маркеров филовирусов ZEBOV, SUDV и MARV (Таблица 4). Вторая часть - FiloB-FI предназначена для выявления молекулярных маркеров филовирусов BDBV, TAIHV и непатогенного для человека филовируса RESTV (Таблица 5).

Таблица 4 - Дизайн FiloA-FI [85,86,99]

Вирус	Праймер/зонд	Сиквенс (5'-3')	Тип зонда	Размер ампликона	мишень
ZEBOV	rt-ZEBOV-f	ATT TgA ATg ggg TCC AAT TgC C	TaqMan	113 нт	L
	rt-ZEBOL-r	AAg CAg TRC CTA TAC Tag CCA			
	ZEBOV-prb	FAM-AgT CCC TTA AAA Cgg CTA CAA GAA Tgg gAC-BHQ1			
SUDV	rt-SUDV-f	AgA gTC ATC TTA ggA ggg AAA AC	TaqMan	130 нт	VP30
	rt-SUDV-r	TgA TTg TCT ATC CCA CTg TTg C			
	SUDV-prb	R6G-AgA CCA AgC TgA ATC AgT TCT CgA ggT C-BHQ1			
MARV	rt-MARV-f	ACT gAA ATC ACA CAC AgT CAg AC	TaqMan	135 нт	NP
	rt-MARV-r	ACT gTg ACA CCC gAT TCT gTg			
	MARV-prb	ROX-TWg CCg TCC TCA gCC AgA AAC gg-BHQ2			
IC-STI87-rec	STI-87f	N/A	TaqMan	117 нт	Искусственный фрагмент
	STI-87r	N/A			
	STI-87-prb	Cy5-(X) ₂₅ -BHQ2			

Таблица 5 - Дизайн FiloB-FI

Вирус	Праймер/зонд	Сиквенс (5'-3')	Тип зонда	Размер ампликона	мишень
TAFV	rt-TAFV-f	TAT CTg gCC CgA AAg TgC TgA Tg	TaqMan	97 нт	VP40
	rt-TAFV-r	Tgg TAT ATg ATg CTA gCA TAA Tgg CAg			
	TAFV-prb	FAM-CAA ATC CCA ATC Tgg CTT CCT CTg ggA T-BHQ1			
BDBV	rt-BDBV-f	ATT gAA ATT gAg ATT CTA ATC TCg AC	TaqMan	85 нт	NP
	rt-BDBV-r	TgC CAA ggA gCA gAT gAC TTC			
	BDBV-prb	R6G-TCC CCA ATA CCA ACA CTg AgA ATT ggg-BHQ1			
RESTV	rt-RESTV-f	TTC ACT ACC CAT gAT TAA ggA TC	TaqMan	86 нт	L
	rt-RESTV-r	AAg TCA CTA ATC ACC TTY gTA gAg			
	RESTV-prb	ROX-TCT ATg ggA ATT CTA TCA TCT TAA TCA CCC ATA-BHQ2			
IC-STI87rec	STI-87f	N/A	TaqMan	117 нт	Искусственный фрагмент
	STI-87r	N/A			
	STI-87-prb	Cy5-(X) ₂₅ -BHQ2			

Состав реакционной смеси и режим амплификации

Реакцию ОТ-ПЦР-РВ для обеих частей разрабатываемого диагностикума проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 10 мкл РНК-пробы, по 0,2 мМ каждого праймера и каждого зонда, 2,5 мкл дНТФ (1,76 мМ, АмплиСенс®, Россия), 5 мкл смеси RT-PCR mix2 FEP/FRT (АмплиСенс®, Россия), 0,25 мкл MMLV-ревертазы (АмплиСенс®, Россия), 0,25 мкл RTG-mix2 (АмплиСенс®, Россия) и 0,5 мкл TaqF полимеразы (АмплиСенс®, Россия). Реакции проводили в приборе для ПЦР-РВ RotorGene 6000 (Qiagen, Germany) в следующем режиме: 50°C - 15 мин; 95°C - 15 мин; 95°C -10 с, 60°C - 20 с, n=45. Детекцию проводили при 60°C [87,88,100].

Конструирование позитивных контрольных образцов ПЦР и защищенных ПКО осуществили, как описано выше и смешали эквимольно, для создания контрольных позитивных препаратов. Концентрацию оценивали методом цифровой капельной ПЦР с использованием прибора QX100 (Bio-Rad, USA).

Специфичность и чувствительность

Специфичность оценивали с использованием образцов гетерологичной ДНК/РНК (Таблица 1) и образцов биологического материала от пациентов с клиническими проявлениями лихорадки, у которых диагноз «лихорадка эбола» не подтвердился (n=164) и сывороток от клинически здоровых людей (n=50).

Образцы клинического материала от пациентов с лихорадкой были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории геморрагических лихорадок Университета Гамаля Абдель Нассера, г. Конакри, Республика Гвинея. Исследование показало отсутствие ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Аналитическая чувствительность, определенная с помощью серийных разведений ПКО, составила 5×10^2 ГЭ/мл ПКО для FiloA-F1 (Рисунок 8) и 5×10^3 ГЭ/мл для FiloB-F1 (Рисунок 9). Детекция оставалась линейной в диапазоне концентраций 10^5 ГЭ/мл (Ct 28) - 5×10^2 ГЭ/мл (Ct 36) для EBOV ($R^2=0,99$), 10^5 ГЭ/мл (Ct 27) - 5×10^2 ГЭ/мл (Ct 37) для SUDV ($R^2=0,98$), 10^5 ГЭ/мл (Ct 27) - 5×10^2 ГЭ/мл (Ct 37) для MARV ($R^2=0,98$), 10^5 ГЭ/мл (Ct 31) - 10^3 ГЭ/мл (Ct 39) для TAIHV ($R^2=0,99$), 10^5 ГЭ/мл (Ct 29) - 10^3 ГЭ/мл (Ct 36) для BDBV ($R^2=0,97$) и 10^5 ГЭ/мл (Ct 31) - 10^3 ГЭ/мл (Ct 39) для RESTV ($R^2=0,98$).

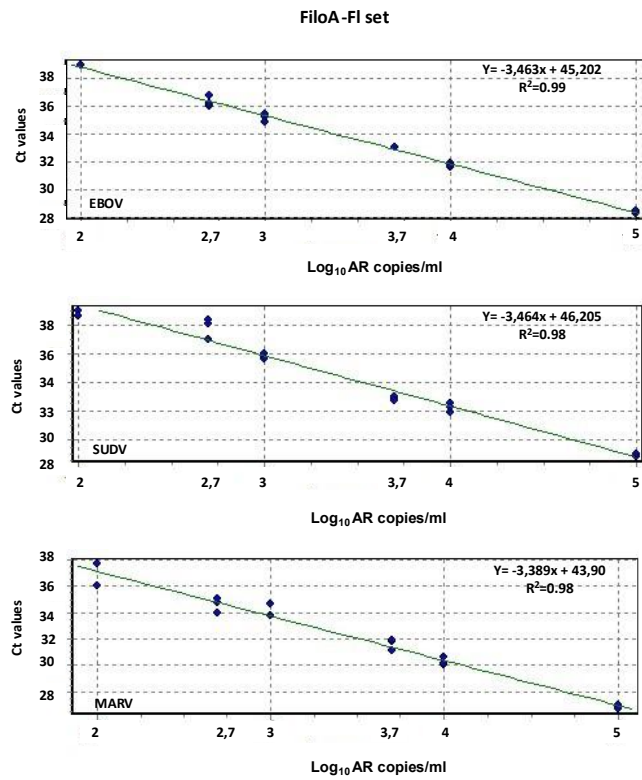


Рисунок 8 - Определение предела детекции FiloA-FI с помощью стандартных разведений ПКО. Показан диапазон линейности для каждой мишени

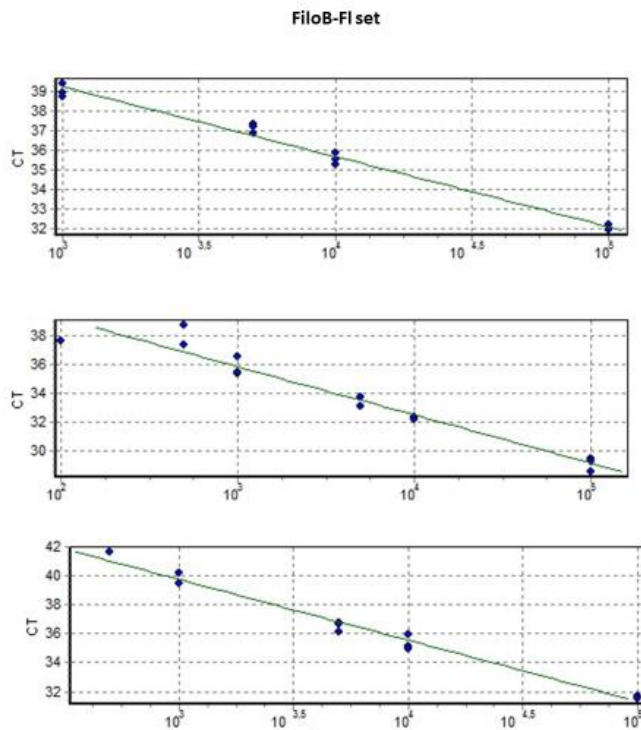


Рисунок 9 - Определение предела детекции FiloB-FI с помощью стандартных разведений ПКО. Показан диапазон линейности для каждой мишени

Таким образом, были разработаны диагностикумы для выявления всех известных филовиров, полностью отвечающие по аналитическим характеристикам ведущим зарубежным аналогам [10]. Была отработана система оперативного создания диагностических наборов с использованием *in silico* методик. Данный опыт далее был успешно реализован в ходе оперативной разработки диагностической системы COVID-19Amp (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Россия).

3.3 Разработка методики в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров SARS-CoV-2

В конце 2019 – начале 2020 г. появились сообщения из г. Ухань (КНР) о вспышке инфекции, вызванной новым бета-коронавирусом SARS-CoV-2, названной впоследствии coronavirus disease 2019 (COVID-19) (<https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-tehe-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>; [23,100,101]. В связи с отсутствием отечественных средств молекулярной диагностики SARS-CoV-2, а также принимая во внимание необходимость массового тестирования населения, Руководителем Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) было дано поручение подведомственным институтам эпидемиологического профиля оперативно разработать и наладить производство диагностических систем для выявления молекулярных маркеров нового коронавируса. В соответствии с данным поручением нами в сжатые сроки, с учетом ранее выработанного алгоритма, удалось разработать диагностическую систему в формате ОТ-ПЦР-РВ, а также наладить ее крупносерийное производство.

Определение консервативных сайтов генома SARS-CoV-2 и дизайн праймеров и зонда для ОТ-ПЦР-РВ

Все имеющиеся к февралю 2020 года сиквенсы SARS-CoV-2, депонированные в GenBank были выровнены с помощью пакета программ BioEdit 7.2.5 software package (Ibis Biosciences, USA). 113н.т. фрагмент гена ORF1ab, кодирующего неструктурный белок nsp2 был выбран в качестве мишени с помощью онлайн-ресурса PLOTCON (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/plotcon>).

Структуры праймеров и зонда представлены в Таблице 6 [103].

Таблица 6 - Дизайн диагностикума COVID-19Amp

Праймер/зонд	Сиквенс 5'–3'	Тип зонда	Мишень	Длина, нт	Координаты в референс геноме (GenBank ID MT457401.1)
CoV_pr	R6G - TCT TgC CgA ATA CCA TAA TgA ATC Tgg CAA - BHQ1	TaqMan	ORF1ab	30	1414–1441
CoV_for	TCA CAA TTC AgA AgT Agg ACC Tg		ORF1ab	23	1384–1406
CoV_rev	AgC CTC CAA Agg CAA TAg TgC		ORF1ab	21	1470–1490
ICS_pr	FAM - CTA gCT ggg CgT Cag gAA TCC Cag g - BHQ1	TaqMan	Искусственная мишень	25	–
ICS_for	CCG GAT TGC GTA TCT CCG GAC T		Искусственная мишень	22	–
ICS_rev	CAC GGC GGC ATC TCT ATC ACG A		Искусственная мишень	22	–

Состав реакционной смеси и режим проведения реакции

Реакцию ОТ-ПЦР-РВ для обеих частей разрабатываемого диагностикума проводили в объеме 25 мкл, содержащего следующие компоненты: 1 мкл смеси ферментов BioMaster Mix (Биолабмикс, Россия); 12,5 мкл 2-х кратного реакционного буфера (Биолабмикс, Россия); 0,25 мкл каждого праймера и зонда (Cov_for, Cov_rev, Cov_pr) в конечной концентрации 0,4 мМ для праймеров и 0,28 мМ для зонда; 0,25 мкл каждого праймера и зонда для детекции внутреннего контроля (ICS) (ICS_for, ICS_rev, ICS_pr) в конечной концентрации 0,2 мкМ для праймеров и 0,12 мМ для зонда; 10 мкл РНК из биологического образца. Режим амплификации был следующим: 50 °С - 15мин, 95 °С - 5мин, и далее 40 циклов 95 °С - 10с, 57 °С - 30с. Детекцию проводили при 57 °С по каналам JOE (для SARS-CoV-2) и FAM (для ICS).

ПКО ПЦР и обратной транскрипции были синтезированы в соответствии с методикой, описанной выше.

Определение предела детекции (LOD – Limit of detection)

Предел детекции определяли с помощью 10-кратных разведений ПКО SARS-CoV-2 [106]. Предел детекции, рассчитанный подобным способом, составил 10^3 ГЭ/мл. Детекция оставалась линейной в диапазоне концентраций 10^6 ГЭ/мл ($C_t=21,08-22,17$) - 10 ГЭ/мл ($C_t=38,17-39,16$) фаговых частиц SARS-CoV-2 ($R^2=0,97-0,99$; Рисунок 10).

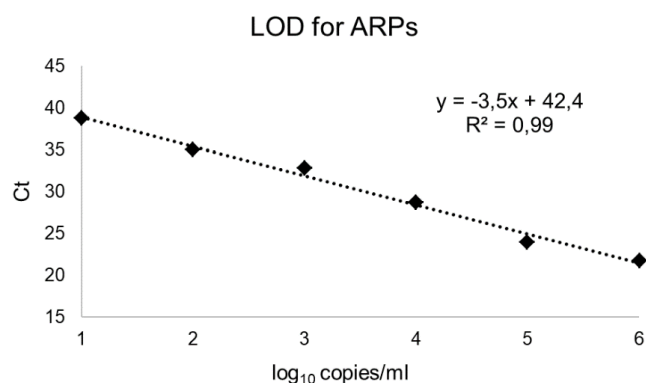


Рисунок 10 - Предел детекции диагностикума COVID-19 Amp, определенный с помощью серийных разведений ПКО. Детекция линейная в диапазоне 10^6 ГЭ/мл - 10 ГЭ/мл. Предел детекции (LOD) был определен как минимальная концентрация, детектируемая в трех повторях

Специфичность

Отсутствие кросс-реактивности подтверждали с помощью панели, содержащей РНК и ДНК респираторных вирусов 7 видов (Таблица 7). Ложноположительных результатов не выявили.

Таблица 7 - Перечень образцов гетерологичной ДНК/РНК

Вирус	Семейство	Род	Вид нуклеиновых кислот
MERS-CoV	<i>Coronaviridae</i>	<i>Betacoronavirus</i>	РНК
Coronavirus 229E	<i>Coronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	РНК
Coronavirus NL63	<i>Coronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	РНК
Coronavirus OC43	<i>Coronaviridae</i>	<i>Betacoronavirus</i>	РНК
Adenovirus 3 type	<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	ДНК
RCV	<i>Pneumoviridae</i>	<i>Orthopneumovirus</i>	РНК
Parainfluenza virus 3 type	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus</i>	РНК

Диагностическая чувствительность и специфичность

Мазки из носоглотки больных COVID-19 (n=109) были исследованы разработанным диагностикумом и по протоколу, рекомендованному ВОЗ (Таблица 8).

Таблица 8 - Список клинических образцов для определения диагностической чувствительности и специфичности COVID-19 Amp

№	Пол	Возраст	C _т , COVID-19 Amp	C _т , Протокол ВОЗ
1	Ж	63	24,04	26,03
2	Ж	50	19,66	21,06
3	Ж	49	19,46	23,08
4	Ж	62	27,14	27,36
5	М	34	18,41	21,75
6	Ж	49	22,24	22,93
7	Ж	37	19,74	23,23
8	Ж	24	25,55	35,81
9	М	32	20,92	23,52
10	М	56	23,07	24,62
11	Ж	37	26,76	28,36
12	М	59	29,09	39,96
13	Ж	23	21,63	23,72
14	Ж	52	26,21	27,90
15	Ж	54	25,13	28,05
16	Ж	59	28,73	28,29
17	М	25	22,03	24,12
18	Ж	31	25,84	25,72
19	М	56	19,27	22,80
20	Ж	40	20,53	23,10
21	Ж	40	32,58	27,45
22	М	43	23,19	27,01
23	Ж	57	22,56	23,30
24	Ж	46	21,34	25,43
25	Ж	30	22,23	24,94
26	Ж	48	20,16	23,63
27	М	70	21,29	24,37
28	М	23	23,77	25,47
29	М	68	22,04	26,02
30	М	25	20,85	24,73
31	М	40	31,32	24,58
32	Ж	58	23,52	26,46
33	Ж	49	22,31	23,37
34	Ж	79	18,14	22,72
35	М	27	21,24	24,39
36	М	29	20,11	21,73
37	Ж	73	21,17	23,29
38	Ж	59	25,20	26,60
39	Ж	41	22,79	24,53
40	М	53	24,19	24,56
41	М	65	26,68	26,54
42	Ж	61	21,18	23,07
43	Ж	38	19,92	22,05
44	М	57	22,04	22,52
45	М	27	21,51	23,30
46	М	24	23,61	27,19
47	Ж	36	23,06	23,16
48	Ж	51	18,53	23,04
49	Ж	61	25,36	27,03
50	М	64	24,51	25,55

Продолжение таблицы 8

51	Ж	23	22,63	25,44
52	Ж	33	28,83	30,76
53	Ж	47	25,04	28,04
54	Ж	50	20,48	23,49
55	Ж	39	21,29	22,69
56	Ж	48	24,33	27,94
57	М	30	20,59	23,37
58	Ж	60	21,02	23,12
59	М	44	18,30	22,44
60	М	51	23,79	25,80
61	Ж	56	24,10	25,26
62	М	26	16,72	19,40
63	Ж	71	20,64	23,78
64	Ж	64	19,00	22,28
65	Ж	86	26,82	28,53
66	Ж	41	23,85	25,73
67	М	48	23,75	26,18
68	М	31	25,21	26,37
69	Ж	21	24,46	27,51
70	М	73	26,10	24,40
71	Ж	82	23,49	24,61
72	М	88	20,29	23,77
73	Ж	69	25,56	28,16
74	Ж	67	22,04	25,22
75	Ж	83	23,19	24,43
76	Ж	65	18,90	22,85
77	М	31	24,93	26,69
78	М	33	23,42	27,19
79	М	40	24,89	27,65
80	М	58	23,21	26,34
81	Ж	27	26,56	27,85
82	Ж	28	19,35	22,53
83	Ж	63	22,96	28,22
84	М	73	19,07	22,81
85	Ж	59	26,67	30,04
86	М	23	28,09	29,52
87	М	61	28,31	30,44
88	Ж	53	29,40	22,03
89	Ж	47	29,43	32,60
90	М	39	26,52	28,28
91	Ж	40	29,79	30,94
92	Ж	33	26,37	27,23
93	Ж	34	26,21	29,24
94	Ж	56	17,01	20,81
95	Ж	55	22,42	23,79
96	Ж	49	28,05	28,39
97	М	47	23,05	26,06
98	Ж	58	21,78	25,30
99	М	50	24,55	28,25
100	Ж	70	27,15	30,43

Доверительный 95% интервал был рассчитан в соответствии с рекомендациями R. Newcombe [103]. Кроме того, дискордантные образцы были исследованы дополнительно

набором Vector-PCRrv-2019-nCoV-RG (ФБУН ГНЦ «Вектор», Новосибирск), широко используемым в России в момент проведения исследования.

Показатели C_t исследованных с помощью разработанного диагностикума COVID-19 Amp варьировали в диапазоне 16,7-32,6 циклов, а согласно протоколу, рекомендованному ВОЗ - 19,4-39,96 (Таблица 8, Рисунок 11).



Рисунок 11 - Сравнение C_t позитивных образцов, исследованных COVID-19 Amp и по протоколу ВОЗ. Среднее C_t при исследовании диагностикумом COVID-19 Amp меньше на 2,2 цикла по сравнению с протоколом ВОЗ

Отличие показателя C_t COVID-19 Amp и протокола ВОЗ составило 2,2, что свидетельствует о большей чувствительности разработанного диагностикума, в сравнении с протоколом, рекомендованным ВОЗ.

Таким образом, нами был разработан алгоритм, позволяющий оперативно создавать средства молекулярной диагностики. При этом основная часть работы выполняется без использования реального возбудителя за счет методов синтетической биологии и биоинформатики. Алгоритм был успешно применен в рамках разработки диагностической системы EBOV-Zaire-F1 (АмплиСенс®, Россия) [15,80,82,83,84,85,86] во время эпидемии лихорадки Эбола в Западной Африке (2013 г. -2015 г.), и диагностической системы COVID-19 Amp (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Россия), во время пандемии COVID-19. Всего к настоящему моменту с помощью данного алгоритма разработано 22 набора для диагностики инфекционных заболеваний человека и животных. Их перечень и характеристики приведены в Таблице 9.

Таблица 9 - Перечень диагностических наборов, разработанных в рамках исследования

N	Набор	Производитель	Формат	Назначение	Мишень	Контроли	Предел детекции	Ссылка/ патент
1	KEMV-FI	ЦНИИЭ Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус Кемерово	L	К+, ПКО, ВКО STI	10 ³ копий/мл	[105,106]
2	*EBOV(Zaire)-FL Амплисенс®	ЦНИИЭ Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус Эбола Заир (ZEBOV)	L	К+, ПКО, ВКО STI	5x10 ² копий/мл	[82, 99]
3	*FiloA-screen-FI Амплисенс®	ЦНИИЭ Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирусы Эбола Заир и Судан, вирус Марбург (ZEBOV/ SUDV/MARV)	L/VP30/ NP	К+, ПКО, ВКО STI	5x10 ² копий/мл	[100]
4	FiloB-screen-FI Амплисенс®	ЦНИИЭ Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирусы Эбола леса Таи, Бундибутио, Рестон (TAFV/BDBV/RESTV)	VP40/NP/ L	К+, ПКО, ВКО STI	5x10 ³ копий/мл	[100]
5	RABV-FI Амплисенс®	ЦНИИЭ Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус бешенства (RABV)	N	К+, ПКО, ВКО STI	5x10 ³ копий/мл	[109,110]
6	LASV-FI	ЦНИИЭ Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус Ласса (LASV)	L	К+, ПКО, ВКО STI	10 ³ -10 ⁵ копий/мл	[64,110]
7	LUJV-FI	ЦНИИЭ Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус Льюй (LUJV)	L	К+, ПКО, ВКО STI	5x10 ³ копий/мл	[66,103], Патент
8	*COVID-19Amp	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус SARS-CoV-2	L	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	[68,113], Патент
9	*nOPV2-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Измененный вакцинный штамм полиовируса 2-го типа (nOPV2)	сre инсерция в 5'-UTR регионе	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	[69,114, 118], Патент
10	*MV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус кори (MeV)	L	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	[69,114], Патент
11	SFTSV_AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус тяжелой лихорадки с тромбоцитопенически м синдромом (SFTSV)	L	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	[72], Патент
12	NIPV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус Нипах (NIPV)	G	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	[75,76,115,1 16], Патент
13	HENV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус Хендра (HENV)	N	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	Патент
14	GTOV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус Гуанарито (GTOV)	L	К+, ПКО, ВКО	10 ² копий/мл	Патент
15	MPX-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- PB	Вирус оспы Обезьян (MPX)	OPG025	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	Патент

Продолжение таблицы 9

16	OROPV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- РВ	Вирус Орапуш (OROPV)	L	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	-
17	MACHV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- РВ	Вирус Мачупо	L	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	-
18	SABV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- РВ	Вирус Сэбиа	L	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	-
19	JUNV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- РВ	Вирус Хунин	L	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	-
20	CHAPV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- РВ	Вирус Чапаре	S	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	-
21	TBEV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- РВ	Вирус клещевого энцефалита	NS3	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	Патент
22	CCHFV-AmpPS	НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора	ОТ-ПЦР- РВ	Вирус Крымской- Конго геморрагической лихорадки	L, S	К+, ПКО, ВКО	10 ³ копий/мл	Патент

*Набор зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения

4. Разработка подходов к изучению разнообразия и экологии вирусов позвоночных, обладающих эпидемическим потенциалом

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в настоящее время, весь спектр инфекционной патологии по-прежнему остается неясным, и его проявления способны приводить к возникновению чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера [90,120,121]. Существующая система надзора за инфекционными заболеваниями включает сложившиеся и доказавшие эффективность алгоритмы реагирования на уже возникшие эпидемии, вызванные известными возбудителями. В связи с актуальностью проблемы новой инфекционной патологии стали складываться принципы действий в условиях чрезвычайных ситуаций, вызванных возбудителями неизвестных инфекционных болезней [120], однако вопросу отслеживания потенциальных эпидемиологических рисков по-прежнему не уделяется должного внимания. Между тем, спектр новых инфекций чрезвычайно широк и находится в сфере интереса различных научно-исследовательских организаций, специалисты которых уже обращают внимание на необходимость совершенствования круга задач, стоящих перед современным эпидемиологическим надзором [119,121]. Согласно имеющимся оценкам,

существует минимум 320 тысяч вирусов позвоночных, каждый из которых является потенциальным патогеном [123].

Необходимость изучения разнообразия вирусов наглядно показало пандемическое распространение новой коронавирусной инфекции, вызванной бета-коронавирусом SARS-CoV-2, ставшее неожиданностью для мирового сообщества и способствовавшее изменению устоявшихся представлений о месте, занимаемом «новыми инфекциями» [28,29]. Необходимость совершенствования мониторинга за новыми инфекциями влечет за собой необходимость создания единой концепции для целостного восприятия проблемы, координации направлений деятельности по изучению новых инфекций, общей оценки эпидемиологической ситуации, своевременного выявления потенциальных угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию [28]. Данная концепция предусматривает существование систем мониторинга этих инфекций, отличающихся от традиционного надзора за уже известными возбудителями [122].

4.1 Родоспецифическая ПЦР

Использование тест-систем для выявления известных вирусов не решает вопрос диагностики новых вирусных инфекций. Например, расшифровка эпидемии атипичной пневмонии в 2002-2003 гг., вызванной SARS-CoV-1, заняла несколько месяцев и заметно отставала от скорости распространения заболевания. Таким образом, противоэпидемическая безопасность требует разработки методик, способных определять еще неизвестные вирусы.

Одним из направлений разработки таких методик являлось использование родоспецифической ПЦР с праймерами, специфичными сразу ко всем известным представителям группы вирусов, чаще всего таксономического рода. Такие методики рассчитаны на амплификацию эволюционно консервативных участков вирусного генома с последующим капиллярным секвенированием полученных фрагментов [28,33,34]. По сравнению с классическими тест-системами такие поисковые методы обладают сниженной чувствительностью и специфичностью, но расширенным диагностическим диапазоном, и способны выявлять еще неизвестные вирусы, как в пределах таксономической группы, так и отдаленно родственные вирусы. Происходит это за счет использования в качестве мишеней эволюционно консервативных генетических элементов [28,29].

Полученный ПЦР-продукт клонируют в плазмиду (вектор) и трансформируют компетентные клетки (*E. coli*). Далее методом ПЦР *in situ* амплифицируют клонированные фрагменты и секвенируют методом капиллярного секвенирования по 10-20 отдельных колоний, с целью выявить геномную последовательность вирусной кДНК/ДНК

Следует отметить, однако, что данные методики, в традиционном исполнении, являются чрезвычайно ресурсо-затратными, требуют высокой квалификации исследователя и при этом чрезвычайно малочувствительны. Традиционная схема молекулярного типирования вирусов методом родоспецифической ПЦР представлена на Рисунке 12.

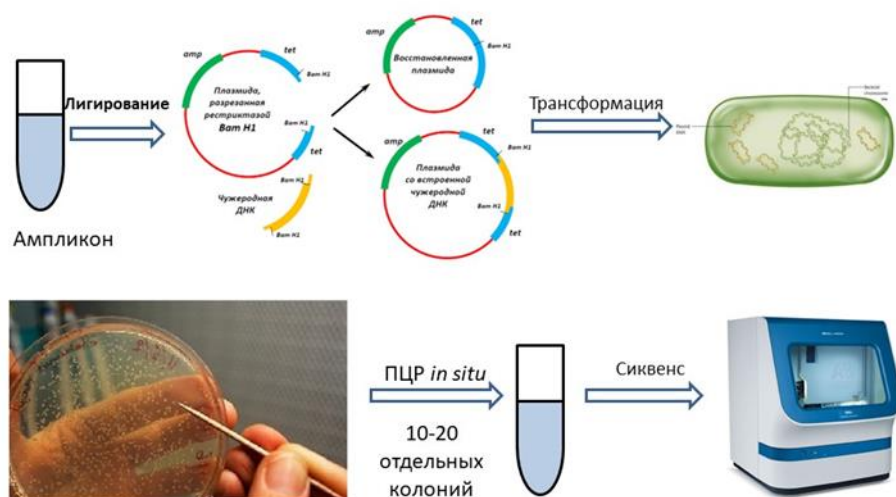


Рисунок 12 - Схема молекулярного типирования вирусов методом родоспецифической ПЦР

Появление технологий NGS вызвало настоящую революцию в самых различных областях медицины и биологии. Вирусология также получила существенный толчок в развитии благодаря возможности обнаруживать новые патогены и прочитывать вирусные геномы целиком [27]. Так, WGS вирусов стало рутинным методом, применяемым не только для фундаментальных исследований, но и для целей эпидемиологического надзора.

В то время как большинство экспериментов по секвенированию бактериальных геномов в настоящее время осуществляется на клинических изолятах, которые проходят этап предварительного культивирования [28,44], и таким образом их пробоподготовка для NGS сравнительно проста, изучение вирусных нуклеиновых кислот, будь то выделенных из культуральных сред или непосредственно из клинических образцов, практически всегда осложняется наличием контаминационной (загрязняющей) ДНК-хозяина [28,32,108,130]. Чтобы решить эту проблему, изучение геномов вирусов может проводиться как путем ультраглубокого секвенирования, так и обогащением нуклеиновых кислот вирусов перед секвенированием [131]. Последнее может осуществляться либо напрямую, либо же путем концентрации вирусных частиц. При этом все эти подходы имеют свои собственные издержки и сложности. Так, широко распространен метагеномный подход, позволяющий обнаруживать различные вирусные

патогены с использованием так называемого «шот-ган» секвенирования [28,44,45,131], который все более активно применяется для выявления патогенов и для характеристики микробного разнообразия в экологических и клинических образцах [49,50]. Однако, несмотря на постоянное снижение стоимости прочтения ДНК, этот способ дорог и нецелесообразен для скрининга большого количества образцов. Метагеномный подход отличается тем, что для подготовки библиотек используют препараты тотальной ДНК/РНК, выделенные из образцов. Такие препараты содержат нуклеиновые кислоты не только целевого организма, но также хозяина и контаминирующих примесей (бактерий, грибов и т.п.). Прямое «шот-ган» секвенирование таких образцов (без предварительного удаления нежелательных примесей) приводит к генерации данных, преимущественно состоящих из последовательностей, относящихся к геномам хозяина и/или других организмов [28,29].

