

საქართველოსა და მიმდებარე რეგიონებში გავრცელებული
Yersinia pestis შტამების მოლეკულური დახასიათება

ეკატერინე ჟღენტი

სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და მედიცინის ფაკულტეტზე, სიცოცხლის
შემსწავლელ მეცნიერებების დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების
მოთხოვნების შესაბამისად

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: პროფ. რევაზ სოლომონია ბმდ,
მერაბ კეკელიძე ბმდ.

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი, 2019

1.1. განაცხადი

ვაცხადებ, რომ წარმოდგენილი სადისერტაციო ნაშრომი „საქართველოსა და მიმდებარე რეგიონებში გავრცელებული *Yersinia pestis* შტამების მოლეკულური დახასიათება“ ჩემი დამოუკიდებელი კვლევის შედეგია და იგი არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

ეკატერინე ჟღენტი



10. 04. 2019 წ.

1.2. აბსტრაქტი

შავი ჭირი განსაკუთრებით საშიში, მწვავე ინფექციური დაავადებაა, რომელიც დღემდე ჯანმრთელობის საერთაშორისო რეგულაციის განხილვის საგანია. შავი ჭირის გამომწვევი *Yersinia pestis* ბაქტერიული პათოგენებიდან ყველაზე საშიშია, რომელმაც სამი ისტორიული პანდემიის დროს 200 მილიონზე მეტი ადამიანის სიცოცხლე იმსხვერპლა.

კავკასიაში შავი ჭირის 12 ენდემური კერაა გამოვლენილი, აქედან ორი საქართველოს ტერიტორიაზე მდებარეობს. შავი ჭირი არ იქნება აღმოფხვრილი, სანამ გამომწვევი ცირკულირებს ბუნებრივ კერებში, რეზერვუარებში. შესაბამისად, უაღრესად მნიშვნელოვანია კერებში მოცირკულირე შტამების შესწავლა.

მსოფლიოს მოსახლეობის სწრაფი ზრდა, საერთაშორისო ტრანსპორტირების დაჩქარება, ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტული შტამების გაჩენა ზრდის ახალი, განსხვავებული შტამების წარმოშობის და ეპიდემიოლოგიური მდგომარეობის გაუარესების ალბათობას. ასევე არსებობს შავი ჭირის მიკრობის ბიოლოგიურ იარაღად გამოყენების საფრთხე, რასაც შესაძლოა ეპიდემიის ძლიერი ტალღა მოჰყვეს. აქედან გამომდინარე უაღრესად პრიორიტეტულია ამ ორგანიზმის ეპიდემიოლოგიურ თავისებურებებსა და ვირულენტობის მექანიზმებში საფუძვლიანად გარკვევა, სწრაფი დიაგნოსტიკისა და კვლევის მოლეკულურ-ეპიდემიოლოგიური მეთოდების სრულყოფა, რის საფუძველზეც მოხდება დაავადების წყაროს მიკვლევა, ეპიდემიოლოგიური ჯაჭვის ცალკეული რგოლის გამოვლენა, შესაბამისი მკურნალობის და სანიტარულ-ეპიდემიოლოგიური ღონისძიებების დროული განხორციელება.

მოცემული ნაშრომის ძირითად მიზანს წარმოადგენს საქართველოსა და მოსაზღვრე ქვეყნების ტერიტორიაზე არსებული შავი ჭირის კერებიდან იზოლირებული, საქართველოს დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის კოლექციაში არსებული *Y. pestis* 46 შტამის პასპორტიზაცია, გენეტიკური მრავალფეროვნების და ფილოგენიის შესწავლა, იდენტიფიკაციისთვის სპეციფიკური ტესტების პანელის შექმნა.

მოცემული მიზნის მისაღწევად გამოყენებულ იქნა სხვადასხვა მოლეკულური ტიპირების მეთოდები, როგორიც არის PFGE, IS100, SNP გენოტიპირება. ჩატარდა სრული გენომის სექვენირება, რის საფუძველზეც მოხდა მიკროორგანიზმის ვირულენტობასთან დაკავშირებული ლოკუსების დახასიათება, პლაზმიდური სპექტრის განსაზღვრა, CRISPR ტიპირება. შტამებს შორის განსხვავებები ასევე პროტეომიკური კვლევებით იქნა გამოვლენილი.

კვლევის შედეგად მოხდა კოლექციაში არსებული *Y. pestis* შტამების პასპორტიზაცია, მონაცემთა ბაზის შექმნა. სხვადასხვა მეთოდებით გენოტიპირებამ დაადასტურა კავკასიაში *Y. pestis* ორი გენეტიკურად დაშორებული პოპულაციის არსებობა: *Y. pestis* subs. *pestis* bv. *Medievalis* და *Y. pestis* subs. *microtus* bv. *Caucasica*. SNP საქართველოდან, აზერბაიჯანიდან და ჩრდილოეთ კავკასიიდან იზოლირებულმა bv. *Medievalis* შტამებმა მსგავსება გამოავლინეს თურქული იზოლატების მიმართ და განთავსდნენ *Y. pestis* გლობალურ ევოლუციური მოდელის 2.MED1(IX-X) განშტოებაზე, რომელიც ასახავს *Y. pestis* შტამების ჩინეთიდან თურქეთის მიმართულებით ფილოგეოგრაფიულ გავრცელებას.

ქართული *Y. pestis* შტამები მაღალმთიანი კერიდან, სომხურ იზოლატებთან ერთად ფილოგენეტიკური ხის უძველეს განშტოებაზე 0.PE2-ზე განთავსდნენ წინაპარ *Y. pseudotuberculosis* ახლოს, რაც მიუთითებს, რომ bv. *Caucasica* შტამები, *Y. pestis* უძველეს პოპულაციას წარმოადგენენ.

კვლევის შედეგად იზოლატების შორის მრავალი განმასხვავებელი ლოკუსი იქნა გამოავლენილი, რომლებიც კორელაციაში არიან გეოგრაფიულ ლოკაციასთან და იდეალურ სამიზნეებს წარმოადგენენ ზედამხედველობისთვის ახალი ტესტ-სისტემების შესაქმნელად. ასევე შემუშავდა და დაინერგა ქართული შტამებისთვის სპეციფიკური SNP გენოტიპირების პანელი, რაც ახალი იზოლატების ზუსტი გენეტიკური დახასიათების საშუალებას იძლევა. საქართველოში პირველად გახდა ხელმისაწვდომი *Y. pestis* შტამების სრული გენომური სექვენირება.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: *Yersinia pestis*, შავი ჭირი, საქართველო, SNP, სექვენირება, ფილოგენეტიკა

1.3. Abstract

Plague is especially dangerous infectious disease still subject of the International Health Regulations. Etiological agent of plague, *Yersinia pestis* is the most dangerous bacterial pathogen. Plague was the cause of three known historic pandemics, killing more than 200 million people.

Plague is still endemic in different parts of the world. There are 12 natural foci of plague in the Caucasus, two of which are located in Georgia. Plague will not be eliminated until the microorganism circulates in the reservoirs of endemic foci. Therefore it is very important to study circulating strains in the foci.

Plague is considered as a serious bioterrorism threats that can lead to a wave of epidemics of great concern. Thus, it is highly important to study epidemiological characteristics and mechanism of virulence of this organism, develop/improve molecular-epidemiological methods and diagnostics tests for rapid identification and traicing infectious source of the disease for timely implementation of appropriate treatment and sanitary-epidemiological measures.

The aim of this thesis was genotyping and phylogenetic analysis as well as developing specific identification test systems for archival *Y. pestis* strains from plague foci of Georgia and neighboring countries, kept in live culture repository of the National Center for Disease Control and Public Health of Georgia (NCDC).

For this parpouse different molecular typing methods such as PFGE, IS100, SNP genotyping were used. Based on performed whole genome sequencing, different virulence loci of the organism were characterized and CRISPR typing conducted. The differences between the strains of *Y. pestis* were also studied by proteomic approach including 2-D dimensional gel electrophoresis and MS. Several differentially expressed proteins were revealed and for some of them the differences were further validated by Western immunoblotting experiments.

Various genotyping methods confirmed the presence of two genetically distant population of *Y. pestis* in Caucasus region: *Y. pestis* subs. *pestis* bv. *Medievalis* and *Y. pestis*

subs. *microtus* bv. *Caucasica*. Bv. *Medievalis* isolates from Georgia, Azerbaijan and the North Caucasus showed relationship to Turkish isolates and were placed on 2.MED1 IX-X branch of *Y. pestis* Global Evolution Model, reflecting phylogeographic expansion of *Y. pestis* from China to Turkey.

Y. pestis bv. *Caucasica* strains from Georgia and Armenia clustered within one of the most ancient branches of *Y. pestis* global phylogenetic tree, being very close to precursor *Y. pseudotuberculosis*.

Developed new SNP assays and other typing methods can be useful for epidemiological or forensic purposes as molecular markers for specific populations of *Y. pestis* isolates. NGS-based characterization of strains enables to capture whole-genome sequence variations and can provide insights to the understanding mechanisms of pathogenesis and genomic evolution of the organism.

Key words: *Yersinia pestis*, plague, Georgia, SNP, sequencing, phylogenetics

1.4. მადლობა



– გულითად მადლობას ვუხდით ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის მეცნიერებათა და ხელოვნების ფაკულტეტის პროფესორს, ჩემს სამეცნიერო ხელმძღვანელს, ბატონ რევაზ სოლომონიას და თანახელმძღვანელს დოქტორ მერაბ კეკელიძეს სადოქტორო ნაშრომის შესრულების დროს მოცემული რჩევებისთვის და თანადგომისთვის.



– მადლობას ვუხდით ლოს ალამოსის ნაციონალურ ლაბორატორიის (LANL) მეცნიერ თანამშრომლებს, დოქტორ პატრიკ ჩეინის და ტრეისი ერკილას ერთობლივ სამუშაოს შესრულებისას გაწეული დახმარებისთვის.



– მადლობას ვუხდით ლოურენს ბერკლის ნაციონალური ლაბორატორიის (LBNL) პროფესორ ტამას ტოროკს და დოქტორ პინგ ჰუს, ერთობლივ სამუშაოში შეტანილი წვლილისთვის.



– ჩრდილოეთ არიზონას უნივერსიტეტის (NAU), მიკრობული გენეტიკისა და გენომიკის ლაბორატორიის (არიზონა, აშშ) პროფესორ პოლ კეიმს, დოქტორ დევიდ ვაგნერს, დოქტორი დონ ბერდსელს კვლევაში შეტანილი წვლილისთვის.



– ვოლტერ რიდის სამხედრო კვლევითი ინსტიტუტს (WRAIR, მერილენდი, აშშ) და დოქტორ მაიკჯონ ნიკოლიჩს, გაწეული ფინანსური დახმარებისათვის.



– აშშ საფრთხის შემცირების სააგენტოს (DTRA), გაწეული ფინანსური დახმარებისათვის.



– გულითად მადლობას ვუხდით დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის (დკსჯეც) ვირუსოლოგის, მოლეკულური ბიოლოგიისა და გენომის შემსწავლელი დეპარტამენტის თანამშრომლებს ჩემი კვლევების მიმართ გამოჩენილი ყურადღებისა და მხარდაჭერისათვის. ასევე განსაკუთრებული მადლობა მინდა გადავუხადო პროფესორ გურამ კაციტაძეს და პროფესორ პაატა იმნაძეს მოცემული რჩევებისთვის და თანადგომისთვის.

1.5. სარჩევი

1. საწყისი გვერდები.....	i
1.1. განაცხადი.....	i
1.2. აბსტრაქტი.....	ii
1.3. Abstract.....	iv
1.4. მადლობა	vi
1.5. სარჩევი	vii
1.6. ილუსტრაციების ჩამონათვალი	x
1.7. ცხრილების ჩამონათვალი	xiii
1.8. აბრევიატურების, განმარტებების, ერთეულების ჩამონათვალი	xiv
2. ძირითადი ნაწილი.....	1
2.1. შესავალი	1
2.2. სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა	6
ისტორიული მიმოხილვა	6
პანდემიები	6
შავი ჭირი – ბიოლოგიური იარაღი.....	8
შავი ჭირი - შემთხვევები საქართველოში	9
საქართველოს ტერიტორიაზე არსებული შავი ჭირის ბუნებრივი კერები.....	11
მიკრობის აღმოჩენის ისტორია	14
მიკრობის ზოგადი დახასიათება	15
ეპიდემიოლოგია	16
შავი ჭირის მიკრობის სასიცოცხლო ციკლი	18
შავი ჭირის კლინიკური ფორმები	21
ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა	25
შიდასახეობრივი ტაქსონომია	28

წარმოშობა	29
ვირულენტობის ფაქტორები	31
გენოტიპირება.....	34
2.3. კვლევის მეთოდები.....	41
კვლევებში გამოყენებული მასალები.....	41
პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში.....	43
გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში – PFGE	48
IS100 გენოტიპირება	50
ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი - SNP	53
SNP მიკროარე.....	58
სრული გენომის სექვენირება	60
პროტეომიკული კვლევები	63
2.4. მიღებული შედეგები	70
პჯრ რეალურ დროში. დეტექცია	70
გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში – (PFGE).....	74
IS100 გენოტიპირება	78
პჯრ-ზე დაფუძნებული - SNP ტიპირება.....	79
მაღალი სიმჭიდროვის SNP მიკროარეზე ტიპირება	85
სრული გენომის სექვენირება	88
pgm	89
LcrV.....	90
CRISPR ტიპირება	91
სრული გენომის სექვენირებაზე დაფუძნებული ფილოგენეტიკური ანალიზი...	94
პლაზმიდები	96
პროტეომიკული კვლევები.....	99

2.5. შედეგების განხილვა	109
2.6. დასკვნები.....	119
3. ბოლო გვერდები.....	121
3.1. გამოყენებული ლიტერატურა	121
3.2. პუბლიკაციები	134
3.3. დანართები	135
დანართი 1. დესჯეც კოლექციაში არსებული <i>Y. pestis</i> შტამების მახასიათებლები .	135
დანართი 2. პჯრ დაფუძნებულ SNP ტიპირებისთვის გამოყენებული SNP-ები.....	138

1.6. ილუსტრაციების ჩამონათვალი

სურათი 1. შავი ჭირის ბუნებრივი კერები (2016წ.)	2
სურათი 2. "შავი ჭირის ექიმის" სამოსი შუა საუკუნეებში.....	7
სურათი 3. შავი ჭირის სამი ისტორიული პანდემიის გავრცელების რუკა	8
სურათი 4. ბაქტერიოლოგიური იარაღი..	9
სურათი 5. სამარხები, ანატორები	10
სურათი 6. შავი ჭირის ბუნებრივი კერები საქართველოში.....	11
სურათი 7. შავი ჭირის რეზერვუარები საქართველოში.....	12
სურათი 8. შავი ჭირის გადამტანები საქართველოში, ექტოპარაზიტები	12
სურათი 9. შავი ჭირის ბაცილა.....	14
სურათი 10. შავი ჭირის მიკრობის აღმომჩენები.	14
სურათი 11. <i>Y. pestis</i> 48 (ა) და 72 საათიანი კულტურა (ბ).	16
სურათი 12. შავი ჭირის მიკრობის სასიცოცხლო ციკლი.	21
სურათი 13. შავი ჭირის კლინიკური გამოვლინება.	24
სურათი 14. შავი ჭირის კლინიკური ნიმუშების ანალიზისთვის შემუშავებული ალგორითმი	27
სურათი 15. <i>Yersinia spp.</i> III ტიპის სეკრეციულ აპარატი (T3SS).	32
სურათი 16. <i>Y. pestis</i> SNP ევოლუციური მოდელი.....	38
სურათი 17. CRISPR-Cas სისტემის წყობა	39
სურათი 18. დესჯეც-ის კოლექციაში არსებული <i>Y. pestis</i> შტამების იზოლაციის ადგილები	43
სურათი 19. ჰიბრიდიზაციული ზონდები. ილუსტრაცია.....	44
სურათი 20. პჯრ-ზე დაფუძნებული IS100 ტიპირება. ილუსტრაცია	50
სურათი 21. სავარაუდო SNP-ების გადამოწმება. Integrative Genomic Viewer (IGV).	54
სურათი 22. melt-MAMA პჯრ-ის SNP ალტერნატიული ფორვარდ პრაიმერების კონკურენციის პრინციპის ილუსტრაცია.....	55