Альтернативой метагеномным подходам является целевое обогащение определенного вирусного генома(-ов) или их фрагментов перед секвенированием. Так, эффективность исследования можно значительно увеличить за счет комбинирования родоспецифической ПЦР и технологий NGS [28]. Таким образом, с развитием технологий высокопроизводительного секвенирования методика выявления новых патогенов методом родоспецифической ПЦР обрела второе рождение. В Таблице 10 представлены праймеры для амплификации консервативных фрагментов различных родов вирусов [28].

Таблица 10 - Список праймеров для родоспецифической ПЦР, использованных в исследовании

№	Род	Название	Последовательность 5'-3'	Ссылка
1	<i>Cardiovirus</i>	Cardio CF1_188 Cardio CR1_990	CTAATCAGAGGAAAGTCAGCAT GACCACTTGGTTTGGAGAAGCT	[128]
2	<i>Enterovirus</i>	EV_6590F EV_7000R	ATGCCNTCNGGNTGYTCWGGNAC YTTRTCWGSWGGWGTCAT	[128]
3	<i>Parechovirus</i>	PV2090F PV2523R	GAYAATGCTATMTAYACWATYTGTGA ACWGTRAARATRTCHACATTSATDG	[30]
4	<i>Orthoflavivirus</i>	FlaviPF1S FlaviPF2Rbis	TGYRTBTAYAACATGATGGG GTGTCCCANCCNCGNTRTC	[130]
5	<i>Pestivirus</i>	PestiV-NS5-F PestiV-NS5-R	GCNATNCCNAAGAATGAGAAGAG AAGCCRTCRCNCCRCASACGTG	[128]
6	<i>Norovirus</i>	NV-F268 NV-R787a NV-R787b	TCNTTYTAYGGTGATGATGAGAT GTCCTTAGACGCCATCATCA GTCATTGACGCCATCTTCA	[128]
7	<i>Mamastrovirus</i>	AstroFwd1a AstroFwd2a AstroRev	GARTTYGATTGGRCCKGKTAYGA GARTTYGATTGGRCCKAGGTAYGA GGYTTKACCCACATNCCRAA	[131]
8	<i>Hepeviridae</i>	HEV-F4228 HEV-R4598	ACYTTYTGTGCTYNTTTGGTCCNTGGTT GCCATGTCCAGAYGGTGTCCA	[132]

Продолжение таблицы 10

9	<i>Alphavirus</i>	Pan Alpha-s Pan Alpha-as	TTTAAGTTTGGTGCGATGATGAAGTC GCATCTATGATATTGACTTCCATGTT	[133]
10	<i>Filoviridae</i>	PanFilo-F PanFilo-R	GCNAAGGCNTTCCNAGYAATATGATGGT TGNGGNGGRTTATAAWAGTCACTNACATG	[128]
11	<i>Arenaviridae</i>	OWA-3359A-plus OWA-3359D-plus OWA-3359G-plus OWA-3754A-minus OWA-3754D-minus	AGAATTAGTGAAAAGGGAGAGCAATTC AGAATCAGTGAAAAGGGAAAAGCAATTCC AGAATTAGTGAAAAGGGAGAGTAACTCC CACATCATTGGTCCCCATTTACTATGATC CACATCATTGGTCCCCATTTACTGTGATC	[134]
12	<i>Paramyxovirus</i>	AVU-RUB-F1 RES-MOR-HEN-F1 PNE-F1 AVU-RUB-R RES-MOR-HEN-R PNE-R	GGTTATCCTCATTTITTYGARTGGATHCA TCITTCTTTAGAACITTYGGNCAYCC GTGTAGGTAGIATGTTYGCNATGCARCC GCAATTGCTTGATTITCICCYTGNAC CTCATTTGTAI GTCATYTTNGCRAA GTC CCACAA ITTTTGRCAACCANCCYTC	[135]
13	<i>Orthonairovirus</i>	Nairo-F Nairo-R	TCTCAAAGAAACACGTGCCGC GTCCTTCCTCCACTGWRGCGAGCCTGCTGGTA	[136,137]
14	<i>Lyssavirus</i>	JW12 JW6 (DPL) JW6 (E) JW6 (M)	ATGTAACACCYCTACAATTG CAATTCGCACACATTTTGTG CAGTTGGCACACATCTTGTG CAGTTAGCGCACATCTTATG	[141]
15	<i>Phlebovirus</i>	Phlebo F1 Phlebo R1	TTTGCTTATCAAGGATTGACC TCAATCAGTCCAGCAAAGCTGGGATGCATCAT	[138]
16	<i>Orthobunyavirus</i>	Bun F Cal/Bwa F Oropouche F Wyeomyia-F Bun R Cal/Bwa R Oropouche R Wyeomyia-R	CTGCTAACACCAGCAGTACTTTTGAC GCAAATGGATTTGATCCTGATGCAG GGCCCATGGTTGACCTTACTTT ATGCTGAAATTGTATTTGATGATATTGG TGGAGGGTAAGACCATCGTCAGGAAGT TTGTTCTGTTTGCTGGAAAATGAT ACCAAAGGGAAGAAAGTGAAT TATTTGATTCCCCGAAAGT	[128]
17	<i>Orthobornavirus</i>	Borna-F4551 Borna-R5671	CAGAAGTCATGGTAYTTYCCTGAGAT ATGATTGTTTGRTRTCMCCYTG	[128]
18	<i>Orbivirus</i>	OrbiVP1 F2295a OrbiVP1 F2295b OrbiVP1-R2523a OrbiVP1 R2523b OrbiVP1 R2523c OrbiVP1 R2523d OrbiVP1 R2523e OrbiVP1 R2523f	CGGAGCAGTATGTGGNGATGAYA CGGAGATGTATGTGGNGATGAYA TCWGAWGAKATKATCATCATTCGRTCTTG TCAGACGAGATCAACATCATTCGRTCTTG TCAGAGGAGACCATCATCATTCGRTCTTG TCCGATGAAATGAACATCATTCGRTCTTG TCGGACGAAACTAGCATCATTCGRTCTTG TCAGAACTGACAAATCATCATTCGRTCTTG	[128]
19	<i>Orthoreovirus</i>	Orthoreo -2090F Orthoreo -2334R	GGBTCMACNGCYACYTCBACYGAGCA CDATGTCRTAHWYCCANCCRAA	[139]
20	<i>Adenoviridae</i>	Hex1 Hex2	GCCSCARTGGKCWTACATGCACAT CAGCACSCCNCGRATGTCAAA	[141]
21	<i>Orthoherpesviridae</i>	DFASA-F GDTDIB-R	GTGTTGACTTYGCNAGYYTNTAYCC CGGCATGCGACAAACACGGAGTCNGTRTCNCRTA	[141]

Сочетание родоспецифической ПЦР и высокопроизводительного секвенирования позволяет существенно сократить временные затраты на исследование одного образца. Кроме того, существенно повышает чувствительность метода (Рисунок 13).

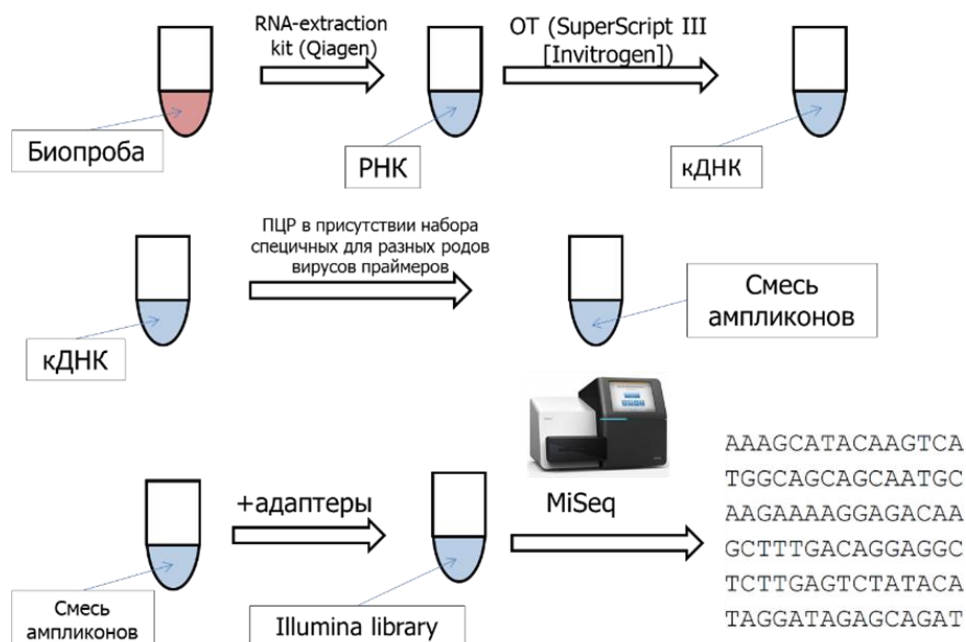


Рисунок 13 - Схема методики родоспецифической ПЦР с последующим анализом методом высокопроизводительного секвенирования. После выделения нуклеиновых кислот и реакции обратной транскрипции для получения кДНК проводится родоспецифическая ПЦР. Полученный от разных реакций ПЦР продукт смешивается и исследуется методом высокопроизводительного секвенирования [142]

4.2 Создание панелей праймеров для полногеномного секвенирования вирусных геномов

ПЦР-амплификация вирусного генетического материала с использованием праймеров, комплементарных известной нуклеотидной последовательности, является наиболее распространенным подходом для обогащения небольших вирусных геномов, таких как ВИЧ и вирус гриппа. В качестве примера обогащения ПЦР амплификацией с последующим секвенированием, можно привести филогенетический анализ вспышки вируса кори на зимних Олимпийских играх 2010 г. [30] и отслеживание эпидемий вирусов Эболы и Зика. С помощью секвенирования длинных ампликонов ($2,5\text{--}3 \times 10^3$ п.о.) фрагментов была исследована вариабельность генома норовируса и возможность его нозокомиальной передачи среди пациентов нескольких госпиталей во Вьетнаме [53,55], что выявило как независимые заносы возбудителя в больницу, так и внутрибольничную передачу, несмотря на предпринимаемые меры

по борьбе с инфекцией [28]. В других исследованиях с помощью глубокого секвенирования на основе ПЦР были получены полные геномы вируса гриппа [143] и HCV [28]. Это стало возможным, поскольку данные вирусы имеют сравнительно небольшие геномы, для покрытия и сборки полногеномных последовательностей которых требуется всего несколько ампликонов. Однако, гетерогенность РНК-содержащих вирусов, например, лиссавирусов [28,29], может потребовать использования множественных перекрывающихся сетов праймеров для обеспечения амплификации всех известных геновариантов вируса [28,29].

Перекрывающиеся панели ПЦР-ампликонов в сочетании с NGS используются для секвенирования полных геномов больших вирусов, таких как, например, SARS-CoV-2 [28, 156,157,158,159,160]. Для реализации данного подхода необходимо синтезировать значимые количества олигонуклеотидных праймеров. Однако подход имеет смысл в случае необходимости регулярного секвенирования большого количества геномов одного и того же вируса, либо при необходимости секвенирования генома из незначительного количества исходного материала. Например, для амплификации генома вируса Эбола Заир потребовалось 8–19 продуктов ПЦР [54], а для исследования норовирусов было необходимо 14 продуктов ПЦР соответственно [57]. Для получения генома вируса Парамушир понадобилось 60 ПЦР продуктов, а также дополнительные эксперименты по секвенированию с применением прямого метода Сенгера для покрытия недосеквенированных участков [147,148,149,150,152]. Однако, для клинической диагностики такой подход является проблематичным из-за значительного объема лабораторной нагрузки, связанной с многочисленными ПЦР постановками, необходимости индивидуальной нормализации концентраций различных ПЦР-продуктов до смешивания, высокой вероятности отказа ПЦР-реакции из-за несоответствия праймера матрице (особенно для быстро мутирующих вирусов, а также высокой стоимости расходных материалов и трудозатрат [36]. Поэтому, несмотря на техническую возможность секвенирования вирусов размером вплоть до 250 кб, пропорциональная взаимосвязь между длиной генома и технической сложностью делает секвенирование вирусных геномов более чем 50 кб на основе ПЦР нецелесообразным с использованием современных технологий, в частности для крупных исследований с большим числом образцов или рутинной диагностики [28]. Высоковариабельные патогены, особенно те, которые имеют широко расходящиеся генетические линии и генотипы, такие как HCV [37], вирус гриппа и норовирусы, также вызывают серьезные проблемы для ПЦР-амплификации, особенно из-за несоответствия праймеров матрице [28,38,50,57]. Тщательный подход при дизайне структур праймеров может помочь смягчить эти проблемы, но процесс изучения новых вариантов все же остается проблематичным. Стоит также отметить, что в ряде случаев различия между матрицей и праймерами настолько велики, что могут приводить к выпадению целых вирусных сегментов,

как было показано при секвенировании вирусов SARS-CoV-2, Парамушир, Кемерово [149,150,152,153].

4.3 Применение методов амплификации для идентификации и полногеномного секвенирования вирусных геномов

4.3.1 Проведение полногеномного секвенирования двух изолятов вируса Эбола Заир из коллекции образцов, полученных из Республики Гвинея в 2014-2015 гг.

В рамках проведения генетического мониторинга вируса Эбола Заир в ходе эпидемии 2013-2015 гг. в Западной Африке, по согласованию с руководством ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» было получено 7 образцов, представляющих собой тотальную кДНК из клинического материала от пациентов с диагнозом «Лихорадка Эбола». Лабораторное подтверждение диагноза осуществлялось на базе Специальной противоэпидемической бригады в Республике Гвинея с помощью набора EBOV-Zaire-F1 (АмплиСенс®, Россия) [81,84,85,99]. Выделение РНК проводили набором Рибо-преп (АмплиСенс®, Россия). До момента доставки в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» материал хранился на базе Специальной противоэпидемической бригады около 6 месяцев при температуре -15 °С. Синтез кДНК проведен сотрудниками ГНЦ «Вектор» с помощью набора Реверта-L (АмплиСенс®, Россия). Полученная кДНК была передана для последующего исследования молекулярными методами.

С учетом низкого качества полученного материала и неоптимальных условий его хранения был сделан вывод о нецелесообразности проведения секвенирования тотальной кДНК методом NGS. В связи с этим было принято решение о разработке панели праймеров для получения ампликонов с перекрытием для последующего секвенирования методом высокопроизводительного секвенирования.

Для этого был осуществлен дизайн и синтез специфических олигонуклеотидных праймеров (26 пар), позволяющих проводить амплификацию и секвенирование фрагментов, полностью покрывающих геном вируса Эбола Заир (Таблица 11). Выбор праймеров осуществлен таким образом, чтобы получающиеся фрагменты имели среднюю протяженность 800 пар оснований, при этом области их перекрытия составляли 50-70 пар оснований. Кроме того, праймеры обладают сходными термодинамическими характеристиками, что позволило использовать универсальный режим амплификации.

Таблица 11 - Панель праймеров для секвенирования вируса Эбола Заир

№	Название	5-3 последовательность	Кол-во шагов
1	Zr-f1	TAg gAT CTT TTg TgT gCg AAT AAC	24
2	Zr-r1	TCT TgA CTT CAA AAC ggA ACC C	22
3	Zr-f2	TCA TgC GTA CCA Agg AgA TTA C	22
4	Zr-r2	ATT gTT ggA gTT gCT TCT CAg C	22
5	Zr-f3	TCg CAg gAg TAA ATg TTg gAg A	22
6	Zr-r3	TgA TCT CTg TAT ACg ggA gCC	21
7	Zr-f4	TCC gCC CTT AgA gTC AgA Tg	20
8	Zr-r4	AAC gAT CgT gTA AAT gTT ggg C	22
9	Zr-f5	ATA AgC gTT AAg CCA CAg TTA Tag	24
10	Zr-r5	Tgg TAC TgT CTA gAT TgT TgA ATg	24
11	Zr-f6	Tgg ACC ATC ACT TTA TgA AgA AAg	24
12	Zr-r6	TTg CTC AAC gTT TAC AAg ATg AAg	24
13	Zr-f7	TAA CCC AAA CCA AAA ATg ATg AAg AT	26
14	Zr-r7	ACg ATC TTA AAg TCC Tgg AgT g	22
15	Zr-f8	ACC CAA CAA AAg Tgg gAA gAA g	22
16	Zr-r8	TCg CCT CAC AAT ATC CTT CTA g	22
17	Zr-f9	AgA TTA TTT gTC TTC CAg AgT Agg	24
18	Zr-r9	AAC CTC gAA CAA gTA CTC TgT C	22
19	Zr-f10	ATC TAA gTA CAg ACA TTg CTC TTC	24
20	Zr-r10	ATT gTg gTA gAA TAA TAg CCA CTC	24
21	Zr-f11	Agg TgT CgT TgC ATT TCT gAT AC	23
22	Zr-r11	Tgg TgA TgA gTg TTg TTg TTg C	25
23	Zr-f12	AAC TAC AgC gAg ACT gCT gg	20
24	Zr-r12	AAT CAC ATT ggC TAT gTT TgA AgC	24
25	Zr-f13	ATC ACT TgA ATC TAA gAT TAC TTg AC	26
26	Zr-r13	AAT TTC CTC gTC ATC ACA gCA C	22
27	Zr-f14	ACT gAT CAA gAC ggC AgA ACA C	22
28	Zr-r14	ACC ATA gAC CTC CTC CAC AAC	21
29	Zr-f15	Agg Agg TAG CAA CgA TCC ATC	21
30	Zr-r15	ACC AgC CCA ATA AAC TTT CCA C	22
31	Zr-f16	TgT CTT AAg CgA CCT CTg TAA C	22
32	Zr-r16	TTT gTg AAA CCT AAC ACA CAT gAC	24
33	Zr-f17	AgA gAT TCC AAg ACA ACA TCA Tag	24
34	Zr-r17	AgA gTT TCC TCg ATT TAA TCT ACC	24
35	Zr-f18	TCT TAT CTT CAA TTC Agg gCA ATG	24
36	Zr-r18	ACA CTg TAC CAA gAT CCT TgA C	22
37	Zr-f19	TgC TAC ATA gTg AAA CAg CAA TC	23
38	Zr-r19	TCT TAA CAC CAT AgC AAC ggT Tg	23
39	Zr-f20	AgC TTT gTA ACT gAT TTA gAg AAA TAC	27
40	Zr-r20	TCA ggA TTC AAg AAg gAT AAC CC	23
41	Zr-f21	TgA CCT Tgg ACA gTT AAC ACT C	22
42	Zr-r21	TTg ACT gCT ACT gAC ACg AAT g	22
43	Zr-f22	TgA TTg AgC AAT TCA AAg Tgg TTT g	25
44	Zr-r22	TCg AAT AAg gTC ATC TTC TAT AAT g	25
45	Zr-f23	AAT gAA TTg ATT TAT gAC AAT AAT CCT C	28
46	Zr-r23	Tgg TgT CTT GAT gAA TCA TgC AC	23

Продолжение таблицы 11

47	Zr-f24	TCC AAC ACC TGT TAA TAA TTT CCT C	25
48	Zr-r24	TgA CTC TAT ACT ggA CTC AgT Ag	23
49	Zr-f25	TTg ATT CAg AAA TAC CAA gTT AAg AC	26
50	Zr-r25	TAT gAT AgA ACC TAT TgC ACA CAC	24
51	Zr-f26	ACA TAA Tgg gAC ATg gCA AgC	21
52	Zr-r26	TTg CAA CgT TTA TTC TAg TgA gC	23
53	Zr-5end	TCT Tgg TgA TAT ggC TCT gAA AC	23
54	Zr-3end	AAT TAA ggC ATT gAC CAC gCT C	22

С учетом количества полученного материала (кДНК) и его концентрации для секвенирования были отобраны две пробы с номерами 2214 и 2210, соответствующими внутренней нумерации, используемой в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» для образцов из Республики Гвинея. кДНК данных образцов была амплифицирована и секвенирована с помощью разработанного набора олигонуклеотидных праймеров. С учетом того, что при амплификации фрагментов область посадки праймеров является невалидной, концевые части кДНК остаются нерасшифрованными. Для их секвенирования необходимо осуществление процедуры RACE (rapid amplification of cDNA ends). При этом осуществление данной процедуры предполагает наличие высококонцентрированной РНК вируса в качестве исходного материала. Суть метода заключается в лигировании внешних адаптеров к 5'-3' концам РНК с последующей реверсией и амплификацией при помощи праймера, специфичного последовательности адаптера и праймера, специфичного последовательности кДНК вируса. Тем не менее, нами была предпринята попытка осуществления RACE в расчете на возможность наличия остаточных фрагментов РНК в составе гетеродуплекса кДНК/РНК. С этой целью мы лигировали к 3' концу кДНК/РНК петлеобразный адаптер. Полученную смесь подвергли реакции обратной транскрипции и амплификации с праймером, гомологичным последовательности адаптера и внешним праймером, гомологичным последовательности вируса Эбола Заир. Полученный ПЦР-продукт клонировали в плазмидный вектор p-Gem (Promega, USA) и трансформировали им компетентные клетки *E. coli*. Амплифицировали и секвенировали индивидуальные колонии с помощью внешних праймеров, гомологичных последовательности вектора. В результате анализа сиквенсов от 50 клонов была расшифрована 5'-концевая последовательность генома вируса Эбола Заир.

С помощью полученных сиквенсов была осуществлена сборка двух последовательностей генома вируса Эбола Заир длиной 18867 нуклеотида, при полной длине 18959. Таким образом в полученных геномах отсутствуют 92 нуклеотида на 3'-конце. Следует отметить, однако, что данные нуклеотиды относятся к некодирующей части генома и представляют собой часть трейлерной последовательности, состоящей из гомополимеров. По этой причине в подавляющем

большинстве сиквенсов полных геномов вируса Эбола Заир, представленных в GenBank NCBI, 3'-концевая часть генома не секвенирована (за исключением 1 сиквенса штамма 1976 г).

Полученные сиквенсы были аннотированы и депонированы в GenBank NCBI под номерами KT765131 и KT765130, соответственно.

Для проведения филогенетического анализа проведено множественное выравнивание полных геномов и отдельных генов. Всего проведен анализ по 63 полным геномам вируса Эбола Заир, выделенным в период 1976 - 2015 гг. как на территории центральной, так и западной части Африки.

Выравнивание проведено с помощью пакета программ Bioedit 7.0 (Ibis Biotech, USA). Реконструкция филогенетических деревьев осуществлена с помощью пакета программ Mega 6.0. При построении использована модель замен Jukes-Cantor, статистическая модель NJ. Количество бутстрэп повторов 1000. В качестве аут-группы использован геном вируса Эбола Судан (удален).

Данные филогенетического анализа свидетельствуют о близости геномов изолятов CREMS2214 и CREMS1022 к группе изолятов из Западной Африки, депонированных в GenBank NCBI (Рисунок 14).

Анализ сиквенсов CREMS2214 и CREMS1022 позволяет говорить об отсутствии каких-либо особенностей, отличающих данные геномы от других геномов вируса Эбола Заир, выделенных в Западной Африке.

Анализ филогенетического дерева в целом, позволяет говорить о том, что группа вирусов из Западной Африки имела общего предка с группой вирусов из Центральной Африки (Конго, Габон) [81,83]. Это означает, что вирус Эбола Заир циркулировал в Западной Африке продолжительное время независимо от штаммов, циркулировавших в Центральной Африке. Также об этом свидетельствует отсутствие филогенетической связи западноафриканских штаммов со штаммами, выделенными в Республике Конго в 2014 г. Более того, анализ топологии внутренней части филогенетического дерева, описывающей взаимоотношения групп центральноафриканских штаммов вируса Эбола Заир позволяет сделать вывод о том, что штаммы, выделенные в более поздний период, не являются прямыми потомками штаммов, выделенных ранее на данной территории [85, 86, 87].

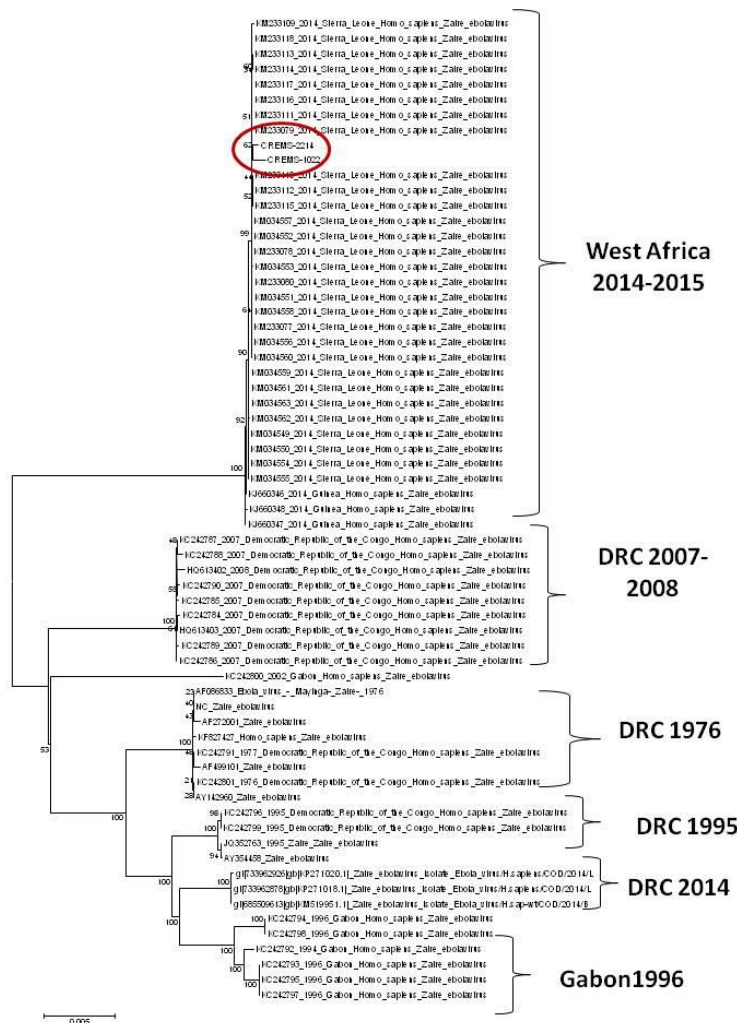


Рисунок 14 - Филогенетическое дерево реконструировано по полногеномным последовательностям вирусов Эбола Заир. Нуклеотидный уровень. Модель замен Jukes-Cantor, статистическая модель NJ. Бутстрэп-поддержка 1000

Эволюция различных частей генома происходила равномерно, о чем можно судить по сходству топологии деревьев, построенных для последовательностей отдельных генов (Рисунок 15).

Следовательно, отсутствуют признаки того, что в процессе эволюционного развития вирус не подвергался какому-либо «генетическому давлению» естественного либо искусственного характера.

Таким образом, нами проведено полногеномное секвенирование 2-х изолятов вируса Эбола Заир. Геномы аннотированы и подготовлены к депонированию в GenBank NCBI под названиями CREMS2214 и CREMS1022. Сравнительный анализ геномов выявил 99% гомологию с группой геномов из Западной Африки, секвенированных ранее и 97% гомологию с геномом Эбола Заир, изолированным в 1976. Штаммы вируса Эбола Заир в Западной и Центральной

Африке имеют общего предка и в настоящий момент циркулируют независимо друг от друга [78,80]. Каждая новая вспышка лихорадки Эбола вызвана штаммами, не являющимися потомками штаммов предыдущих вспышек, что свидетельствует о большом разнообразии штаммов вируса Заир в природе [84,85].

Происхождение западноафриканских штаммов не несет признаков какого-либо направленного воздействия на геном и носит естественный характер.

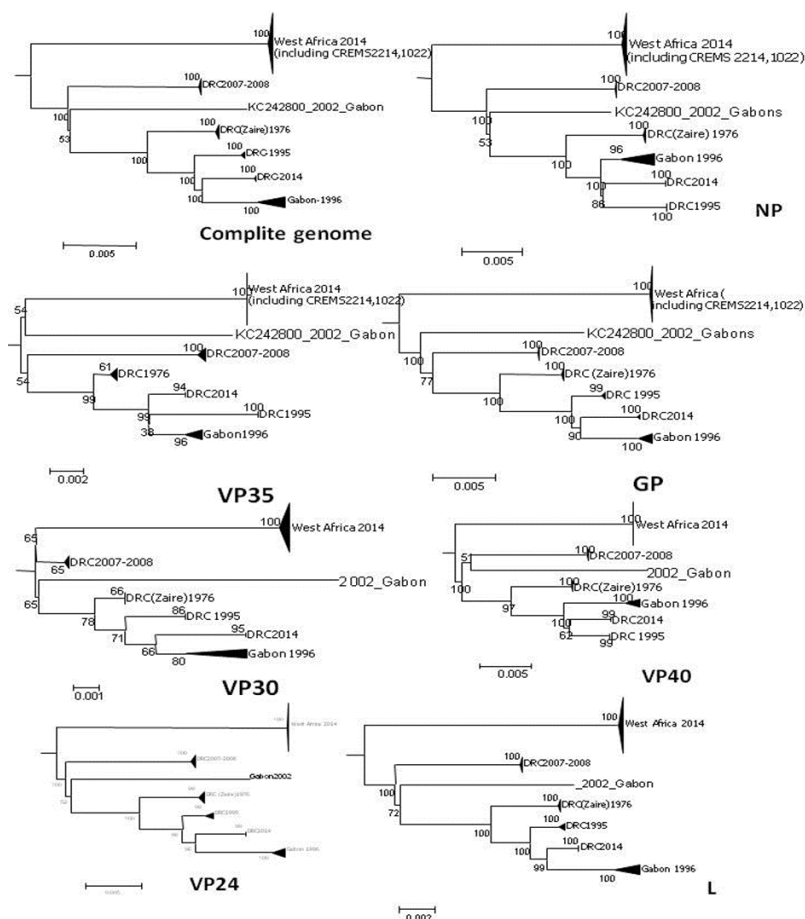


Рисунок 15 - Филогенетические деревья, построенные по последовательностям индивидуальных генов вируса Эбола Заир. Нуклеотидный уровень. Модель замен Jukes-Cantor, статистическая модель NJ. Бутстрэп-поддержка 1000

4.3.2 Секвенирование полных геномов вируса Парамушир из клещей вида *Ixodes uria*, собранных на острове Тюлений

В ходе программы изучения разнообразия арбовирусов клещи *I. uriae* были собраны из гнезд птиц, расположенных на острове Тюлений (48°29' северной широты, 144°38' восточной долготы) в Охотском море недалеко от острова Сахалин (Рисунок 16А).