სურათი 23. გენომურ ბანკში ატვირთული 11 <i>Y. pestis</i> გენომებისათვის მინიჭებული ნუმერაცია.	61
სურათი 24. პჯრ <i>Y. pestis</i> ქომოსომულ (<i>yihN</i>) და პლაზმიდურ (pCD, pMT, pCP) მარკერებზე	71
სურათი 25. პჯრ რეალურ დროში <i>Y. pestis yihN</i> მარკერზე.....	72
სურათი 26. <i>Y. pestis</i> შტამების რესტრიქციული ანალიზი <i>XbaI</i> ენდონუკლეაზით.....	77
სურათი 27. <i>Y. pestis</i> შტამების რესტრიქციული ანალიზი <i>SpeI</i> ენდონუკლეაზით	77
სურათი 28. 46 <i>Y. pestis</i> შტამის IS100 დენდროგრამა.	78
სურათი 29. IS100 გენოტიპირება. პჯრ. 0708F და 0705R პრაიმერებზე	79
სურათი 30. canSNP გენოტიპირების საფუძველზე სამუზეუმო შტამების <i>Y. pestis</i> ევოლუციურ მოდელზე განთავსება	80
სურათი 31. SNP ფილოგენეტიკური ხის 2MED1 განშტოება.....	81
სურათი 32. გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხის 0.PE2 განშტოება.	82
სურათი 33. SNP ფილოგენეტიკური ხის 0.PE2b განშტოების ახალი ქვეჯგუფები.	83
სურათი 34. <i>Y. pestis</i> 2694 SNP გენოტიპირების საფუძველზე აგებული დენდროგრამა.	86
სურათი 35. <i>pgm</i> -ლოკუსის და მისი მოსაზღვრე უბნების შედარება.....	90
სურათი 36. <i>lcrV</i> ამინომჟავური თანამიმდევრობების შედარება (ფრაგმენტი).	91
სურათი 37. <i>Y. pestis</i> სამი CRISPR ლოკუსის (YP1, YP2, YP3) წყობა.....	92
სურათი 38. <i>Y. pestis</i> შტამების სამი CRISPR ლოკუსის (YP1, YP2, YP3) სპეისერები. ..	93
სურათი 39. <i>Y. pestis</i> სამი CRISPR ლოკუსის ლიდერული თანამიმდევრობის (leader sequences) შედარება MAFFT პროგრამის გამოყენებით. და AT- მდიდარი უბანი გამოყოფილია წითელი ჩარჩოთი.....	93
სურათი 40. <i>Y. pestis</i> იზოლატების განთავსება CRISPR დაფუძნებულ ევოლუციურ მოდელში [107].	94
სურათი 41. CRISPR-Cas სისტემის წყობა.	94
სურათი 42. <i>Y. pestis</i> სრული გენომის სექვენირების საფუძველზე აგებული ფილოგენეტიკური ხე	95
სურათი 43. #790 შტამის ქიმერული პლაზმიდა (pMT/pCD)	97

სურათი 44. <i>Y. pestis</i> (შტამი #1853, მდგომარეობა 28°C) ცილოვანი ექსტრაქტის ვერცხლით შეღებილი 2-განზომილებიანი	99
სურათი 45. ვესტერნ ბლოტის აუტორადიოგრამები და საკალიბრაციო მრუდები. ყველა ცდაში ვიყენებით ერთიდაიგივე სტანდარტს, რომელიც წარმოადგენდა ყველა საცდელი <i>Y. pestis</i> -ის ცილოვანი ექსტრაქტის ნარევს.	101
სურათი 46. F1 ანტიგენის ფარდობითი რაოდენობები #1390, #1853, #2944, და #8787 <i>Y. pestis</i> -ის შტამებში ზრდის შემდეგი პირობებისას: (A) 28°C; (B) 28°C, Ca ²⁺ ; (C) 37°C; და (D) 37°C, Ca ²⁺	103
სურათი 47. გარეთა მემბრანული ცილა C პორინის ფარდობითი რაოდენობები 1390, 1853, 2944, და 8787 <i>Y. pestis</i> -ის შტამებში შემდეგი ზრდის პირობებისას: (a) 28°C; (B) 28°C, Ca ²⁺ ; (c) 37°C; და (D) 37°C, Ca ²⁺	104
სურათი 48. ტელურიუმ რეზისტენტული ცილის ფარდობითი რაოდენობები #1390, #1853, #2944, და #8787 <i>Y. pestis</i> -ის შტამებში შემდეგი ზრდის პირობებისას: (a) 28°C; (B) 28°C, Ca ²⁺ ; (c) 37°C; და (D) 37°C, Ca ²⁺	106
სურათი 49. დნმ-დამაკავშირებელის ცილა H-NS-ის ფარდობითი რაოდენობები 1390, 1853, 2944, და 8787 <i>Y. pestis</i> -ის შტამებში შემდეგი ზრდის პირობებისას: (a) 28°C; (B) 28°C, Ca ²⁺ ; (c) 37°C; და (D) 37°C, Ca ²⁺	107
სურათი 50. #1390, #1853, #2944, #8787 და EV <i>Y. pestis</i> -ის შტამებით ინდუცირებული მაკროფაგების კასპაზა-3-ის აქტივობები.	108

1.7. ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1. დკსჯეც-ის ეროვნულ კოლექციაში დაცული <i>Y. pestis</i> შტამები.....	41
ცხრილი 2. Idaho Technology <i>Y. pestis</i> რეალურ დროში პჯრ პირობები	45
ცხრილი 3. <i>Y. pestis</i> სპეციფიკური პრიმერები და ფლ. ზონდები.	46
ცხრილი 4. <i>Y. pestis</i> ქრომოსომული და პლაზმიდური მარკერებისთვის პჯრ რეაქციის ნარევის მომზადების ცხრილი	46
ცხრილი 5. <i>Y. pestis</i> ქრომოსომული და პლაზმიდური მარკერებისზე პჯრ პირობები	47
ცხრილი 6. IS100 პჯრ გენოტიპირების პრაიმერები	50
ცხრილი 7. IS100 ტიპირების პჯრ პირობები	52
ცხრილი 8. SNP პჯრ სარეაქციო ნარევი. კონკურენტული რეაქცია.	57
ცხრილი 9. SNP პჯრ სარეაქციო ნარევი. არაკონკურენტული რეაქცია.	57
ცხრილი 10. SNP ტიპირება; პჯრ პირობები	57
ცხრილი 11. პჯრ შედეგები.	72
ცხრილი 12 <i>Y. pestis</i> შტამების <i>SpeI</i> და <i>XbaI</i> რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით PFGE ანალიზი.....	75
ცხრილი 13. <i>Y. pestis</i> შტამების <i>SpeI</i> და <i>XbaI</i> რესტრიქციით მიღებული PFGE პროფილები	76
ცხრილი 14. Melt-MAMA ანალიზისათვის შერჩეული კანონიკური SNP (canSNP) პრაიმერები:	83
ცხრილი 15. SNP ვარიაციები ქართულ <i>Pestoides/microtus</i> შტამებში	87
ცხრილი 16. ახალი ტესტებისთვის კანდიდატი SNP-ები	88
ცხრილი 17. <i>Y. pestis</i> 11 სექვენირებული შტამის ძირითადი მახასიათებლები.	97
ცხრილი 18. 2-განზომილებიანი ელექტროფორეზით და მს-ით იდენტიფიცირებული განსხვავებულად ექსპრესირებული ცილები შტამის და ფიზიოლოგიური მდგომარეობის მიხედვით	100

1.8. აბრევიატურების, განმარტებების, ერთეულების ჩამონათვალი

bv.	– ბიოვარი, ბვ., (biovar)
bp	– ნუკლეოტიდურ ფუძეთა წყვილი (base pair)
CSB	– უჯრედების სუსპენზირების ბუფერი (Cell Suspension Buffer: 100mM Tris; 100mM EDTA; pH_8.0)
can-SNP	–SNP რომლებიც გამოყოფენ/განასხვავებენ ორ კლასტერს/ჯგუფს ერთმანეთისგან
CRISPR	–კლასტერული მოკლე პალინდრომული განმეორებები, რომლებიც სპეისერებით არიან განცალკევებულნი (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
CRA	– კონგოს წითელი აგარი (Congo-Red agar)
dNTP	– დეზოქსინუკლეოზიდტრიფოსფატები (Deoxynucleotide triphosphates)
DRs	– პირდაპირი განმეორებები (Direct repeats)
EDTA	–ეთილენდიამინტეტრააცეტატის მჟავა (Ethylenediaminetetraacetic acid)
fg	–ფემტოგრამი, ფგ., 10^{-15} გრამი
Fpr/Fp	–წინა, ფორვარდ პრაიმერი (Forward primer)
IS	– ინსერციული, ჩართული თანამიმდევრობები (Insertion Sequence)
Kb	– 10^3 ნუკლეოტიდი.
Mb	– 10^6 ნუკლეოტიდი (Megabase)
melt-MAMA	–მუტაციის ანალიზი, არასწორად შეწყვილებული ფუძეების ამპლიფიკაციის ლლობის მრუდებით (Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays)
μg	–მიკროგრამი, მკგ, გრამის ერთი მემილიონედი ნაწილი (10^{-6} გრამი)
MLVA	–მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი (Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis)
PCR	–პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია, პჯრ (Polimerase Chain Reaction)

PFGE	–გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (Pulsed Field Gel-Electrophoresis)
PMNs	–პოლიმორფულბირთვიანი ლეიკოციტები (polymorphonuclear leukocytes)
real-time PCR	–პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში
RFLP	–რესტრიქციული ფრაგმენტების სიგრძის პოლიმორფიზმი (Restriction Fragment Length Polymorphism)
Rpr/Rp	–უკუ, რევერს პრაიმერი (Reverse primer)
SDS	–ნატრიუმის დოდეცილსულფატი (Sodium dodecyl sulfate)
SNP	– ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (Single Nucleotide Polymorphism)
subp.	–ქვესახეობა (subspecies)
TBE	– ტრის - ბორის მჟავა-ეთილენდიამინოტეტრამმარმჟავა (Tris 130 mM; EDTA 2.5 mM; ბორის მჟავა 45 mM)
TE	–ტრის -ეთილენდიამინოტეტრამმარმჟავა (10mM Tris; 1mM EDTA; pH_8.0)
T3SS	– III ტიპის სეკრეციული აპარატი (type III secretion system)
VNTR	–ცვლადი რაოდენობის ტანდემური განმეორებები (Variable-Number Tandem Repeats)
WGS	–სრული გენომის სექვენირება (Whole Genome Sequence)
ალელები	– მოლეკულურ მარკერზე მიღებული გენოტიპების ვარიანტები
ამპლიკონი	–პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (ამპლიფიკაციის) პროდუქტი
დნმ	– დეზოქსირიბონუკლეინის მჟავა
მს	– მასს-სპექტრომეტრია (Mass Spectrometry)
შტამი	–კონკრეტული წყაროდან (ნებისმიერი ორგანიზმი ან გარემოს ობიექტი) იზოლირებული მიკროორგანიზმების კულტურა
ჯანმო	–ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაცია (The World Health Organization WHO)

2.1. შესავალი

შავი ჭირი განსაკუთრებით საშიში, მწვავე ინფექციურ დაავადებაა. შავი ჭირის სამმა ისტორიულმა პანდემიამ უპრეცედენტო მასშტაბის სიკვდილიანობა გამოიწვია და წარუშლელი კვალი დატოვა კაცობრიობის ისტორიაში; ზემოქმედება მოახდინა და შეცვალა ომების მიმდინარეობა, ურბანიზაცია, პოპულაციის ზრდა, მიგრაცია, კულტურული განვითარება [29]. ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (ჯანმო) მონაცემებით მსოფლიოში დღემდე რეგისტრირდება შავი ჭირის ორი ათასამდე შემთხვევა [130].

შავი ჭირის გამომწვევი, გრამ-უარყოფითი ბაქტერია - *Yersinia pestis* შესულია ბიოტერორიზმის აგენტების A კატეგორიაში *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Francisella tularensis* და *Ebola virus* და *Lassa virus* -თან ერთად [60, 84, 113].

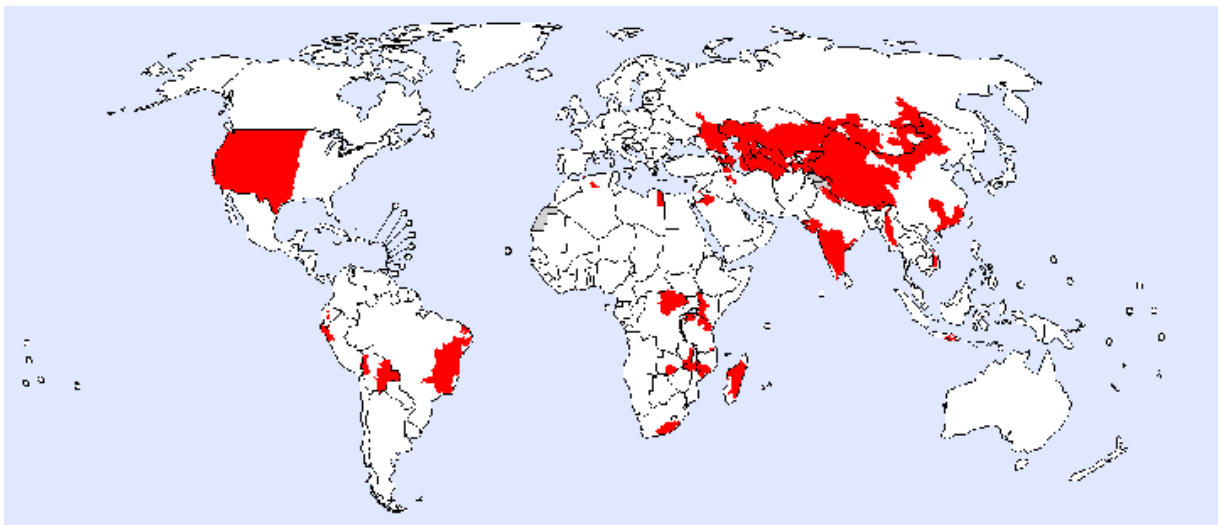
შავი ჭირი სამი საკარანტინო დაავადებიდან ერთ-ერთია (ქოლერასთან და ყვითელი ცხელებასთან ერთად), რომელიც დღემდე ჯანმრთელობის საერთაშორისო რეგულაციის განხილვის საგანს წარმოადგენს.

შავი ჭირი ზოონოზური დაავადებაა. იგი პათოგენურია ადამიანისთვის, მღრღნელების, მტაცებლების, ჩლიქოსნების, პრიმატებისა და ფრინველებისთვისაც კი. მიუხედავად იმისა, რომ ადამიანმა ძლიერ შეუწყო ხელი მსოფლიოს მასშტაბით შავი ჭირის გამომწვევის გავრცელებას, იგი მხოლოდ დროებით მასპინძელს წარმოადგენს. ბუნებაში შავი ჭირის მიკრობის ხანგრძლივი დროით შენარჩუნებაში წამყვანი როლი ძირითად რეზერვუარს, მღრღნელების 300-მდე სახეობას უკავია [59].