Вид и пол клещей были определены морфологическим методом. Клещи были классифицированы в соответствии с видом, полом и стадиями развития, а затем собраны в пулы по 10 (незрелые клещи) и 25 особей (взрослые особи). Все клещи хранились живыми во влажной камере до выделения нуклеиновых кислот. Пулированные образцы (n=30) гомогенизировали с помощью гомогенизатора Tissue Lyser LT (Qiagen, Germany) в течение 5 мин в 100 мкл фосфатно-буферного раствора (pH 7,0, Dako, Denmark), центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, а надосадочную жидкость использовали для экстракции нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты выделяли и очищали с использованием набора для выделения ДНК/РНК Рибо-преп, (АмплиСенс®, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. ДНК/РНК элюировали в 50 мкл буфера для элюции (АмплиСенс®, Россия) и хранили при -70°C до проведения исследования.

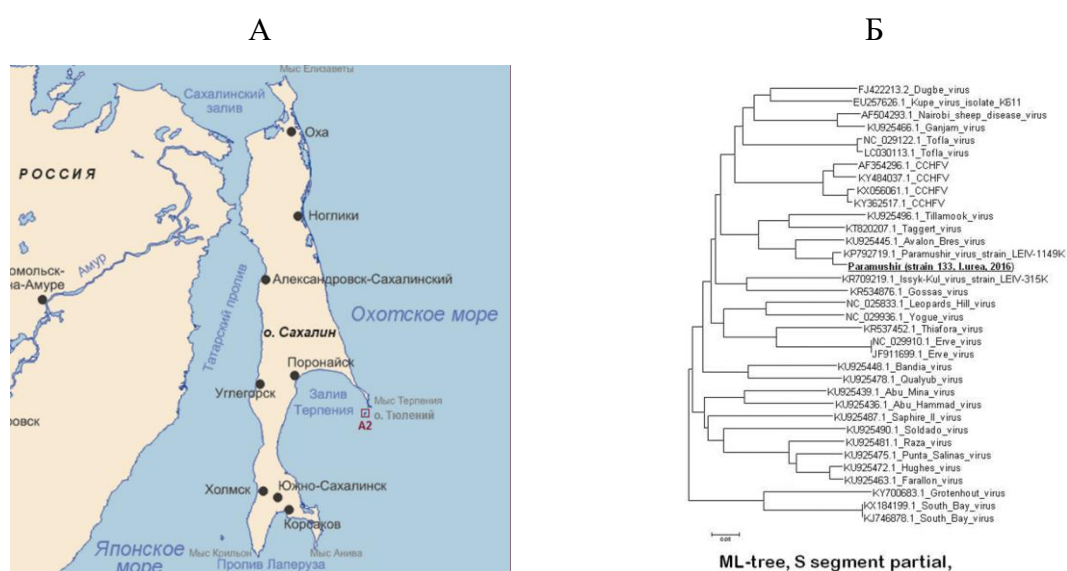


Рисунок 16 - Место сбора клещей и первичное типирование вируса ортонайровируса Парамушир. А – карта острова Сахалин и острова Тюлений. Б – первичный фрагментный филогенетический анализ для типирования вируса по S – сегменту. Метод максимального правдоподобия [151]

Родоспецифическую ОТ-ПЦР проводили с использованием набора родоспецифических праймеров, предназначенных для выявления арбовирусов следующих родов: *Orthoflavivirus*, *Orthonairovirus*, *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus*, *Orthoreovirus*, and *Orbivirus* (Таблица 12).

Таблица 12 - Олигонуклеотидные праймеры для родоспецифической ПЦР, позволяющие детектировать арбовирусы

№	Род	Название	Последовательность, 5'-3'	Ожидаемая длина фрагмента, по	Референс
1	<i>Orthoflavivirus</i>	PhlP2 PhlM2	GGCTACTTCAARAAYAARGANGA CTCTCTCAGICCICRTGYTG	507	[154]
2	<i>Orthonaivirus</i>	Nairo-F Nairo-R	TCTCAAAGAAACACGTGCCGC GTCCTTCCTCCACTTGWGRGCAGCCTGCTGGTA	400	[135,136]
3	<i>Phlebovirus</i>	Phlebo F1 Phlebo R1	TTTGCTTATCAAGGATTTGACC TCAATCAGTCCAGCAAAGCTGGGATGCATCAT	370	[135,136]
4	<i>Orthobunyavirus</i>	Bun F Cal/Bwa F Oropouche F Wyeomyia-F Bun R Cal/Bwa R Oropouche R Wyeomyia-R	CTGCTAACACCAGCAGTACTTTTGAC GCAAATGGATTGATCCTGATGCAG GGCCCATGGTTGACCTTACTTT ATGTCTGAAATTGTATTGATGATATTGG TGGAGGGTAAGACCATCGTCAGGAACTG TTGTTCTGTTTGTGGAATGAT ACCAAAGGGAAGAAAGTGAAT TATTTGATTCCCCGAAAGT	222-286	[135,150]
5	<i>Orbivirus</i>	OrbiVP1 F2295a OrbiVP1 F2295b OrbiVP1-R2523a OrbiVP1 R2523b OrbiVP1 R2523c OrbiVP1 R2523d OrbiVP1 R2523e OrbiVP1 R2523f	CGGAGCAGTATGTGGNGATGAYA CGGAGATGTATGTGGNGATGAYA TCWGAWGAKATKATCATTCGRTCTTG TCAGACGAGATCAACATCATTCGRTCTTG TCAGAGGAGACCATCATTCGRTCTTG TCCGATGAAATGAACATCATTCGRTCTTG TCGGACGAACTAGCATCATTCGRTCTTG TCAGAACTGACAATCATTCGRTCTTG	228	[126]
6	<i>Orthoreovirus</i>	Orthoreo -2090F Orthoreo -2334R	GGBTCMACNGCYACYTCBACYGAGCA CDATGTCRTAHWYCCANCCRAA	244	[138]

Реакцию обратной транскрипции и амплификацию проводили с использованием одноэтапной системы RT-PCR SuperScript III (Invitrogen, USA) в реакционной смеси, содержащей 2 мкл РНК, 0,4 мкм прямого праймера, 0,4 мкм обратного праймера, 12,5 мкл 2^x реакционного буфера, 1 мкл смесь ферментов, 0,2 мкл 50 мМ Mg₂SO₄, 1 мкл бычьего сывороточного альбумина (BSA; 1 нг/мкл) и H₂O в общем объеме 25 мкл.

Использовались следующие параметры термоциклирования: 45°C в течение 20 мин и 94°C в течение 3 мин, затем 5 циклов по 94°C в течение 20 с, от 55°C до 45°C (-2°C за цикл) в течение 20 с и 72°C в течение 30 с; далее 40 циклов при 94 °C в течение 20 с, 45 °C в течение 20 с, 72 °C в течение 30 с; и 72 °C в течение 3 мин. Все этапы амплификации проводили с использованием термоциклера МахуGene (Ахуген, USA). Продукты реакций амплификации анализировали методом электрофоретической детекции в 1,2% агарозном геле с последующим окрашиванием в бромистом этидии.

В двух из тридцати проанализированных пулов (ID 133 и 137) с помощью родовой ПЦР были обнаружены одиночные полосы ожидаемой длины для рода *Orthonairovirus*. Эти полосы были очищены, секвенированы методом Сэнгера и исследованы с помощью BLAST. Обе последовательности имели длину 400 п.н. и имели 97% нуклеотидную идентичность с L-сегментом ортонайровируса Парамушир PARV (штамм LEIV-1149K, регистрационный номер KR792717). Таким образом, оба изолята были идентифицированы как PARV (Рисунок 16B). Изоляты были обозначены как Paramushir virus/Ixodes uriae/Russia/Tyuleniy Island/133/2015 и Paramushir virus/Ixodes uriae/Russia/Tyuleniy Island/137/2015 (PARV strain 133 и PARV strain 137).

Для полногеномного секвенирования двух изолятов вируса была разработана панель из 60 олигонуклеотидов (Таблица 13).

Таблица 13 - Панель праймеров для полногеномного секвенирования вируса Парамушир

№	Пул	Название прямого праймера	Последовательность 5'-3'	Название обратного праймера	Последовательность 5'-3'	Длина ПЦР-продукта, по
1	1	ParamL_1_LEFT	TCCTTTAACTGGCATCCCTCTCT	ParamL_1_RIGHT	CGTAACGCATGACATGGTCACA	386
2	2	ParamL_2_LEFT	AACGAATGGGGCTCAACACTTG	ParamL_2_RIGHT	TGGGGATCAGCTTTCGAACCTCT	407
3	3	ParamL_3_LEFT	GTTGGTGAACGAGGAAGAGCTG	ParamL_3_RIGHT	GTCCTTAGCAACCCAGGTAGGT	373
4	1	ParamL_4_LEFT	CTCTGACTCTAAGAACACTTGGTCAT	ParamL_4_RIGHT	GGATGCTCGTACAGGTCCTTCT	365
5	2	ParamL_5_LEFT	AGAAGAAGTTCATAACCAACTGCCT	ParamL_5_RIGHT	GCTCTGTCAACTGCTCCTTGTC	382
6	3	ParamL_6_LEFT	TGAAACAGAAGACTTTGGTCACCT	ParamL_6_RIGHT	AGGAAGGATTGCCTGTGTTCCCT	404
7	1	ParamL_7_LEFT	AGGAGAGTCTGAAGCTGAGCAC	ParamL_7_RIGHT	TGAACTCTGGGTGAAGCTGAGT	400
8	2	ParamL_8_LEFT	ATGGAGGTATGTGCCAGAGGAC	ParamL_8_RIGHT	TTGATGAGGAGGCCGTCTTCAG	406
9	3	ParamL_9_LEFT	CGGTGCCATTGAAGTGTTCGAA	ParamL_9_RIGHT	TTAACCACTGACCCTGCCTTGA	427
10	1	ParamL_10_LEFT	TCCTCAAATCTTCAATCAGCTTTCTCT	ParamL_10_RIGHT	GGTCTTCCTTTAGCCAGGCAAC	424
11	2	ParamL_11_LEFT	TCATTGACGCCTTTGAGAGAACA	ParamL_11_RIGHT	GTGAGCCTTACCAGCCTATCCA	368
12	3	ParamL_12_LEFT	CCCACAGTGAGACGAAGAGTTG	ParamL_12_RIGHT	CTGGCACTTTGAGTTGGCTTGA	403
13	1	ParamL_13_LEFT	AGTTGGCAGAGGAGAAGCTGAA	ParamL_13_RIGHT	GCCTCAACATCAATTCCGCAGA	361
14	2	ParamL_14_LEFT	AGGAGACTACATCAGCAACAAGC	ParamL_14_RIGHT	CAGGATGTAGCTGTAGGAGGCT	431

Продолжение таблицы 13

15	3	ParamL_15 _LEFT	TGACCTGCTGTTTATACAATAGCAG T	ParamL_15 _RIGHT	GGAGCTGTTTGTGTTGCTGCTG	424
16	1	ParamL_16 _LEFT	ACACTCATGACCACTTTATAAGGGT T	ParamL_16 _RIGHT	CGATGCAGCCCTCATCAAAGTT	430
17	2	ParamL_17 _LEFT	TCTATGGAGCCTGGGTCAACAG	ParamL_17 _RIGHT	TCCCTTTCTACCTTGAACCCTGA	428
18	3	ParamL_18 _LEFT	AGGTCGGTTGGTTCCAGTAACA	ParamL_18 _RIGHT	AGCATGTGTGTCTTTGGGACTG	387
19	1	ParamL_19 _LEFT	TCCCACCTGATGCAATAGAAAAGT	ParamL_19 _RIGHT	GCTGCTAAGGTCTTAAGCCAGC	419
20	2	ParamL_20 _LEFT	TTCTACCACTGGAAGGAGCTGG	ParamL_20 _RIGHT	AGTTAGAGTTGGGAGTGCAGCT	370
21	3	ParamL_21 _LEFT	TTCAGAGTGCCTGGGAGAAGAC	ParamL_21 _RIGHT	CCAAGAGTTGGCAGTCAGGTTT	376
22	1	ParamL_22 _LEFT	CCCTGGTGTGTCCACTACAAGT	ParamL_22 _RIGHT	CCATAGAAACTCATGCCTGCCG	370
23	2	ParamL_23 _LEFT	GCGTGAGAAGGTTGTTCAAGGT	ParamL_23 _RIGHT	CCATCATCGTTCGTTGTGCTCA	427
24	3	ParamL_24 _LEFT	AGGCTGTCGAGATCTACTGGTG	ParamL_24 _RIGHT	TGCAGAGGGTATTCCACCTGT	389
25	1	ParamL_25 _LEFT	GTGGAATGATGCAGCAGCTACT	ParamL_25 _RIGHT	TGAAAAGAAGTCTCGCGCTAGC	387
26	2	ParamL_26 _LEFT	AGCTACAATCACATGGGTCAAGG	ParamL_26 _RIGHT	TGATCACTGCCGGTGTAACCTT	377
27	3	ParamL_27 _LEFT	GCCCGATGCTGTCTAGATGAAAG	ParamL_27 _RIGHT	AGCCGAGCAAGAGATAACCTCA	409
28	1	ParamL_28 _LEFT	TGACGCTTGGGTCATTATCACC	ParamL_28 _RIGHT	TGGACTTTGGATCCAGAGGTCC	409
29	2	ParamL_29 _LEFT	GCCAGAACCATCCAAGATTACTCC	ParamL_29 _RIGHT	GTTGCAAACCTGGTAGGAGCTC	407
30	3	ParamL_30 _LEFT	GAAGACCCAATGATACAACCTCATCC C	ParamL_30 _RIGHT	GTCTCTGTAGTTCGTGCTGTGC	361
31	1	ParamL_31 _LEFT	ACTCTCAGTGCCTCTGTACACA	ParamL_31 _RIGHT	CAAGTTCTGCTTCTGGAGGCTG	414
32	2	ParamL_32 _LEFT	CAATGACCTAGACATACTTCACAAA GAATT	ParamL_32 _RIGHT	ACTGCAGTCCAGATCCTGTTGT	371
33	3	ParamL_33 _LEFT	CCACAAGGATAGATCTATCAAACCT GC	ParamL_33 _RIGHT	TGGCAGAGATGCAGTGGAGAAT	382
34	1	ParamL_34 _LEFT	TCGTATGGGATCAAAGAAGGAAGG T	ParamL_34 _RIGHT	GGCCCTCTCCCATGTCTTAAA	413
35	2	ParamL_35 _LEFT	AAGGAAAAGTATAAGTGACCTTATC GACT	ParamL_35 _RIGHT	AGAGAGACGGAGGCTATCTTGC	370
36	3	ParamL_36 _LEFT	CGGACTTAGTCTCAAAGGAACAGC	ParamL_36 _RIGHT	AGTTTCGGAGAAAGTGCATTTGC	384
37	1	ParamL_37 _LEFT	AGAGACTCAGACCACATACCATGA	ParamL_37 _RIGHT	TCCTTGTCAGTGATGTTGCTGT	367
38	2	ParamL_38 _LEFT	TCCTGTCAAGTGTTCTCTGGCA	ParamL_38 _RIGHT	ACTCATAAACGCATCAATGGTGCT	382

Продолжение таблицы 13

39	3	ParamL_39 _LEFT	GCTTCCGCTGTTTGGAAGCTTC	ParamL_39 _RIGHT	AGCATTAGGACGGACACAGTGA	361
40	1	ParamL_40 _LEFT	TGTCGATTGTCAGAAGCAGAAGC	ParamL_40 _RIGHT	CTCTCGGTTGTTGCTGCTGATG	429
41	2	ParamL_41 _LEFT	CCACCATTGGCAACCTCTTCAT	ParamL_41 _RIGHT	TCTGGCTCAGGAACCACTTCTT	368
42	3	ParamM_1 _LEFT	AGACCCACCTTCACATGCTCTG	ParamM_1 _RIGHT	ACAAAATTAAGGCCGGTCCTGC	408
43	1	ParamM_2 _LEFT	AGTCTGTTTACCACTTTCATTGAAG GT	ParamM_2 _RIGHT	TTGTCACAGGAGGCCTTCTTGA	381
44	2	ParamM_3 _LEFT	CAAAGGAAGATAGAGCACCTTGGT	ParamM_3 _RIGHT	AATTGTGCACTCCTCGTTGTGG	375
45	3	ParamM_4 _LEFT	TGGTACCATGTCGAATTGGTGG	ParamM_4 _RIGHT	GTAAGCTTGTACCCCTTGTGCC	378
46	1	ParamM_5 _LEFT	GCATCCAACCTCCACTTTGATTCCA	ParamM_5 _RIGHT	GCATTGGGCAGCTTATGTCGAT	431
47	2	ParamM_6 _LEFT	CTTCAGTGATGCAGTGGGTGAC	ParamM_6 _RIGHT	GAACCTGGTGCTGCAGTAAGGG	395
48	3	ParamM_7 _LEFT	TGCCCTGAATGCCTAGACAGAT	ParamM_7 _RIGHT	CTGGTTGTCACACTGGCTAACC	385
49	1	ParamM_8 _LEFT	TCATGCTGTCTCTCCGGTGAA	ParamM_8 _RIGHT	CTTTGCTGCTGAAAAGTGACCA	424
50	2	ParamM_9 _LEFT	TGGGACTCAGAAGAAGAAGTTGGT	ParamM_9 _RIGHT	CATGAGAACTGCCAGGTGTTCC	406
51	3	ParamM_1 0_LEFT	GCAAGAAATTGGGGCTGCAATC	ParamM_1 0_RIGHT	CGCTCTTGACAAGGTGATCCAC	431
52	1	ParamM_1 1_LEFT	ACATCCTGACATGGTCACGACT	ParamM_1 1_RIGHT	GCTTGCCTTGACATCCCAAGT	375
53	2	ParamM_1 2_LEFT	ACACAAAGTCGAAAGAGTGCTCT	ParamM_1 2_RIGHT	ACTGACAGGGGAGAACAGCTTT	398
54	3	ParamM_1 3_LEFT	GCCTGACAGATTTGCAGTGCAT	ParamM_1 3_RIGHT	ATGACAAGCCCAGCGCAAATAA	424
55	1	ParamM_1 4_LEFT	TGCTAGAAAACAGAGGGACCATCA	ParamM_1 4_RIGHT	TCAGTGAGGTGGGAGAATGCTT	383
56	2	ParamS_1_ LEFT	GCAAGCTGGACTTTGAGGACAA	ParamS_1_ RIGHT	CACTTGCAGTCTCGGTGAACTC	436
57	3	ParamS_2_ LEFT	TCAAGAAGCGTGCCCTCTCT	ParamS_2_ RIGHT	TACAAGTTTGACAGGCCAGTG	372
58	1	ParamS_3_ LEFT	TTAGGCGTAGGAACCTTGTGCT	ParamS_3_ RIGHT	ATCATTGCACCGCTTGACTCTG	368
59	2	ParamS_4_ LEFT	AGATGGTTGAGGAGCCTGACAA	ParamS_4_ RIGHT	CATGCAGCCATATCTGACAGCC	401
60	3	ParamS_5_ LEFT	CCTTCAAGTGGGGTAAGGGGAT	ParamS_5_ RIGHT	GCCCTTCACTCTTGAGACGTTG	366

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием случайных гексануклеотидных праймеров и набора Реверта-L (АмплиСенс®, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. кДНК хранили при -70°C и впоследствии использовали в качестве

матрицы для амплификации. Разработанные праймеры были разделены на три группы, каждая из которых содержала двадцать пар праймеров. В результате были амплифицированы три группы фрагментов ДНК по 200-400 п.н., которые были далее секвенированы системой для высокопроизводительного секвенирования на системе Ion S5 (Thermo Fisher Scientific, USA) (Рисунок 17).

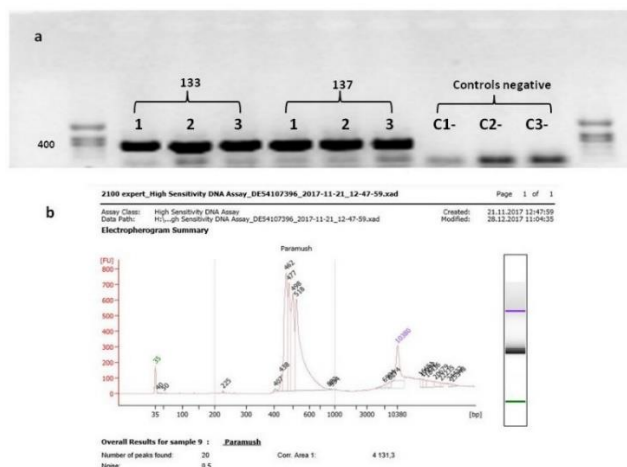


Рисунок 17 - Подготовка библиотеки для полногеномного секвенирования с использованием системы Ion S5

а – Продукты ПЦР после мультиплексной ПЦР

б – Набор окончательных библиотек RARMV для системы Ion S5 после выбора размера

Изоляты ортонайровируса Парамушир PARV strain 133 и PARV strain 137 были секвенированы и депонированы GenBank NCBI под номерами доступа MH124637, MH638289, MH124638, и MH124634-MH124636, соответственно.

Два новых изолята ортонайровируса Парамушир на 98% и 97-98% идентичны последовательностям L и S сегментов штамма PARV LEIV-1149K (KP792717, KP792719) и отличались друг от друга лишь на 1-2% в пределах нуклеотидных последовательностей сегментов L и S. Сравнение последовательностей M-сегмента показало 90%-нуклеотидную идентичность между штаммами PARV LEIV-1149K) и тзолятом PARV 137, тогда как нуклеотидная идентичность между штаммами PARV LEIV-1149K и PARV изолят 133 была намного ниже (67%). Оба секвенированных штамма имели 68% нуклеотидную идентичность в последовательности M-сегмента. Таким образом, основываясь на нуклеотидных последовательностях новых штаммов PARV, было показано, что M-сегмент является наиболее расходящимся.

Анализ дендрограмм нуклеотидных последовательностей сегментов L, M и S изолятов PARV 133 и PARV 137, наряду с соответствующими последовательностями других

ортонаировирусов, подтверждает их принадлежность к роду *Orthonairovirus* (Рисунок 18). Расположение изолятов PARV 133 и PARV 137 на деревьях указывает на их принадлежность к сахалинской подгруппе и тесную связь со штаммом PARV LEIV-1149K, который был секвенирован ранее.

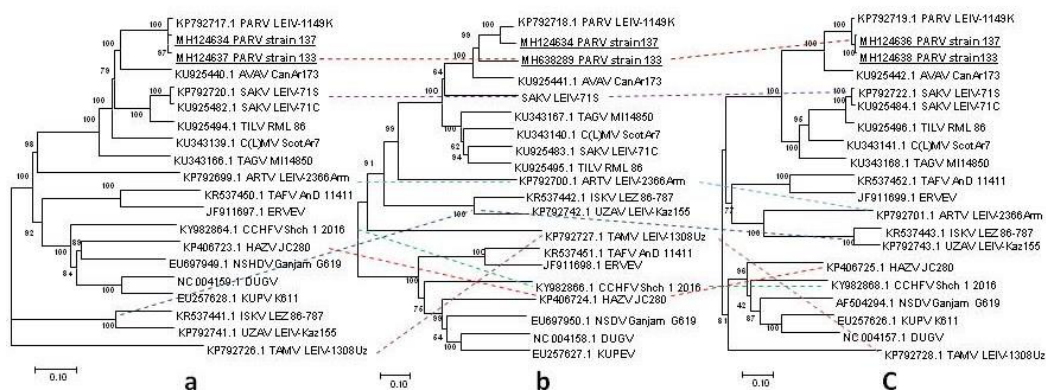


Рисунок 18 - Дендрогаммы полных последовательностей L, M и S PARV (нуклеотидный уровень)

а – дендрогамма для полных L-последовательностей PARV

б – дендрогамма для полных M-последовательностей PARV

с – дендрогамма для полных S-последовательностей PARV

Филогенетический анализ был выполнен с использованием модели замен Jukes-Cantor, деревья были реконструированы с использованием алгоритма Neighbor-Joining (NJ) в программном пакете MEGA 6.0. Надежность деревьев была протестирована с использованием 1000 бутстреп-повторов. Места нахождения на деревьях изолятов вируса Paramushir virus/Ixodes uriae/Russia/Tyuleniy Island/133/2015 и Paramushir virus/Ixodes uriae/Russia/Tyuleniy Island/137/2015 отмечены черными точками

Таким образом нами были идентифицированы и секвенированы две полногеномные последовательности ортонаировируса Парамушир с использованием комбинации высокопроизводительного секвенирования и специфической мультиплексной ПЦР. Результаты анализа последовательностей подтвердили применимость данного подхода для повторного секвенирования известных вирусных геномов, особенно в случае отсутствия достаточного количества вирусной РНК. Филогенетический анализ показал их родство с сахалинской геногруппой рода *Orthonairovirus* и со штаммом PARV LEIV-1149K. Были выявлены признаки множественной реассортации среди ортонаировирусов, включая PARV, и вероятных событий рекомбинации внутри сахалинской генетической группы [151].

4.3.3 Секвенирование полного генома вируса Вад Медани из клещей *Dermacentor nuttalli*, собранных в Республике Тыва

Клещи *Dermacentor nuttalli* (3 самца) были собраны с овец в Овюрском районе Республики Тыва в 2012 году [168] (Рисунок 19А). Видовая принадлежность и пол клещей были определены фенотипически с учетом рекомендованных таксономических ключей [157]. Клещей гомогенизировали с помощью гомогенизатора Tissue Lyser LT (Qiagen, Germany) в течение 5 мин в 500 мкл среды 199 в растворе Эрла (ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия). Гомогенаты центрифугировали при $10000 \times g$ в течение 10 мин, а надосадочную жидкость добавляли к суточной культуре клеток эмбриональной почки свиньи (РЕК), Vero или почек хомячка (ВНК) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Готовили поддерживающие среды, состоящие из среды 199 в растворе Эрла (для культуры клеток РЕК) или среды DMEM (для культуры клеток Vero и ВНК), дополненной 2% бычьей сывороткой (FBS, Gibco, USA) и антибиотиками (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). Супернатанты инфицированной культуры собирали сразу после появления цитопатического эффекта, признака, связанного с инфекцией, и использовали для выделения РНК [9,158,166].

РНК выделяли с использованием набора QIAmp (Qiagen, Germany) в соответствии с протоколом производителя. Очищенную РНК элюировали в 10 мкл воды, не содержащей РНКазы (Qiagen, Germany).

Комплементарную ДНК получали путем обратной транскрипции экстрагированной РНК с использованием набора Реверта-L (АмплиСенс®, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Первую цепь кДНК очищали с использованием магнитных частиц, покрытых карбоксилем (GE Healthcare, USA). Вторую цепь кДНК получали с помощью модуля синтеза второй цепи NEB Next Ultra (NEB, GB, USA). Концентрации двухцепочечной кДНК измеряли с помощью набора Qubit dsDNA флуориметром Qubit 2.0 (Invitrogen, USA). Двухцепочечную кДНК подвергали ферментативной фрагментации с использованием набора Ion Shear™ Plus (Thermo Fischer Scientific, USA). Впоследствии набор фрагментов Ion X-Press и набор адаптеров штрих-кодов Ion Xpress были использованы для подготовки библиотеки в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию библиотеки проводили с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5® (NEB, GB, USA). Выбор размера конечных библиотек тотальной кДНК производили в 2% E-Gel™ size select™ II agarose gel (Thermo Fisher Scientific, USA) с помощью системы для электрофореза E-Gel (Thermo Fisher Scientific, USA). Секвенирование проводили на платформе Ion S5 с использованием набора для подготовки

образцов реагентов Ion 540 Kit-Chef и с использованием чипов Ion 540 на приборе Ion Chef (Thermo Fisher Scientific, USA).

Сырые данные фильтровали с помощью Trimmomatic для удаления нецелевых последовательностей и некачественных прочтений (используя параметры CROP:250 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:40) [159]. Сборку генома осуществили с помощью SPAdes [160]. Последовательности вируса Wad Medani (WMV) были отфильтрованы методом BLAST на собранных контигах, используя доступную геномную последовательность WMV в качестве эталона [161]. Аннотация генома была выполнена Prokka и отредактирована вручную [162]. Считывания были выровнены в bowtie2 с использованием параметров по умолчанию [163]. Филогенетические деревья были реконструированы методом максимального правдоподобия, основанного на общей обратимой во времени параметрической модели (GTR), допускающей гамма-распределенное изменение частоты между сайтами и долю инвариантных сайтов в последовательности [164,165].



Рисунок 19 - Места выделения вируса WMV. Желтой звездой обозначено место выделения изолята в республике Тыва

В ходе секвенирования было получено 19894538 единичных прочтений со средней длиной 196 п.н. После фильтрации и обрезки осталось 3296321 прочтений со средней длиной 85 п.н. Был собран полный геном полученного штамма. Он состоял из десяти линейных сегментов длиной от 715 до 3930 н.т. Далее 31411 отфильтрованных прочтений (0,95%) были выровнены по референсному геному WMV. Наличие 10 сегментов в сочетании с фактом наличия клещей в качестве источника выделения позволило предположить, что полученный штамм относится к роду *Orbivirus*. Таким образом, был проведен филогенетический анализ нуклеотидной

последовательности сегмента 2 (VP3), и штамм действительно был идентифицирован как вирус Wad Medani, принадлежащий к роду *Orbivirus* (Рисунок 20).

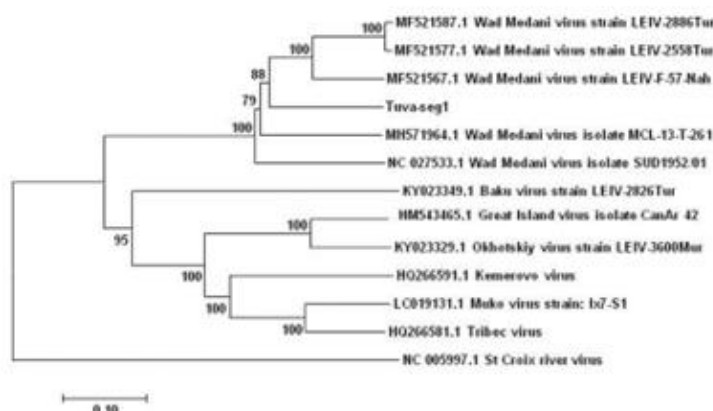


Рисунок 20 - Первичный фрагментный филогенетический анализ для типирования вируса по VP3 гену (сегмент 2). Метод максимального правдоподобия [166]

Полученный штамм был назван «WMV, штамм Tuva-2012» и депонирован в GenBank NCBI под номерами MK978726-MK978735. Последовательности WMV, использованные для филогенетической реконструкции, были: WMV LEIV-2886Tur (MF521588.1), WMV LEIV-2558Tur (MF521578.1), WMV LEIV-F-57-Nah (MF521568.1), WMV MCL-13-T-261 (MH571965.1), WMV SUD 1952/01 (NC027534.1), Baku virus LEIV-2826Tur (KY023350.1), Great Island virus CanAr42 (HM543466.1), Okhotskiy virus LEIV-3600Mur (KY023330.1), Kemerovo virus (HQ266592.1), Muko virus Ix7-S1 (LC019132.1) и Tribec virus (HQ266582.1). Дерево было укоренено на геном St. Croix River virus (NC_005998.1).