ბაქტერიის გადაცემის მექანიზმი, რაც უზრუნველყოფს ბუნებრივი კერების შენარჩუნებას, ტრანსმისიულია. ინფექციის გადაცემა ხდება ექტოპარაზიტების - რწყილების საშუალებით. რწყილების დაახლოებით 80-მდე სახეობა შავი ჭირის გადამტანად არის მიჩნეული. მასპინძლების და გადამტანების ასეთი მრავალფეროვნება ზრდის გენეტიკური ცვალებადობის ალბათობას.

კაცობრიობისთვის ცნობილი ერთ-ერთი უძველესი დაავადება - შავი ჭირი, დღემდე მსოფლიოს მრავალ კუთხეში ენდემურია. შავი ჭირის გამომწვევი, *Y. pestis* ყველა კონტინენტზე ცირკულირებს ავსტრალიის გარდა (სურ. 1). შავი ჭირის ბუნებრივ კერებს დედამიწის მშრალი ზედაპირის 6 - 7% უკავია: მსოფლიოს გარშემო

თბილ ტემპერატურულ სარტყელში (ტროპიკულ, სუბტროპიკულ განედებში) ჩრდილოეთის 55°-დან სამხრეთის 40°-მდე. თუმცა ამ საზღვარშიც დიდი არეალი თავისუფალია შავი ჭირის ბუნებრივი კერებისგან (უდაბნოები – სადაც მცირე რაოდენობით ან საერთოდ არ არიან მღრღნელები, ასევე ტროპიკული ტყეები, მყინვარები). შავი ჭირის ეპიდემიებისა და ეპიზოოტიების არსებობის მიუხედავად, ზოგიერთ რეგიონში (ავსტრალია, ჰავაი) არ მოხდა შავი ჭირის კერების ჩამოყალიბება, სავარაუდოდ ენზოოტიისთვის სათანადო რეზერვუარის არარსებობის გამო და დროთა განმავლობაში დაავადება საერთოდ გაქრა [20, 60, 105]. რაც შეეხება კავკასიის რეგიონს, ტერიტორიაზე შავი ჭირის 12 ბუნებრივი კერაა რეგისტრირებული, აქედან ორი საქართველოს ტერიტორიაზე მდებარეობს. შავი ჭირის აღმოფხვრა არ მოხდება მანამ, სანამ ცირკულირებს ბუნებრივ კერებში, რეზერვუარებში. აქედან გამომდინარე, მნიშვნელოვანია *Y. pestis* იზოლატების ზუსტი ლაბორატორიული კლასიფიკაცია იმ შტამების იდენტიფიკაციისათვის, რომლებიც პასუხისმგებელნი არიან ეპიზოოტიებსა და ადამიანის ინფიცირებაზე.



სურათი 1. შავი ჭირის ბუნებრივი კერები (2016წ.)

მედიცინის თანამედროვე მიღწევებმა რეალურად შეამცირა შავი ჭირის მომავალი პანდემიების საფრთხე, თუმცა დაავადების აღმოფხვრა ჯერ-ჯერობით ვერ მოხერხდა. მსოფლიოს სხვადასხვა კუთხეში დღემდე გვხვდება შავი ჭირის ცალკეული, მცირე ეპიდაფეთქებები. შემთხვევების აბსოლუტური უმრავლესობა იმ ქვეყნებზე მოდის სადაც შავი ჭირის ბუნებრივი კერები მდებარეობს. ბოლო 50 წლის მანძილზე მსოფლიოში წლიურად საშუალოდ 1700 შემთხვევამდე რეგისტრირდება.

ჯანმოში 1954-1997 წლებში მიღებული შეტყობინებების მიხედვით შავი ჭირის 80 ათასზე მეტი შემთხვევა დაფიქსირდა მსოფლიოს 38 ქვეყანაში, აქედან 6587 ლეტალური გამოსავლით. შავი ჭირის შემთხვევების მაქსიმალური რაოდენობა დაფიქსირდა 1967 წელს – 6004, ხოლო მინიმალური 1981წ-ს – 200 შემთხვევა. აღსანიშნავია შავი ჭირის ბოლოდროინდელი ეპიდაფეთქება მადაგასკარში, სადაც ჯანმო-ს მონაცემებით 2017 წლის აგვისტოდან ნოემბრის ჩათვლით 2348 შემთხვევა დაფიქსირდა, აქედან 202 ლეტალური გამოსავლით.

არსებობს შავი ჭირის მიკრობის ბიოლოგიურ იარაღად გამოყენების საფრთხე, რასაც შესაძლოა ეპიდემიის ძლიერი ტალღა მოყვეს. აქედან გამომდინარე, უაღრესად პრიორიტეტულია ამ მიკროორგანიზმის დროული იდენტიფიცირება, ეპიდემიოლოგიური თავისებურებებისა და ვირულენტობის მექანიზმებში საფუძვლიანად გარკვევა [8, 13, 31, 47, 48, 52, 55, 56, 86]. დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ამ მიკროორგანიზმის კლასიფიკაციის და ნომენკლატურის შესწავლას. მიუხედავად პათოგენური ბაქტერიების ტაქსონომიაში ბოლო დროის მიღწევებისა, ამ პრობლემის ბევრი ასპექტი იერსინიების კლასის მიმართებით დღემდე შესწავლას საჭიროებს. მრავალმა კვლევამ გამოავლინა სხვადასხვა ბუნებრივი კერიდან გამოყოფილი შავი ჭირის მიკრობებს შორის მნიშვნელოვანი განსხვავებების არსებობა. ასევე მნიშვნელოვანია დნმ-ის თანამიმდევრობებში ცალკეული ცვლილებების ზეგავლენის დადგენა ბაქტერიის პროტეომის შემადგენლობაზე. სათანადოდ *Y. pestis* შიდასახეობრივი გარჩევა-განსხვავება პრაქტიკული მედიცინის ინტერესებში შედის.

მიუხედავად იმისა, რომ ადამიანებში შავი ჭირის შემთხვევების მაჩვენებელი მაღალი არ არის, შეცდომა იქნებოდა ამ დაავადების შესაძლო საფრთხის უგულებელყოფა, ვინაიდან მას ახასიათებს სწრაფი გავრცელება, მწვავე კლინიკური მიმდინარეობა და მკურნალობის გარეშე სიკვდილიანობის მაღალი მაჩვენებელი. ფილტვისმიერი და სეპტიცემიური შავი ჭირის ლეტალობა მკურნალობის გარეშე 100% უახლოვდება. დროული დიაგნოზისა და ანტიბიოტიკოთერაპიის შემთხვევაში, შავი ჭირი შესაძლოა წარმატებულად იქნას დაძლეული, თუმცა მადაგასკარზე ანტიბიოტიკებისადმი მულტირეზისტენტული *Y. pestis* შტამების გამოჩენამ კიდევ ერთხელ ცხადყო შავ ჭირზე ეფექტური ეპიდზედამხედველობის აუცილებლობა [43, 69].

შავი ჭირის ეპიდაფეთქებები გავლენას ახდენს მოსახლეობის არა მარტო ჯანმრთელობაზე, არამედ კოლექტიურ ფსიქიკაზეც. ამის ნათელ მაგალითს წარმოადგენს ეპიდაფეთქება ინდოეთში; მიუხედავად იმისა რომ მსხვერპლთა რიცხვი დიდი არ იყო (სამოცამდე ადამიანი გარდაიცვალა), ეპიდაფეთქებას მოჰყვა მასობრივი პანიკა, ქვეყნის მასშტაბით ტურიზმისა და ვაჭრობის კოლაფსი, ეკონომიკურმა ზარალმა ნახევარ მილიარდ აშშ დოლარს გადააჭარბა [43, 86, 130].

მსოფლიოს მოსახლეობის სწრაფი ზრდა, საერთაშორისო ტრანსპორტირების ძლიერ დაჩქარება, ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტული შტამების გაჩენა, ასევე რწყილების გაზრდილი რეზისტენტობა ინსექტიციდების მიმართ, საერთაშორისო ტერორიზმის საფრთხის არსებობა ზრდის ახალი, განსხვავებული შტამების გაჩენის და ეპიდემიოლოგიური მდგომარეობის გაუარესების ალბათობას [69, 86]. ამასთანავე, დაავადება შესაძლოა ხელახლა გაჩნდეს იმ ადგილებში, სადაც დიდი ხნის მანძილზე არ იყო გამოვლენილი [61, 129]. ზემოთ აღნიშნული ნათელს ხდის *Y. pestis* შტამების სწრაფი დიაგნოსტიკისა და მოლეკულურ - ეპიდემიოლოგიური მეთოდების სრულყოფის აუცილებლობას, რომელიც მიმართული იქნება სხვადასხვა ბუნებრივ კერებში არსებული შტამების გენეტიკურ პასპორტიზაციაზე, რის საფუძველზეც მოხდება დაავადების წყაროს მიკვლევა, და შესაბამისი მკურნალობის და სანიტარო-ეპიდემიოლოგიური ღონისძიებების განხორციელება.

აქედან გამომდინარე, უდიდეს მნიშვნელობას იძენს კვლევის ახალი თანამედროვე მეთოდების დანერგვა და განვითარება კლინიკურ დიაგნოსტიკასა და ეპიდემიოლოგიურ კვლევებში. ამ მხრივ პერსპექტიულად ითვლება მოლეკულურ - ბიოლოგიური კვლევის მეთოდები, განსაკუთრებით რამდენიმე მეთოდის კომპლექსური გამოყენება [114, 117], რაც საშუალებას იძლევა უფრო ზუსტად გამოვლინდეს ეპიდემიოლოგიური ჯაჭვის ცალკეული რგოლი და მოხდეს კერის დროული ლოკალიზაცია.

მოცემული ნაშრომის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა საქართველოსა და მოსაზღვრე ქვეყნების ტერიტორიაზე არსებული შავი ჭირის კერებიდან იზოლირებული, საქართველოს დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის (დკსჯეც) ბაქტერიებისა და ვირუსების ეროვნულ საცავში არსებული *Y. pestis* 46 შტამის პასპორტიზაცია, გენეტიკური

მრავალფეროვნების და ფილოგენიის შესწავლა. ქართული *Y. pestis* შტამების სწრაფი და ზუსტი იდენტიფიკაციისთვის სპეციფიკური ტესტების პანელის შექმნა.

დასახული მიზნის ფარგლებში დასმული იქნა კონკრეტული ამოცანები:

- ✓ *Y. pestis* სწრაფი დეტექციის და იდენტიფიცირების მიზნით პჯრ რეაქციების ოპტიმიზაცია;
- ✓ დკეც ბაქტერიების და ვირუსების ეროვნულ კოლექციაში არსებული შტამების პლაზმიდური სპექტრის შესწავლა;
- ✓ სხვადასხვა რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით *Y. pestis* შტამის PFGE დაქტილოსკოპიის მეთოდით პასპორტიზაცია (ტიპება);
- ✓ პჯრ-ზე დაფუძნებული IS100 მეთოდით შტამების გენოტიპირება;
- ✓ შტამების დახასიათება ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის, ე.წ. SNP ტიპირების მეთოდის გამოყენებით;
- ✓ გენოტიპირება მაღალი სიმჭიდროვის SNP მიკროარეების საშუალებით;
- ✓ სრული გენომის სექვენირების საფუძველზე სხვადასხვა ვირულენტობასთან ასოცირებული უბნების დახასიათება;
- ✓ გენოტიპირება კლასტერული მოკლე პალინდრომული განმეორებებით (CRISPR ტიპირება);
- ✓ *Y. pestis* შტამების გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე განთავსება და შტამებს შორის ევოლუციური კავშირების დადგენა;
- ✓ გენოტიპირების სხვადასხვა მეთოდის გარჩევადობის ხარისხის და კლასტერიზაციის სიზუსტის განსაზღვრა;
- ✓ განახლებადი ელექტრონული მონაცემთა ბაზის შექმნა;
- ✓ შედარებითი პროტეომიკის მეთოდით ბაქტერიის სხვადასხვა შტამებს შორის განსხვავების გამოვლენა ცილოვან დონეზე;

2.2. სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

ისტორიული მიმოხილვა

პანდემიები

შავი ჭირის ეპიდემიის შესახებ ინფორმაცია დღემდე მოღწეულ წყაროთა შორის უძველეს, შუმერულ ლიტერატურულ ნაწარმოებში, გილგამეშის ეპოსშია მოცემული (ჩვ.წ.აღ.-მდე XXII საუკუნე). შავი ჭირის ეპიდემია ასევე აღწერილია ბიბლიაში (სამუელის პირველ წიგნში, I თავი) ებრაელებსა და ფილისტიმელებს შორის ომის დროს (ჩვ.წ.აღ.-მდე 1320წ.). ისტორიულ ცნობებით ათენში, პელოპონესის ომის დროს ჩვ.წ.აღ.-მდე 430წ-ს შავი ჭირის ეპიდემიამ დაახლოებით 300000 ადამიანის სიცოცხლე იმსხვერპლა (მოსახლეობის ერთი მესამედი) და კლასიკური საბერძნეთის შესუსტებისა და დაცემის მიზეზი გახდა.

ჩვენს ერაში შავი ჭირის ეპიდემიები 5-12 წლიანი ციკლისაგან შემდგარ სამ პანდემიაში ერთიანდება. შავი ჭირის პირველი პანდემია, რომელიც ცნობილია “იუსტინიანეს ჭირის” სახელით (ჩვ.წ.აღ.-ით 541-767წწ), დაიწყო ჩვ.წ.აღ.-ით 541-წელს აღმოსავლეთ რომის იმპერიაში (ეგვიპტეში ან ეთიოპიაში), ბიზანტიის იმპერატორის იუსტინიანე I-ის მმართველობისას, საიდანაც სავაჭრო გზებით (ხმელთაშუა ზღვა) დაავადებამ მიაღწია კონსტანტინოპოლს, ხოლო აქედან გავრცელდა ბიზანტიის ჩრდილოეთ, სამხრეთ და აღმოსავლეთ ნაწილებში. 654 წლისთვის ეპიდემიამ მოიცვა ჩრდილოეთ აფრიკა, მთელი ევროპა, ცენტრალური და სამხრეთ აზია, არაბეთი. როგორც ისტორიულ დოკუმენტებშია აღწერილი, “ბიზანტიის იმპერიაში ეპიდემიამ აპოგეას 544წ-ს მიაღწია, როცა კონსტანტინოპოლში ყოველდღიურად 5000 ადამიანი კვდებოდა, ხოლო ცალკეულ დღეებში გარდაცვლილთა რიცხვი 10000-ს აღწევდა”. აღმოსავლეთში შავი ჭირმა დაახლოებით 100 მილიონი, ხოლო ევროპაში 25 მილიონი ადამიანის სიცოცხლე შეიწირა (კონსტანტინოპოლის მოსახლეობის 40%). შავი ჭირი გახდა ბიზანტიის იმპერიის შესუსტების ერთ-ერთი მთავარი მიზეზი და ასევე, სავარაუდოდ, წვლილი შეიტანა თაობების შემდგომ არაბი დამპყრობლების წარმატებაში ბიზანტია-არაბეთის ომის დროს [28, 102].

შავი ჭირის მეორე პანდემია რომელიც ცნობილია “შავი სიკვდილის” და “დიდი პესტიცემიის” სახელით, დაიწყო ჩინეთიდან 1334 წ. და შემდეგ სავაჭრო გზებით გავრცელდა დასავლეთის მიმართულებით, შავი ზღვისკენ, ყირიმისკენ და საბოლოოდ მიუახლოვდა და გავრცელდა მთელს ევროპაში. ეს პანდემია, გაგრძელდა 130წ-ზე მეტ ხანს და მსოფლიოს მაშტაბით დაახლოებით 75 მლნ ადამიანის სიცოცხლე შეიწირა, აქედან ევროპის მოსახლეობის 20-30 მლნ-ი, რაც მაშინდელი პოპულაციის 1/3-ს წარმოადგენდა (30-60%). მსოფლიოს პოპულაცია 1400წ-თვის 450მლნ-დან დაახლოებით 350-370 მლნ-მდე შემცირდა [74, 119, 121].