Парное сравнение нуклеотидных последовательностей VP3 показало, что штамм WMV Tuva-2012 имеет 78,08% - 81,21% нуклеотидную идентичность с известными штаммами WMV, секвенированными ранее. Максимальная идентичность была обнаружена у штамма WMV LEIV-F-57-Nah, выделенного из клещей *Hyalomma asiaticum* в 1985 году, в то время как минимальная идентичность была обнаружена у штамма WMV G-673, выделенного в 1954 году из клещей *Hyalomma marginatum* в Индии. Следует отметить, что нуклеотидная последовательность VP3 штамма WMV Tuva-2012 максимально идентична другим последовательностям VP3 известных штаммов WMV, в то время как нуклеотидная последовательность сегмента 4 (VP2) наиболее отлична (Таблица 14).

Таблица 14 - Посегментное сравнение идентичности WMV Tuva-2012 с ранее выделенными штаммами. Нуклеотидный уровень

Сегмент	Белок	Штамм WMV						
		LEIV-F-57-Nah (MF521567-MF521576)	MCL-13-T-261 (MH571964-MH571973)	G-673 (MG770337-MG770346)	SUD1952/01 (NC_027533-NC_027547)	LEIV-2558Tur (MF521577-MF521586)	LEIV-2886Tur (MF521587-MF521596)	LEIV-2886Tur (MF521587-MF521596)
1	VP1	77.63	76.69	76.02	75.56	76.83	76.53	76.55
2	VP3	81.21	78.91	78.08	78.20	81.10	81.08	79.87
3	VP4	72.77	72.44	73.16	72.09	73.31	72.62	73.56
4	VP2	69.63	69.19	72.05	74.23	69.00	70.02	70.25
5	NS1	73.46	73.72	72.83	70.61	75.55	75.89	75.59
6	VP5	77.25	79.53	75.58	77.14	78.45	78.03	77.26
7	NS2	76.99	73.57	74.22	77.27	77.55	76.68	78.02
8	VP7	77.23	78.41	78.56	80.21	79.09	78.60	77.26
9	VP6	78.12	78.71	78.29	78.95	77.80	75.30	76.72
10	NS3	82.06	74.85	81.23	77.03	80.21	80.15	77.76

Филогенетические деревья для различных сегментов генома выявили отчетливые филогенетические взаимосвязи между штаммом WMV Tuva-2012 и другими штаммами WMV (Рисунок 20).

Таким образом, нами был секвенирован и охарактеризован штамм вируса Вад Медани, впервые выделенный на территории России, в Республике Тыва в 2012 году. Принадлежность штамма к роду *Orbivirus* семейства *Sedoreoviridae* была определена с использованием молекулярных методов. Полный геном штамма WMV Tuva-2012 был секвенирован и депонирован в GenBank NCBI. Филогенетический анализ показал тесную взаимосвязь между штаммом Tuva-2012 и штаммами WMV, выделенными в предыдущих исследованиях. Согласно 10-му отчету Международного комитета таксономии вирусов, критерием разграничения видов для рода *Orbivirus* является идентичность нуклеотидной последовательности VP3 менее чем на 74% (отчет ICTV, 2016). Анализ идентичности последовательностей между штаммом Tuva-2012 и доступными последовательностями WMV показал идентичность в диапазоне от 78,08% до 81,21% (Таблица 13). Следовательно, согласно текущим критериям, штамм Tuva-2012 следует считать представителем вида WMV. Множественные события реассортации, включающие все десять сегментов, были обнаружены в пределах клады штаммов WMV (исключая штаммы LEIV 2558-Tur и LEIV-F-57-Nah) (Рисунок 21). Феномен реассортации, как источник генетического разнообразия у клещевых орбивирусов, также был ранее описан и для генетической группы вирусов Great Island [6,151,167]. Межсегментная реассортация, по-видимому, является характерной особенностью представителей рода *Orbivirus*.

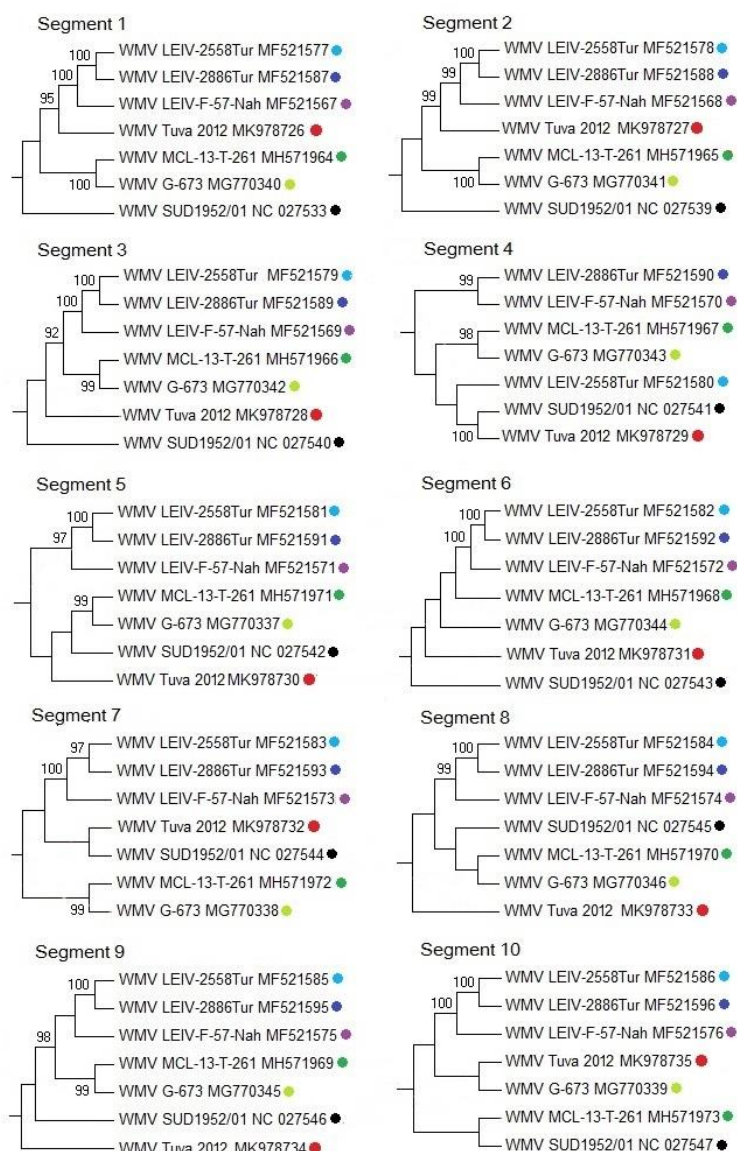


Рисунок 21 - Филогенетические деревья штаммов вируса Вад Медани

Дальнейшее изучение WMV, как потенциального источника новых или рецидивирующих инфекций, необходимо из-за его способности использовать различные переносчики, широкого распространения, специфичности и неизвестного медицинского значения. Способность WMV вызывать цитопатогенные эффекты и инфекционную активность у мышей-сосунков частично подтверждает это предположение.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей осуществлен методом максимального правдоподобия с использованием параметрической модели GTR с помощью программного обеспечения MEGA версии 6.0. Для построения деревьев использовали последовательности вируса Вад Медани: WMV LEIV-2886Tur (MF521587.1- MF521596.1), WMV LEIV-2558Tur (MF521577.1- MF521586.1), WMV LEIV-F-57-Nah (MF521567.1- MF521576.1),

WMV MCL-13-T-261 (MH571964.1- MH571973.1), WMV SUD 1952/01 (NC_027533.1- NC_027547.1) и WMV G-673 (MG770337.1- MG770346.1). Деревья были укоренены на геном вируса Baku (BAKUV, штамм LEIV-2826Tur; KY023349 – KY023358) (не показан). Надежность топологии была оценена с использованием 1000 бутстреп повторов. Местоположения штаммов WMV отмечены цветными точками [166].

4.3.4 Ретроспективная диагностика двух случаев бешенства у людей методом высокопроизводительного секвенирования

Вирус бешенства (RABV – Rabies virus) – нейротропный вирус порядка *Mononegavirales*, семейства *Rhabdoviridae* и рода *Lyssavirus*. Помимо RABV, род *Lyssavirus* включает 13 видов вирусов: австралийский лиссавирус летучих мышей (ABLV), вирус Дювенхаге (DUVV), европейские лиссавирусы летучих мышей 1 и 2 (EBLV1 и 2), вирус Араван (ARAV), вирус Худжанд (KHUV), вирус Иркут (IRKV), лагосский вирус летучих мышей (LBV), вирус Мокола (MOKV), западнокавказский вирус летучей мыши (WCBV) и лиссавирус летучей мыши Шимони (SHIBV). Все лиссавирусы вызывают острый прогрессирующий энцефалит (бешенство) у млекопитающих, обычно оканчивающийся летальным исходом. Передача лиссавирусов от бешеных животных происходит непосредственно при укусах, царапинах или загрязнении слизистых оболочек инфицированной слюной [168,169].

Представители рода *Lyssavirus* вносят различный вклад в заболеваемость бешенством. RABV широко распространен по всему миру и является возбудителем большинства случаев бешенства. Другие лиссавирусы имеют ограниченные области распространения и ограниченный диапазон хозяев, в основном представленных различными видами летучих мышей. Тем не менее, эти вирусы также могут вызывать заражение бешенством у людей [123,125,126,169].

Бешенство распространено в 150 странах, включая Россию (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789240690943_eng.pdf). Средняя зарегистрированная заболеваемость бешенством среди животных в России составляет 3000 случаев в год. Из них 36% - лисы, 21% - собаки, 20% - крупный рогатый скот и 13% - кошки [125]. Ежегодно в Российской Федерации регистрируется не менее 500 000 случаев укусов и царапин животных [126]. Однако в год сообщается лишь о 2-4 случаях заражения бешенством среди людей (http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/22c/gd_2014_seb_dlya-sayta.pdf). Такая относительно низкая заболеваемость бешенством среди людей является результатом хорошо организованного эпидемиологического надзора и контроля за RABV, а также легкодоступной вакцинацией и терапией специфическими иммуноглобулинами. Однако из-за низкой

заболеваемости осведомленность врачей об инфицировании бешенством у пациентов с острой энцефалопатией снижена, и некоторые случаи бешенства остаются недиагностированными.

В ходе ретроспективного изучения аутоптата, собранного у пациентов, умерших от энцефалита неизвестной этиологии, были исследованы два образца ткани головного мозга мальчика (семи лет) и мужчины (пятидесяти лет) с целью выяснения причины смерти. Оба образца были собраны в Астраханской области Российской Федерации в 2003 году и хранились в коллекции ФБУН ЦНИИЭ при температуре -70°C .

Общую РНК экстрагировали с использованием набора RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК элюировали 100 мкл воды, не содержащей РНКазы (Qiagen, Germany), и хранили при -70°C .

Родоспецифическую ОТ-ПЦР проводили с использованием набора олигонуклеотидов, предназначенных для амплификации фрагментов нуклеиновых кислот следующих родов вирусов: *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Parechovirus*, *Orthoflavivirus*, *Pestivirus*, *Norovirus*, *Astrovirus*, *Hepevirus*, *Alphavirus*, *Filoviridae*, *Arenaviridae*, *Paramyxovirus*, *Orthonairovirus*, *Lyssavirus*, *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus*, *Orthoreovirus*, *Adenoviridae*, and *Orthoherpesviridae* (Таблица 15).

Таблица 15 - Праймеры для родоспецифической ОТ-ПЦР

№	Таксон	Название	Последовательность 5'-3'	Источник
1	<i>Cardiovirus</i>	Cardio CF1_188 Cardio CR1_990	CTAATCAGAGGAAAGTCAGCAT GACCACTTGGTTTGAGAGCT	[128]
2	<i>Enterovirus</i>	EV_6590F EV_7000R	ATGCCNTCNGGNTGYTCWGGNAC YTTRTCWGSWGGWGTCAT	[132]
3	<i>Parechovirus</i>	PV2090F PV2523R	GAYAATGCIATMTAYACWATYTGTA ACWGTRAARATRTCHACATTSATDG	[130]
4	<i>Orthoflavivirus</i>	FlaviPF1S FlaviPF2Rbis	TGYRTBTAYAACATGATGGG GTGTCCCANCCNGCNGTRTC	[137]
5	<i>Pestivirus</i>	PestiV-NS5-F PestiV-NS5-R	GCNATNCCNAAGAATGAGAAGAG AAGCCRTCRTCNCRCASACGTG	[137]
6	<i>Norovirus</i>	NV-F268 NV-R787a NV-R787b	TCNTTYTAYGGTGATGATGAGAT GTCCTTAGACGCCATCATCA GTCATTCGACGCCATCTTCA	[137]
7	<i>Mamastrovirus</i>	AstroFwd1a AstroFwd2a AstroRev	GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA GGYTTKACCCACATNCCRAA	[131]
8	<i>Chirohepevirus</i>	HEV-F4228 HEV-R4598	ACYTTYTGTCYYTNTTTGGTCCNTGGTT GCCATGTTCCAGAYGGTGTCCA	[137]
9	<i>Alphavirus</i>	Pan Alpha-s Pan Alpha-as	TTTAAGTTTGGTGCGATGATGAAGTC GCATCTATGATATTGACTTCCATGTT	[133]
10	<i>Filoviridae</i>	PanFilo-F PanFilo-R	GCNAAGGCNTTCCNAGYAATATGATGGT TGNGGNGGRTTATAAWAGTCACTNACATG	[137]

Продолжение таблицы 15

11	<i>Arenaviridae</i>	OWA-3359A-plus OWA-3359D-plus OWA-3359G-plus OWA-3754A-minus OWA-3754D-minus	AGAATTAGTGAAAGGGAGAGCAATTC AGAATCAGTGAAAGGGAAAGCAATTCC AGAATTAGTGAAAGGGAGAGTAACTCC CACATCATTGGTCCCCATTACTATGATC CACATCATTGGTCCCCATTACTGTGATC	[137]
12	<i>Respirovirus</i>	AVU-RUB-F1 RES-MOR-HEN-F1 PNE-F1 AVU-RUB-R RES-MOR-HEN-R PNE-R	GGTTATCCTCATTTITTYGARTGGATHCA TCITTCTTTAGAACITTYGGNCAYCC GTGTAGGTAGIATGTTYGCNATGCARCC GCAATTGCTTGATTITCICCYTGNAC CTCATTTTGTAI GTCATYTTNGCRAA GTC CCACAA ITTTTGRACCANCCYTC	[135]
13	<i>Orthonairovirus</i>	Nairo-F Nairo-R	TCTCAAAGAAACACGTGCCGC GTCCTTCCTCCACTTGWGRGCAGCCTGCTGGTA	[136]
14	<i>Lyssavirus</i>	JW12 JW6 (DPL) JW6 (E) JW6 (M)	ATGTAACACCYCTACAATTG CAATTCGCACACATTTTGTG CAGTTGGCACACATCTTGTG CAGTTAGCGCACATCTTATG	[134]
15	<i>Phlebovirus</i>	Phlebo F1 Phlebo R1	TTTGCTTATCAAGGATTTGACC TCAATCAGTCCAGCAAAGCTGGGATGCATCAT	[137]
16	<i>Orthobunyavirus</i>	Bun F Cal/Bwa F Oropouche F Wyeomyia-F Bun R Cal/Bwa R Oropouche R Wyeomyia-R	CTGCTAACACCAGCAGTACTTTTGAC GCAAATGGATTTGATCCTGATGCAG GGCCCATGGTTGACCTTACTTT ATGTCTGAAATTGTATTTGATGATATTGG TGGAGGGTAAGACCATCGTCAGGAACGTG TTGTTCTGTTTGCTGGAAAATGAT ACCAAAGGGAAGAAAGTGAAT TATTTGATTCCCCGAAAGT	[136]
17	<i>Orthobornavirus</i>	Borna-F4551 Borna-R5671	CAGAAGTCATGGTAYTTYCCTGAGAT ATGATTGTTTGRITRTCMCCYTG	[137]
18	<i>Orbivirus</i>	OrbiVP1 F2295a OrbiVP1 F2295b OrbiVP1-R2523a OrbiVP1 R2523b OrbiVP1 R2523c OrbiVP1 R2523d OrbiVP1 R2523e OrbiVP1 R2523f	CGGAGCAGTATGTGGGNGATGAYA CGGAGATGTATGTGGGNGATGAYA TCWGAWGAKATKATCATTCGRTCTTG TCAGACGAGATCAACATCATTCGRTCTTG TCAGAGGAGACCATCATTCGRTCTTG TCCGATGAAATGAACATCATTCGRTCTTG TCGGACGAACTAGCATCATTCGRTCTTG TCAGAACTGACAATCATCATTCGRTCTTG	[137]
19	<i>Orthoreovirus</i>	Orthoreo -2090F Orthoreo -2334R	GGBTCMACNGCYACYTCBACYGAGCA CDATGTCRTAHWYCCANCCRAA	[139]
20	<i>Adenoviridae</i>	Hex1 Hex2	GCCSCARTGGKCWTACATGCACAT CAGCACSCCNCGRATGTCAAA	[140]
21	<i>Orthoherpesviridae</i>	DFASA-F GDTDIB-R	GTGTTGACTTYGCNAGYYTNTAYCC CGGCATGCGACAAACACGGAGTCNGTRTCNCCRTA	[137,142]

Обратную транскрипцию и амплификацию проводили с использованием одноэтапной системы RT-PCR SuperScript III с ДНК-полимеразой Platinum Taq (Invitrogen, USA) в реакции, содержащей 2 мкл РНК, 0,4 мкм прямого праймера, 0,4 мкм обратного праймера, 12,5 мкл 2^x

реакционного буфера, 1 мкл фермента, смешанного с 0,2 мкл 50 мм Mg_2SO_4 , 1 мкл бычьего сывороточного альбумина (BSA; 1 нг/мкл) и H_2O до общего объема 25 мкл.

Использовали следующие параметры термоциклирования: 45°C в течение 20 мин и 94°C в течение 3 мин, затем 10 циклов по 94°C в течение 20 с, от 55°C до 45°C (-1°C за цикл) в течение 20 с и 72°C в течение 30 с; и затем 40 циклов при 94°C в течение 20 с, 45°C в течение 20 с и 72°C в течение 30 с; и, наконец, 72°C в течение 3 мин. Все этапы амплификации проводили с использованием термоциклера Mastercycler Nexus (Eppendorf, Germany). Продукты реакций амплификации анализировали методом электрофореза в 1,2% агарозном геле.

Продукты амплификации для каждого образца объединяли в одну пробирку, очищали с помощью набора для ПЦР-очистки QIAamp (Qiagen, Germany), элюировали в 50 мкл буфера для элюирования и готовили для высокопроизводительного секвенирования с использованием набора для подготовки образцов ДНК TruSeq v.2.0 (Illumina, Inc., USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Для каждого образца были подготовлены отдельные библиотеки. Секвенирование проводили с использованием системы MiSeq (Illumina, Inc., USA) для генерации парных конечных считываний по 150 п.н.

Полученные данные были проанализированы с помощью специального биоинформационного протокола. На первом этапе прочтения были отфильтрованы с использованием программного обеспечения Trimmomatic v 0.35 для исключения прочтений низкого качества [159]. Затем последовательности вырожденных праймеров ПЦР широкого спектра, а также простых повторов были проанализированы с помощью комбинации пользовательских скриптов Python и программных пакетов. Отфильтрованные прочтения использованы для дальнейшего анализа. Чтобы присвоить таксономические метки полученным прочтениям, мы сравнили собранные контиги и отдельные прочтения с базами данных GenBank NCBI, используя алгоритмы blastn, blastx или tblastn.

После демультиплексирования и контроля качества данных высокопроизводительного секвенирования было получено 6041914 прочтений, относящихся к двум образцам. В общей сложности 124781 из этих прочтений имели высокое сходство с последовательностью RABV (JQ944704). Полные геномы двух штаммов RABV (исключая 5' и 3' концы) были получены с использованием 20 пар праймеров, описанных в Таблице 16 [126].

Таблица 16 - Праймеры для секвенирования полных геномов вируса бешенства

№	Название	Последовательность 5'-3'	Координаты относительно Последовательности референс-штамма JQ944704
1	Rab1f	ACGCTTAACAACAAAATCATAGAAG	1-25
2	Rab1r	AACATGTCTAGGTTCCGGC	689-708
3	5N-f	ACGCTTAACAACAAAATCATAGAAGAAGC	1-29
4	5N-r	AGAATCCGGGGTGATCTTGGTTC	369-391
5	NP-f	ATGAATGGAGGTCGACTAAAGAGATC	1301-1326
6	NP-r	TCTCACCGAGGTTGGACGATTTTC	1695-1718
7	Rab2f	ATGACAACACACAAAATGTGYGC	632-653
8	Rab2r	GGATTGACGAAGATCTTGCTCAT	1515-1537
9	Rab3f	ATGAGCAAGATCTTCGTCAATCC	1515-1537
10	PM-f	TGCTTTGGCCAATTCCAAGAAATTCC	2312-2336
11	PM-r	ATACAAAAGTTCCTCATGTCTTCTTGC	2632-2659
12	Rab3r	AGAAAGTTCATTTTGTGTCAGTGGTG	2483-2506
13	Rab-4f	AACACCACTGACAAAATGAACTTTC	2481-2505
14	MG-f	TCTGGTGTATCAACATGAATTCAAGAGC	2998-3025
15	MG-r	TAAATTGTTTGGGCAGCTGAGATGATG	3431-3457
16	Rab-4r	AGCCCGTATGTTCTCTCCTC	3146-3165
17	Rab-5f	AGCCTCTTGATGTGAAAAAAC	3263-3285
18	Rab5r	TTC CRTCCATAAGTCTAAGTCC	4067-4087
19	Rab-6f	AAGACYTGTGGVTTTGTRGATG	3986-4007
20	Rab-6r	AAACACCTTTTTGARGGGATG	4387-4407
21	Rab-7f	TTGATGGAGGCTGAWGCCAC	4337-4357
22	Rab-7r	TCCACMACCTTTGRTATCAGT	5123-5143
23	Rab-8f	CTGATACCAAAGGTGGTGGGA	5124-5143
24	Rab-8r	ATAYCTCCRAATGCCTTRTC	5888-5908
25	Rab-9f	TCYGAATCAAACAGGAGYCGG	5732-5752
26	Rab-9r	TCCCRAATGCCTTRTCATARTC	5882-5903
27	Rab-10f	TTTAGAGTTCTGKATCAATTYGAC	6455-6478
28	Rab-10r	AAARAATCGRCCYTCAATCTTC	7051-7072
29	Rab-11f	ACTTGATAATTGGYCTYAAGCC	7014-7035
30	Rab-11r	TATGTCGGACATAGAACCTG	7601-7620
31	Rab-12f	TCAGACAGRTCAGACCTYATCGG	7397-7419
32	Rab-12r	TCTCTCCRAGATCHG GGTCCC	8243-8264
33	Rab-13f	ATGTCRAGRATAATCTATCTAGACC	8072-8096
34	Rab-13r	TTTCTWGTGATGAACCAGTTTATRG	9003-9027

Продолжение таблицы 16

35	Rab-14f	TCACYAATGTTTCATGTGGTRAAAAG	8958-8982
36	Rab-14r	TYT CTCCTCTAAGAGAYGGTTCTC	9825-9848
37	Rab-15f	TTTGAATCTYTAAGTGGTAGRG	9510-9531
38	Rab-15r	AACATCCTRCCTTGCGWG	10288-10305
39	Rab-16f	ATCAAGARGTSCGCCAYGC	10227-10245
40	Rab-16r	AATCAARCARYCAGAGGTYC	11871-11890

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора Реверта-L (АмплиСенс®, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. кДНК хранили при -70°C и использовали в качестве матрицы для амплификации.

ПЦР-амплификацию с горячим стартом проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем 2 мкл кДНК, 0,4 мкм прямого праймера, 0,4 мкм обратного праймера, 2,5 мкл ДНТФ (1,76 мм, АмплиСенс®, Россия) и 10 мкл ПЦР-буфера blue-2 с 7,5 мм MgCl₂ (АмплиСенс®, Россия) [87]. Использовались следующие параметры термоциклирования: 94°C в течение 1 мин; 40 циклов при 94°C в течение 10 с, от 55 до 65°C (в зависимости от пары праймеров) в течение 15 с и 72°C в течение 60 с; и 72°C в течение 5 мин. Реакции проводили в градиентном термоциклере МахуGene (Ахуген, USA). Продукты анализировали методом электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле. Все продукты ПЦР были очищены и секвенированы с использованием ABI Prism 3500 XL (Applied Biosystems, USA).

Полные геномы двух штаммов RABV Rus(Астрахань)_8929Н_2003 и Rus(Астрахань)_8930Н_2003 были депонированы в GenBank NCBI под регистрационными номерами KT728348 и KT728349, соответственно.

Филогенетический анализ показал, что оба штамма принадлежали к евразийской подгруппе RABV, которая широко распространена в регионах Российской Федерации с умеренным климатом (Рисунок 22).



Рисунок 22 - Филогенетическое древо вируса бешенства на основе последовательности N-гена (нуклеотидный уровень). Филогенетический анализ был выполнен с использованием модели замен Тамуры, деревья были реконструированы с использованием метода максимального правдоподобия (ML) в программном обеспечении MEGA 6.0. Статистическая значимость топологии была оценена путем 1000 бутстреп-повторов. Местоположения штаммов Rus (Астрахань)_8929H_2003 (KT728348) и Rus (Астрахань)_8930H_2003 (KT728349) отмечены серым цветом на дереве. Регистрационные номера других штаммов RABV, используемых для создания деревьев, включают AB570996, AY352455-AY352491, EU284093, EU853594, KC595280-KC595283, KJ748635, KJ152733, JN258592, JN258588, U43025, U43432 и U03768 [124]

Два штамма RABV отличались на 0,6% по нуклеотидной последовательности несмотря на то, что оба случая бешенства произошли в одном регионе и в одно время.

Наличие RABV в обоих образцах было подтверждено с помощью методов флуоресцирующих антител, ИФА и биологической пробы (Рисунок 23а-к).

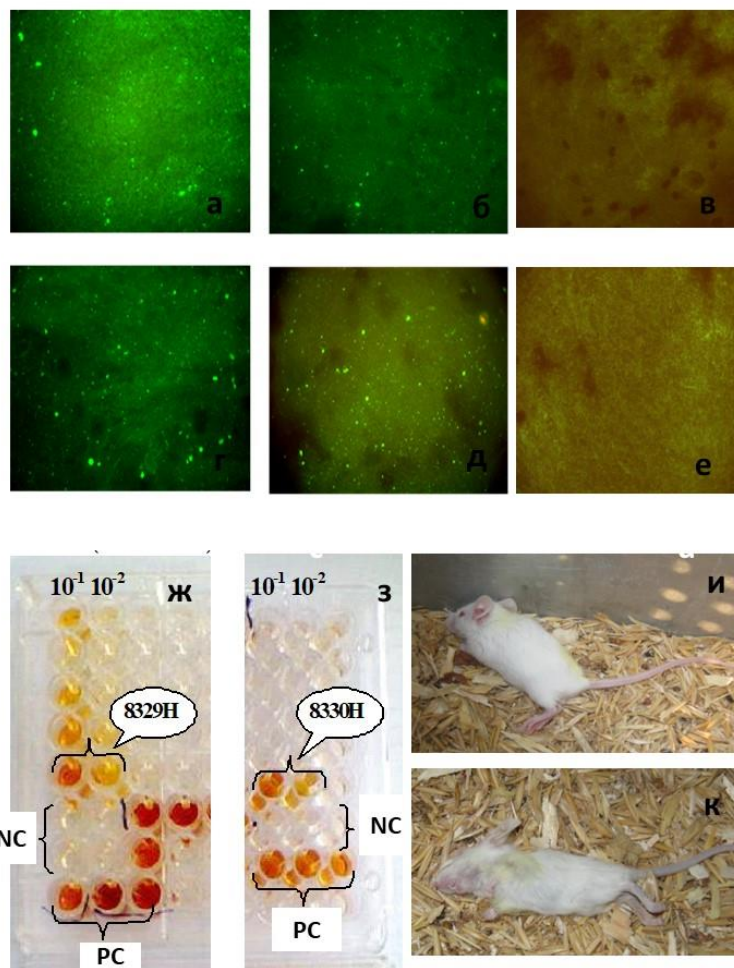


Рисунок 23 - Результаты применения метода флуоресцирующих антител (Изображения окрашенных образцов)

а: 8929Н аутопнат мозга человека;

б: 8930Н аутопнат мозга человека;

в: отрицательный контроль;

г: 8929Н мозг инфицированной мыши;

д: 8930Н мозг инфицированной мыши;

е: отрицательный контроль;

ж,з: ИФА;

и,к: биологическая проба.

Идентификация возбудителя является важнейшей проблемой в инфектологии. Исследования осложняются регулярным появлением новых вирусных патогенов, что приводит к увеличению числа заболеваний с неизвестным этиологическим агентом. Успех диагностики инфекционных заболеваний зависит от способности персонала лаборатории идентифицировать возбудителей с помощью молекулярных методов.

ПЦР-РВ, вероятно, является наиболее удобным методом диагностики инфекционных заболеваний. Однако этот метод основан на предварительной гипотезе относительно предполагаемого возбудителя. Большинство диагностических лабораторий располагают ограниченным ассортиментом диагностических наборов, которые нацелены на наиболее распространенные инфекции. Более того, некоторые потенциально нейровирулентные вирусы, такие как энтеровирусы и герпесвирусы, распространены повсеместно и могут присутствовать в образцах, но могут при этом не являться этиологическими агентами энцефалита. Поэтому в сложных случаях желательно не только обнаружить вирус, но и исключить другие возбудители. Эта задача дополнительно осложняется тем фактом, что возбудитель может присутствовать в небольшом количестве, что затрудняет его однозначное обнаружение с помощью обычной диагностической ПЦР.

Нами показано, что ПЦР широкого спектра действия в сочетании с высокопроизводительным секвенированием может быть применена и для клинической диагностики.

5. Разработка критериев оценки эпидемического потенциала

Необходимость совершенствования мониторинга за новыми инфекциями влечет за собой необходимость создания единой концепции для целостного восприятия проблемы, координации направлений деятельности по изучению новых инфекций, общей оценки эпидемиологической ситуации, своевременного выявления потенциальных угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию. Данная концепция предусматривает существование системы мониторинга инфекций, отличающихся от традиционного надзора за уже известными возбудителями [90,119].

Одной из таких особенностей является осуществление так называемой «предэпидемической диагностики», сопровождающей целенаправленный поиск возбудителей с оценкой степени их опасности, т. е. не только выявления новой инфекции, но и определение предпосылок возникновения вызванных ею эпидемиологических осложнений [91,120,122,171]. Мерой «предэпидемической диагностики» в отношении уже известных эпидемически значимых возбудителей может считаться давно существующий метод мониторинга природно-очаговых

инфекций – оценка эпидемического потенциала природных очагов [170]. Этот метод позволяет определить степень потенциальной эпидемиологической опасности территории в отношении возможного распространения инфекции, и в настоящий момент разработаны способы оценки данного показателя для возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), лептоспирозов, туляремии, инфекций, передающихся клещами, холеры и чумы [171,172,173,174]. Однако при данном подходе производится оценка состояния конкретной территории без учета особенностей самого возбудителя, которые могут играть важную роль, особенно для новых инфекций, когда их эпидемиологическая характеристика затруднена ввиду малой изученности [91,120].

Оценить степень эпидемиологической опасности в данном случае поможет оценка эпидемического потенциала непосредственно возбудителя. Под эпидемическим потенциалом возбудителя понимается совокупность его свойств, определяющих способность вызывать эпидемический процесс и осложнения эпидемиологической ситуации [176]. Иначе говоря, этот показатель отражает эпидемиологическую опасность возбудителя, связанную с риском инфицирования людей [171]. В настоящий момент в литературе отсутствует какая-либо единая система определения эпидемического потенциала возбудителя. Он складывается из совокупности разнородных качественных и количественных показателей, которые влияют на формирование и проявление эпидемического процесса, и могут по-разному учитываться каждым исследователем относительно каждого отдельно взятого инфекционного агента. Поэтому определение эпидемического потенциала может носить достаточно умозрительный характер и не позволяет сравнивать между собой различные возбудители. В свою очередь, без четко определенных критериев невозможно оценить эпидемический потенциал новых и возвращающихся инфекций, находящихся, по определению В.В. Шкарина с соавт., «в зале ожидания», т. е. находящихся в стадии изучения [91,120,171]. В связи с возрастающим интересом специалистов к данной группе инфекций все большее внимание уделяется проблемам их мониторинга и разработке подходов к оценке эпидемиологической опасности. На примере пандемии свиного гриппа H1N1 2009 г. [176], вспышек ближневосточного респираторного синдрома, вызванного коронавирусом (MERS-CoV) [177], и лихорадки Зика [3], массовой эпизоотии гриппа птиц в 2003–2004 гг. [4], а также глобальной пандемии коронавирусной инфекции COVID-19 ([https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)), было показано, что чрезвычайные ситуации, связанные с новыми инфекциями, могут представлять серьезную угрозу для человека и требуют совершенствования подходов к выявлению и мониторингу новых инфекционных заболеваний [5].

Для разработки критериев количественного определения эпидемического потенциала проведена разноплановая оценка с учетом экологических, генетических и эпидемиологических характеристик возбудителей природно-очаговых инфекций вирусной этиологии, поскольку они объединены общими закономерностями существования в рамках теорий природной очаговости [181] и учения об эпидемическом процессе [182]. Понятие эпидемического потенциала тесно связано с понятием эпидемиологической опасности, формирующей эпидемиологический риск и складывающейся из опасностей источника инфекции, механизма передачи и восприимчивости организма [183] в соответствии с классической триадой эпидемического процесса Громашевского [182]. Для разработки универсальных критериев оценки эпидемического потенциала проанализированы факторы, формирующие эпидемиологический риск как в отношении уже изученных возбудителей, так и для новых инфекций, находящихся в стадии изучения. При этом особенное внимание необходимо уделить именно инфекциям, находящимся в «зале ожидания», эпидемиологическую опасность которых еще предстоит оценить [171], поскольку риски возникновения чрезвычайных ситуаций, связанных с группой малоизученных возбудителей, являются неочевидными и, как следствие, недооцененными [176].

В рамках созданной системы количественной оценки эпидемического потенциала был определен ряд показателей, разделенных на три группы по опасности каждого из элементарных звеньев эпидемического процесса в рамках существующих представлений об эпидемиологическом риске: опасность источника возбудителя инфекции, опасность механизма передачи и опасность восприимчивости макроорганизма [183]. В рамках каждой группы обозначено по 4 показателя, в каждый из которых включены факторы, ранжированные по шкале от 1 до 5, в соответствии со значимостью с точки зрения реализации эпидемиологического риска (Таблица 17) [90,118].

Максимальное количество баллов, по которым может быть оценен возбудитель в каждой из трех групп — 20, с учетом всех трех групп — 60. Эпидемический потенциал вируса оценивается при суммировании баллов по всем трем группам, соотношение баллов между группами позволяет оценить значимость того или иного элемента в развитии эпидемического процесса для данного возбудителя, а, следовательно, ведущий фактор эпидемиологического риска [90,118].

Таблица 17 - Критерии оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии

Опасность источника инфекции		
Фактор	Элементы фактора	Баллы
Тип генетического материала вируса	(+) РНК	5
	Сегментированная (-) РНК и дцРНК	4
	Несегментированная (-) РНК	3
	оцДНК	2
	дцДНК	1
Дополнительные источники генетической изменчивости	Показана способность к межвидовой реассортации и/или рекомбинации	5
	Показана способность к внутривидовой реассортации и/или рекомбинации	4
	Показана межвидовая реассортация и/или рекомбинации у близкородственного вируса, патогенного для человека	3
	Показана внутривидовая реассортация и/или рекомбинации у близкородственного вируса, патогенного для человека	2
	Наличие реассортационных и/или рекомбинационных событий у любого близкородственного вируса	1
Филогенетические взаимоотношения вируса с близкородственными представителями	Наличие в пределах рода возбудителей актуальных инфекций, для которых проводятся надзорные мероприятия	5
	Наличие в пределах рода представителей с доказанной патогенностью для человека	4
	Наличие в филогенетически близких родах возбудителей актуальных инфекций, для которых проводятся надзорные мероприятия	3
	Наличие в филогенетически близких родах представителей с доказанной патогенностью для человека	2
	Наличие в семействе патогенных представителей	1
Характеристика организмов-резервуаров инфекции	Полигостальность, включая птиц и рукокрылых	5
	Полигостальность, включая мелких млекопитающих, грызунов и диких хищников	4
	Полигостальность, включая КРС, МНС, свиней и диких копытных	3
	Моногостальность с повсеместным распространением	2
	Моногостальность с локальным распространением	1
Опасность механизма передачи		
Ведущий механизм передачи	Аспирационный	5
	Фекально-оральный	4
	Трансмиссивный поливекторный	3
	Трансмиссивный моновекторный	2
	Контакт	1
Характер взаимодействия человека с природным резервуаром инфекции	Постоянное взаимодействие групп населения с эпизоотическим очагом	5
	Регулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом характерно для определённых групп населения	4
	Нерегулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом среди различных групп населения	3
	Нерегулярное взаимодействие с эпизоотическим очагом характерно для определённых групп населения	2
	Случайное взаимодействие с эпизоотическим очагом	1
Территориальная характеристика природного резервуара	Множественные очаги в различных природно-климатических зонах	5
	Множественные очаги в пределах одной природно-климатической зоны	4
	Локальные очаги большой территориальной протяжённости	3
	Множественные очаги малой территориальной протяжённости	2

Продолжение Таблицы 17

	Единичные очаги малой территориальной протяжённости	1
Возможность передачи от человека к человеку	Формирует устойчивые антропоургические очаги за счёт передачи аспирационным или фекально-оральным путём	5
	Возможна аспирационная или фекально-оральная передача без формирования устойчивых антропоургических очагов	4
	Возможна контактная передача	3
	Возможна трансмиссивная передача	2
	Возможна вертикальная передача	1
Опасность восприимчивости макроорганизма		
Восприимчивый организм	Доказана патогенность для человека	5
	Доказана патогенность для млекопитающих – различных видов тест-организмов	4
	Патогенен для определённого вида тест-организмов или только при определённом способе заражения	3
	Патогенен для новорожденных мышей, вызывает ЦПД на клетках	2
	Наличие патогенных близкородственных представителей	1
Обычная продолжительность инкубационного периода	Более 3 недель	5
	До трёх недель	4
	До двух недель	3
	От 5 дней до недели	2
	Менее 5 дней	1
Характер течения инфекционного процесса	Неманифестное (бессимптомное)	5
	Манифестное лёгкое	4
	Манифестное средней тяжести	3
	Манифестное тяжёлое	2
	Манифестное тяжёлое с летальным исходом	1
Интенсивность распространения эпидемического процесса	Зарегистрированы случаи пандемической заболеваемости	5
	Зарегистрированы случаи эпидемической заболеваемости	4
	Зарегистрированы случаи вспышечной заболеваемости	3
	Зарегистрированы случаи спорадической заболеваемости	2
	Наличие серопревалентности при отсутствии заболеваемости	1

Опасность источника возбудителя инфекции

Источник возбудителя инфекции – первое звено эпидемического процесса, место естественной жизнедеятельности возбудителя. Согласно традиционным представлениям о природно-очаговых инфекциях, сюда необходимо относить все, что касается природы животных – резервуаров инфекции, в популяции которых возбудитель циркулирует за счет эпизоотий и носительства. Однако современные представления в контексте изучения эпидемиологии новых и возвращающихся инфекций указывают на необходимость рассмотрения не только характеристик источника возбудителя, но также и самого возбудителя, участвующего в формировании и поддержании эпидемического процесса [182], в первую очередь — его потенциала генетической изменчивости и других факторов, модулирующих вирулентность и способность адаптироваться к различным видам носителей и переносчиков. В эту группу были отнесены такие факторы, как тип генетического материала вируса, с которым непосредственно

связаны темпы мутационной изменчивости, дополнительные источники генетической изменчивости в виде реассортации и рекомбинации, филогенетические взаимоотношения с близкородственными вирусами, патогенными для человека, а также характеристика природного резервуара возбудителя, от видового состава и разнообразия которого также напрямую зависит изменчивость вируса и риск инфицирования человека [90,118]. Следует отметить, что оценка эпидемического потенциала на генном уровне требует учета стохастических событий, связанных с генетической изменчивостью в обширных популяциях патогена, циркулирующего в ареалах обитания резервуарных хозяев и переносчиков [184], что делает предсказание эпидемического потенциала на генном уровне очень сложным, особенно в случае малоизученных возбудителей, для которых отсутствуют данные о детерминантах патогенности и об уровне и механизмах формирования генетического разнообразия. Поэтому оценка эпидемического потенциала новых инфекций тесно сопряжена с необходимостью изучения их фундаментальных основ, а сам эпидемический потенциал представляет собой динамическую величину, которая может изменяться с появлением новых данных об эколого-генетических основах существования, механизмах изменчивости изучаемых возбудителей [90,118].

Опасность механизма передачи возбудителя

В данную группу факторов входят: ведущий механизм передачи возбудителя, возможность передачи от человека к человеку, территориальная характеристика природного резервуара инфекции и особенности взаимодействия человека с ним. Тот или иной механизм передачи инфекции, как второе звено эпидемического процесса, реализуется посредством разнообразных факторов передачи, и, как и первая группа факторов, отчасти сопряжен с биологическими свойствами возбудителя, предопределяющими его способность сохраняться во внешней среде. Характер взаимодействия человека, проживающего на эндемичной территории, с источником инфекции, также, как и территориальная характеристика природного резервуара в определенной мере относятся к факторам, отражающим опасность первого звена эпидемического процесса, но при этом также характеризуют эпидемиологическую опасность реализации механизма передачи инфекции, поэтому в существующей системе показателей данные факторы отнесены ко второму звену [90,118].

Опасность восприимчивости макроорганизма

Включает факторы, описывающие опасность третьего, обязательного, элемента эпидемического процесса, особенности течения инфекционного процесса при взаимодействии организма человека с возбудителем, которые способствуют проявлению и поддержанию патологического процесса на популяционном уровне. В данную группу отнесены непосредственный круг восприимчивых организмов и факторы, характеризующие время существования возможного эпидемического очага и риск возникновения вторичных и третичных

случаев заражения (обычная продолжительность инкубационного периода, характер течения инфекции), а также интенсивность распространения эпидемического процесса. Для оценки эпидемического потенциала вируса в соответствии с разработанными критериями необходимо обобщить и проанализировать известные данные по трем рассматриваемым группам факторов, участвующим в формировании эпидемиологической опасности [90,118].

По результатам оценки возбудителя по предложенным факторам, по сумме баллов предлагается следующая шкала определения эпидемического потенциала:

1. при сумме баллов 24 и ниже – низкий эпидемический потенциал;
2. при сумме баллов от 25 до 44 – средний эпидемический потенциал;
3. при сумме баллов 45 и выше – высокий эпидемический потенциал.

Если в ходе балльной оценки для вируса подходит несколько факторов из перечисленных – оценка выставляется по максимальному значению. Если данные по какому-либо фактору отсутствуют или в настоящий момент никак не изучены – ставится 0.

Для проверки предлагаемой системы оценки эпидемического потенциала дополнительно с помощью представленных критериев было проведено определение эпидемического потенциала ряда возбудителей природно-очаговых инфекций с трансмиссивным и нетрансмиссивным механизмом передачи (Таблица 18) [90,118].

Таблица 18 - Результаты оценки эпидемического потенциала возбудителей некоторых природно-очаговых инфекций

Вирус Virus	1 группа	2 группа	3 группа	Сумма баллов	Эпидемический потенциал
Вирус Кемерово (KEMV)	16	11	11	38	Средний
Вирус Муко (MUV)	13	8	0	21	Низкий
Вирус клещевого энцефалита (TBEV)	12	15	15	42	Средний
Вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго (CSHFV)	17	16	14	47	Высокий
Вирус Парамушир (PARV)	10	12	0	22	Низкий
Вирус Лихорадки Западного Нила (WNV)	19	13	15	47	Средний
Вирус денге (DENV)	19	15	16	50	Высокий
Вирус Зика (ZIKV)	18	15	16	49	Высокий
Вирус Японского энцефалита (JEV)	19	12	14	45	Высокий
Вирус Ласса (LASV)	16	18	14	48	Высокий
Вирус Луйо (LUJV)	15	13	11	39	Средний
Вирус Эбола Заир (EBOV)	8	18	14	40	Средний
Вирус Рестон (RESTV)	9	8	1	18	Низкий
Вирус бешенства (RABV)	16	10	14	40	Средний
Вирус Хатанга (CHTV)	15	7	1	23	Низкий
Вирус Добrava (DOBV)	15	14	16	45	Высокий
Вирус Пуумала (PUUV)	15	14	16	45	Высокий
Вирус Вад-Медани (WMV)	12	8	0	20	Низкий
Бетакоронавирус SARS-CoV-2	18	17	15	49	Высокий

Полученные значения и присвоенный согласно им эпидемический потенциал, в целом, соответствуют современным представлениям об эпидемиологической опасности оцененных

возбудителей природно-очаговых инфекций. Возбудители особо опасных инфекций I-II группы патогенности, такие как вирус Эбола Заир, вирус Ласса, вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго, способные передаваться нетрансмиссивно, а также от человека к человеку, обладают высоким эпидемическим потенциалом. Возбудители II группы патогенности с трансмиссивным механизмом передачи обладают средним и приближающимся к высокому эпидемическому потенциалу, который ограничивается отсутствием возможности нетрансмиссивной передачи или отсутствием передачи от человека к человеку (например, для вируса клещевого энцефалита). Малоизученные, непатогенные для человека вирусы и вирусы с ещё недоказанной патогенностью ожидаемо обладают низким эпидемическим потенциалом. Однако, по мере их изучения и появления новых данных, текущее значение эпидемического потенциала для них может измениться [90,118].

Таким образом, предложенная система оценки эпидемического потенциала позволяет не только представить способность возбудителей к формированию эпидемического процесса в количественном выражении, но и сравнить эпидемический потенциал различных возбудителей между собой и оценивать в полученном значении удельный вес каждого из трех факторов эпидемиологической опасности, составляющих компоненты эпидемического процесса. В дальнейшем система оценки может быть расширена за счет внесения новых значимых показателей или усовершенствована иным образом, что позволит ей стать универсальным инструментом в рамках развивающегося подхода «аналитики вспышек» и предупреждения угроз возникновения чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера [184].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами была разработана концепция непрерывного молекулярно-генетического мониторинга для оперативного реагирования на возникающие биологические угрозы. Концепция предполагает наличие четырех ключевых элементов: модульного научно-исследовательского комплекса своевременного реагирования на биологические угрозы, наличие алгоритма экстренной разработки средств молекулярной детекции патогенных микроорганизмов, организацию систематических исследований разнообразия и вирусов позвоночных, обладающих эпидемическим потенциалом, наличие критериев оценки потенциальной опасности существующих и вновь выявляемых вирусных агентов.

В рамках описанной концепции нами были оперативно разработаны, зарегистрированы и внедрены в практику набор реагентов в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров вируса Эбола Заир (EBOV-(Zaire)-Fl) и наборы реагентов в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров филовирусов Эбола и Марбург (FiloA-Fl и FiloB-Fl) в рамках реагирования на эпидемию лихорадки эбола в Западной Африке в 2013-2015 гг., а также набор реагентов в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров вируса SARS-CoV-2 в рамках реагирования на пандемию новой коронавирусной инфекции COVID-19. Помимо этого разработаны еще 19 наборов реагентов для диагностики опасных вирусных инфекций.

Также были разработаны подходы применения высокопроизводительного секвенирования для идентификации патогенов и их последующего полногеномного секвенирования. Разработанные методики позволяют существенно увеличить пропускную способность лаборатории, повысить чувствительность исследования при снижении материальных и временных затрат в пересчете на один исследуемый образец. Продемонстрирована состоятельность разработанных методик для проведения как скрининговых исследований образцов из окружающей среды, так и для расшифровки случаев заболеваний неясной этиологии.

Наконец, нами разработан подход, позволяющий проводить простую и быструю оценку эпидемического потенциала выявляемых вирусных агентов для своевременного принятия адекватных управленческих решений, направленных на обеспечение санитарно-эпидемического благополучия населения Российской Федерации.

ВЫВОДЫ

1. Создана концепция модульного научно-исследовательского комплекса оперативного реагирования на биологические угрозы.
2. С помощью алгоритма экстренной разработки средств молекулярной детекции вирусов созданы диагностические методики в формате ОТ-ПЦР-РВ для выявления генетических маркеров актуальных и особо опасных вирусов, соответствующие по своим аналитическим характеристикам лучшим зарубежным аналогам.
3. Разработаны подходы к изучению разнообразия и экологии вирусов позвоночных, обладающих эпидемическим потенциалом.
4. Показано, что штамм вируса Эбола Заир, вызвавший эпидемию в Западной Африке 2013 - 2015 гг. не подвергался «генетическому давлению» и образовался в ходе естественного эволюционного процесса.
5. Установлено, что вирус Парамушир продолжает циркулировать в дальневосточном регионе страны и способен к внутривидовой реассортации и рекомбинации.
6. Впервые показана циркуляция вируса Вад Медани на территории Российской Федерации и его способность к множественной межсегментной реассортации.
7. В ходе изучения биологического материала от лиц с энцефалитами неясной этиологии установлен факт гиподиагностики бешенства.
8. С помощью разработанных критериев оценки потенциальной опасности существующих и вновь выявляемых вирусных агентов показано, что возбудители особо опасных вирусных инфекций I-II группы патогенности, способные передаваться нетрансмиссивно, а также от человека к человеку, обладают высоким эпидемическим потенциалом, в то время как возбудители вирусных инфекций II группы патогенности с трансмиссивным механизмом передачи обладают средним и приближающимся к высокому эпидемическому потенциалу, который ограничивается отсутствием возможности нетрансмиссивной передачи или отсутствием передачи от человека к человеку.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Научным учреждениям, занимающимся разработкой средств молекулярной диагностики рекомендовано:
 - внедрение модульного научно-исследовательского комплекса оперативного реагирования на биологические угрозы;

- использование алгоритма экстренной разработки средств молекулярной детекции вирусов.

2. Научным учреждениям, занимающимся реализацией Федерального проекта «Санитарный щит – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» рекомендовано:

- внедрение разработанных подходов к изучению разнообразия и экологии вирусов позвоночных;
- использование критериев оценки эпидемического потенциала вновь выявляемых вирусов.

3. С целью совершенствования эпизоотолого-эпидемиологического контроля за инфекциями, передаваемыми клещами (ИПК) рекомендуется мониторировать циркуляцию вирусов Парамушир, Вад Медани и родственных им вирусов на территории Российской Федерации.

4. Для решения вопроса о возможном вкладе данных инфекционных агентов в формирование заболеваемости ИПК неясной этиологии рекомендуется проводить исследование материала от больных с менинго-энцефалитами и лихорадочными состояниями, возникшими после присасывания клеща при отсутствии лабораторно подтвержденных диагнозов ВКЭ, ОГЛ, СКТ, ГАЧ, МЭЧ, КГЛ, АПЛ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Алгоритм экстренной разработки средств молекулярной детекции вирусов может быть адаптирован для разработки средств молекулярной диагностики патогенов бактериальной природы, а также грибов и простейших. Разработанные подходы к изучению разнообразия и экологии вирусов позвоночных, обладающих эпидемическим потенциалом, позволяют облегчить проведение метавирусных исследований, что создает предпосылки для обнаружения редких и новых вирусов – потенциальных возбудителей заболеваний человека и животных.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fraser C., Donnelly C.A., Cauchemez S., Hanage W.P., Van Kerkhove M.D., Hollingsworth T.D., Griffin J. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings // *Science*. – 2009. – V.324. – № 5934. – 1557–1561. DOI: 10.1126/science.1176062.
2. Eslaminejad T, Shojaeepour S, Torabizadeh SA, Mirzaie V. Coronavirus in Recent Years: Characteristics, Outbreaks, and Treatments. *Tanaffos*. – 2024. V. 23. № 3. – 220-237.
3. Campos G.S., Bandeira A.C., Sardi S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil // *Emerg. Infect. Dis.* – 2015. – V.21. – № 10. – 1885– 1886. DOI: 10.3201/eid2110.150847.
4. Liu J., Xiao H., Lei F., Zhu Q., Qin K., Zhang X.W., Zhang X.L., Zhao D., Wang G., Feng Y., Ma J., Liu W., Wang J., Gao G.F. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds // *Science*. – 2005. – V.309. – № 5738. – 1206. DOI: 10.1126/science.1115273.
5. Osterholm M.T. Preparing for the next pandemic. // *N Engl J Med*. – 2005. V.352. – № 18. – 1839–1842. DOI: 10.1056/NEJMp058068.
6. Dedkov V.G., Simonova E.G., Beshlebova O.V., Safonova M.V., Stukolova O.A., Verigina E.V., Savinov G.V., Karaseva I.P., Blinova E.A., Granitov V.M., Arsenjeva I.V., Shipulin G.A. The burden of tick-borne diseases in the Altai region of Russia // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. – 2017. –V.8. – № 5. – 787-794. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.06.004.
7. Бесхлебова О.В., Гранитов В.М., Дедков В.Г., Арсеньева И.В. Клещевые инфекции с природной очаговостью в Алтайском крае: настоящее и будущее // *Бюллетень медицинской науки*. – 2018. – Т.12. – № 4. – 39-44.
8. Dedkov V.G., Magassouba N.F., Stukolova O.A., Savina V.A., Camara J., Soropogui B., Safonova M.V., Semizhon P., Platonov A.E. Differential Laboratory Diagnosis of Acute Fever in Guinea: Preparedness for the Threat of Hemorrhagic Fevers // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – V.18. – № 11. – 6022. DOI: 10.3390/ijerph18116022.
9. Granitov V.M., Shpynov S.N., Beshlebova O.V., Arsenjeva I.V., Dedkov V.G., Safonova M.V., Stukolova O.A., Pantjukhina A.N., Tarasevich I.V. New evidence on tick-borne rickettsioses in the Altai region of Russia using primary lesions, serum and blood clots of molecular and serological study // *Microbes and Infection*. – 2015. – V.17. – № 11-12. – 862-865. DOI: 10.1016/j.micinf.2015.08.011.
10. Ikegami T., Saijo M., Niikura M., Miranda M.E., Calaor A.B., Hernandez M., Manalo. D.L., Kurane I., Yoshikawa Y., Morikawa S. Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus // *Epidemiol Infect.* – 2003. V.130. № 3. – 533-539.

11. Семенцова А.О., Дедков В.Г., Терновой В.А., Чуб Е.В., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Максюттов Р.А., Малеев В.В., Попова А.Ю. Клиническая лабораторная диагностика лихорадки Эбола. Анализ существующих методик и диагностических средств. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2018. - Т. 95. – № 3. - 105-116. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-3-105-116.
12. Дедков В.Г. Основные направления и результаты научных исследований / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора / Под редакцией докт. мед. наук, профессора А.Ю. Поповой, академика РАН, докт. мед. наук, профессора В.В. Кутырева. – М.: ООО «Творческий информационно-издательский центр», 2016. – 195-199.
13. Дедков В.Г. Клиническая лабораторная диагностика лихорадки Эбола. Анализ существующих методик и диагностических средств/ А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией профессора, доктора медицинских наук А. Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – 102-113.
14. Dolgova A.S., Dedkov V.G., Safonova M.V., Faye O. Current View on Genetic Relationships within the Bunyamwera Serological Group // Viruses. – 2022. –V.14. – № 5. –1135. DOI: 10.3390/v14061135.
15. Дедков В.Г. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики БВВЭ в Российской Федерации / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Эпидемиология, профилактика и лабораторная диагностика болезни, вызванной вирусом Эбола: практическое руководство/ Под редакцией докт. мед. наук, профессора А.Ю. Поповой, академика РАН, докт. мед. наук, профессора В.В. Кутырева. – Саратов: ООО «Буква», 2015. – 100-106.
16. Naidenova E.V., Zakharov K.S., Kartashov M.Y., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Magassouba N.F., Nouridine I., Nassour A.A., Bah M.B., Kourouma A., Boumbali S., Boiro M.Y., Scherbakova S.A., Kuttyrev V.V., Dedkov V.G. Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in rural areas of Guinea // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2020. – V.11. – № 5. – 101475. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101475.
17. Mhamadi M., Dieng I., Dolgova A.S., Touré C.T., Ndiaye M., Diagne M.M., Faye B., Gladkikh A.S., Dedkov V.G., Sall A.A., Faye O., Faye O. / Whole Genome Analysis of African Orthobunyavirus Isolates Reveals Naturally Interspecies Segments Recombinations between Bunyamwera and Ngari Viruses // Viruses. – 2023. – V. 15. – № 2. – 550. DOI: 10.3390/v15020550.

18. Volynkina A.S, Lisitskaya Y.V, Kolosov A.V, Shaposhnikova L.I, Pisarenko S.V, Dedkov V. G., Dolgova A.S, Platonov A.E, Kulichenko A.N. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia // PLoS One. – 2022. – V.17. – № 5. – e0266177. DOI: 10.1371/journal.pone.0266177.
19. Sharova AA, Tokarevich NK, Baimova RR, Freylikhman OA, Karmokov IA, Riabiko EG, Lunina GA, Buzinov RV, Sokolova OV, Buts LV, Bespyatova LA, Bubnova LA, Safonova OS, Kalinina EL, Stankevich AI, Vikse R, Andreassen AK, Gladkikh AS, Forghani M, Gritseva AS, Popova MR, Ramsay ES, Dedkov VG. Prevalence and genetic diversity of tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks from specific regions of northwestern Russia. // PLoS ONE. - 2025. – V.20. – № 1. - e0314385. DOI: 10.1371/journal.pone.0314385.
20. Badji A., Ndiaye M., Gaye A., Dieng I., Ndiaye E.H., Dolgova A.S., Mhamadi M., Diouf B., Dia I., Dedkov V.G., Faye O., Diallo M. / Detection of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus from Livestock Ticks in Northern, Central and Southern Senegal in 2021 // Tropical Medicine and Infectious Disease. – 2023. – V. 8. – № 6. – 317. DOI: 10.3390/tropicalmed8060317.
21. Волков А.А., Долгова А.С., Дедков В.Г. Молекулярные диагностические платформы, созданные на базе систем CRISPR/Cas // Инфекция и иммунитет. – 2022. –Т.12. – № 1. – 9-20. DOI: 10.15789/2220-7619-CCB-1843.
22. Жданов К.В., Мальцев О.В., Козлов К.В., Миклуш П.И., Передельский Е.В., Сидорчук С.Н., Кравчук Ю.А., Сигидаев А.С., Дедков В.Г., Конушкалиев А.А. Клинический случай тяжелого течения Крымской геморрагической лихорадки с длительной персистенцией возбудителя в сочетании с клещевым боррелиозом // Журнал инфектологии. – 2023. – Т.15. – № 2. – 156-161. DOI: 10.22625/2072-6732-2023-15-2-156-161.
23. Ndiaye M, Badji A, Dieng I, Dolgova AS, Mhamadi M, Kirichenko AD, Gladkikh AS, Gaye A, Faye O, Sall AA, Diallo M, Dedkov VG, Faye O. Molecular Detection and Genetic Characterization of Two Dugbe Orthonairovirus Isolates Detected from Ticks in Southern Senegal // Viruses. – 2024. – V.16. – № 6. – 964. DOI: 10.3390/v16060964.
24. Koopmans M., Daszak P., Dedkov V.G., Dwyer D.E., Farag E., Fischer T.K., Hayman D.T.S., Leendertz F., Maeda K., Nguyen-Viet H., Watson J. Origins of SARS-CoV-2: window is closing for key scientific studies // Nature. 2021. – V.596. – 482-485. DOI: 10.1038/d41586-021-02263-6.
25. Venter M., Manuguerra J.-C., Alviola Ph., Assiri A., Blacksell S.D., Damon I.K., **Dedkov V.G.**, Drosten C., Farag E., Fischer T.K., Gangakhedkar R., Ghosn N., Guzman M.G., Happi C., Kalema-Zikusoka G., Labbe N., Ly S., Myint K., Morel C., Nguyen-Viet H., Ochu C.L., Saijo M., Sang R., Summermatter K., Wacharapluesadee S., Watson J., Yang Yu., Gilbert J., Simnieceanu A., Van Kerkhove M.D. / Scientific Advisory Committee for the Origins of Novel

- Pathogens (SAGO) and WHO SAGO Secretariat. A WHO global framework to guide investigations into origins of potentially epidemic and pandemic pathogens // *Nature Communications*. – 2025. – V. 16. – 2122. DOI: 10.1038/s41467-025-57218-6.
26. Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Хафизов К.Ф., Дубоделов Д.В., Углева С.В., Семененко Т.А., Плоскирева А.А., Горелов А.В., Пшеничная Н.Ю., Ежлова Е.Б., Летюшев А.Н., Демина Ю.В., Кутырев В.В., Максютлов Р.А., Говорун В.М., Дятлов И.А., Тотолян А.А., Куличенко А.Н., Балахонов С.В., Рудаков Н.В., Троценко О.Е., Носков А.К., Зайцева Н.Н., Топорков А.В., Лиознов Д.А., Андреева Е.Е., Микаилова О.М., Комаров А.Г., Ананьев В.Ю., Молдованов В.В., Логунов Д.Ю., Гушин В.А., Дедков В.Г., Черкашина А.С., Кузин С.Н., Тиванова Е.В., Кондрашева Л.Ю., Саенко В.В., Селезов С.Ю., Гасанов Г.А., Сванадзе Н.Х., Глазов М.Б., Остроушко А.А., Миронов К.О., Есьман А.С. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2 // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2022. – Т.99. – № 4. – 381 - 396. DOI.org/10.36233/0372-9311-295.
 27. Karamitros T., Magiorkinis G. A novel method for the multiplexed target enrichment of MinION next generation sequencing libraries using PCR-generated baits // *Nucleic Acids Res.* – 2015. - V.43. – № 22. - e152 – e152. DOI: 10.1093/nar/gkv773.
 28. Хафизов К. Ф., Сперанская А. С., Мацвай А. Д., Шипулин Г. А., Дедков В. Г. Передовые технологии в диагностике вирусных заболеваний неясной этиологии // *Инфекция и иммунитет*. -2020. – № 1. – 9 - 26. DOI: 10.15789/2220-7619-ATI-824.
 29. Kiselev D.A., Matsvay A.D., Abramov I.S., Dedkov V.G., Shipulin G.A., Khafizov K.F. / *Current Trends in Diagnostics of Viral Infections of Unknown Etiology* // *Viruses*. – 2020. –V. 12. – № 2. – 211. DOI: 10.3390/v12020211.
 30. Gardy J.L., Naus M., Amlani A., Chung W., Kim H., Tan M., Severini A., Krajden M., Puddicombe D., Sahni V., Hayden A.S., Gustafson R., Henry B., Tang P. Whole-genome sequencing of measles virus genotypes H1 and D8 during outbreaks of infection following the 2010 Olympic Winter Games reveals viral transmission routes // *J Infect Dis.* – 2015. - V.212. – № 10. – 1574 – 1578. DOI: 10.1093/infdis/jiv271.
 31. Lipkin W.I. A Vision for investigating the microbiology of health and disease // *J Infect Dis.* – 2015. - V.212. - suppl. 1. - S26–S30. DOI: 10.1093/infdis/jiu649.
 32. Speranskaya A.S., Artiushin I.V., Samoilov A.E., Korneenko E.V., Khabudaev K.V., Ilina E.N., Yusefovich A.P., Safonova M.V., Dolgova A.S., Gladkikh A.S., Dedkov V.G., Daszak P. Identification and Genetic Characterization of MERS-Related Coronavirus Isolated from Nathusius' Pipistrelle (*Pipistrellus nathusii*) near Zvenigorod (Moscow Region, Russia), 2023 // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2023. –V.20. – № 4. – 3702. DOI: 10.3390/ijerph20043702.