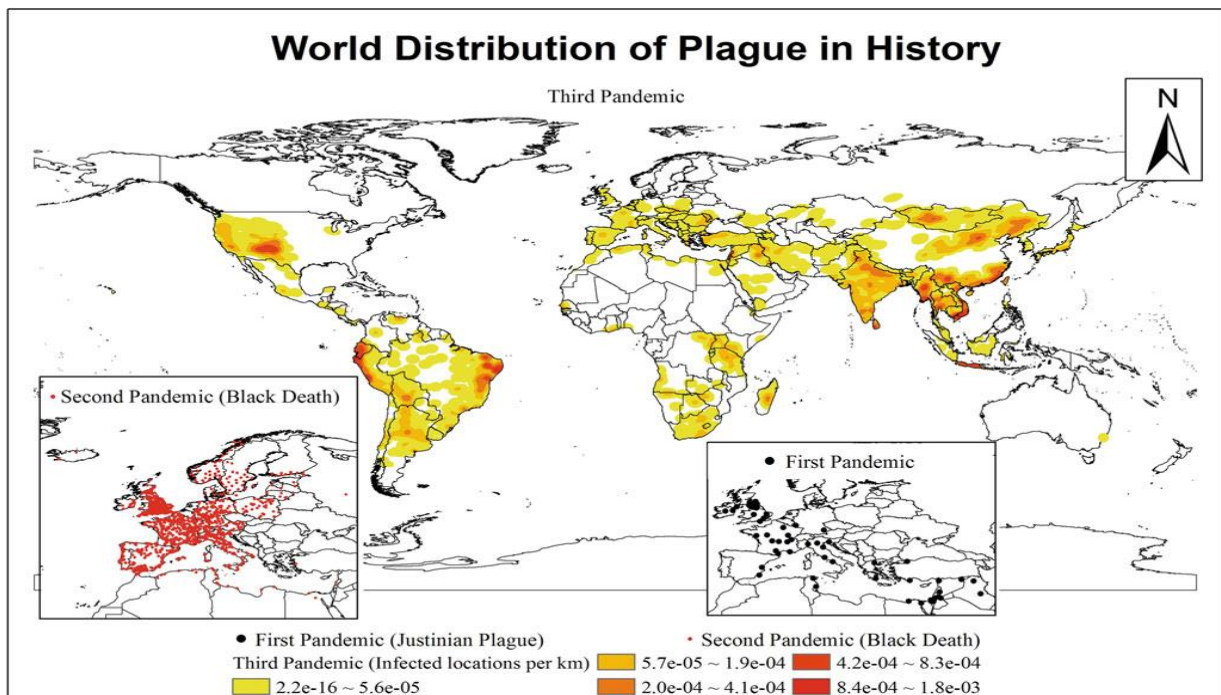
სურათი 2. "შავი ჭირის ექიმის" სამოსი შუა საუკუნეებში: ქუდი, ფრინველის ნისკარტისმაგვარი ნილაბი, გრძელი მოსასხამი და სათვალე. ჯოხი ახორციელებდა მაჩვენებელის ფუნქციას რათა პაციენტები დარჩენილიყვნენ მანძილზე.

“შავი სიკვდილის” ეპიდემია 1351 წლისათვის დასრულდა, მაგრამ დაავადება მაინც არსებობდა და განსხვავებული ინტენსივობით რეგულარულად იჩენდა თავს XVII საუკუნის ბოლომდე. ამ დროის მანძილზე ევროპას 100-ზე მეტმა ეპიდემიამ გადაუარა. ყველაზე საგულისხმოა 1361 წლისა და 1369 წლის ეპიდემიები. ამის შემდგომ ეპიდემიათა შორის პერიოდები შედარებით გახანგრძლივდა.

მესამე პანდემია დაიწყო ჩინეთში 1855წ.-ს და ორთქმავალი გემით სწრაფად გავრცელდა ყველა დასახლებულ კონტინენტზე [20, 37, 60, 105]. 10 წლის განმავლობაში (1894 - 1903) შავმა ჭირმა შეაღწია ხუთი კონტინენტის 77 პორტში: აზიაში (31 პორტში), ევროპაში (12), აფრიკაში (8), ჩრდილოეთ ამერიკაში (4), სამხრეთ ამერიკასა (15) და ავსტრალიაში (7). მხოლოდ ინდოეთში 1898 – 1918წ-ში 12.5 მლნ. ადამიანის სიცოცხლე შეიწირა. ეს პანდემია დასაწყისი იყო მომდევნო საუკუნეში შავი ჭირის ეპიდემიებისა, რამაც დიდი კვალი დაამჩნია ევროპასა და აფრიკას. მიუხედავად იმისა რომ მესამე პანდემია შესუსტებულია, ის კვლავ მიმდინარედ ითვლება [45, 65, 104, 105] (სურ. 3).

წინა საუკუნეებთან შედარებით მეოცე საუკუნეში, მკვეთრად შემცირდა შავი ჭირის გავრცელება და სიკვდილიანობის კოეფიციენტი, რაც ძირითადად ჯანდაცვის

ეფექტური ღონისძიებებით და ანტიბიოტიკების აღმოჩენით (1950 წლიდან) იყო განპირობებული. თუმცა ეს პანდემია გახდა ენზოოტიური კერების გაჩენის მიზეზი ყველა დასახლებულ კონტინენტზე, ავსტრალიის გარდა [8, 9, 20, 37, 90, 105]. დღეისათვის შავი ჭირის ბუნებრივი კერები გვხვდება ჩრდილოეთ და სამხრეთ ამერიკაში, აფრიკასა და აზიაში, და სამხრეთ აღმოსავლეთ ევროპის შედარებით მცირე ტერიტორიაზე. ევროპაში შავი ჭირის ბუნებრივი კერები დღემდე შემორჩენილია კავკასიის ტერიტორიაზე, სადაც 12 ბუნებრივი კერაა რეგისტრირებული, აქედან ორი საქართველოს ტერიტორიაზე მდებარეობს.



სურათი 3. შავი ჭირის სამი ისტორიული პანდემიის გავრცელების რუკა [115].

შავი ჭირი – ბიოლოგიური იარაღი

ჯერ კიდევ უძველესი დროიდან ხდებოდა შავი ჭირის ბიოლოგიურ იარაღად გამოყენება. კერძოდ თურქები და მონღოლები, ძველ ჩინეთსა და შუასაუკუნეების ევროპაში დაავადებული ცხოველების გვამებით (ცხენების, ძროხების) და ადამიანების ცხედრებით აბონძურებდნენ წყლის საცავების, წყალგაყვანილობის სისტემებს, არხებს. არსებობს ისტორიული ცნობები, ზოგიერთი ქალაქის ალყის დროს, ინფიცირებული მასალის კატაპულტირების შესახებ.

მეორე მსოფლიო ომის დროს იაპონიის შეიარაღებული ძალების კუთვნილი თვითმფრინავებიდან ხდებოდა შავი ჭირით დაინფიცირებული რწყილების გადმოყრა (სურ. 4). სპეციალური რაზმი „731“ მიზანმიმართულად ანფიცირებდა ჩინეთში, კორეასა და მანჯურიაში მშვიდობიან მაცხოვრებლებსა და ტყვეებს, მათზე ატარებდნენ სამედიცინო კვლევებსა და ექსპერიმენტებს, მასობრივი განადგურების ბიოლოგიური იარაღის შემუშავების მიზნით [113]. ასევე შეიმქნა



სურათი 4. ბაქტერიოლოგიური იარაღი. კერამიკული ბომბი, რომელშიც შავი ჭირით ინფიცირებული რწყილების კოლონია იყო მოთავსებული.

შავი ჭირის შტამი, რომლის ვირულენტობაც 60-ჯერ აღემატებოდა საწყისი შტამის ვირულენტობას. ასეთი შტამი ბუნებრივად გავრცელების უნარის მქონე, ეფექტურ მასობრივი განადგურების იარაღს წარმოადგენდა.

მეორე მსოფლიო ომის შემდეგ, საბჭოთა კავშირში და აშშ-ში ბიოლოგიური იარაღის შექმნის პროგრამის ფარგლებში, მუშაობდნენ პნევმონიური შავი ჭირის ბიოლოგიური იარაღის შექმნაზე. ექსპერიმენტები სხვადასხვა მიმართულებით მიმდინარეობდა. შემუშავდა უდიდესი საფრთხის შემცველი შავი ჭირის პირდაპირი აეროზოლირების ტექნიკა, რამაც შეამცირა დაავადების გავრცელების დამოკიდებულება ვექტორზე - რწყილზე. ინფორმაცია მრავალი ასეთი პროექტის შესახებ დღემდე არ არის ხელმისაწვდომი.

შავი ჭირი - შემთხვევები საქართველოში

ქართულ ხელნაწერებში შავი ჭირი პირველად „უსწორო კარაბადინში“ XI საუკუნეშია მოხსენებული. XV საუკუნის ხელნაწერში - „სამკურნალო წიგნი - კარაბადინი“ უფრო დეტალური ინფორმაციაა მოწოდებული შავი ჭირის, კერძოდ, მისი ბუბონური ფორმის კლინიკური გამოვლინების შესახებ. 1616წ.-ს დასავლეთ

საქართველოში აღწერილ იქნა შავი ჭირის შემთხვევები, რომელიც, შესაძლოა, კათოლიკე მისიონერების მიერ იქნა შემოტანილი.

ქართულ ფოლკლორში შავი ჭირი ხშირად მოიხსენიება “ჟამის” სახელით. ისტორიულად ცნობილია, რომ საქართველოს მთიანი რეგიონის (ხევსურეთი) მოსახლეობა შავი ჭირით დაავადებული ადამიანების იზოლაციისთვის აგებდა სამარხებს, ე.წ. “ანატორებს”. ანატორა სოფლის სახელია ხევსურეთში, სადაც პირველად აიგო აღნიშნული ტიპის სამარხი და რომელიც შემდგომ, XIX ს-ის დასაწყისში დაიცალა შავი ჭირის გავრცელების გამო. მსგავსი სამარხები დღემდე შემორჩენილია ხევსურეთსა და თუშეთში (სურ. 5).



სურათი 5. შავი ჭირით დაავადებული ადამიანების იზოლაციისთვის აგებდა სამარხები, ანატორები

ოფიციალურ საარქივო ცნობების მიხედვით, საქართველოში შავი ჭირის ეპიდემიები მე – 19 საუკუნის დასაწყისში, კერძოდ, 1803 –1807 წწ, 1811 – 1812 წწ, 1838 – 1843 წწ დაფიქსირდა. 1801-1803 წლებში შავი ჭირის ეპიდემიები იყო თბილისში, გორში, თელავში, ეპიდემია გასცდა აღმოსავლეთ საქართველოს ფარგლებს და დასავლეთ საქართველოშიც შეაღწია. ისტორიული ცნობებით 1570 ადამიანი გარდაიცვალა. 1806-1808 წლებში ეპიდემიები ადგილი ჰქონდა გორში, ანანურში, ქარელში.

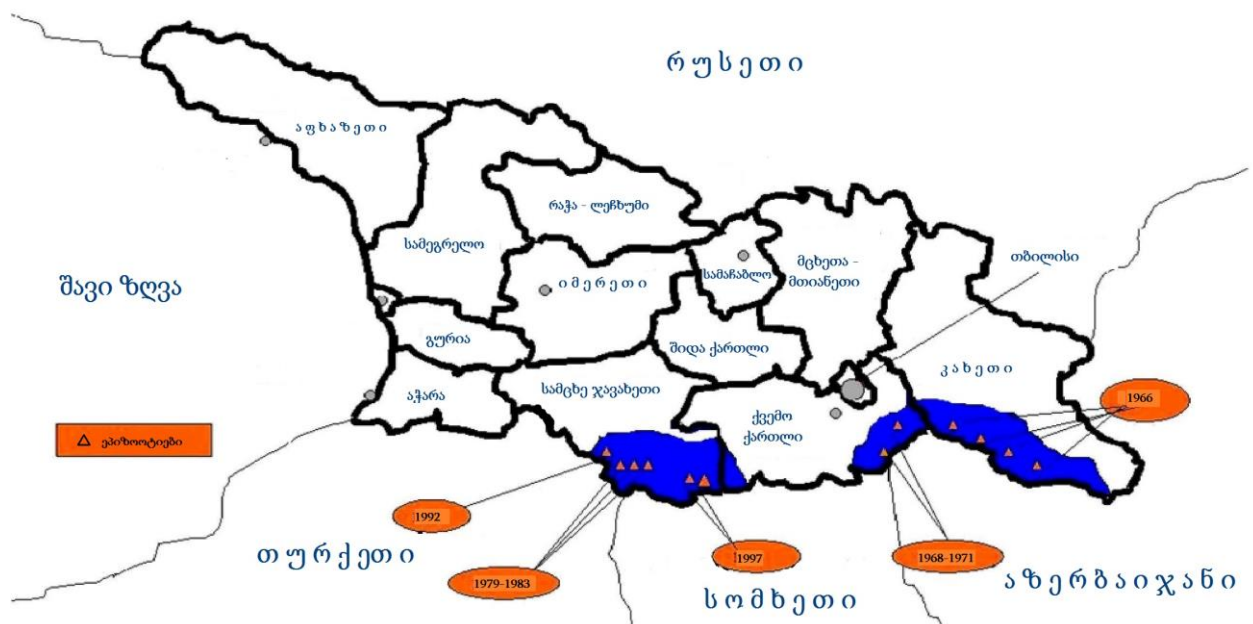
1811-1812წ.წ. ეპიდემია ჯავახეთიდან, კერძოდ ახალციხიდან დაიწყო და უპირატესად დასავლეთ საქართველოში გავრცელდა (რაჭა, იმერეთი). ოფიციალური მონაცემებით 2787 ადამიანი გარდაიცვალა.

1838–1843 წწ შავი ჭირის მესამე ეპიდემია კვლავ სამხრეთ საქართველოდან, ახალციხიდან დაიწყო. დაავადების აღწერილობა და ლეტალობის მაჩვენებელი შავი ჭირის ბუბონურ ფორმაზე მიუთითებს. მხოლოდ 1836 წლის აპრილ-ოქტომბერში 286

ინფიცირებულიდან 208 გარდაიცვალა. ეპიდემია 1843 წლის ბოლომდე გაგრძელდა. საქართველოში შავი ჭირის ბოლო შემთხვევა დაფიქსირდა 1910წ.-ს ბათუმში [123].

საქართველოს ტერიტორიაზე არსებული შავი ჭირის ბუნებრივი კერები

საქართველოს ტერიტორიაზე შავი ჭირის ორი ბუნებრივი კერა მდებარეობს: აღმოსავლეთ საქართველოს ვაკე-მთისწინა (დედოფლისწყაროს, სიღნაღის და გარდაბნის რაიონები) და სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა (ნინოწმინდის, ახალქალაქის, ადიგენის, ახალციხის და ასპინძის რაიონები).



სურათი 6. შავი ჭირის ბუნებრივი კერები საქართველოში.