33. Korneenko E.V., Samoilov A.E., Chudinov I.K., Butenko I.O., Sonets I.V., Artyushin I.V., Yusefovich A.P., Kruskop S.V., Safonova M.V., Sinitsyn S.O., Klyuchnikova E.O., Gladkikh A.S., Dedkov V.G., Speranskaya A.S., Daszak P. Alphacoronaviruses from *Pipistrellus* bats captured in European Russia in 2015 and 2021 are closely related to those of Northern Europe // *Frontiers in Ecology and Evolution*. – 2024. – V.12. DOI: 10.3389/fevo.2024.1324605.
34. Karas B.Y., Sitnikova V.E., Nosenko T.N., Dedkov V.G., Arsentieva N.A., Gavrilenko N.V., Moiseev I.S., Totolian A.A., Kajava A.V., Uspenskaya M.V. ATR-FTIR spectrum analysis of plasma samples for rapid identification of recovered COVID-19 individuals // *Journal of Biophotonics* - 2023 – V.16. – № 7. – e202200166. DOI: 10.1002/jbio.202200166.
35. Bonsall D., Ansari M.A., Ip C., Trebes A., Brown A., Klenerman P., Buck D., STOP-HCV Consortium, Piazza P., Barnes E., Bowden R. ve-SEQ: robust, unbiased enrichment for streamlined detection and whole-genome sequencing of HCV and other highly diverse pathogens // *F1000 Research*. – 2015. - V. 4. - 1062. DOI: 10.12688/f1000research.7111.1.
36. Briese T., Kapoor A., Mishra N., Jain K., Kumar A., Jabado O.J., Lipkin W.I. Virome capture sequencing enables sensitive viral diagnosis and comprehensive virome analysis // *mBio*.- 2015. - V.6. – № 5. - e01491-15. DOI: 10.1128/mBio.01491-15.
37. Brown J.R., Roy S., Ruis C., Yara Romero E., Shah D., Williams R., Breuer J. Norovirus whole-genome sequencing by sureselect target enrichment: a robust and sensitive method // *J Clin Microbiol*. – 2016. - V.54. – № 10. – 2530 – 2537. DOI: 10.1128/JCM.01052-16.
38. Chen Y., Yao H., Thompson E.J., Tannir N.M., Weinstein J.N., Su X. VirusSeq: software to identify viruses and their integration sites using next-generation sequencing of human cancer tissue // *Bioinformatics*. – 2013. - V.29. № 2. – 266 – 267. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts665.
39. Choi S.K., Choi J.K., Park W.M., Ryu K.H. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus- specific single pair of primers // *J Virol Methods*. – 1999. - V.83. - №1–2. – 67 – 73. DOI: 10.1016/s0166-0934(99)00106-8.
40. Clarke S., Innocenti G.M. Organization of immature intrahemispheric connections. *J. Comp. Neurol.*, 1986. - V. 251, № 1. – 1 – 22. DOI: 10.1002/cne.902510102.
41. Litov A.G., Deviatkin A.A., Goptar I.A., Dedkov V.G., Gmyl A.P., Markelov M.L., Shipulin G.A., Karganova G.G. Evaluation of the population heterogeneity of TBEV laboratory variants using high-throughput sequencing // *Journal of General Virology*. – 2018. – V.99. – № 2. – 240 - 245. DOI: 10.1099/jgv.0.001003.
42. De Vries M., Deijs M., Canuti M., van Schaik B.D.C., Faria N.R., van de Garde M.D.B., Jachimowski L.C.M., Jebbink M.F., Jakobs M., Luyf A.C.M., Coenjaerts F.E.J., Claas E.C.J., Molenkamp R., Koekkoek S.M., Lammens C., Leus F., Goossens H., Ieven M., Baas F., van der

- Hoek L. A sensitive assay for virus discovery in respiratory clinical samples // PLoS One. – 2011. – V.6. – № 1. – e16118. DOI: 10.1371/journal.pone.0016118.
43. Denesvre C., Dumarest M., Rémy S., Gourichon D., Eloit M. Chicken skin virome analyzed by high-throughput sequencing shows a composition highly different from human skin // Virus Genes. – 2015. – V.51. – № 2. – 209 – 216. DOI: 10.1007/s11262-015-1231-8.
 44. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., Vodop'ianov A.S., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Titova S.V., Maleev V.V., Shipulin G.A. Travel-Associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia // Emerging Infectious Diseases. – 2016. – V.22. – № 11. – 2006 - 2008. DOI: 10.3201/eid2211.151727.
 45. Dolgova A.S., Safonova M.V., Dedkov V.G. / Universal Library Preparation Protocol for Efficient High-Throughput Sequencing of Double-Stranded RNA Viruses // Book chapter 14. In: Nucleic Acid Detection and Structural Investigations: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Kira Astakhova and Syeda Atia Bukhari (eds.), Springer Science+Business Media, 2020. – V. 2063. – 181 - 188. DOI: 10.1007/978-1-0716-0138-9_14.
 46. Кафтырева Л.А., Макарова М.А., Матвеева З.Н., Полев Д.Е., Сaitова А.Т., Дедков В.Г. Первые находки монофазной *Salmonella Typhimurium* в Санкт-Петербурге // Проблемы медицинской микологии. – 2023. – Т.25. – №3. – 3 - 9. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-3-3-9.
 47. Morfopoulou S., Brown J.R., Davies E.G., Anderson G., Virasami A., Qasim W., Chong W.K., Hubank M., Plagnol V., Desforages M., Jacques T.S., Talbot P.J., Breuer J. Human Coronavirus OC43 associated with fatal encephalitis // N Engl J Med. – 2016. – V.375. – №5. – 497 – 498. DOI: 10.1056/NEJMc1509458.
 48. VanDevanter D.R., Warren P., Bennett L., Schultz E.R., Coulter S., Garber R.L., Rose T.M. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR // J Clin Microbiol. – 1996. – V.34. – №7. – 1666 – 1671.
 49. Stano M., Beke G., Klucar L. viruSITE — integrated database for viral genomics // Database. – 2016. – V.2016. – p. baw162. DOI: 10.1093/ database/baw162.
 50. Allen U.D., Hu P., Pereira S.L., Robinson J.L., Paton T.A., Beyene J., Khodai-Booran N., Dipchand A., Hébert D., Ng V., Nalpathamkalam T., Read S. The genetic diversity of Epstein–Barr virus in the setting of transplantation relative to nontransplant settings: a feasibility study // Pediatr. Transplant. – 2016. – V.20. – №1. – 124 – 129. DOI: 10.1111/petr.12610.
 51. Calvet G., Aguiar R.S., Melo A.S.O., Sampaio S.A., de Filippis I., Fabri A., Araujo E.S.M., de Sequeira P.C., de Mendonça M.C.L., de Oliveira L., Tschoeke D.A., Schrago C.G., Thompson F.L., Brasil P., dos Santos F.B., Nogueira R.M.R., Tanuri A., de Filippis A.M.B. Detection and

- sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study // *Lancet Infect. Dis.* – 2016. - V.16. - №6. – 653 – 660. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5.
52. Kuiken C., Yusim K., Boykin L., Richardson R. The Los Alamos hepatitis C sequence database // *Bioinformatics.* – 2005. – V.21. - №3. – 379 – 384. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth485 58.
 53. Kundu S., Lockwood J., Depledge D.P., Chaudhry Y., Aston A., Rao K., Hartley J.C., Goodfellow I., Breuer J. Next-generation whole genome sequencing identifies the direction of norovirus transmission in linked patients // *Clin Infect Dis.* – 2013. – V.57. - №3, - 407 – 414. DOI: 10.1093/cid/cit287.
 54. Cotten M., Petrova V., Phan M.V.T., Rabaa M.A., Watson S.J., Ong S.H., Kellam P., Baker S. Deep sequencing of Norovirus genomes defines evolutionary patterns in an urban tropical setting // *J Virol.* -2014. - V.88. - №19. – 11056 – 11069. DOI: 10.1128/JVI.01333-14.
 55. Renzette N., Bhattacharjee B., Jensen J.D., Gibson L., Kowalik T.F. Extensive genome-wide variability of Human cytomegalovirus in congenitally infected infants // *PLoS Pathog.* – 2011. – V.7. - №5. e1001344. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001344.
 56. Quick J., Loman N.J., Duraffour S., Simpson J.T., Severi E., Cowley L., Bore J.A., Koundouno R., Dudas G., Mikhail A., Ouédraogo N., Afrough B., Bah A., Baum J.H.J., Becker-Ziaja B., Boettcher J.P., Cabeza-Cabrero M., Camino-Sánchez Á., Carter L.L., Doerrbecker J., Enkirch T., Dorival I.G., Hetzelt N., Hinzmann J., Holm T., Kafetzopoulou L.E., Koropogui M., Kosgey A., Kuisma E., Logue C.H., Mazzei A., Meisel S., Mertens M., Michel J., Ngabo D., Nitzsche K., Pallasch E., Patrono L.V., Portmann J., Repits J.G., Rickett N.Y., Sachse A., Singethan K., Vitoriano I., Yemanaberhan R.L., Zekeng E.G., Racine T., Bello A., Sall A.A., Faye O., Faye O., Magassouba N., Williams C.V., Amburgey V., Winona L., Davis E., Gerlach J., Washington F., Monteil V., Jourdain M., Bererd M., Camara A., Somlare H., Camara A., Gerard M., Bado G., Baillet B., Delaune D., Nebie K.Y., Diarra A., Savane Y., Pallawo R.B., Gutierrez G.J., Milhano N., Roger I., Williams C.J., Yattara F., Lewandowski K., Taylor J., Rachwal P., J. Turner D., Pollakis G., Hiscox J.A., Matthews D.A., Shea M.K.O., Johnston A.M., Wilson D., Hutley E., Smit E., Di Caro A., Wölfel R., Stoecker K., Fleischmann E., Gabriel M., Weller S.A., Koivogui L., Diallo B., Keita S., Rambaut A., Formenty P., Günther S., Carroll M.W. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance // *Nature.* – 2016. – V.530. № 7589. – 228 – 232. DOI: 10.1038/nature16996.
 57. Wylie T.N., Wylie K.M., Herter B.N., Storch G.A. Enhanced virome sequencing using targeted sequence capture // *Genome Res.* – 2015. – V.25. - №12. – 1910 – 1920. DOI: 10.1101/gr.191049.115.
 58. Depledge D.P., Kundu S., Jensen N.J., Gray E.R., Jones M., Steinberg S., Gershon A., Kington P.R., Schmid D.S., Balloux F., Nichols R.A., Breuer J. Deep sequencing of viral

- genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of Varicella Zoster virus and its vaccine in humans // *Mol Biol Evol.* – 2014. - V.31. - №2. – 397 – 409. DOI: 10.1093/molbev/mst210.
59. Travers K.J., Chin C.-S., Rank D.R., Eid J.S., Turner S.W. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V.38. - №15. - e159 – e159. DOI: 10.1093/nar/gkq543.
 60. Thomson E., Ip C.L.C., Badhan A., Christiansen M.T., Adamson W., Ansari M.A., Bibby D., Breuer J., Brown A., Bowden R., Bryant J., Bonsall D., Da Silva Filipe A., Hinds C., Hudson E., Klennerman P., Lythgow K., Mbisa J.L., McLauchlan J., Myers R., Piazza P., Roy S., Trebes A., Sreenu V.B., Witteveltd J., STOP-HCV Consortium, Barnes E., Simmonds P. Comparison of next-generation sequencing technologies for comprehensive assessment of full-length hepatitis C viral genomes // *J Clin Microbiol.* – 2016. - V.54. - №10. – 2470 – 2484. DOI: 10.1128/JCM.00330-16.
 61. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Baabdullah M.M., Watson S.J., Cotten M., Arrand J.R., Murray P.G., Allday M.J., Rickinson A.B., Young L.S., Farrell P.J., Kellam P. Genome diversity of Epstein–Barr Virus from multiple tumor types and normal infection // *J Virol.* – 2015. – V.89. - №10. – 5222 – 5237. DOI: 10.1128/JVI.03614-14.
 62. Tweedy J., Spyrou M.A., Donaldson C.D., Depledge D., Breuer J., Gompels U.A. Complete genome sequence of the Human Herpesvirus 6A strain AJ from Africa resembles strain GS from North America // *Genome Announc.* – 2015. V.3. - №1. DOI: 10.1128/genomeA.01498-14.
 63. Donaldson C.D., Clark D.A., Kidd I.M., Breuer J., Depledge D.D. Genome sequence of Human Herpesvirus 7 strain UCL-1 // *Genome Announc.* – 2013. - V.1. - №5. DOI: 10.1128/genomeA.00830-13.
 64. Патент № 2744665. Способ выявления РНК вируса Луйо методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени: № 2020119188: заявл. 02.06.2020 / Е. В. Найденова, А. М. Сеничкина, Д. А. Агафонов, В. Г. Дедков, М. В. Сафонова; заявитель Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб. " – 14 с.: 7 ил. – Текст: непосредственный.
 65. Патент № 2744187 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6876. Способ выявления вируса клещевого энцефалита методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2019144134: заявл. 26.12.2019: опубл. 03.03.2021 / В. Г. Дедков, М. В. Сафонова, А. С. Долгова, Е. А. Сюзюмова; заявитель 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". – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.

66. Патент № 2744198 С1 Российская Федерация, МПК C07K 14/165, C12N 15/50, C12Q 1/6806. Набор для выявления вируса SARS-CoV методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2020118246: заявл. 25.05.2020: опубл. 03.03.2021 / В. Г. Дедков, Е. А. Гончарова, А. С. Долгова, И. С. Кассиров; заявитель 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". – 19 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
67. Патент № 2803898 С1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68. Способ выявления вируса обезьяньей оспы вида Monkeurox методом ПЦР в реальном времени (MPX AMP PS): № 2023107184: заявл. 23.03.2023: опубл. 21.09.2023 / А. С. Долгова, А. С. Гладких, А. В. Шабалина В. А. Шайеб, В. Г. Дедков; заявитель 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". – 12 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
68. Патент № 2795703 С1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, A61K 39/00. Способ выявления РНК модифицированного вакцинного полиовируса типа 2 (nOPV2) методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2022124008: заявл. 08.09.2022: опубл. 11.05.2023 / С. А. Антонов, А. С. Долгова, А. С. Гладких, В. Г. Дедков [и др.]; заявитель 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". – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
69. Патент № 2822430 С1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, C12Q 1/6844, C12Q 1/6876. Способ выявления вируса кори методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2023107183: заявл. 23.03.2023: опубл. 05.07.2024 / В. Г. Дедков, А. С. Долгова, Е. Н. Милашенко, А. В. Шабалина; заявитель 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". – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
70. Патент № 2816271 С1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, C12Q 1/6876, C12Q 1/6888. Способ выявления вируса Nipah методом, основанным на применении дезоксирибозима 10-23: № 2023115551: заявл. 13.06.2023: опубл. 28.03.2024 / А. Д. Кириченко, Е. А. Брюшкова, А. С. Долгова, В. Г. Дедков; заявитель 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". – 15 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
71. Патент № 2816270 С2 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления вируса Nipah методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2022124003: заявл. 08.09.2022: опубл. 28.03.2024 / С. А. Антонов, А. С. Долгова, А. В. Шабалина В. Г. Дедков, Е. Н. Милашенко; заявитель 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". – 10 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 72. Патент № 2831410 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления РНК вируса Bandavirus dabieense (SFTSV) методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2024114595: заявл. 28.05.2024: опубл. 05.12.2024 / М. Р. Попова, М. В. Сафонова, В. Г. Дедков [и др.]; заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки "Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека". – 12 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 73. Патент № 2822164 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/686. Способ выявления РНК вируса Хунин методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2023129624: заявл. 14.11.2023: опубл. 02.07.2024 / А. С. Долгова, С. А. Широбокова, А. В. Шабалина, В. Г. Дедков; заявитель 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". – 13 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 74. Патент № 2822161 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6844, С12Q 1/6876. Способ выявления РНК вируса Хендра вида Hendra henipavirus методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2023120035: заявл. 27.07.2023: опубл. 02.07.2024 / В. Г. Дедков, А. С. Долгова, С. А. Широбокова, А. В. Шабалина; заявитель 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". – 12 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 75. Патент № 2834950 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6876. Способ выявления РНК вируса Henipavirus hendraense методом рекомбиназной полимеразной амплификации: заявл. 19.04.2024: опубл. 19.02.2025 / М. А. Капитонова, А. В. Шабалина, В. Г. Дедков, А. С. Долгова; заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки "Санкт-

- Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека". – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
76. Патент № 2834907 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6876. Способ выявления вируса *Henipavirus hendraense* методом DETECTR с изотермической амплификацией: заявл. 19.04.2024; опубл. 17.02.2025 / М. А. Капитонова, А. В. Шабалина, В. Г. Дедков, А. С. Долгова; заявитель 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". – 12 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
77. Патент № 2827922 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12N 7/00. Способ выявления вируса *Guanarito* методом, основанным на применении дезоксирибозима 10-23: № 2024106689: заявл. 13.03.2024; опубл. 03.10.2024 / А. Д. Кириченко, Е. А. Брюшкова, А. С. Долгова, В. Г. Дедков; заявитель 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". – 15 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
78. Патент № 2834909 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления РНК вируса *Mammarenavirus guanaritoense* методом рекомбиназной полимеразной амплификации: заявл. 28.05.2024; опубл. 17.02.2025 / М. А. Капитонова, А. В. Шабалина, В. Г. Дедков, А. С. Долгова; заявитель 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". – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
79. Патент № 2832917 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6876. Способ выявления вируса *Mammarenavirus machupoense* методом DETECTR с изотермической амплификацией: заявл. 14.02.2024; опубл. 10.01.2025 / М. А. Капитонова, А. В. Шабалина, В. Г. Дедков, А. С. Долгова; заявитель 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". – 14 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
80. Патент № 2834908 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления РНК вируса геморрагической лихорадки Крым-Конго методом ОТ-ПЦР в реальном времени: заявл. 27.04.2024; опубл. 17.02.2025 / А. С. Долгова, А. С. Туренко, А. В. Шабалина, В. Г. Дедков; заявитель 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". – 13 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.

81. Дедков В.Г. Разработка и внедрение новых препаратов для диагностики БВВЭ/ А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] //Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора / Под редакцией докт. мед. наук, профессора А.Ю. Поповой, академика РАН, докт. мед. наук, профессора В.В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – Ижевск: ООО «Принт-2», 2017. – С.188-192
82. Дедков В.Г. Районирование африканской природно-очаговой провинции в отношении филовиральных лихорадок/ А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией профессора, доктора медицинских наук А. Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – С. 32-45.
83. Дедков В.Г. Природный резервуар филовиральных и типы связанных с ними эпидемических вспышек на территории Африки/ А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией профессора, доктора медицинских наук А. Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – С. 46-55.
84. Дедков В.Г. Разработка диагностической системы в формате ОТ_ПЦР-РВ для выявления РНК вируса Эбола Заир / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией профессора, доктора медицинских наук А. Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – С.133-139.
85. Дедков В.Г. Совершенствование диагностической системы в формате ОТ-ПЦР-РВ «Амплиенс ЕВОВ (Zaire)-FL» для детекции РНК вируса Эбола Заир / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией профессора, доктора медицинских наук А. Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – С.140-143.
86. Дедков В.Г. Вирус Эбола (Заир) /М.Р. Агеева, В.С. Азарова, Ф. Альварес // Молекулярная диагностика инфекционных болезней. – Москва: ООО «Рипол Классик», 2018. – С. 546-552.
87. Дедков В.Г. Разработка и апробация диагностических препаратов/ А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Россия – Гвинея: итоги и перспективы сотрудничества

- в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения / Под ред. д-ра мед. наук, проф. А.Ю. Поповой, акад. РАН, д-ра мед. наук, проф. В.В. Кутырева. – Саратов: Амирит, 2020. – С. 229-234.
88. Дедков В.Г. Разработка средств детекции нового коронавируса SARS-Co V-2 /А.Ю. Попова, Е.Б. Ежлова, В.Ю. Смоленский [и др.] // COVID-19: научно-практические аспекты борьбы с пандемией в Российской Федерации / под ред. д-ра мед. наук, проф. А.Ю. Поповой. – Саратов: Амирит, 2021. – С.184-193.
 89. Дедков В.Г. Способ выявления РНК вируса Луйо методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Е.В. Найденова, В.Г. Дедков, Т.А. Агафонов [и др.] // Россия-Африка. Опыт работы Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней / Под ред. д-ра мед. наук, проф. А.Ю. Поповой, акад. РАН, д-ра мед. наук, проф. В.В. Кутырева. – Элиста: ООО «Просвет», 2023. – С.223-229.
 90. Сафонова М.В. Российская Государственная библиотека: специальность 03.02.02 «Вирусология», 14.02.02 «Эпидемиология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Сафонова Марина Викторовна; [Место защиты: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»]. - Санкт-Петербург, 2022. - 151 с. - Библиогр.: с. 124–140. - Текст: непосредственный.
 91. Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J. Molecular Cloning, A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2003.
 92. Cheng Y., Niu J., Zhang Y., Huang J., and Li Q. Preparation of His-Tagged Armored RNA Phage Particles as a Control of Serve Acute Respiratory Syndrome Coronavirus // J Clin Microb. – 2006. – V.44. - №10. - 3557-3561.
 93. Clercq, E. The design of drugs for HIV and HCV // Nat Rev Drug Discov. - 2007. – V.6. - 1001–1018. DOI: 10.1038/nrd2424.
 94. Дедков В.Г., Сафонова М.В., Девяткин А.В., Долгова А.С., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Агафонов А.П., Малеев В.В., Шипулин Г.А. Разработка диагностической системы в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК вируса Эбола Заир // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2015. - №2. С. 26-32
 95. Gire S.K., Goba A., Andersen K.G., Sealfon R.S., Park D.J., Kanneh L., Jalloh S., Momoh M., Fullah M., Dudas G., Wohl S., Moses L.M., Yozwiak N.L., Winnicki S., Matranga C.B., Malboeuf C.M., Qu J., Gladden A.D., Schaffner S.F., Yang X., Jiang P.P., Nekoui M., Colubri A., Coomber M.R., Fonnies M., Moigboi A., Gbakie M., Kamara F.K., Tucker V., Konuwa E., Saffa S., Sellu J., Jalloh A.A., Kovoma A., Koninga J., Mustapha I., Kargbo K., Foday M., Yillah M., Kanneh F., Robert W., Massally J.L., Chapman S.B., Bochicchio J., Murphy C., Nusbaum C., Young S.,

- Birren B.W., Grant D.S., Scheffelin J.S., Lander E.S., Happi C., Gevaio S.M., Gnirke A., Rambaut A., Garry R.F., Khan S.H., Sabeti P.C. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak // *Science*. – 2014. – V.345. - №6202. - 1369-72. DOI: 10.1126/science.1259657.
96. Tyagi S., Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization // *Nat Biotechnol*. – 1996. - V.14. - №3. – 303 - 308.
 97. Van Pelt-Verkuil E., van Belkum A., Hays J.P. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. New York: Springer, 2008.
 98. Ed. Yuryev A. New Jersey. PCR Primer Design. Totowa: Humana Press Inc., 2007.
 99. Dedkov V.G., Magassouba N.F., Safonova M.V., Deviatkin A.A., Dolgova A.S., Pyankov O.V., Sergeev A.A., Utkin D.V., Odinkov G.N., Safronov V.A., Agafonov A.P., Maleev V.V., Shipulin G.A. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for the detection of Ebola virus (Zaire) during an Ebola outbreak in Guinea in 2014-2015 // *Journal of Virological Methods*. – 2016. – V.228. – 26 - 30. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.11.007.
 100. Dedkov V.G., Magassouba N.F., Safonova M.V., Bodnev S.A., Pyankov O.V., Camara J., Sylla B., Agafonov A.P., Maleev V.V., Shipulin G.A. Sensitive Multiplex Real-time RT-qPCR Assay for the Detection of Filoviruses // *Health Security*. – 2018. –V.16. – №1. –14 - 21. DOI: 10.1089/hs.2017.0027.
 101. Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F., Wu S., Sun Z. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin // Transl. Immunology*. – 2020. – V.9. - №5. - e01136. DOI: 10.1002/cti2.1136.3.
 102. Xu X., Chen P., Wang J., J. Feng, H. Zhou, Li X., Zhong W., Hao P. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission // *Sci China Life Sci*. – 2020. – V.63. - №3. – 457 –460. DOI:10.1007/s11427-020-1637-5.4.
 103. Goncharova E.A., Dedkov V.G., Dolgova A.S., Kassirov I.S., Safonova M.V., Voytsekhovskaya Y.A., Totolian A.A. One-step quantitative RT-PCR assay with armored RNA controls for detection of SARS-CoV-2 // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – V.93. – №3. – 1694 - 1701. DOI: 10.1002/jmv.26540.
 104. Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods // *Stat Med*. – 1998. – V.17. - №8. – 857. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0258(19980430)17:83.0.CO;2-E.
 105. Cherpillod P., Schibler M., Vieille G., Cordey S., Mamin A., Vetter P., Kaiser L., Ebola virus disease diagnosis by real-time RT-PCR: A comparative study of 11 different procedures // *J Clin Virol*. – 2016. – V.77. – 9 – 14. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.01.017.

106. Varizhuk A.M., Zatsepin T.S., Golovin A.V., Belyaev E.S., Kostyukevich Y.I., Dedkov V.G., Shipulin G.A., Shpakovski G.V., Aralov A.V. Synthesis of oligonucleotides containing novel G-clamp analogue with C8-tethered group in phenoxazine ring: Implication to qPCR detection of the low-copy Kemerovo virus dsRNA // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2017. – V.25. – №14. – 3597 - 3605. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.03.062.
107. Zatsepin T.S., Varizhuk A.M., Dedkov V.G., Shipulin G.A., Aralov A.V. / Oligonucleotide Primers with G8AE-Clamp Modifications for RT-qPCR Detection of the Low-Copy dsRNA // Book chapter 18. In: *Non-Natural Nucleic Acids: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. Nathaniel Shank (ed.), Springer Science+Business Media, 2019. – V.1973. – 281 - 297. DOI: 10.1007/978-1-4939-9216-4_18.
108. Dedkov V.G., Deviatkin A.A., Poleshchuk E.M., Safonova M.V., Blinova E.A., Shchelkanov M.Y., Sidorov G.N., Simonova E.G., Shipulin G.A. Development and evaluation of a RT-qPCR assay for fast and sensitive rabies diagnosis // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2018. – V.90. – №1. – 18 - 25. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.009.
109. Дедков В.Г., Найденова Е.В., Magassouba N.F., Айгинин А.А., Soropogui B., F. Kourouma F., Camara A.B., Camara J., Крицкий А.А., Щелканов М.Ю., Малеев В.В. Разработка и испытание метода выявления РНК вируса Ласса на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2018. – Т.4. – 39 - 47. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-39-47.
110. Dedkov V.G., Magassouba N.F., Safonova M.V., Naydenova E.V., Ayginin A.A., Soropogui B., Kourouma F., Camara A.B., Camara J., Kritziy A.A., Tuchkov I.V., Shchelkanov M.Y., Maleev V.V. Development and Evaluation of a One-Step Quantitative RT-PCR Assay for Detection of Lassa Virus // *Journal of Virological Methods*. – 2019. – V.271. – 113674. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113674.
111. Найденова Е.В., Дедков В.Г., Агафонов Д.А., Сеничкина А.М., Сафонова М.В., Кутырев В.В. Разработка и апробация способа выявления РНК вируса Луйо методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2021. –Т.1. – 110 - 115. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-110-115.
112. Dolgova A.S., Kanaeva O.I., Antonov S.A., Shabalina A.V., Klyuchnikova E.O., Sbarzaglia V.A., Gladkikh A.S., Ivanova O.E., Kozlovskaya L.I., Dedkov V.G. Qualitative real-time RT-PCR assay for nOPV2 poliovirus detection // *Journal of Virological Methods*. – 2024. – V.329. – 114984. DOI: 10.1016/j.jviromet.2024.114984.
113. Ivanova, O.E., Ereemeeva T.P., Baykova O.Y., Krasota A.Y., Yakovchuk E.V., Shustova E.Y., Malyshkina L.P., Mustafina A. N.-I., Mikhailova Y.M., Chirova A.V., Cherepanova E.A.,

- Morozova N.S., Gladkikh A.S., Dolgova A.S., Dedkov V.G., Totolian A.A., Kozlovskaya L.I. Detection of Polioviruses Type 2 among Migrant Children Arriving to the Russian Federation from a Country with a Registered Poliomyelitis Outbreak // *Vaccines*. – 2024. – V.12. – №7. – 718. DOI: 10.3390/vaccines12070718.
114. Chayeb, V. A., Dolgova, A. S., Popova, M. R., Zheleznova, N. V., Shirobokova, S. A., Shabalina, A. V., Sharova, A. A., Gladkikh, A. S., Antipova, A. Y., Kirichenko, A. D., Ramsay, E. S., & Dedkov, V. G. Development and Evaluation of a New Measles Detection Assay Using Real-Time RT-PCR. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – V.26. - №5. - 1801. DOI: 10.3390/ijms26051801.
 115. Kirichenko A.S., Bryushkova E.A., Dedkov V.G., Dolgova A.S. A Novel DNzyme-Based Fluorescent Biosensor for Detection of RNA-Containing Nipah Henipavirus // *Biosensors*. – 2023. – V.13. – №2. – 252. DOI: 10.3390/bios13020252.
 116. Kirichenko A.S., Bryushkova E.A., Shabalina A.V., Dedkov V.G., Dolgova A.S. DNzyme as a method for Nipah Henipavirus Detection // *International Journal of Infectious diseases*. – 2023. – V.130. – 144 - 145. DOI: 10.1016/j.ijid.2023.04.355.
 117. Малеев В.В. Проблемы инфекционной патологии на современном этапе // *Инфекционные болезни*. - 2015. - Т.13. - №2. – 5 – 9.
 118. Сафонова М.В., Симонова Е.Г., Лопатин А., Долгова А.С., Дедков В.Г. Разработка критериев количественной оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии // *Инфекция и иммунитет*. – 2022. –Т.12. – №4. – 745 - 754. DOI: 10.15789/2220-7619-DOQ-1926.
 119. Топорков А.В., Куклев Е.В., Щербакова С.А., Осина Н.А., Топорков В.В. Типовой алгоритм действий в условиях чрезвычайных ситуаций, вызванных возбудителями неизвестных инфекционных болезней // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. - 2010. - №5. – 20 – 24.
 120. Симонова Е.Г., Сергевнин В.И. Предэпидемическая диагностика в системе риск-ориентированного эпидемиологического надзора над инфекционными болезнями // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. - 2018.- Т.17. - №5.
 121. Anthony S.J., Epstein J.H., Murray K.A., Navarrete-Macias I., Zambrana-Torrel C.M., Solovyov A., Ojeda-Flores R., Arrigo N.C., Islam A., Ali Khan S., Hosseini P., Bogich T.L., Olival K.J., Sanchez-Leon M.D., Karesh W.B., Goldstein T., Luby S.P., Morse S.S., Mazet J.A., Daszak P., Lipkin W.I. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals // *mBio*. – 2013. – V.4 - №5. - e00598-13. DOI: 10.1128/mBio.00598-13.
 122. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Историк О.А., Мосевич О.С., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Черный М.А., Балабышева Н.С., Логинова И.С., Владимирова О.С.,

- Самоглядова И.С., Васев Н.А, Румянцева С.В., Чупалова, Е.Ю. Селиванова Г.В., Муравьева М.В., Тимофеева Л.В., Ханкишиева Э.Н., Тильчевская В.Д., Никитенко Н.Д., Костеницкая Н.В., Виркунен Н.В., Климкина И.М., Кузьмина Т.М., Дегтяренко Н.В., Базунова А.И., Филиппова Л.А., Пальчикова Н.А., Кукушкин А.В., Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Богумильчик Е.А., Воскресенская Е.А., Дробышевская В.Г., Зуева Е.В., Кокорина Г.И., Курова Н.Н., Любимова Н.Е., Ферман Р.С., Хамдулаева Г.Н., Хамитова И.В., Хорькова Е.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Оценка популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период эпидемии COVID-19 // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. –Т.3. – 114 - 123. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123.
123. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) // Инфекция и иммунитет. – 2020. –Т.10. – №2. –221 - 246. DOI: 10.15789/2220-7619-HOI-1412.
 124. Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleschchuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N., Karganova G.G., Galkina I.V., Shchelkanov M.Y., Shipulin G.A. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation // PLoS One. – 2017. – V.12. – №2. – e0171855. DOI: 10.1371/journal.pone.0171855.
 125. Samoilov A.E., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Evengard B., Zueva E.V., Panferova Y.A., Ostankova Y.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Kovalev E.V., Litovko A.R., Goncharov A.U., Semenov A.V., Khafizov K.F., Dedkov V.G. Lethal Outcome of Leptospirosis in Southern Russia: Characterization of Leptospira Interrogans Isolated from a Deceased Teenager // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2020. –V.17. – №12. – 4238. DOI: 10.3390/ijerph17124238.
 126. Dedkov V.G., Lukashev A.N., Deviatkin A.A., Kuleshov K.V., Safonova M.V., Poleschchuk E.M., Drexler J.F., Shipulin G.A. Retrospective diagnosis of two rabies cases in humans by high throughput sequencing // Journal of Clinical Virology. – 2016. – V.78. –74 - 81. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.03.012.
 127. Poleschchuk E.M., Deviatkin A.A., Dedkov V.G., Sidorov G.N., Ochkasova J.V., Hodjakova I.A., Schukina I.A., Savel'ev S.I., Golenskih A.G., Shipulin G.A. Complete genome sequences of four virulent rabies virus strains isolated from rabid animals in Russia // Genome Announcements. – 2013. – V.1. – №3. – e00140-13. DOI: 10.1128/GenomeA.00140-13.
 128. Drexler J.F., Luna L.K., Stöcker A., Almeida P.S., Ribeiro T.C., Petersen N., Herzog P., Pedroso C., Huppertz H.I., Ribeiro Hda C. Jr., Baumgarte S., Drosten C. Circulation of 3 lineages of a novel Saffold cardiovirus in humans // Emerg Infect Dis. – 2008. – V.14. - №9. – 1398 - 405. DOI: 10.3201/eid1409.080570.

129. Harvala H., Robertson I., McWilliam Leitch E.C., Benschop K., Wolthers K.C., Templeton K., Simmonds P. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections // *J Clin Microbiol.* – 2008. – V.46. - №10. – 3446 - 3453. DOI: 10.1128/JCM.01207-08.
130. Cook S., Bennett S.N., Holmes E.C., De Chesse R., Moureau G., de Lamballerie X. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico // *J Gen Virol.* – 2006. – V.87. - №4. – 735 - 748. DOI: 10.1099/vir.0.81475-0.
131. Chu D.K., Poon L.L., Guan Y., Peiris J.S. Novel astroviruses in insectivorous bats // *J Virol.* - 2008. – V.82. - №18. 9107-14. DOI: 10.1128/JVI.00857-08.
132. Drexler J.F., Seelen A., Corman V.M., Fumie Tateno A., Cottontail V., Melim Zerbinati R., Gloza-Rausch F., Klose S.M., Adu-Sarkodie Y., Oppong S.K., Kalko E.K., Osterman A., Rasche A., Adam A., Müller M.A., Ulrich R.G., Leroy E.M., Lukashev A.N., Drosten C. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae // *J Virol.* – 2012. – V.86. - №17. – 9134 - 9147. DOI: 10.1128/JVI.00800-12.
133. Grywna K., Kupfer B., Panning M., Drexler J.F., Emmerich P., Drosten C., Kümmerer B.M. Detection of all species of the genus Alphavirus by reverse transcription-PCR with diagnostic sensitivity // *J Clin Microbiol.* – 2010. – V.48. - №9. – 3386 - 3387. DOI: 10.1128/JCM.00317-10.
134. Vieth S, Drosten C, Lenz O, Vincent M, Omilabu S, Hass M, Becker-Ziaja B, ter Meulen J, Nichol ST, Schmitz H, Günther S // RT-PCR assay for detection of Lassa virus and related Old World arenaviruses targeting the L gene // *Trans R Soc Trop Med Hyg.* – 2007.- V.101. - №12. – 1253 - 1264. DOI: 10.1016/j.trstmh.2005.03.018.
135. Tong S., Chern S.W., Li Y., Pallansch M.A., Anderson L.J. Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses // *J Clin Microbiol.* – 2008. – V.46. - №8. – 2652 - 2658. DOI: 10.1128/JCM.00192-08.
136. Lambert A.J., Lanciotti R.S. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae // *J Clin Microbiol.* – 2009. – V.47. - №8. – 2398 - 2404. DOI: 10.1128/JCM.00182-09.
137. Dedkov V.G., Shchelkanov M.Y., Bushkieva B.T., Rudenko T.A., Kurdyukova O.V., Galkina I.V., Sapotsky M.V., Blinova E.A., Dzhambinov S.D., Shipulin G.A. A neonatal death associated with Crimean-Congo hemorrhagic fever (Republic of Kalmykia, Russia, June 2016) // *Antiviral Research.* – 2017. – V.146. – 146 - 148. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.08.018.

138. Heaton P.R., Johnstone P., McElhinney L.M., Cowley R., O'Sullivan E., Whitby J.E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses // *J Clin Microbiol.* – 1997. V.35. - №11. – 2762 - 2766. DOI: 10.1128/jcm.35.11.2762-2766.1997.
139. Landolfi J.A., Terio K.A., Kinsel M.J., Langan J., Zachariah T.T., Childress A.L., Wellehan J.F. Orthoreovirus infection and concurrent cryptosporidiosis in rough green snakes (*Opheodrys aestivus*): pathology and identification of a novel orthoreovirus strain via polymerase chain reaction and sequencing // *J Vet Diagn Invest.* – 2010. – V.22. - №1. – 37 - 43. DOI: 10.1177/104063871002200106.
140. Allard A., Albinsson B., Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis // *J Clin Microbiol* - 2001 -V.39 - №2 – 498 - 505. DOI: 10.1128/JCM.39.2.498-505.2001.
141. Rose TM. CODEHOP-mediated PCR - a powerful technique for the identification and characterization of viral genomes // *Virol J.* – 2005. – V.2. - №20. DOI: 10.1186/1743-422X-2-20.
142. Ayginin A.A., Pimkina E.V., Matsvay A.D., Speranskaya A.S., Safonova M.V., Blinova E.A., Artyushin I.V., Dedkov V.G., Shipulin G.A., Khafizov K. The Study of Viral RNA Diversity in Bird Samples Using De Novo Designed Multiplex Genus-Specific Primer Panels // *Advances in Virology.* – 2018. – V.1. – 3248285. DOI: 10.1155/2018/3248285.
143. Watson S.J., Langat P., Reid S.M., Lam T.T.-Y., Cotten M., Kelly M., Van Reeth K., Qiu Y., Simon G., Bonin E., Foni E., Chiapponi C., Larsen L., Hjulsager C., Markowska-Daniel I., Urbaniak K., Dürwald R., Schlegel M., Huovilainen A., Davidson I., Dán Á., Loeffen W., Edwards S., Bublot M., Vila T., Maldonado J., Valls L., ESNIP3 Consortium, Brown I.H., Pybus O.G., Kellam P. Molecular epidemiology and evolution of influenza viruses circulating within european swine between 2009 and 2013 // *J Virol.* – 2015. - V.89. -№19. – 9920 – 9931. DOI: 10.1128/JVI.00840-15.
144. Naccache S.N., Greninger A.L., Lee D., Coffey L.L., Phan T., Rein-Weston A., Aronsohn A., Hackett J., Delwart E.L., Chiu C.Y. The perils of pathogen discovery: origin of a novel parvovirus-like hybrid genome traced to nucleic acid extraction spin columns // *J Virol.* – 2013. – V.87. - №22. – 11966 – 11977. DOI: 10.1128/JVI.02323-13.
145. Miia J.-V., Tiina N., Tarja S., Olli V., Liisa S., Anita H. Evolutionary trends of European bat lyssavirus type 2 including genetic characterization of Finnish strains of human and bat origin 24 years apart // *Arch Virol.* – 2015. - V.160. - №6. – 1489 – 1498. DOI: 10.1007/s00705-015-2424-0 71.

146. Gladkikh A.S., Dolgova A.S., Dedkov V.G., Sbarzaglia V.A., Kanaeva O.I., Popova A.U., Totolian A.A. Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Genetic Variant with Distinct Spike Protein Mutations // *Viruses*. – 2021. – V.13. – №6. – 1029. DOI: 10.3390/v13061029.
147. Gladkikh A.S., Dedkov V.G., Sharova A.A., Klyuchnikova E.O., Sbarzaglia V.A., Arbuzova T.V., Forghani M., Ramsay E., Dolgova A.S., Shabalina A.V., Tsyganova N.A., Totolian A.A. Uninvited Guest: Arrival and Dissemination of Omicron Lineage SARS-CoV-2 in St. Petersburg, Russia // *Microorganisms*. – 2022. – V.10. – №8. – 1676. DOI: 10.3390/microorganisms10081676.
148. Gladkikh A.S., Dedkov V.G., Sharova A.A., Klyuchnikova E.O., Sbarzaglia V.A., Kanaeva O.I., Arbuzova T.V., Tsyganova N.A., Popova A.U., Ramsay E., Totolian A.A. Epidemiological Features of COVID-19 in Northwest Russia in 2021 // *Viruses*. – 2022. – V.14. – №5. – 931. DOI: 10.3390/v14050931.
149. Gladkikh A.S., Cao T.M., Klyuchnikova E.O., Dao M.H., Sharova A.A., Melnichenko V.D., Popova M.R., Arbuzova T.V., Sbarzaglia V.A., Tsyganova N.A., Ramsay E., Dedkov V.G. Near complete genome sequences from Southern Vietnam revealed local features of genetic diversity and intergenerational changes in SARS- CoV-2 variants in 2020-2021 // *BMC Infectious Diseases*. – 2023. – V.23. – №1. – 806. DOI: 10.1186/s12879-023-08814-8.
150. Gladkikh A.S., Klyuchnikova E.O., Pavlova P.A., Sbarzaglia V.A., Tsyganova N.A., Popova M.V., Arbuzova T.V., Sharova A.A., Ramsay E., Samoilov A.E., Dedkov V.G., Totolian A.A. Comparative Analysis of Library Preparation Approaches for SARS-CoV-2 Genome Sequencing on the Illumina MiSeq Platform // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V.24. – №3. – 2374. DOI: 10.3390/ijms24032374.
151. Safonova M.V., Shchelkanov M.Y., Khafizov K.F., Matsvay A.D., Ayginin A.A., Dolgova A.S., Shchelkanov E.M., Pimkina E.V., Speranskaya A.S., Galkina I.V, Dedkov V.G. Sequencing and genetic characterization of two strains Paramushir virus obtained from the Tyuleniy Island in the Okhotsk Sea (2015) // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. – 2019. – V.10. – №2. – 269 - 279. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.11.004.
152. Safonova M.V., Gmyl A.P., Lukashev A.N., Speranskaya A.S., Neverov A.D., Fedonin G.G., Pimkina E.V., Matsvay A.D., Khafizov K.F., Karganova G.G., Kozlovskaya L.I., Valdokhina A.V., Bulanenko V.P., Dedkov V.G. Genetic diversity of Kemerovo virus and phylogenetic relationships within the Great Island virus genetic group // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. – 2020. – 101333 DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.101333.
153. Щелканов М.Ю., Магассуба Н.Ф., Дедков В.Г., Шипулин Г.А., Галкина И.В., Попова А.Ю., Малеев В.В. Природный резервуар филовирусов и типы связанных с ними эпидемических вспышек на территории Африки // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2017. – Т.72. – №2. – 112 - 119. DOI: 10.15690/vramn803.

154. Щелканов М.Ю., Дедков В.Г., Галкина И.В., Магассуба Н.Ф., Зуманиги Н., Шипулин Г.А., Попова А.Ю., Малеев В.В. Районирование Африканской природно очаговой провинции в отношении филовирусных лихорадок // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т.72. – №5. – 325 - 335. DOI: 10.15690/vramn804.
155. Klimentov A.S., Butenko A.M., Khutoretskaya N.V., Shustova E.Y., Larichev V.F., Isaeva O.V., Karganova G.G., Lukashev A.N., Gmyl A.P. Development of pan-phlebovirus RT-PCR assay // J Virol Methods. – 2016. – V.232. – 29 - 32. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.02.009.
156. Kholodilov I., Belova O., Burenkova L., Korotkov Y., Romanova L., Morozova L., Kudriavtsev V., Gmyl L., Belyaletdinova I., Chumakov A., Chumakova N., Dargyn O., Galatsevich N., Gmyl A., Mikhailov M., Oorzhak N., Polienko A., Saryglar A., Volok V., Yakovlev A., Karganova G. Ixodid ticks and tick-borne encephalitis virus prevalence in the South Asian part of Russia (Republic of Tuva) // Ticks Tick Borne Dis. – 2019. – V.10. – №5. – 959 - 969. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.04.019.
157. Филиппова Н. А. Фауна СССР. Паукообразные. Том 4. Выпуск 4. Иксовые клещи подсемейства Ixodinae // Ленинград: Наука, 1977.
158. Li M., Zheng Y., Zhao G., Fu S., Wang D., Wang Z., Liang G. Tibet Orbivirus, a novel Orbivirus species isolated from Anopheles maculatus mosquitoes in Tibet, China // PLoS One. – 2014. – V.9. – №2. – e88738. DOI: 10.1371/journal.pone.0088738.
159. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. – 2014. – V.30. – №15. – 2114 - 2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
160. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. // J Comput Biol. – 2012. – V.19. – №5. – 455 - 477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
161. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // Basic local alignment search tool // J Mol Biol – 1990. – V.215. – №3. – 403 - 410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
162. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinformatics. – 2014. V.30. – №14. – 2068- 2069. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153.
163. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat Methods. – 2012. – V.9. – №4. – 357 - 359. DOI: 10.1038/nmeth.1923.
164. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Cambridge University Press, 2001. – 117–120.
165. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum

- parsimony methods // *Mol Biol Evol.* – 2011. – V.28. - №10. - 2731- 2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
166. Dedkov V.G., Dolgova A.S., Safonova M.V., Samoilov A.E., Belova O.A., Kholodilov I.S., Matsvay A.D., Speranskaya A.S., Khafizov K., Karganova G.G. Isolation and characterization of Wad Medani virus obtained in the tuva Republic of Russia // *Ticks and Tick-Borne Diseases.* – 2021. – V.12. – №2. – 101612. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101612.
 167. Ed. King Andrew M.Q., Michael A.J., Carstens B.E., Lefkowitz J.E. Oxford. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier, 2012.
 168. Леонова Г.Н., Ченцова И.В., Петухова С.А., Сомова Л.М., Беликов С.И., Кондратов И.Г., Крылова Н.В., Плехова Н.Г., Павленко Е.В., Романова Е.В., Мацак В.А., Смирнов Г.А., Новиков Д.В. Впервые выявленный летальный случай лиссавирусной инфекции в Приморском крае // *Тихоокеанский медицинский журнал.* – 2010. – Т.3.- 90 - 94.
 169. Шкарин В.В., Ковалишена О.В. Проблемы и перспективы системы мониторинга контроля за новыми инфекциями // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* - 2013. - №4. – 4 – 9.
 170. Хотько Н.И., Федянин Ю.П., Коломиец В.В. К проблеме использования эпидемического потенциала при эпиднадзоре за инфекциями с природной очаговостью. В кн. *Природно-очаговые болезни человека: сб. научн. тр. Омск, 1996.* – 232 – 233.
 171. Куклев Е.В., Кокушкин А.М., Кутырев В.В. Количественная оценка величины эпидемического потенциала природных очагов чумы и оптимизация эпидемиологического надзора за этой инфекцией // *Эпидемиология и инфекционные болезни.* - 2001. - №5. – 10 – 13.
 172. Москвитина Э.А., Горобец А.В., Прометной В.И., Баташев В.В. Оценка эпидемического потенциала территории при холере с использованием комплекса показателей (Сообщение 2) // *Проблемы особо опасных инфекций: сб. науч. тр.* - 2001. - Т.82. – 35 – 43.
 173. Нафеев А.А. Современные особенности эпидемических проявлений природно-очаговых инфекций (геморрагической лихорадки с почечным синдромом, лептоспирозов, иксодовых клещевых боррелиозов, туляремии) и оптимизация эпидемиологического надзора за ними (на модели Ульяновской области) // *СПб. Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 2007.* - 346.
 174. Bettencourt L.M., Ribeiro R.M. Real time bayesian estimation of the epidemic potential of emerging infectious diseases // *PLoS One.* – 2008. - V.3., №5 - e2185. DOI: 10.1371/journal.pone.0002185.

175. Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Платонов М.Е., Майская Н.В., Коломбет Л.В., Соломенцев В.И., Богун А.Г., Анисимов А.П. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного, неосновного подвидов и других представителей *Yersinia pseudotuberculosis* complex // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. -2017. - Т.35. - №2. – 5 – 10.
176. Fraser C., Donnelly C.A., Cauchemez S., Hanage W.P., Van Kerkhove M.D., Hollingsworth T.D., Griffin J. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings // Science. – 2009. – V.324. - №5934. – 1557 – 1561. DOI: 10.1126/science.1176062.
177. Cauchemez S., Fraser C., Van Kerkhove M.D., Donnelly C.A., Riley S., Rambaut A., Ferguson N.M. Middle East respiratory syndrome coronavirus: quantification of the extent of the epidemic, surveillance biases, and transmissibility // Lancet Inf. Dis. – 2014.- V.14. - №1 – 50 – 56. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70304-9.
178. Campos G.S., Bandeira A.C., Sardi S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil // Emerg. Infect. Dis. – 2015. - V.21. - №10. – 1885 – 1886. DOI: 10.3201/eid2110.150847.
179. Павловский Е.Н. О природной очаговости инфекционных и паразитарных болезней // Вестник АН СССР. - 1939.- Т.10. – 98 – 108.
180. Громашевский Л.В. Общая эпидемиология. 4-е изд. М.: Медицина, 1965. - 290.
181. Черкасский Б.Л. Оценка риска в эпидемиологии. М.: Медицина, 2006. -160.
182. Holmes E.C., Rambaut A., Andersen K.G. Pandemics: spend on surveillance, not prediction // Nature. – 2018. – V.558. - № 7709. – 180 – 182. DOI: 10.1038/d41586-018-05373-w.
183. Morens D.M., Folkers G.K., Fauci A.S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases // Nature. – 2004. - V.430. - № 6996. – 242 – 249. DOI: 10.1038/nature0275.
184. Polonsky J.A., Baidjoe A., Kamvar Z.N., Cori A., Durski K., Edmunds W.J., Eggo R.M., Funk S., Kaiser L., Keating P., de Waroux O.L.P., Marks M., Moraga P., Morgan O., Nouvellet P., Ratnayake R., Roberts C.H., Whitworth J., Jombart T. Outbreak analytics: a developing data science for informing the response to emerging pathogens. //Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2019. – V.374. - № 1776. - e20180276. DOI: 10.1098/rstb.2018.0276.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ВИДЕ НАУЧНОГО ДОКЛАДА

Статьи в научных изданиях по базам данных научного цитирования за 2016-2025 гг.

Научные обзоры:

1. Kiselev D.A., Matsvay A.D., Abramov I.S., **Dedkov V.G.**, Shipulin G.A., Khafizov K.F. / Current Trends in Diagnostics of Viral Infections of Unknown Etiology // Viruses. – 2020. –V.

12. – № 2. – 211. DOI: 10.3390/v12020211. Импакт-фактор: 3.5. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
2. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., **Дедков В.Г.**, Акимкин В.Г., Малеев В.В. / История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10. – № 2. – 221 - 246. DOI: 10.15789/2220-7619-HOI-1412. Импакт-фактор: 1.048. Квартиль Web of Science: **Q4**. Квартиль Scopus: **Q4**. БAK: **K1**
3. Волков А.А., Долгова А.С., **Дедков В.Г.** / Молекулярные диагностические платформы, созданные на базе систем CRISPR/Cas // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12. – №1. – 9 - 20. DOI: 10.15789/2220-7619-CCB-1843. Импакт-фактор: 1.048. Квартиль Web of Science: **Q4**. Квартиль Scopus: **Q4**. БAK: **K1**

Научные статьи:

4. **Dedkov V.G.**, Lukashev A.N., Deviatkin A.A., Kuleshov K.V., Safonova M.V., Poleshchuk E.M., Drexler J.F., Shipulin G.A. / Retrospective diagnosis of two rabies cases in humans by high throughput sequencing // Journal of Clinical Virology. – 2016. – V. 78. – 74 - 81. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.03.012. Импакт-фактор: 3.4. Квартиль Web of Science: **Q2**. Квартиль Scopus: **Q1**
5. **Dedkov V.G.**, Magassouba N.F., Safonova M.V., Deviatkin A.A., Dolgova A.S., Pyankov O.V., Sergeev A.A., Utkin D.V., Odinokov G.N., Safronov V.A., Agafonov A.P., Maleev V.V., Shipulin G.A. / Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for the detection of Ebola virus (Zaire) during an Ebola outbreak in Guinea in 2014-2015 // Journal of Virological Methods. – 2016. – V. 228. – 26 - 30. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.11.007. Импакт-фактор: 1.6. Квартиль Web of Science: **Q4**. Квартиль Scopus: **Q3**
6. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., **Dedkov V.G.**, Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., Vodop'ianov A.S., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Titova S.V., Maleev V.V., Shipulin G.A. / Travel-Associated Vibrio cholerae O1 El Tor, Russia // Emerging Infectious Diseases. – 2016. – V. 22. – № 11. – 2006 - 2008. DOI: 10.3201/eid2211.151727. Импакт-фактор: 6.6. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
7. Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleshchuk E.M., **Dedkov V.G.**, Tkachev S.E., Sidorov G.N., Karganova G.G., Galkina I.V., Shchelkanov M.Y., Shipulin G.A. / The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation // PLoS One. – 2017. – V. 12. – № 2. – e0171855. DOI: 10.1371/journal.pone.0171855. Импакт-фактор: 2.6. Квартиль Web of Science: **Q2**. Квартиль Scopus: **Q1**
8. Varizhuk A.M., Zatsepin T.S., Golovin A.V., Belyaev E.S., Kostyukevich Y.I., **Dedkov V.G.**, Shipulin G.A., Shpakovski G.V., Aralov A.V. / Synthesis of oligonucleotides containing novel

- G-clamp analogue with C8-tethered group in phenoxazine ring: Implication to qPCR detection of the low-copy Kemerovo virus dsRNA // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 25. – № 14. – 3597 - 3605. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.03.062. Импакт-фактор: 3.0. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
9. Щелканов М.Ю., Дедков В.Г., Галкина И.В., Магассуба Н.Ф., Зуманиги Н., Шипулин Г.А., Попова А.Ю., Малеев В.В. / Районирование Африканской природно-очаговой провинции в отношении филовиральных лихорадок // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2017. – Т. 72. – № 5. – 325 - 335. DOI: 10.15690/vramn804. Импакт-фактор: 1.198. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q4**. ВАК: **K1**
 10. Щелканов М.Ю., Магассуба Н.Ф., Дедков В.Г., Шипулин Г.А., Галкина И.В., Попова А.Ю., Малеев В.В. / Природный резервуар филовиральных и типы связанных с ними эпидемических вспышек на территории Африки // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2017. – Т. 72. – № 2. – 112 - 119. DOI: 10.15690/vramn803. Импакт-фактор: 1.198. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q4**. ВАК: **K1**
 11. **Dedkov V.G.**, Shchelkanov M.Y., Bushkueva B.T., Rudenko T.A., Kurdyukova O.V., Galkina I.V., Sapotsky M.V., Blinova E.A., Dzhambinov S.D., Shipulin G.A. / A neonatal death associated with Crimean-Congo hemorrhagic fever (Republic of Kalmykia, Russia, June 2016) // *Antiviral Research*. – 2017. – V. 146. – 146 - 148. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.08.018. Импакт-фактор: 4.0. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 12. **Dedkov V.G.**, Simonova E.G., Beshlebova O.V., Safonova M.V., Stukolova O.A., Verigina E.V., Savinov G.V., Karaseva I.P., Blinova E.A., Granitov V.M., Arsenjeva I.V., Shipulin G.A. / The burden of tick-borne diseases in the Altai region of Russia // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. – 2017. – V. 8. – № 5. – 787 - 794. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.06.004. Импакт-фактор: 3.4. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 13. **Dedkov V.G.**, Deviatkin A.A., Poleshchuk E.M., Safonova M.V., Blinova E.A., Shchelkanov M.Y., Sidorov G.N., Simonova E.G., Shipulin G.A. / Development and evaluation of a RT-qPCR assay for fast and sensitive rabies diagnosis // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2018. – V. 90. – № 1. – 18 - 25. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.009. Импакт-фактор: 1.8. Квартиль Web of Science: **Q3**. Квартиль Scopus: **Q2**
 14. Бесхлебова О.В., Гранитов В.М., Дедков В.Г., Арсеньева И.В. / Клещевые инфекции с природной очаговостью в Алтайском крае: настоящее и будущее // *Бюллетень медицинской науки*. – 2018. – Т. 12. – № 4. – 39 - 44. Импакт-фактор: 0.56. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: -. ВАК: **K3**
 15. Дедков В.Г., Найденова Е.В., Magassouba N.F., Айгинин А.А., Soropogui B., Kourouma F., Samara A.B., Samara J., Крицкий А.А., Щелканов М.Ю., Малеев В.В. / Разработка и