შავი ჭირის ვაკე-მთისწინა კერა მდებარეობს საქართველოს სამხრეთ-აღმოსავლეთით, აზერბაიჯანის მოსაზღვრე ტერიტორიაზე, ზღვის დონიდან საშუალოდ 500-800 მ. სიმაღლეზე (არაუმეტეს 1000-1200მ-სა) და მოიცავს 350,000 ჰექტარს (სურ. #6). ვაკე-მთისწინა კერა წარმოადგენს აზერბაიჯანის ტერიტორიაზე მდებარე ჯეირან-ჩელის კერის გაგრძელებას - იგი ამ კერის ჩრდილო-დასავლეთ საზღვარია. ეს ადგილი ტიპური ნახევრად უდაბნოს ზონაა. კერაში გავრცელებულია მღრღნელების რამდენიმე სახეობა, მათ შორის ყველაზე მრავალრიცხოვანია შავი ჭირის ძირითადი რეზერვუარი - წითელკუდა მექვიშა, *Meriones libicus (erythraurus)* (სურ. 7). მღრღნელებიდან და მათი სოროებიდან

გამოვლენილია რწყილების რამდენიმე სახეობა, მათგან შავი ჭირის ძირითადი გადამტანია *Xenopsilla conformis* და *Ceratophyllus laeviceps* (სურ. 8). ვაკე-მთისწინა კერაში *Y. pestis* პირველი კულტურები მიღებული იქნა 1966 წელს. კერაში შავი ჭირის ეპიზოოტია წითელკუდა მექვიშეებში აღინიშნა 1968-1971 წლებში, გამოყოფილ იქნა *Y. pestis* 83 კულტურა როგორც რეზერვუარიდან (*Meriones libicus*) ისე გადამტანიდან (*Xenopsilla conformis*)[14]. ამ კერიდან გამოყოფილი შტამები მაღალი ვირულენტობით ხასიათდებოდნენ და ეპიზოოტიებსაც განსაკუთრებით მწვავე ხასიათი ჰქონდა; გამოყოფილი იზოლატების უმრავლესობა მკვდარი მღრღნელებიდან იყო მიღებული. ამ კერაში გამოყოფილი კულტურებიდან დესჯეც-ის ბაქტერიებისა და ვირუსების ეროვნული კოლექციაში ინახება ერთი შტამი (#771), დანარჩენი კულტურები გადაგზავნილ იქნა სტავროპოლის სამეცნიერო კვლევით ინსტიტუტში.

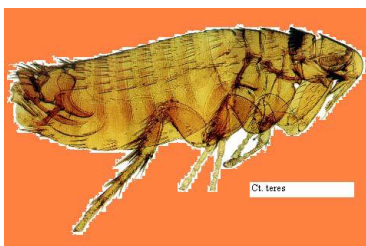


ა



ბ

სურათი 7. შავი ჭირის რეზერვუარები საქართველოში, მღრღნელები: ა. წითელკუდა მექვიშა. ვაკე-მთისწინა კერაში *Y. pestis* მტარებელი/რეზერვუარი. ბ. ჩვეულებრივი მემინდვრია. მაღალმთიან კერაში *Y. pestis* რეზერვუარი.



ა



ბ



გ

სურათი 8. შავი ჭირის გადამტანები საქართველოში, ექტოპარაზიტები (რწყილები): ა. *Y. pestis* გადამტანი მაღალმთიან კერაში რწყილი - *Ct. teres*; ბ. *Y. pestis*-ის გადამტანი ვაკე-მთისწინა რწყილი *X. conformis*; გ. *Y. pestis*-ის გადამტანი რწყილი *X. cheopis*.

შავი ჭირის მაღალმთიანი კერა 200 – 250 ათას ჰექტარზეა გადაჭიმული, სამხრეთით ესაზღვრება სომხეთის და თურქეთის ტერიტორიებს. (სურ. #5)

ჯავახეთის მაღალმთიანეთი განთავსებულია ალპურ და სუბალპური ზონებში, ზღვის დონიდან 1200-3000 მეტრის სიმაღლეზე მკვეთრად გამოხატული ვულკანური ლანდშაფტით. კერა უშუალოდ ესაზღვრება სომხეთის ტერიტორიაზე შავი ჭირის ეპიზოოტიურად აქტიურ გუმრის მთიანეთის ტერიტორიას, თითქმის იდენტური ფლორის, ფაუნისა და გეოგრაფიული მახასიათებლებით. კერის ტერიტორიაზე რეგისტრირებულია 12 სახეობის მღრღნელი, მათ შორის ჩვეულებრივი მემინდვრია (*Microtus arvalis*) – შავი ჭირის ძირითადი რეზერვუარია (სურ. 7). ჩვეულებრივ მემინდვრიებსა და მათ სოროებში გამოვლენილია რამდენიმე სახეობის რწყილი, რომელთაგან დომინირებს სახეობა *Ctenophthalmus teres* (სურ. 8). ასევე გავრცელებულია *Callopsilla caspia* და *Nosopsilus consimilis*. მაღალმთიან კერაში შავი ჭირის ეპიზოოტია ჩვეულებრივ მემინდვრიებში დაფიქსირდა 1979-1983 წლებში, შემდეგ კი 1992 და 1997 წლებში. სულ გამოიყო 39 კულტურა, მათ შორის 1979-1983 წწ - 27 (6 მღრღნელებისგან, 21 რწყილებისგან); 1992 წ - 9 (6 მღრღნელებისგან, 3 რწყილებისგან); 1997 წ - 3 (სამივე რწყილისგან). ამ კერიდან მიღებული იზოლატები აღ. საქართველოს ვაკე მთისწინა კერის შტამებისგან განსხვავებით დაბალი ვირულენტურობით ხასიათდებიან, *Y. pestis* კლასიკური შტამებისგან განსხვავებით აქვთ რამნოზას და მელიბიოზას ფერმენტაციის უნარი, არ წარმოქმნიან პესტიცინს, თუმცა სენსიტიურნი არიან მის მიმართ [137].

გამოყოფილი კულტურების იდენტიფიკაცია, მოთავე ინსტიტუტის მიერ მოწოდებული სქემის მიხედვით ხდებოდა ადგილზე, რის შემდეგაც კულტურების დუბლიკატები იგზავნებოდა სტავროპოლის სამეცნერო კვლევათა ინსტიტუტში (ჩუბინიძე). კულტურების ფენოტიპური მახასიათებლების დამატებითი, სრულყოფილი გამოკვლევა ჩატარდა დკსჯეც-ის ბაზაზე [137].

საბჭოთა პერიოდში, შავი ჭირის ეპიდზედამხედველობას დიდი ყურადღება ექცეოდა. შავი ჭირის საწინააღმდეგო სადგურების, ცენტრების და კვლევითი ინსტიტუტების ფართო ქსელი ჩართული იყო შავი ჭირის ბუნებრივ კერებზე ეპიდზედამხედველობასა და ლაბორატორიულ კვლევებში. საბჭოთა კავშირის დაშლის შემდგომ საქართველოსა და მეზობელ სახელმწიფოებში შავი ჭირის კერებზე ეპიდემიოლოგიური და ეპიზოოტოლოგიური ზედამხედველობა შესუსტდა. ბოლო ათწლეულში ზედამხედველობის კუთხით სიტუაცია ნაწილობრივ გაუმჯობესდა;

ენდემურ კერებში ეპიდრაზმების მიერ ყოველწლიურად ხდება მასალის მოპოვება და შავი ჭირის გამომწვევზე შემოწმება. თუმცა ჩატარებული სამუშაოების მასშტაბი გაცილებით ნაკლებია. ჩრდილოეთ კავკასიის შავი ჭირის ბუნებრივ კერებში მოპოვებულ მცირე რაოდენობით მღრღნელებისა და ექტოპარაზიტებში *Y. pestis* არსებობა [54] საფუძველს გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ სამხრეთ კავკასიის ბუნებრივ კერებშიც შესაძლოა ეპიზოოტიური პროცესის ნებისმიერ დროს გააქტიურება.

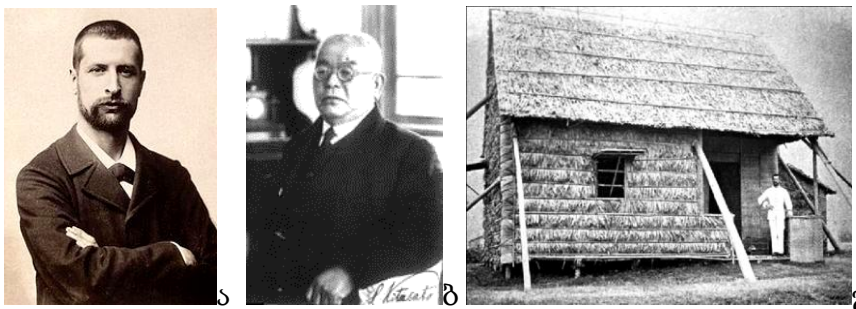
მიკრობის აღმოჩენის ისტორია

1894 წელს, ჰონგკონგში, შავი ჭირის მესამე პანდემიის დროს, ორმა ბაქტერიოლოგმა, ალექსანდრე იერსინმა (საფრანგეთი) და შიბასაბურო კიტასატომ (იაპონია) დამოუკიდებლად მოახდინეს შავი ჭირის გამომწვევი ბაქტერიის იზოლაცია. მიუხედავად იმისა რომ ორივე მკვლევარმა თითქმის ერთდროულად განაცხადა თავიანთი აღმოჩენის შესახებ, კიტასატოს მიერ რიგი ურთიერთგამომრიცხავი განცხადებების გამო საბოლოოდ იერსინი იქნა მიჩნეული ამ ორგანიზმის აღმომჩენად. იერსინმა პასტერის პატივსაცემად ბაქტერიას *Pasteurella pestis* უწოდა (სურ. 10).



სურათი 9. შავი

Y. pestis რიგი ნომენკლატურული ცვლილებები ჭირის ბაცილა განიცადა – *Bacterium pestis* იწოდებოდა 1900 წლამდე, - *Pasteurella pestis* 1923 წლამდე ; ხოლო 1970 წლიდან საბოლოოდ ეწოდა *Yersinia pestis* ალექსანდრე იერსინის საპატივსაცემოდ [37].



სურათი 10. შავი ჭირის მიკრობის აღმომჩენები. ა. ალექსანდრე იერსინი; ბ. შიბასაბურო კიტასატო; გ. ალექსანდრე იერსინი შავი ჭირის საკარანტინო სადგურთან, შანხაი, ჩინეთი 1936

1898წ-ს ფრანგმა მეცნიერმა პოლ-ლუი სიმონდმა “ზუბონური” შავი ჭირის ტრანსმისიის მექანიზმი დაადგინა, დაადგინა რომ შავი ჭირი მღრღნელების დაავადებაა, რომელიც რწყილების საშუალებით ვრცელდება და გადაეცემა ადამიანს. [22, 37, 39, 102].

1897წ ბომბეში (ინდოეთი) ეპიდემიების დროს პირველად იქნა გამოყენებული ჰოფკინის მიერ შექმნილი შავი ჭირის საწინააღმდეგო ვაქცინა [71].

მიკრობის ზოგადი დახასიათება

შავი ჭირის ეტიოლოგიური აგენტი - *Y. pestis* არის არის მცირე ზომის (სიგრძე 1,5 მკმ სიგანე 0,75 მკმ), უძრავი, გრამ უარყოფითი ბაცილა. შედის *Yersinia* გვარში (ენტერობაქტერიების ოჯახი), 18 სხვა სახეობასთან ერთად, რომელთაგან მხოლოდ სამი არის ადამიანისთვის პათოგენური (*Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* და *Yersinia enterocolitica*).

➤ ტიპი - *Proteobacteria*

❖ კლასი - *Gammaproteobacteria*

• რიგი - *Enterobacteriales*

✓ ოჯახი - *Enterobacteriaceae*

▪ გვარი - *Yersinia*

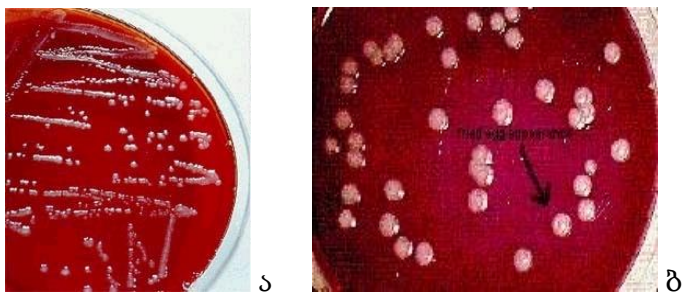
ადამიანისთვის
პათოგენური

{

- სახეობა *Yersinia pestis*
- სახეობა *Yersinia pseudotuberculosis*
- სახეობა *Yersinia enterocolitica*

ადამიანისთვის არაპათოგენური სახეობები - *Yersinia aldovae*, *Yersinia aleksiciae*, *Yersinia bercovieri*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia mollaretii*, *Yersinia rohdei*, *Yersinia ruckeri*, *Y. entomophaga*, *Y. massiliensis*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. philomiragia*, *Y. similis*.

შავი ჭირის ბაქტერია ფაკულტატური ანაერობია, არ წარმოქმნის სპორებს, იზრდება ჩვეულებრივ საკვებ არეებზე, კარგად იზრდება სისხლიან ან მაკკონკის აგარზე. ხასიათდება ნელი ზრდით, გამდიდრებულ საკვებ არეზე კოლონიების ფორმირებისთვის ძირითადად საჭიროებს 24 – 48 სთ (სურ. 11). ზრდის ოპტიმალური



სურათი 11. *Y. pestis* 48 (ა) და 72 საათიანი კულტურა (ბ).

ტემპერატურაა 28⁰-30⁰C. pH 6,9 – 7,0. თუმცა შესაძლოა გაიზარდოს 2-40⁰C ტემპერატურაზე. pH – 5,8 - 8,0. 37⁰C წარმოქმნის კაფსულას. ირიბ აგარზე კულტურა გამჭვირვალე, წებოვანი

(ლორწოვანი) მასის სახით იზრდება. ბულიონში ზედაპირზე წარმოქმნის აპკს, ქვევით ჩამოშვებული სტალაქტიდების მაგვარი ძაფისებური წარმონაქმნებით.

Y. pestis ბუნებრივი აუქსოტროფია, ზრდისთვის საჭიროებს ცისტეინს, მეთიონინს, ფენილალანინს, ვალინს, იზოლეიცინს და ზრდის სხვა სტიმულატორებს. 37⁰C ორგანიზმს დამატებით ჭირდება ბიოტინი, თიამინი და გლუტამინის მჟავა. *Y. pestis* ობლიგატური პარაზიტია.

შავი ჭირის ბაქტერია არ ათხელებს ჟელატინს, არ წარმოქმნის ინდოლს, ნიტრატებს აღადგენს ნიტრიტებად, გლუკოზას ფერმენტირების შედეგად წარმოქმნის მჟავეებს (ყოველთვის არა), ზოგიერთი შტამი აფერმენტირებს გლიცერინს.

Y. pestis გარემო პირობებისადმი ნაკლებად გამძლე ბაცილების ჯგუფს განეკუთვნება. შავი ჭირის გამომწვევი დაბალი ტემპერატურისადმი მდგრადობით ხასიათდება, 0⁰C-ზე ექვსი თვის მერეც არ კვდება. კარგად ძლებს სინესტაში, ძალიან მგრძნობიარეა მაღალი ტემპერატურისა და გამოშრობისადმი, 50⁰C-ზე 30-40 წუთის განმავლობაში კვდება, 70⁰C-ზე 10 წუთში, ხოლო დუდილისას ერთ წუთში. პირდაპირი მზის სხივები მიკრობს 2-3 საათში კლავს. ინფიცირებულ რწყილებში 0-15⁰C-ზე 396, ხოლო ტკიპებში - 509 დღემდე ძლებს. *Y. pestis* სწრაფად კვდება 3-5% ლიზოლის, 1-5 % ქლორამინის, 3% წყალბადის ზეჟანგის ხსნარის მოქმედებისას (1 - 10წთ-ში).

ეპიდემიოლოგია

შავი ჭირი ზოონოზური დაავადებაა, იგი იწვევს ეპიზოოტიებს ყველა დასახლებულ კონტინენტზე ავსტრალიის გარდა. შავი ჭირის გამომწვევს აქვს უნარი

გამრავლდეს უმარტივესებში და მცენარეებში. პათოგენურია მღრღნელების, ადამიანების, მტაცებლების, ჩლიქოსნების, პრიმატებსა და ფრინველებისთვისაც კი.

ძუძუმწოვრების 300-მდე სახეობა ბუნებრივ პირობებში ავადდება შავი ჭირით [59]. მთავარ რეზერვუარს მღრღნელები წარმოადგენენ. ხანგრძლივი დროის განმავლობაში *Y. pestis* შენახვა - გადარჩენაში სხვა ცხოველები არ იღებენ მონაწილეობას, მათი როლი შემოიფარგლება დაავადების გავრცელების პოტენციალით მღრღნელების ერთი პოპულაციიდან მეორეში.

მღრღნელები, რომლებიც ენზოოტურ მასპინძლებს წარმოადგენენ, *Y. pestis* მიმართ ჰეტეროგენული მგრძნობელობა გააჩნიათ. ბევრ ინდივიდი ინფექციის მიმართ ზომიერი რეზისტენტობას ავლენს (წარსულში პათოგენთან კონტაქტის ან სახეობის/ქვესახეობის მემკვიდრული თვისებების გამო). მათში დაავადებისათვის დამახასიათებელი ნიშნები შედარებით სუსტად არის გამოხატული და სიკვდილიანობის კოეფიციენტი დაბალია [104, 105, 109]. ასეთ მასპინძლებში ყველა სეზონის განმავლობაში აღინიშნება რწყილების მნიშვნელოვანი აქტივობა. იმისდა მიხედვით თუ რა პერიოდში მოხდა პათოგენთან კონტაქტი, ზოგიერთ ან შესაძლოა თითქმის ყველა ინდივიდს ჰქონდეს შავი ჭირის საწინააღმდეგო ანტისხეულები.

შავი ჭირის გადაცემა მღრღნელებს შორის და ასევე სხვა ცხოველებზე ექტოპარაზიტების – რწყილების, ასევე კანიბალიზმის და ნიადაგის (სავარაუდოდ) საშუალებით ხდება. დღემდე ბოლომდე არ არის ნათელი, თუ როგორ ხდება შავი ჭირის მიკრობის შენარჩუნება ეპიზოოტიათშორის პერიოდში [58, 62]. *Y. pestis* ბუნებაში ცირკულირების კლასიკური სქემა: მღრღნელი – რწყილი – მღრღნელი – სავარაუდოდ გამარტივებული სახეა რეალური ბიოცენოზური კავშირისა. არსებობს მოსაზრება რომ ამ პერიოდში მიკრობი ნიადაგში ინახება [21, 44]. ბუნებაში შავი ჭირის მიკრობის ცირკულაციის რეალურ სურათთან, სავარაუდოდ, შემდეგი სქემა უფრო მიახლოებულია: მღრღნელი – რწყილი – მღრღნელი – ნიადაგი – მცენარე – მღრღნელი - რაც *Y. pestis* მინიმუმ კიდევ ორ ფენოტიპური ფაზური ვარიანტის არსებობას გულისხმობს: ნიადაგის და მცენარის. მიუხედავად იმისა რომ, როგორც ცნობილია *Y. pestis* წამოიქმნა ენტერობაქტერია *Y. pseudotuberculosis* -დან, რომელიც აქვს უნარი ხანგრძლივი დროის განმავლობაში გადარჩეს წყალში და ნიადაგში, კვლევებმა უჩვენეს რომ გადაცემის ვექტორულ გზაზე გადასვლის გამო *Y. pestis*

მიკრობმა გადარჩენის ამ მექანიზმებიდან ბევრი დაკარგა, რაც ნაკლებად სავარაუდოს ხდის ბაქტერიის გადარჩენას ხანგრძლივი დროის განმავლობაში მასპინძლის ან გადამტანის გარეშე. თუმცა რიგი კვლევებში ნაჩვენებია ხელოვნურ პირობებში *Y. pestis* ნიადაგში შენარჩუნების უნარი [3, 33, 50, 92].

შავი ჭირის მიკრობის სასიცოცხლო ციკლი

Y. pestis უპირველეს ყოვლისა მღრღნელების პათოგენია. მღრღნელებს შორის ტრანსმისია ექტოპარაზიტების – რწყილების საშუალებით ხდება. *Y. pestis* რწყილის ორგანიზმში ინფიცირებული მღრღნელის სისხლთან ერთად ხვდება. რწილში ინფექცია მხოლოდ ალიმენტარული (საჭმლის მომნელებელი) სისტემით შემოიფარგლება და არ ხვდება სხვა ქსოვილებსა და ორგანოებში, როგორცაა სანერწყვე ჯირკვლები და რეპროდუქციული ორგანოები. ინფექციის გადაცემა არ ხდება ტრანსოვარიულად. აქედან გამომდინარე შავი ჭირის მიკრობის ბუნებაში შენარჩუნება მთლიანად დამოკიდებულია რწყილსა და ძუძუმწოვარში ინფექციის ციკლურ ტრანსმისიაზე [12, 13, 35, 104, 105]. შავი ჭირის კლასიკური ვექტორი *Xenopsylla cheopis* ამოწოვს 0.03 – 0.5 მკლ სისხლს. ბაქტერიემიის დონე დაავადებულ მღრღნელში კორელაციაშია ინფიცირებული რწყილების პროცენტულ რაოდენობასთან [57, 79, 106]. რწყილის კუჭში, სადაც სუსტი მჟავე გარემოა (pH 6 -7) გამოიყოფა ლიზოციმის მაგვარი ფერმენტი, რომელსაც სავარაუდოდ ანტიბაქტერიული მოქმედება გააჩნია [40, 127]. დაავადებული მღრღნელის კბენისას რწყილის ორგანიზმში მოხვედრილი შავი ჭირის მიკრობები ხვდებიან პრევენტრიკულუსში, იწყებენ აქტიურ გამრავლებას და წარმოქმნიან ე.წ. “საცობს”. პრევენტრიკულუსი, რომელიც საყლაპავსა და კუჭს ერთმანეთთან აკავშირებს, სფინქტერისმაგვარ ორგანოს წარმოადგენს, რომლის ნემსისმაგვარი კბილანები შიგნით – კუჭისკენ არის მიმართული, რითაც აკავებს სისხლის უჯრედებს და საკვების (სისხლის) რეგურგიტაციას უშლის ხელს [8, 13]. ინფიცირებული სისხლის ამოწოვიდან 3-9 დღეში ბაქტერიული მასა მთლიანად ბლოკავს პრევენტრიკულუსს, მიღებული სისხლი კუჭში ვეღარ ხვდება [5, 11, 13, 45]. რის გამოც მწერი მუდმივ შიმშილს განიცდის. ის გადადის ერთი მასპინძლიდან მეორეზე საკვების (სისხლის) მიღების იმედით. სისხლის ამოწოვის მცდელობას თან სდევს კბენის ადგილას

სისხლის ამოინთხევა ბაქტერიულ მასასთან ერთად (ამ დროს კანის ზედაპირზე ხვდება ათასობით 11000 – 24000 ბაქტერია) და ამგვარად ხდება ინფექციის გადასცემა ახალ მასპინძელზე. ასეთი რწყილი 10 დღეზე მეტ ხანს არ ცოცხლობს და ვიდრე მოკვდება ასწრებს საკმაოდ ბევრი მასპინძლის დაინფიცირებას.

რწყილიდან გამოთავისუფლებული *Y. pestis* უჯრედებში, დაბალი ტემპერატურის გამო, არ ხდება F1 (ფრაქცია1 –კაფსულის ანტიგენი) და LCRS (Low-calcium response) კომპონენტების ექსპრესია და ამიტომ უჯრედები მაშინვე განიცდიან ფაგოციტოზს პოლიმორფულბირთვიანი ლეიკოციტების (polymorphonuclear leukocytes -PMNs) და მონოციტების მიერ. უჯრედების უმეტესობა, რომლებიც განიცდიან ფაგოციტოზს, PMNs-ით იშლება, მაშინ, როცა ბაცილების მცირე რაოდენობა, რომლებიც მონოციტების მიერ შთაინთქმებიან, უჯრედის შიგნით გადარჩებიან და იწყებენ ვირულენტობის ფაქტორების ექსპრესიას, რის მერეც უვითარდებათ განმეორებითი ფაგოციტოზისადმი რეზისტენტობა. ამის შემდგომ მიკროორგანიზმი კლავს მაკროფაგს და გამონთავისუფლდება უჯრედგარე გარემოში, სადაც PMNs-ს უკვე აღარ შეუძლიათ მათი ფაგოციტოზი. *Y. pestis* სწრაფად ვრცელდება რწყილის კბენის (საწყისი) ადგილიდან პერიფერიულ ლიმფურ კვანძებისკენ, იქ აქტიურად მრავლდება და წარმოქმნის ე.წ. ბუბონს (შესიებული ლიმფური ჯირკვალი). ამის შემდგომ ინფექცია შესაძლოა სისხლის მიმოქცევით გავრცელდეს, რისი საშუალებითაც გამომწვევი სხვადასხვა ორგანოში, უპირატესად ღვიძლში და ელენთაში ხვდება. ბაქტერია ასევე შესაძლოა მოხვდეს ფილტვებში. ბუნებაში ეფექტური ტრანსმისიის შესაწარმუნებლად საჭიროა განვითარდეს სათანადო ხარისხის და ხანგრძლივობის ბაქტერიემია. ბაქტერიემიული ან სეპტიცემიური მდრღნელის სისხლით რწყილის ინფიცირებით ციკლი სრულდება.

რწყილის ინფიცირებისთვის *Y. pestis* მიკრობმა ძუძუმწოვრებში უნდა გამოიწვიოს სათანადი დონის ბაქტერიემია, ასევე უნდა უზრუნველყოს რწყილის კუჭის ბლოკირება, რაც ინფექციის შემდგომი ტრანსმისიისათვის აუცილებელ პირობას წარმოადგენს. ძუძუმწოვრების უმეტესობას შავი ჭირის გამომწვევის მიმართ მაღალი მგრძნობელობა ახასიათებს, მაღალი ლეტალური გამოსავლით, თუმცა ზოგიერთი მათგანი ნაწილობრივ რეზისტენტობას ავლენს და მათში დაავადება შედარებით მსუბუქად მიმდინარეობს. გადარჩენილ ინდივიდებს ძირითადად შავი

ჭირის საწინააღმდეგო ანტისხეულების მაღალი ტიტრი გააჩნიათ. სწორედ ეს ძუძუმწოვრები განაპირობებენ შავი ჭირის მიკრობის ხანგრძლივ შენახვა-შენარჩუნებას ბუნებრივ კერაში[11, 16, 17, 18, 19, 104, 105, 109].

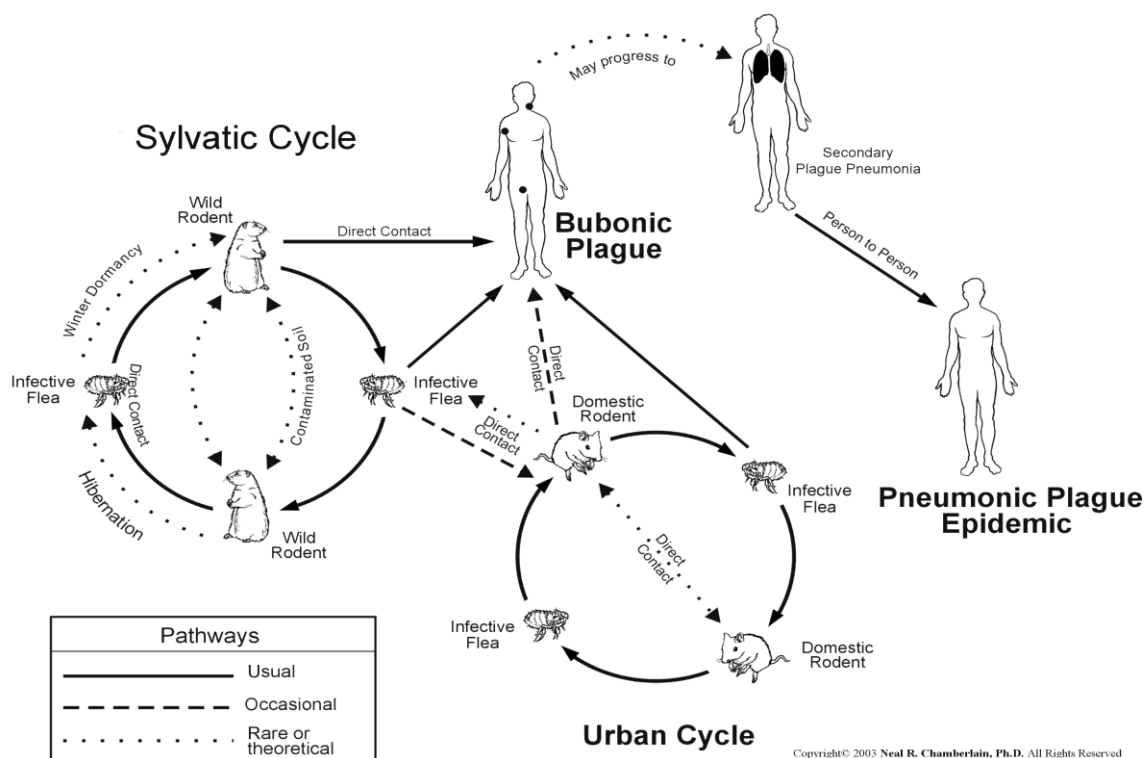
როგორც უკვე აღვნიშნეთ *Y. pestis* უპირველეს ყოვლისა მღრღნელების პათოგენია, ადამიანები შემთხვევით მასპინძლებს წარმოადგენენ და არ მონაწილეობენ ბუნებაში *Y. pestis* ხანგრძლივი დროით შენარჩუნებაში. ადამიანები შავი ჭირის მიმართ მაღალი მგრძნობელობით ხასიათდებიან. შავი ჭირის გამომწვევი ადამიანის ორგანიზმში ძირითადად დაზიანებული კანის ზედაპირიდან ხვდება (როგორც წესი რწყილის ნაკბენით, ასევე ინფიცირებულ მასალასთან მუშაობისას, მღრღნელების გატყავებისას), იშვიათად ლორწოვანი გარსიდან, საჭმლის მომნელებელი სისტემიდან, თვალიდან. დაავადების ფილტვისმიერი ფორმის დროს, შავი ჭირის ბაქტერია შესაძლოა გავრცელდეს ჰაერწვეთოვანი გზით.

ადამიანები შავი ჭირის გამომწვევით შესაძლოა დაინფიცირდნენ პირდაპირი და არაპირდაპირი გზით. არაპირდაპირი გზით - მღრღნელის ექტოპარაზიტის, რწყილის ნაკბენით დაინფიცირება, ტრანსმისიის ყველაზე გავრცელებული ფორმაა როგორც მღრღნელებში, ასევე ადამიანებში. ყველაზე ხშირად ადამიანების დაინფიცირება ხდება როცა პოპულაციის ცენტრში, სინანთროპ ვირთაგვებში ვითარდება ეპიზოოტია, რაც იწვევს დიდი რაოდენობით მღრღნელების სიკვდილს და რწყილების პოპულაციის გადანაცვლებას მათი ბუნებრივი რეზერვუარიდან – ვირთხებიდან ადამიანებისკენ. ექტოპარაზიტები (რწყილები) ტოვებენ შავი ჭირით მკვდარ ვირთაგვების სხეულს და საკვების, სისხლის ძიებაში შესაძლოა კბენით დააინფიცირონ ადამიანი. დაავადებული ადამიანი სხვა ადამიანებისთვის გადამდები შეიძლება აღმოჩნდეს. იშვიათ შემთხვევაში ადამიანის დაინფიცირება ხდება შავი ჭირის ბუნებრივ კერაში - ეპიზოოტიის დროს მკვდარი მღრღნელებით. რწყილები მიწის ზედაპირზე, სოროს შესასვლელთან გროვდებიან და ვინაიდან რწყილები არ არიან თავიანთი მღრღნელი მასპინძლის მიმართ მკაცრად სახეობა სპეციფიკური პარაზიტები, შეუძლიათ დაკბინონ და დააინფიცირონ ადამიანი.