- испытание метода выявления РНК вируса Ласса на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – Т. 4. – 39 - 47. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-39-47. Импакт-фактор: 1.0. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q4**. ВАК: **K1**
16. Семенцова А.О., Дедков В.Г., Терновой В.А., Чуб Е.В., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Максюттов Р.А., Малеев В.В., Попова А.Ю. / Клиническая лабораторная диагностика лихорадки Эбола. Анализ существующих методик и диагностических средств. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – Т. 95. – № 3. – 105 - 116. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-3-105-116. Импакт-фактор: 1.701. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q4**. ВАК: **K1**
 17. **Dedkov V.G.**, Magassouba N.F., Safonova M.V., Bodnev S.A., Pyankov O.V., Camara J., Sylla B., Agafonov A.P., Maleev V.V., Shipulin G.A. / Sensitive Multiplex Real-time RT-qPCR Assay for the Detection of Filoviruses // Health Security. – 2018. – V. 16. – № 1. – 14 - 21. DOI: 10.1089/hs.2017.0027. Импакт-фактор: 1.6. Квартиль Web of Science: **Q3**. Квартиль Scopus: **Q2**
 18. Ayginin A.A., Pimkina E.V., Matsvay A.D., Speranskaya A.S., Safonova M.V., Blinova E.A., Artyushin I.V., **Dedkov V.G.**, Shipulin G.A., Khafizov K. / The Study of Viral RNA Diversity in Bird Samples Using De Novo Designed Multiplex Genus-Specific Primer Panels // Advances in Virology. – 2018. – V. 1. – 3248285. DOI: 10.1155/2018/3248285. Импакт-фактор: 1.4. Квартиль Web of Science: **Q4**. Квартиль Scopus: **Q4**
 19. Litov A.G., Deviatkin A.A., Goptar I.A., **Dedkov V.G.**, Gmyl A.P., Markelov M.L., Shipulin G.A., Karganova G.G. / Evaluation of the population heterogeneity of TBEV laboratory variants using high-throughput sequencing // Journal of General Virology. – 2018. – V. 99. – № 2. – 240 - 245. DOI: 10.1099/jgv.0.001003. Импакт-фактор: 4.3. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q2**
 20. **Dedkov V.G.**, Magassouba N.F., Safonova M.V., Naydenova E.V., Ayginin A.A., Soropogui B., Kourouma F., Camara A.B., Camara J., Kritzkiy A.A., Tuchkov I.V., Shchelkanov M.Y., Maleev V.V. / Development and Evaluation of a One-Step Quantitative RT-PCR Assay for Detection of Lassa Virus // Journal of Virological Methods. – 2019. – V. 271. – 113674. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113674. Импакт-фактор: 1.6. Квартиль Web of Science: **Q4**. Квартиль Scopus: **Q3**
 21. Safonova M.V., Shchelkanov M.Y., Khafizov K.F., Matsvay A.D., Ayginin A.A., Dolgova A.S., Shchelkanov E.M., Pimkina E.V., Speranskaya A.S., Galkina I.V., **Dedkov V.G.** / Sequencing and genetic characterization of two strains Paramushir virus obtained from the Tyuleniy Island in the Okhotsk Sea (2015) // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2019. – V. 10. – № 2. – 269 - 279. DOI:

- 10.1016/j.ttbdis.2018.11.004. Импакт-фактор: 3.4. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
22. Хафизов К.Ф., Сперанская А.С., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А., **Дедков В.Г.** / Передовые технологии в диагностике вирусных заболеваний неясной этиологии // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10. – № 1. – 9 - 25. DOI: 10.15789/2220-7619-ATI-824. Импакт-фактор: 1.048. Квартиль Web of Science: **Q4**. Квартиль Scopus: **Q4**. ВАК: **K1**
 23. Naidenova E.V., Zakharov K.S., Kartashov M.Y., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Magassouba N.F., Nourdine I., Nassour A.A., Bah M.B., Kourouma A., Boumbali S., Boiro M.Y., Scherbakova S.A., Kuttyrev V.V., **Dedkov V.G.** / Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in rural areas of Guinea // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2020. – V. 11. – № 5. – 101475. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101475. Импакт-фактор: 3.4. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 24. Samoilov A.E., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Evengard B., Zueva E.V., Panferova Y.A., Ostankova Y.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Kovalev E.V., Litovko A.R., Goncharov A.U., Semenov A.V., Khafizov K.F., **Dedkov V.G.** / Lethal Outcome of Leptospirosis in Southern Russia: Characterization of Leptospira Interrogans Isolated from a Deceased Teenager // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2020. – V. 17. – № 12. – 4238. DOI: 10.3390/ijerph17124238. Импакт-фактор: 4.614. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q2**
 25. Safonova M.V., Gmyl A.P., Lukashev A.N., Speranskaya A.S., Neverov A.D., Fedonin G.G., Pimkina E.V., Matsvay A.D., Khafizov K.F., Karganova G.G., Kozlovskaya L.I., Valdokhina A.V., Bulanenko V.P., **Dedkov V.G.** / Genetic diversity of Kemerovo virus and phylogenetic relationships within the Great Island virus genetic group // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2020. – V. 11. – № 2. – 101333. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.101333. Импакт-фактор: 3.4. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 26. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Историк О.А., Мосевич О.С., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Черный М.А., Балабышева Н.С., Логинова И.С., Владимирова О.С., Самоглядова И.С., Васев Н.А., Румянцева С.В., Чупалова Е.Ю., Селиванова Г.В., Муравьева М.В., Тимофеева Л.В., Ханкишиева Э.Н., Тыльчевская В.Д., Никитенко Н.Д., Костеницкая Н.В., Виркунен Н.В., Климкина И.М., Кузьмина Т.М., Дегтяренко Н.В., Баунова А.И., Филиппова Л.А., Пальчикова Н.А., Кукушкин А.В., Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Богумильчик Е.А., Воскресенская Е.А., Дробышевская В.Г., Зуева Е.В., Кокорина Г.И., Курова Н.Н., Любимова Н.Е., Ферман Р.С., Хамдулаева Г.Н., Хамитова И.В., Хорькова Е.В., Миличкина А.М., **Дедков В.Г.**, Тотолян А.А. / Оценка популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период эпидемии

- COVID-19 // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – Т. 3. – 114 - 123. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123. Импакт-фактор: 1.0. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q4**. БАЗ: **K1**
27. Goncharova E.A., **Dedkov V.G.**, Dolgova A.S., Kassirov I.S., Safonova M.V., Voytsekhovskaya Y.A., Totolian A.A. / One-step quantitative RT-PCR assay with armored RNA controls for detection of SARS-CoV-2 // Journal of Medical Virology. – 2021. – V. 93. – № 3. – 1694 - 1701. DOI: 10.1002/jmv.26540. Импакт-фактор: 4.6. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 28. **Dedkov V.G.**, Dolgova A.S., Safonova M.V., Samoilov A.E., Belova O.A., Kholodilov I.S., Matsvay A.D., Speranskaya A.S., Khafizov K., Karganova G.G. / Isolation and characterization of Wad Medani virus obtained in the tuva Republic of Russia // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2021. – V. 12. – № 2. – 101612. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101612. Импакт-фактор: 3.4. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 29. Gladkikh A.S., Dolgova A.S., **Dedkov V.G.**, Sbarzaglia V.A., Kanaeva O.I., Popova A.U., Totolian A.A. / Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Genetic Variant with Distinct Spike Protein Mutations // Viruses. – 2021. – V. 13. – № 6. – 1029. DOI: 10.3390/v13061029. Импакт-фактор: 3.5. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 30. **Dedkov V.G.**, Magassouba N.F., Stukolova O.A., Savina V.A., Camara J., Soropogui B., Safonova M.V., Semizhon P., Platonov A.E. / Differential Laboratory Diagnosis of Acute Fever in Guinea: Preparedness for the Threat of Hemorrhagic Fevers // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2021. – V. 18. – № 11. – 6022. DOI: 10.3390/ijerph18116022. Импакт-фактор: 4.614. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q2**
 31. Koopmans M., Daszak P., **Dedkov V.G.**, Dwyer D.E., Farag E., Fischer T.K., Hayman D.T.S., Leendertz F., Maeda K., Nguyen-Viet H., Watson J. / Origins of SARS-CoV-2: window is closing for key scientific studies // Nature. – 2021. – V. 596. – 482 - 485. DOI: 10.1038/d41586-021-02263-6. Импакт-фактор: 48.5. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 32. Volynkina A.S., Lisitskaya Y.V., Kolosov A.V., Shaposhnikova L.I., Pisarenko S.V., **Dedkov V.G.**, Dolgova A.S., Platonov A.E., Kulichenko A.N. / Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia // PLoS One. – 2022. – V. 17. – № 5. – e0266177. DOI: 10.1371/journal.pone.0266177. Импакт-фактор: 2.6. Квартиль Web of Science: **Q2**. Квартиль Scopus: **Q1**
 33. Gladkikh A.S., **Dedkov V.G.**, Sharova A.A., Klyuchnikova E.O., Sbarzaglia V.A., Arbuzova T.V., Forghani M., Ramsay E., Dolgova A.S., Shabalina A.V., Tsyganova N.A., Totolian A.A. / Uninvited Guest: Arrival and Dissemination of Omicron Lineage SARS-CoV-2 in St. Petersburg,

- Russia // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10. – № 8. – 1676. DOI: 10.3390/microorganisms10081676. Импакт-фактор: 4.2. Квартиль Web of Science: **Q2**. Квартиль Scopus: **Q2**
34. Gladkikh A.S., **Dedkov V.G.**, Sharova A.A., Klyuchnikova E.O., Sbarzaglia V.A., Kanaeva O.I., Arbuzova T.V., Tsyganova N.A., Popova A.U., Ramsay E., Totolian A.A. / Epidemiological Features of COVID-19 in Northwest Russia in 2021 // *Viruses*. – 2022. – V. 14. – № 5. – 931. DOI: 10.3390/v14050931. Импакт-фактор: 3.5. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 35. Найденова Е.В., **Дедков В.Г.**, Агафонов Д.А., Сеничкина А.М., Сафонова М.В., Кутырев В.В. / Разработка и апробация способа выявления РНК вируса Луйо методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2021. – Т. 1. – 110 - 115. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-110-115. Импакт-фактор: 1.0. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q4**. ВАК: **K1**
 36. Dolgova A.S., **Dedkov V.G.**, Safonova M.V., Faye O. / Current View on Genetic Relationships within the Bunyamwera Serological Group // *Viruses*. – 2022. – V. 14. – № 6. – 1135. DOI: 10.3390/v14061135. Импакт-фактор: 3.5. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 37. Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Хафизов К.Ф., Дубоделов Д.В., Углева С.В., Семененко Т.А., Плоскирева А.А., Горелов А.В., Пшеничная Н.Ю., Ежлова Е.Б., Летюшев А.Н., Демина Ю.В., Кутырев В.В., Максютлов Р.А., Говорун В.М., Дятлов И.А., Тотолян А.А., Куличенко А.Н., Балахонов С.В., Рудаков Н.В., Троценко О.Е., Носков А.К., Зайцева Н.Н., Топорков А.В., Лиознов Д.А., Андреева Е.Е., Микаилова О.М., Комаров А.Г., Ананьев В.Ю., Молдованов В.В., Логунов Д.Ю., Гущин В.А., **Дедков В.Г.**, Черкашина А.С., Кузин С.Н., Тиванова Е.В., Кондрашева Л.Ю., Саенко В.В., Селезов С.Ю., Гасанов Г.А., Сванадзе Н.Х., Глазов М.Б., Остроушко А.А., Миронов К.О., Есьман А.С. / Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2 // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2022. – Т. 99. – № 4. – 381 - 396. DOI: 10.36233/0372-9311-295. Импакт-фактор: 1.701. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q4**. ВАК: **K1**
 38. Сафонова М.В., Симонова Е.Г., Лопатин А., Долгова А.С., **Дедков В.Г.** / Разработка критериев количественной оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии // *Инфекция и иммунитет*. – 2022. – Т. 12. – № 4. – 745 - 754. DOI: 10.15789/2220-7619-DOQ-1926. Импакт-фактор: 1.048. Квартиль Web of Science: **Q4**. Квартиль Scopus: **Q4**. ВАК: **K1**
 39. Badji A., Ndiaye M., Gaye A., Dieng I., Ndiaye E.H., Dolgova A.S., Mhamadi M., Diouf B., Dia I., **Dedkov V.G.**, Faye O., Diallo M. / Detection of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus from Livestock Ticks in Northern, Central and Southern Senegal in 2021 // *Tropical Medicine and*

- Infectious Disease. – 2023. – V. 8. – № 6. – 317. DOI: 10.3390/tropicalmed8060317. Импакт-фактор: 2.6. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q2**
40. Gladkikh A.S., Cao T.M., Klyuchnikova E.O., Dao M.H., Sharova A.A., Melnichenko V.D., Popova M.R., Arbuzova T.V., Sbarzaglia V.A., Tsyganova N.A., Ramsay E., **Dedkov V.G.** / Near complete genome sequences from Southern Vietnam revealed local features of genetic diversity and intergenerational changes in SARS- CoV-2 variants in 2020-2021 // BMC Infectious Diseases. – 2023. – V. 23. – № 1. – 806. DOI: 10.1186/s12879-023-08814-8. Импакт-фактор: 3.0. Квартиль Web of Science: **Q2**. Квартиль Scopus: **Q1**
 41. Gladkikh A.S., Klyuchnikova E.O., Pavlova P.A., Sbarzaglia V.A., Tsyganova N.A., Popova M.V., Arbuzova T.V., Sharova A.A., Ramsay E., Samoilov A.E., **Dedkov V.G.**, Totolian A.A. / Comparative Analysis of Library Preparation Approaches for SARS-CoV-2 Genome Sequencing on the Illumina MiSeq Platform // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – № 3. – 2374. DOI: 10.3390/ijms24032374. Импакт-фактор: 4.9. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 42. Karas B.Y., Sitnikova V.E., Nosenko T.N., **Dedkov V.G.**, Arsentieva N.A., Gavrilenko N.V., Moiseev I.S., Totolian A.A., Kajava A.V., Uspenskaya M.V. / ATR-FTIR spectrum analysis of plasma samples for rapid identification of recovered COVID-19 individuals // Journal of Biophotonics. – 2023 – V. 16. – № 7. – e202200166. DOI: 10.1002/jbio.202200166. Импакт-фактор: 2.3. Квартиль Web of Science: **Q3**. Квартиль Scopus: **Q2**
 43. Kirichenko A.S., Bryushkova E.A., **Dedkov V.G.**, Dolgova A.S. / A Novel DNzyme-Based Fluorescent Biosensor for Detection of RNA-Containing Nipah Henipavirus // Biosensors. – 2023. – V. 13. – № 2. – 252. DOI: 10.3390/bios13020252. Импакт-фактор: 5.6. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q2**
 44. Mhamadi M., Dieng I., Dolgova A.S., Touré C.T., Ndiaye M., Diagne M.M., Faye B., Gladkikh A.S., **Dedkov V.G.**, Sall A.A., Faye O., Faye O. / Whole Genome Analysis of African Orthobunyavirus Isolates Reveals Naturally Interspecies Segments Recombinations between Bunyamwera and Ngari Viruses // Viruses. – 2023. – V. 15. – № 2. – 550. DOI: 10.3390/v15020550. Импакт-фактор: 3.5. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
 45. Speranskaya A.S., Artiushin I.V., Samoilov A.E., Korneenko E.V., Khabudaev K.V., Ilina E.N., Yusefovich A.P., Safonova M.V., Dolgova A.S., Gladkikh A.S., **Dedkov V.G.**, Daszak P. / Identification and Genetic Characterization of MERS-Related Coronavirus Isolated from Nathusius' Pipistrelle (*Pipistrellus nathusii*) near Zvenigorod (Moscow Region, Russia), 2023 // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2023. – V. 20. – № 4. – 3702. DOI: 10.3390/ijerph20043702. Импакт-фактор: 4.614. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q2**

46. Kirichenko A.S., Bryushkova E.A., Shabalina A.V., **Dedkov V.G.**, Dolgova A.S. / DNzyme as a method for Nipah Henipavirus Detection // International Journal of Infectious Diseases. – 2023. – V. 130. – S144 - S145. DOI: 10.1016/j.ijid.2023.04.355. Импакт-фактор: 4.3. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
47. Жданов К.В., Мальцев О.В., Козлов К.В., Миклуш П.И., Передельский Е.В., Сидорчук С.Н., Кравчук Ю.А., Сигидаев А.С., **Дедков В.Г.**, Конушкалиев А.А. / Клинический случай тяжелого течения Крымской геморрагической лихорадки с длительной персистенцией возбудителя в сочетании с клещевым боррелиозом // Журнал инфектологии. – 2023. – Т. 15. – №2. – 156 - 161. DOI: 10.22625/2072-6732-2023-15-2-156-161. Импакт-фактор: 0.662. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: **Q4**. ВАК: **K1**
48. Кафтырева Л.А., Макарова М.А., Матвеева З.Н., Полев Д.Е., Саитова А.Т., **Дедков В.Г.** / Первые находки монофазной Salmonella Typhimurium в Санкт-Петербурге // Проблемы медицинской микологии. – 2023. – Т. 25. – № 3. – 3 - 9. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-3-3-9. Импакт-фактор: 0.486. Квартиль Web of Science: -. Квартиль Scopus: -. ВАК: **K2**
49. Dolgova A.S., Kanaeva O.I., Antonov S.A., Shabalina A.V., Klyuchnikova E.O., Sbarzaglia V.A., Gladkikh A.S., Ivanova O.E., Kozlovskaya L.I., **Dedkov V.G.** / Qualitative real-time RT-PCR assay for nOPV2 poliovirus detection // Journal of Virological Methods. – 2024. – V. 329. – 114984. DOI: 10.1016/j.jviromet.2024.114984. Импакт-фактор: 1.6. Квартиль Web of Science: **Q4**. Квартиль Scopus: **Q3**
50. Ivanova, O.E., Ereemeeva T.P., Baykova O.Y., Krasota A.Y., Yakovchuk E.V., Shustova E.Y., Malyshkina L.P., Mustafina A. N.-I., Mikhailova Y.M., Chirova A.V., Cherepanova E.A., Morozova N.S., Gladkikh A.S., Dolgova A.S., **Dedkov V.G.**, Totolian A.A., Kozlovskaya L.I. / Detection of Polioviruses Type 2 among Migrant Children Arriving to the Russian Federation from a Country with a Registered Poliomyelitis Outbreak // Vaccines. – 2024. – V. 12. – № 7. – 718. DOI: 10.3390/vaccines12070718. Импакт-фактор: 3.4. Квартиль Web of Science: **Q4**. Квартиль Scopus: **Q3**
51. Korneenko E.V., Samoilov A.E., Chudinov I.K., Butenko I.O., Sonets I.V., Artyushin I.V., Yusefovich A.P., Krusko S.V., Safonova M.V., Sinitsyn S.O., Klyuchnikova E.O., Gladkikh A.S., **Dedkov V.G.**, Speranskaya A.S., Daszak P. / Alphacoronaviruses from Pipistrellus bats captured in European Russia in 2015 and 2021 are closely related to those of Northern Europe // Frontiers in Ecology and Evolution. – 2024. – V. 12. – 1324605. DOI: 10.3389/fevo.2024.1324605. Импакт-фактор: 2.6. Квартиль Web of Science: **Q2**. Квартиль Scopus: **Q1**
52. Ndiaye M., Badji A., Dieng I., Dolgova A.S., Mhamadi M., Kirichenko A.D., Gladkikh A.S., Gaye A., Faye O., Sall A.A., Diallo M., **Dedkov V.G.**, Faye O. / Molecular Detection and Genetic

- Characterization of Two Dugbe Orthonairovirus Isolates Detected from Ticks in Southern Senegal // *Viruses*. – 2024. – V.16. – № 6. – 964. DOI: 10.3390/v16060964. Импакт-фактор: 3.5. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
53. Sharova A.A., Tokarevich N.K., Baimova R.R., Freylikhman O.A., Karmokov I.A., Riabiko E.G., Lunina G.A., Buzinov R.V., Sokolova O.V., Buts L.V., Bespyatova L.A., Bubnova L.A., Safonova O.S., Kalinina E.L., Stankevich A.I., Vikse R., Andreassen A.K., Gladkikh A.S., Forghani M., Gritseva A.S., Popova M.R., Ramsay E.S., **Dedkov V.G.** / Prevalence and genetic diversity of tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks from specific regions of northwestern Russia. // *PLoS One*. – 2025. – V. 20. – № 1. – e0314385. DOI: 10.1371/journal.pone.0314385. Импакт-фактор: 2.6. Квартиль Web of Science: **Q2**. Квартиль Scopus: **Q1**
54. Chayeb V.A., Dolgova A.S., Popova M.R., Zheleznova N.V., Shirobokova S.A., Shabalina A.V., Sharova A.A., Gladkikh A.S., Antipova A.Y., Kirichenko A.D., Ramsay E.S., & **Dedkov V. G.** / Development and Evaluation of a New Measles Detection Assay Using Real-Time RT-PCR. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – V. 26. – № 5. – 1801. DOI: 10.3390/ijms26051801. Импакт-фактор: 4.9. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**
55. Venter M., Manuguerra J.-C., Alviola Ph., Assiri A., Blacksell S.D., Damon I.K., **Dedkov V.G.**, Drosten C., Farag E., Fischer T.K., Gangakhedkar R., Ghosn N., Guzman M.G., Happi C., Kalema-Zikusoka G., Labbe N., Ly S., Myint K., Morel C., Nguyen-Viet H., Ochu C.L., Saijo M., Sang R., Summermatter K., Wacharapluesadee S., Watson J., Yang Yu., Gilbert J., Simniceanu A., Van Kerkhove M.D. / Scientific Advisory Committee for the Origins of Novel Pathogens (SAGO) and WHO SAGO Secretariat. A WHO global framework to guide investigations into origins of potentially epidemic and pandemic pathogens // *Nature Communications*. – 2025. – V. 16. – 2122. DOI: 10.1038/s41467-025-57218-6. Импакт-фактор: 15.7. Квартиль Web of Science: **Q1**. Квартиль Scopus: **Q1**

Главы из монографий:

56. **Дедков В.Г.** Порядок организации и проведения лабораторной диагностики БВВЭ в Российской Федерации / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова [и др.] // Эпидемиология, профилактика и лабораторная диагностика болезни, вызванной вирусом Эбола: практическое руководство / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой; д.м.н., профессора, академика РАН В.В. Кутырева. – Саратов: ООО «Буква», 2015. – 100 - 106.
57. **Дедков В.Г.** Основные направления и результаты научных исследований / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова [и др.] // Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противэпидемической бригады

- Роспотребнадзора / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой; д.м.н., профессора, академика РАН В.В. Кутырева. – М.: ООО «Творческий информационно-издательский центр», 2016. – 195 - 199.
58. **Дедков В.Г.** Разработка и внедрение новых препаратов для диагностики БВВЭ / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова [и др.] // Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противэпидемической бригады Роспотребнадзора / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой; д.м.н., профессора академика РАН В.В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – Ижевск: ООО «Принт-2», 2017. – 188 - 192.
 59. **Дедков В.Г.** Районирование африканской природно-очаговой провинции в отношении филовиральных лихорадок / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – 32 - 45.
 60. **Дедков В.Г.** Природный резервуар филовиральных вирусов и типы связанных с ними эпидемических вспышек на территории Африки / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – 46 - 55.
 61. **Дедков В.Г.** Клиническая лабораторная диагностика лихорадки Эбола. Анализ существующих методик и диагностических средств / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – 102 - 113.
 62. **Дедков В.Г.** Разработка диагностической системы в формате ОТ ПЦР РВ для выявления РНК вируса Эбола Заир / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией профессора, доктора медицинских наук А. Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – 133 - 139.
 63. **Дедков В.Г.** Совершенствование диагностической системы в формате ОТ-ПЦР РВ «Амплиенс EBOV (Zaire)-FL» для детекции РНК вируса Эбола Заир / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова [и др.] // Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2017. – С.140 - 143.

64. **Дедков В.Г.** Вирус Эбола (Заир) / М.Р. Агеева, В.С. Азарова, Ф. Альварес // Молекулярная диагностика инфекционных болезней. – Москва: ООО «Рипол Классик», 2018. – 546 - 552.
65. Zatsopin T.S., Varizhuk A.M., **Dedkov V.G.**, Shipulin G.A., Aralov A.V. / Oligonucleotide Primers with G8AE-Clamp Modifications for RT-qPCR Detection of the Low-Copy dsRNA // Book chapter 18. In: Non-Natural Nucleic Acids: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Nathaniel Shank (ed.), Springer Science+Business Media, 2019. – V.1973. – 281 - 297. DOI: 10.1007/978-1-4939-9216-4_18.
66. **Дедков В.Г.** Разработка и апробация диагностических препаратов / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова. [и др.] // Россия – Гвинея: итоги и перспективы сотрудничества в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой; д.м.н., профессора, академика РАН В.В. Кутырева. – Саратов: Амирит, 2020. – 229 - 234.
67. Dolgova A.S., Safonova M.V., **Dedkov V.G.** / Universal Library Preparation Protocol for Efficient High-Throughput Sequencing of Double-Stranded RNA Viruses // Book chapter 14. In: Nucleic Acid Detection and Structural Investigations: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Kira Astakhova and Syeda Atia Bukhari (eds.), Springer Science+Business Media, 2020. – V. 2063. – 181 - 188. DOI: 10.1007/978-1-0716-0138-9_14
68. **Дедков В.Г.** Разработка средств детекции нового коронавируса SARS-Co V-2 / А.Ю. Попова, Е.Б. Ежлова, В.Ю. Смоленский [и др.] // COVID-19: научно-практические аспекты борьбы с пандемией в Российской Федерации / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой. – Саратов: Амирит, 2021. – 184 - 193.
69. **Дедков В.Г.** Способ выявления РНК вируса Луйо методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Е.В. Найденова, В.Г. Дедков, Т.А. Агафонов [и др.] // Россия-Африка. Опыт работы Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней / Под редакцией д.м.н., профессора А.Ю. Поповой; д.м.н., профессора, академика РАН В.В.Кутырева. – Элиста: ООО «Просвет», 2023. – 223 - 229.

Патенты:

70. Патент № 2744187 С1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, C12Q 1/6876. Способ выявления вируса клещевого энцефалита методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2019144134: заявл. 26.12.2019: опубл. 03.03.2021 / **В. Г. Дедков**, М. В. Сафонова, А. С. Долгова, Е. А. Сюзюмова; заявитель 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. – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
71. Патент № 2744198 С1 Российская Федерация, МПК С07К 14/165, С12N 15/50, С12Q 1/6806. Набор для выявления вируса SARS-CoV методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2020118246: заявл. 25.05.2020: опубл. 03.03.2021 / **В. Г. Дедков**, Е. А. Гончарова, А. С. Долгова, И. С. Кассиров; заявитель 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. – 19 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 72. Патент № 2744665. Способ выявления РНК вируса Луйо методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени: № 2020119188: заявл. 02.06.2020 / Е. В. Найденова, А. М. Сеничкина, Д. А. Агафонов, **В. Г. Дедков**, М. В. Сафонова; заявитель Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». – 14 с.: 7 ил. – Текст: непосредственный.
 73. Патент № 2795703 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, А61К 39/00. Способ выявления РНК модифицированного вакцинного полиовируса типа 2 (nOPV2) методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2022124008: заявл. 08.09.2022: опубл. 11.05.2023 / С.А. Антонов, А.С. Долгова, А.С. Гладких, **В.Г. Дедков** [и др.]; заявитель 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. – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 74. Патент № 2803898 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления вируса обезьяньей оспы вида Monkeypox методом ПЦР в реальном времени (MPX AMP PS): № 2023107184: заявл. 23.03.2023: опубл. 21.09.2023 / А.С. Долгова, А.С. Гладких, А.В. Шабалина В.А. Шайеб, **В.Г. Дедков**; заявитель 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. – 12 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 75. Патент № 2831410 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления РНК вируса Bandavirus dabieense (SFTSV) методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2024114595: заявл. 28.05.2024: опубл. 05.12.2024 / М.Р. Попова, М.В. Сафонова, **В.Г. Дедков** [и др.]; заявитель 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. – 12 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
76. Патент № 2827922 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12N 7/00. Способ выявления вируса Guanarito методом, основанным на применении дезоксирибозима 10-23: № 2024106689: заявл. 13.03.2024: опубл. 03.10.2024 / А.Д. Кириченко, Е.А. Брюшкова, А.С. Долгова, **В.Г. Дедков**; заявитель 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. – 15 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 77. Патент № 2822430 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6844, С12Q 1/6876. Способ выявления вируса кори методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2023107183: заявл. 23.03.2023: опубл. 05.07.2024 / **В.Г. Дедков**, А.С. Долгова, Е.Н. Милашенко, А.В.Шабалина; заявитель 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. – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 78. Патент № 2822164 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/686. Способ выявления РНК вируса Хунин методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2023129624: заявл. 14.11.2023: опубл. 02.07.2024 / А.С. Долгова, С.А. Широбокова, А.В. Шабалина, **В.Г. Дедков**; заявитель 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. – 13 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 79. Патент № 2822161 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6844, С12Q 1/6876. Способ выявления РНК вируса Хендра вида Hendra henipavirus методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2023120035: заявл. 27.07.2023: опубл. 02.07.2024 / **В.Г. Дедков**, А.С.Долгова, С.А. Широбокова, А.В. Шабалина; заявитель 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. – 12 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
 80. Патент № 2816271 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6876, С12Q 1/6888. Способ выявления вируса Nipah методом, основанным на применении дезоксирибозима 10-23: № 2023115551: заявл. 13.06.2023: опубл. 28.03.2024 / А.Д. Кириченко, Е.А. Брюшкова, А.С.Долгова, **В.Г. Дедков**; заявитель 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. – 15 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
81. Патент № 2816270 С2 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления вируса Nipah методом ОТ-ПЦР в реальном времени: № 2022124003: заявл. 08.09.2022: опубл. 28.03.2024 / С.А. Антонов, А.С. Долгова, А.В. Шабалина, **В.Г. Дедков**, Е.Н. Милашенко; заявитель 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. – 10 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
82. Патент № 2834950 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6876. Способ выявления РНК вируса *Henipavirus hendraense* методом рекомбиназной полимеразной амплификации: заявл. 19.04.2024: опубл. 19.02.2025 / М.А. Капитонова, А.В. Шабалина, **В.Г.Дедков**, А.С. Долгова; заявитель 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. – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
83. Патент № 2834909 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления РНК вируса *Mammarenavirus guanaritoense* методом рекомбиназной полимеразной амплификации: заявл. 28.05.2024: опубл. 17.02.2025 / М.А. Капитонова, А.В. Шабалина, **В.Г.Дедков**, А.С. Долгова; заявитель 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. – 11 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
84. Патент № 2834908 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ выявления РНК вируса геморрагической лихорадки Крым-Конго методом ОТ-ПЦР в реальном времени: заявл. 27.04.2024: опубл. 17.02.2025 / А.С. Долгова, А.С. Туренко, А.В. Шабалина, **В.Г. Дедков**; заявитель 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. – 13 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.
85. Патент № 2834907 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68, С12Q 1/6876. Способ выявления вируса *Henipavirus hendraense* методом DETECTR с изотермической амплификацией: заявл. 19.04.2024: опубл. 17.02.2025 / М.А. Капитонова, А.В. Шабалина, **В.Г.Дедков**, А.С. Долгова; заявитель 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. – 12 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.

86. Патент № 2832917 С1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, C12Q 1/6876. Способ выявления вируса *Mammarenavirus tashiroense* методом DETECTR с изотермической амплификацией: заявл. 14.02.2024: опубл. 10.01.2025 / М.А. Капитонова, А.В. Шабалина, **В.Г.Дедков**, А.С. Долгова; заявитель 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. – 14 с.: 1 ил. – Текст: непосредственный.