ადამიანი შავი ჭირით ასევე შეიძლება დაავადდეს პირდაპირ - ინფიცირებული მღრღნელების ან სხვა ცხოველით – ნანადირევის დამუშავების, გატყავების, ხორცის დაჭრის ან არასაკმარისად დამუშავებული კონტამინირებული ცხოველის ხორცის

მოხმარებით. შავი ჭირის გამომწვევი შეაღწევს ადამიანის ორგანიზმში კანის დაზიანების ადგილიდან, ასევე პირის, ცხვირის ან თვალის ლორწოვანი გარსიდან.

შავი ჭირი მხოლოდ იშვიათ შემთხვევაში გადაეცემა ადამიანიდან ადამიანს, მას შემდგომ რაც რწყილი უკბენს სეპტიცემიური შავი ჭირით ავადმყოფს და ინფექციას გადაიტანს ჯანმრთელ ადამიანზე; ასევე ჯანმრთელი და ავადმყოფი პირის კონტაქტით (სურ. 12).



სურათი 12. შავი ჭირის მიკრობის სასიცოცხლო ციკლი.

შავი ჭირის კლინიკური ფორმები

გამომწვევის ლოკალიზაციის, ორგანიზმის რეაქტიულობის, მიკრობის ვირულენტობის, ადამიანის უჯრედული და ჰუმორული იმუნიტეტის დონიდან გამომდინარე შესაძლოა განვითარდეს შავი ჭირი კანის - ბუბონური, პირველად სეპტიცემიური, მეორად სეპტიცემიური, პირველადი ფილტვის და მეორადი ფილტვის ფორმები.

საინკუბაციო პერიოდი შავი ჭირის დროს გრძელდება 3-6 დღე, ზოგჯერ რამდენიმე საათი, ცალკეულ შემთხვევებში 8-9 დღე. შავი ჭირი ვლინდება უცერად, პროდრომური პერიოდის გარეშე, ავადმყოფს ეწყება ცხელება, ძლიერი თავის ტკივილი და თავბრუსხვევა, სახე ფერკმრთალდება და დაჰკრავს სილურჯე, ტანჯვის

გამომეტყველებით (facies pestica). შავი ჭირის ცალკეულ ფორმას ახასიათებს სპეციფიკური კლინიკური ნიშნები. სტრეპტომიცინის გამოყენებამდე ლეტალობა ძალიან მაღალი იყო (40-100%).

შავი ჭირის ბუბონური ფორმა

ბუბონური შავი ჭირი დაავადების კლასიკური ფორმაა. ავადმყოფს სიმპტომები ინფიცირებიდან (ინფიცირებული რწყილის ნაკბენის ან ინფექციური მასალის კანის დაზიანებულ ზედაპირზე მოხვედრის შედეგად) ძირითადად 2 – 6 დღეში უვლინდება. უეცრად ვლინდება სისუსტე, თავის ტკივილი, ცხელება 38–41 °C, სახსრების ტკივილი, ლიმფური ჯორკვლები სივდება, ყალიბდება ავადმყოფობისთვის დამახასიათებელი 1-10სმ დიამეტრის ბუბონი, რომელიც მგრძნობიარე, მტკივნეული და ჰემორაგიულია. ასევე ხშირია გულისრევა, ღებინება, დიარეა. ხშირად ლიმფურ კვანძების შესიებას მათი ტკივილი უძღვის წინ. ბუბონი ძირითადად საზარდულთან ახლოს ვითარდება, თუმცა საწყისი ინფექციის საიტიდან ახლოს მდებარე ნებისმიერ სხვა ლიმფურ კვანძებთანაც შეიძლება განვითარდეს [38, 48, 75, 125].

შავი ჭირის სეპტიცემიურ ფორმა

რწყილის ნაკბენით ინფიცირებულ ავადმყოფთა მხოლოდ მცირე ნაწილში შესაძლოა განვითარდეს სეფსისი, ბუბონის გაჩენის გარეშე. შავი ჭირის ამ ფორმას პირველად სეპტიცემიურ ფორმას უწოდებენ. ბუბონური შავი ჭირის დროს ლიმფური სისტემიდან შავი ჭირის ბაქტერია საბოლოოდ შესაძლოა სისხლში მოხვდეს და განვითარდეს შავი ჭირის მეორადი სეპტიცემიურ ფორმა.

შავი ჭირის სეპტიცემიური ფორმის დროს ბაქტერიული ენდოტოქსინი იწვევს დისემინირებული ინტრავასკულარული კოაგულაციას, პატარა სისხლძარღვების იშემიურ ნეკროზს, კანის ჰიპერემიას, რაც იწვევს სხეულზე პატარა სისხლჩაქცევების განვითარებას და იშემიურ ნეკროზს. ამის შედეგად კანის ზედაპირზე და შინაგან ორგანოებში ადგილი აქვს პატარა სისხლჩაქცევების განვითარებას და სისხლდენას, რასაც ხშირად თან სდევს სისხლიანი პირღებინება. მკურნალობის გარეშე ძირითადად ფატალურად სრულდება. ეტიოტროპული მკურნალობის დაწყება ადრეულ ეტაპზე, ლეტალობას ამცირებს 4-15%-მდე. შავი ჭირის სეპტიცემიური ფორმით გარდაცვლილთა უმეტესობა სიმპტომების გაჩენის დღესვე იღუპება.

დაავადების არც ერთი ზემოთ ნახსენები ფორმა არ ვრცელდება ადამიანიდან ადამიანზე.

შავი ჭირის ფილტვისმიერი ფორმა

შავი ჭირის, როგორც ბუბონური, ასევე სეპტიცემიური ფორმით დაავადებულების მხოლოდ მცირე პროცენტში გამოიწვევი შესაძლოა მოხდეს ფილტვში და განვითარდეს შავი ჭირის მეორადი ფილტვისმიერი ფორმა, რის შემდგომ ინფექცია ჰაერწვეთოვანი გზით ვრცელდება ადამიანიდან ადამიანზე. სიმპტომებია ცხელება, ხველა, სისხლიანი ნახველი. ავადმყოფს უნვითარდება მწვავე ბაქტერიული პნევმონია, ხველის დროს გამოაფრქვევს დიდი რაოდენობის სიცოცხლისუნარიან ბაქტერიას, რაც გარშემომყოფთა დაინფიცირების საფრთხეს ქმნის. აღნიშნული გზით დაინფიცირებულ ადამიანს უვითარდება შავი ჭირის პირველადი ფილტვისმიერი ფორმა. ინკუბაციური პერიოდი ძირითადად ერთიდან სამ დღემდეა, მაგრამ მისი ხანგრძლივობა ასევე შესაძლოა მხოლოდ რამდენიმე საათი იყოს. დროული დიაგნოზისა და მკურნალობის გარეშე ფატალურად მთავრდება 1-6 დღეში.

ბუბონური შავი ჭირი, მკურნალობის გარეშე, შემთხვევების 40 - 60%-ში ფატალურად მთავრდება, მაშინ როცა მკურნალობის გარეშე ფილტვისმიერი და სეპტიცემიური შავი ჭირი გარდაუვალ სიკვდილს იწვევს [49, 104].

შავი ჭირის სხვა კლინიკური ფორმები

აღნიშნულის გარდა იშვიათად გხვდება დაავადების გამოვლინების სხვა კლინიკური ფორმები, როგორიცაა ასიმპტომური და აბორტული შავი ჭირი. იშვიათ შემთხვევაში შესაძლოა განვითარდეს შავი ჭირის მენინგეალური ფორმა. დაავადებას ახასიათებს მენინგიტის კლინიკური ნიშნები რასაც მოსდევს უგონო მდგომარეობა და სიკვდილი. მკვლევართა უმეტესობა შავი ჭირის ნაწლავის ფორმას დამოუკიდებლად არ განიხილავენ და სხვა ფორმების გართულებად მიიჩნევენ.

კლინიკური და ეპიდემიოლოგიურ მონაცემების საფუძველზე, ადამიანის შავი ჭირით დაავადებაზე ეჭვის მიტანის შემთხვევაში, დაუყოვნებლივ უნდა მოხდეს მისგან სათანადო ნიმუშების აღება და დაიწყოს კონკრეტული ანტიმიკრობული თერაპია ლაბორატორიიდან საბოლოო პასუხების მიღებამდე, ხოლო თუ ასეთ

პაციენტს პნევმონიის ნიშნები აქვს, უნდა მოხდეს მისი იზოლაცია და სათანადო სიფრთხილის ზომების გატარება [52, 67].



სურათი 13. შავი ჭირის კლინიკური გამოვლინება.

მკურნალობა

შავ ჭირზე ექვის მიტანის შემთხვევაში აუცილებელია პაციენტის დაუყოვნებლივი ჰოსპიტალიზაცია ინფექციური სტაციონარის ბოქსში. შავი ჭირის ბუბონური ფორმის დროს ავადმყოფს კუნთში უკეთდება ანტიბიოტიკები; რეკომენდირებულია გენტამიცინით ან სტრეპტომიცინით მკურნალობა. ასევე ეფექტურად მოქმედებს ტეტრაციკლინი და ქლორამფენიკოლი. მკურნალობა საშუალოდ 10-14 დღე გრძელდება.

იმუნიტეტი

შავი ჭირის გადატანის მერე ყალიბდება ხანგრძლივი, მყარი იმუნიტეტი. წარსულში სხვადასხვა ქვეყნის მოსახლეობას ჰქონდა ამის შესახებ ცოდნა და სწორედ დაავადება-გადატანილ ადამიანები მონაწილეობდნენ ავადმყოფების მოვლასა და გვამების დამარხვაში.

ვაქცინაცია

ბუბონური შავი ჭირის მიმართ არაცოცხალი ვაქცინის გამოყენება ჯერ კიდევ 1890 წლიდან დაიწყო [128]. დღეისთვის მსოფლიოში არსებობს ადამიანისთვის განკუთვნილი *Y. pestis* ცოცხალი (ატენუირებული EV76 შტამიდან მიღებული) და მკვდარი (195P) ვაქცინები. აღნიშნული ვაქცინების ნაკლოვანებები გამოიხატება რეაქტოგენურობასა და პოსტ-ვაქცინაციური გართულებების რისკის არსებობაში. აღნიშნული ვაქცინები ნაკლებად ეფექტურია პირველადი პნევმონიული შავი ჭირის მიმართ. ვაქცინაცია ნაკლებად გამოყენება შავი ჭირის აფეთქებების დროს, ვინაიდან

დამცავი იმუნური პასუხის შემუშავებისთვის დაახლოებით ერთი თვეა საჭირო. ვაქცინა ძირითადად განკუთვნილია იმ პირებისათვის, რომელთა საქმიანობაც მჭიდრო კავშირშია *Y. pestis* მიკრობთან (შავ ჭირზე მომუშავე ლაბორატორიის მუშაკები, მკვლევარები და პირები, რომლებიც ინფიცირებული მღრღნელებზე მუშაობენ) [66]. აქტიურად მიმდინარეობს მუშაობა ახალი რეკომბინანტული ვაქცინის შემუშავებაზე, რომელსაც გაძლიერებული დაცვა ექნება როგორც ბუბონურ, ასევე ფილტვისმიერი შავი ჭირისგან.

ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა

შავ ჭირზე საექვო კლინიკური შემთხვევის დროს საკვლევი მასალა, თუ ეს შესაძლებელია, მკურნალობის დაწყებამდე უნდა იქნას აღებული, თუმცა ამან არ უნდა გამოიწვიოს მკურნალობის დაწყების შეფერხება. გამომწვევის იზოლაციისთვის სათანადო ნიმუშის აღება კლინიკური ნიშნების მიხედვით განისაზღვრება:

- ✓ ფილტვისმიერი ფორმა - სისხლი, ნახველი, ფარინგეალური ნაცხი, ბრონქიალური/ტრაქეალური ლავაჟი
- ✓ ბუბონური ფორმა - ლიმფური ჯირკვლის ასპირატი
- ✓ სეპტიცემიური ფორმა - სისხლი

მსოფლიოს რეფერალურ ლაბორატორიებში შავი ჭირის გამომწვევის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკისთვის სხვადასხვა მეთოდი გამოიყენება:

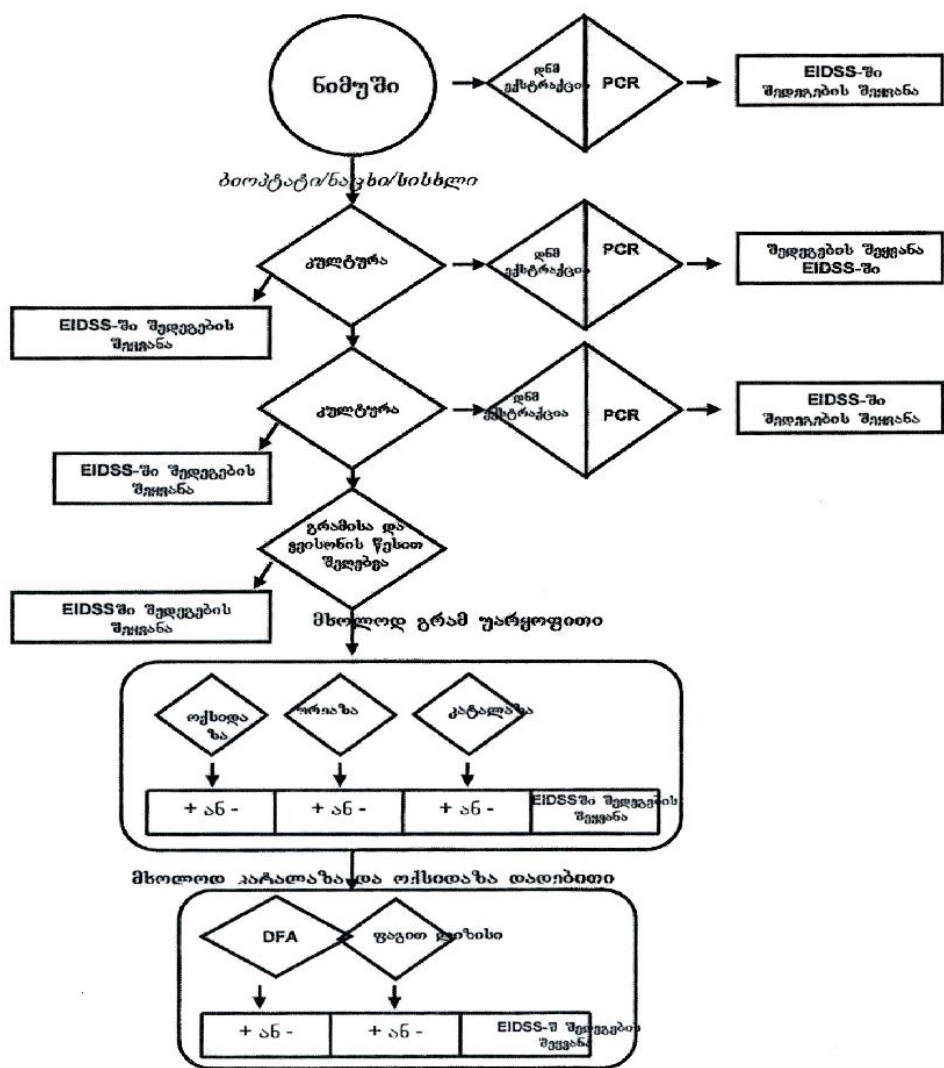
- ❖ მიკროსკოპირება - *Y. pestis* შეიძლება იდენტიფიცირება შეიძლება პერიფერიული სისხლის, ნახველის, ლიმფური კვანძის ნიმუშების, იზოლატების ნაცხის მიკროსკოპული დათვალიერებით. ნაცხის შეღებვა რეკომენდირებულია გრამის, რაიტის, გიმზას, ვეისონის მეთოდებით, ასევე ფლუორესცენტული საღებავით მონიშნული ფრაქცია¹ (F1) კაფსულის ანტიგენის საწინააღმდეგო ანტისხეულებით. ბიპოლარული, ოვოიდური, გრამ-უარყოფითი ორგანიზმების გამოჩენა ნაცხში შავი ჭირის სავარაუდო დიაგნოზის ნიშანს იძლევა.
- ❖ *Y. pestis* კულტურის იზოლაცია - შესაძლოა მოხდეს სხვადასხვა ნიმუშებიდან კლინიკური ნიშნების გათვალისწინებით (მაგ. ლიმფური კვანძის ასპირატი, სისხლი, ნახველი). რეკომენდირებულია ნახევრად სელექტიური ნიადაგის CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) აგარის გამოყენება, რომ არ მოხდეს *Y. pestis* სხვა

ბაქტერიებით გადაზრდა, რაც განსაკუთრებით ხშირად ლიმფური კვანძის ასპირატის შემთხვევაში ხდება. ზრდისთვის რეკომენდებულია 28°C ტემპერატურა. კულტურის მიღების შემთხვევაში კვლევა BSL-3 ლაბორატორიაში უნდა გაგრძელდეს.

- ❖ მოლეკულური (პჯრ)- პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ), ძირითად სამიზნეს ხშირ შემთხვევაში *Y. pestis* სპეციფიკური პლაზმინოგენ აქტვატორი (pla) და F1 (caf) კაფსულის ანტიგენი (კაფე) წარმოადგენენ. პჯრ ტარდება სხვადასხვა ტიპის ნიმუშიდან (EDTA-ზე აღებულ სისხლი, ბუბონის ასპირატი, ნახველი, ბრონქიალურ ამონარეცხი, ბიოფსიური მასალა) გამოყოფილ დნმ-ი. იმ შემთხვევებში, როდესაც კულტურის გამოყოფა არ ხერხდება (მაგალითად, გვამური მასალიდან), შესაძლოა ლიმფური, ელენთის, ფილტვის და ღვიძლის ქსოვილის ან ძვლის ტვინის ნიმუშები პირდაპირ იქნას გამოკვლეული პჯრ მეთოდით.
- ❖ სეროლოგია- თუ ვერ მოხერხდა კულტურის მიღება და პჯრ უარყოფით შედეგს იძლევა, ამ შემთხვევაში სეროლოგიურმა ტესტირებამ, რომელიც F1-ანტიგენის აღმოჩენაზეა დაფუძნებული, შესაძლოა დაადასტუროს დიაგნოზი.

ბოლო ხანებში *Y. pestis* სწრაფი დეტექციისთვის პჯრ-ზე დაფუძნებული მრავალი განსხვავებული ტესტი შემუშავდა. გამომწვევის დნმ-ის აღმოჩენაზე დამყარებული მეთოდები, რომლებიც მაღალი მგრძნობელობით და სპეციფიკურობით გამოირჩევიან, განსაკუთრებულ მნიშვნელობას იძენს მაშინ, როცა ვერ ხერხდება კულტურის იზოლაცია.

დესჯეც-ში შავი ჭირის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკისთვის გამოიყენება აშშ საფრთხის შემცირების სააგენტოს (DTRA) რეკომენდაციების საფუძველზე შემუშავებული ალგორითმი (სურ. 14)



სურათი 14. შავი ჭირის კლინიკური ნიმუშების ანალიზისთვის შემუშავებული ალგორითმი

შიდასახეობრივი ტაქსონომია

წლების განმავლობაში *Y. pestis* შიდასახეობრივი კლასიფიკაციის მრავალ მცდილობას ჰქონდა ადგილი, მისი მრავალფეროვანი ფენოტიპური თვისებების მიხედვით [20, 26, 27]. დევიგნატმა 1951წ-ს გლიცერინის ფერმენტაციის და ნიტრატის აღდგენის უნარის მიხედვით *Y. pestis* შტამები სამ შიდასახეობრივ ჯგუფად - ბიოვარად (bv) დაყო: ანტიკურ - Antiqua (ცენტრალური აფრიკაში, ცენტრალური და ჩრდილოეთ აზიაში მოცირკულირე შტამები), აღმოსავლური - Orientalis (სამხრეთ და სამხრეთ-აღმოსავლეთ აზიაში, სამხრეთ აფრიკაში და ამერიკის ორივე კონტინენტზე) და შუასაუკუნეების - Medievalis (სამხრეთ-აღმოსავლეთ ევროპიდან, ცენტრალური აზიიდან და აფრიკის უდაბნოდან)[53]. შტამების დღევანდელი გავრცელების და ისტორიული წყაროების საფუძველზე არსებობდა მოსაზრება, რომ თითოეული ბიოვარიანტი ცალკეული პანდემიის გამოიწვივი იყო: bv. Antiqua (გლიცერინ+ ნიტრატ+) პირველი პანდემიის, bv. Medievalis (გლიცერინ+ ნიტრატ-) - მეორე, ხოლო bv. Orientalis (გლიცერინ - , ნიტრატ +) მესამესი [31, 70, 94, 102]. უნდა აღინიშნოს რომ სამივე ბიოვარიანტის შტამები ადამიანისა და ცხოველის მიმართ ვირულენტობით და პათოგენურობით არსებითად არ განსხვავდებიან [32, 104]. სხვადასხვა მოლეკულური მეთოდებით კვლევამ დაადასტურა, რომ თითოეული ეს ბიოვარიანტი ფილოგენეტიკური ხის სხვადასხვა განშტოებას წარმოადგენს [3, 107, 136]. თუმცა ცალკეული ბიოვარების კონკრეტულ პანდენიასთან დაკავშირების ჰიპოთეზა შემდგომი კვლევების საფუძველზე არ დადასტურდა. დევიგნატის კლასიფიკაცია მხოლოდ *Y. pestis* კლასიკური ბიოვარების განსაზღვრის საშუალებას იძლევა და არ მოიცავს *Y. pestis* ატიპიურ შტამებს, რომლებიც Pestoides, ასევე *Microtus* სახელით არიან ცნობილნი [4, 94, 110, 111, 122]. ეს შტამები ცირკულირებენ ევროპის სამხრეთ-აღმოსავლეთით, ცენტრალურ და ჩრდილოეთ აზიაში, ასევე აფრიკის რამდენიმე რეგიონში სხვადასხვა სახეობების მემინდვრიების (*Microtus* spp.) პოპულაციაში და ხასიათდებიან უნიკალური პათოგენური, ბიოქიმიური და მოლეკულური თვისებებით. კლასიკური ბიოვარიანტებისგან განსხვავებით, ენზოოტიურ შტამებს შეუძლიათ რამნოზასა და მელიბიოზას ფერმენტაცია. გამოირჩევიან მაღალი ვირულენტობით მათი ძირითადი ბუნებრივი მასპინძლებისა

და ლაბორატორიული თავგების მიმართ, ხოლო ზღვის გოჭების მიმართ, როგორც წესი, ისინი დაბალვირულენტურნი არიან. ამ შტამებს მხოლოდ იშვიათ შემთხვევებში შეუძლიათ დაავადების გამოიწვია ადამიანებში, რასაც თან არ ახლავს ეპიდემიის გამოწვევა, ადამიანიდან-ადამიანზე ინფექციის გადაცემა [6]. ეს შტამები თავდაპირველად ყოფილი საბჭოთა კავშირის მიკრობოლოგთა მიერ იქნა გამოკვლეული *Pestoides* სახელით. პრაქტიკული თვალსაზრისით მნიშვნელოვანი იყო უნივერსალური ვირულენტობის მქონე შავი ჭირის ტიპური შტამების განსხვავება მემინდვრიების პოპულაციაში მოცირკულირე ატიპიურ, დაბალვირულენტურ, არაეპიდემიურ შტამებისგან. დღეისათვის ბიოქიმიური თვისებების, ვირულენტობის, და გეოგრაფიული გავრცელების მიხედვით შემოთავაზებულია *Y. pestis* შტამების ორ ქვესახეობად დაყოფა: *Y. pestis* subsp. *pestis* რომელსაც ასევე ძირითად ქვესახეობასაც (*“main”* subsp.) უწოდებენ და რომელშიც პანდემიების გამომწვევის ბიოვარები (*bv. Antique*, *bv. Medievalis* და *bv. Orientalis*) არიან გაერთიანებულები და *Y. pestis* subsp. *microtus* (*“nonmain”* subsp.) რომელშიც შავი ჭირის ატიპიური, ენზოოტიური შტამებია გაერთიანებული. სხვადასხვა ფენოტიპური თვისებების და გავრცელების ადგილის მიხედვით subs. *microtus*-ში გამოყოფენ *bv. Caucasica*, *bv. Ulegeica*, *bv. Altaica*, *bv. Hissarica* და *bv. Talassica*. მოგვიანებით კიდევ ორი დამატებითი ბიოვარის განისაზღვრა მოხდა, კერძოდ *bv. Xilingolensis* და *bv. Qinghaiensis* [7, 89].

კვლევების შედეგად გამოვლინდა რომ შერჩევითი ვირულენტობის მქონე ე.წ. „მემინდვიის“ subsp. *microtus* შტამები უნივერსალური ვირულენტობის მქონე კლასიკურ *Y. pestis* subsp. *pestis* შედარებით ევოლუციურად უფრო ძველი განშტოებას განეკუთვნებიან.

წარმოშობა

Yersinia-ს გვარში, 18 სხვა სახეობასთან ერთად, რომელთაგან მხოლოდ სამია ადამიანისთვის პათოგენური - *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* და *Yersinia enterocolitica*. *Y. pseudotuberculosis* და *Y. enterocolitica*, ენტეროპათოგენურ ბაქტერიებს წარმოადგენენ და კლინიკური და ეპიდემიოლოგიური ნიშნებით ძლიერ განსხვავდებიან *Y. pestis* -გან. დაავადების ტრანსმისია ფეკალო-ორალური გზით

ხდება და არა გადამტანის საშუალებით [124]. ადამიანში დაავადება გაცილებით მსუბუქი ფორმით მიმდინარეობს. მიუხედავად ამისა გენეტიკურად *Y. pestis* ძალიან ახლოს დგას *Y. pseudotuberculosis* -თან, მათი გენომის მსგავსება 90%-ს აღწევს, ასევე მსგავსია მათი ფიზიოლოგიური თვისებები და ანტიგენური სტრუქტურა [2, 24, 41].

უახლესი კვლევების მიხედვით *Y. pestis* 5000 - 7000 წლის წინ *Y. pseudotuberculosis* დივერგენციის შედეგად წარმოქმნილი კლონია [112, 126]. ტაქსონომიური სტანდარტების მიხედვით *Y. pestis* განხილულ უნდა იქნას როგორც *Y. pseudotuberculosis* ქვესახეობა. არსებობდა კიდევ მოსაზრება ამ სახეობების ერთი სახეობის ქვესახეობებად რეკლასიფიკაციის შესახებ, თუმცა მკვეთრად განსხვავებული გადაცემის მექანიზმების, პათოგენეზის, კლინიკური გამოვლინების და ასევე იმ როლის გამო რაც *Y. pestis* შეასრულა კაცობრიობის ისტორიაში, ამგვარი რეკლასიფიკაცია უკუგდებულ იქნა. ისევე როგორც *Y. pseudotuberculosis* და *Y. enterocolitica* შტამებში, *Y. pestis* პათოგენურობის პროცესში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს 70 – 75 kb pCD1 პლაზმიდა, რომელიც აკოდირებს ე.წ. III ტიპის სეკრეციულ აპარატს (T3SS - type III secretion system). ახლო გენეტიკური ნათესაობის მიუხედავად *Y. pseudotuberculosis* -გან განსხვავებით *Y. pestis* ბევრი გენი, რომლებიც ჩართულნი იყვნენ სხვადასხვა მეტაბოლურ გზებში და ვირულენტობაშიც კი, არ ექსპრესირდება; ამავე დროს, ლატერალური გადაცემის გზით *Y. pestis* შეიძენილი აქვს უნიკალური გენები.

შავი ჭირის მიკროორგანიზმის ევოლუციის მანძილზე მთავარი შენაძენი, რაც, სავარაუდოდ, მისი ვირულენტობის გაზრდის ძირითად მიზეზს წარმოადგენს – ორი პლაზმიდაა: pPCP1 (9.5 kb) და pMT1 (100 - 110 kb). ამ სამი ძირითადი პლაზმიდის გარდა რიგ შტამებში დამატებითი პლაზმიდებიც გვხვდება. *Y. pestis* პლაზმიდების აღმოჩენამ შესაძლებელი გახადა სხვადასხვა ბუნებრივი კერიდან გამოყოფილი შტამების პლაზმიდების პროფილების შედარება, ასევე ცალკეულ პროფილსა და შტამების ვირულენტობას შორის კავშირის დადგენა [23, 64]. როგორც ცნობილია პლაზმიდები *Y. pestis* ვირულენტობის ერთ-ერთი მთავარი განმსაზღვრელი ფაქტორია და ამ ფაქტორების სხვა შტამებში ტრანსფორმაცია შესაძლოა პირდაპირ კავშირში იყოს ვირულენტობის უნარის შეძენასა თუ დაკარგვაზე.

პლაზმიდური სპექტრი და სხვა მცირე გენეტიკური განსხვავებები სავარაუდოდ გახდა *Y. pestis* და *Y. pseudotuberculosis* მიერ სხვადასხვა დაავადების გამოწვევის და ვირულენტობაში არსებული მკვეთრი განსხვავების მთავარი მიზეზი.

Y. pestis ენზოოტიური შტამების კვლევამ გამოავლინა, რომ რიგ პოპულაციებში პლაზმიდური შემადგენლობა საკმაოდ სტაბილურია, მაშინ, როცა ზოგიერთ პოპულაციებში მნიშვნელოვანი ვარიაციები შეინიშნება. რიგ შემთხვევებში პლაზმიდები შეიძლება დაიკარგოს სპონტანურად, ლაბორატორიული შენახვის ან ხშირი გადათესვის პირობებში. პლაზმიდური შემადგენლობის შესწავლა გამოყენება დიაგნოსტიკასა და ეპიდემიოლოგიური კვლევებში [63, 88].

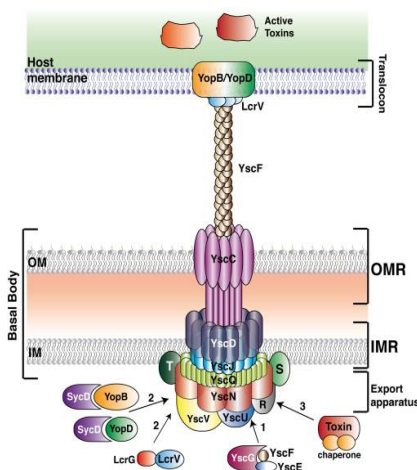
ბუნებრივ კერაში შესანარჩუნებლად, შავი ჭირის მიკრობს უნდა ჰქონდეს მასპინძლის ორგანიზმში შეაღწევის, მღრღნელის დამცავ ბაქტერიოციდულ სისტემისთვის წინააღმდეგობის გაწევის და ბაქტერიემიის გამოიწვევის უნარი, რაც უმნიშვნელოვანესია რწყილის საშუალებით ახალ მასპინძელზე ინფექციის შემდგომი ტრანსმისიისთვის. *Y. pestis* არსებობის ციკლის ყოველი ეს ეტაპი ხორციელდება შავი ჭირის გამომწვევის მრავალი ფაქტორების მეშვეობით, რომლებიც მონაწილეობენ რა ინფიცირებისა თუ ტრანსმისიის სხვადასხვა ეტაპზე, მოქმედებენ ერთობლივად ან ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად. თუმცა მხოლოდ ამ ფაქტორების ერთობლიობა უზრუნველყოფს შავი ჭირის გამომწვევის შენარჩუნებას ბუნებრივ კერაში, იმისდა მიუხედავად თუ რამდენად მნიშვნელოვანია მათი ცალკეული მოქმედების ეფექტი [5].

ვირულენტობის ფაქტორები

Y. pestis ვირულენტობაზე მთავარი პასუხისმგებელია 102კბ არასტაბილური ქრომოსომული უბანი, ე.წ. *pgm* ლოკუსი, რომელიც შედგება პიგმენტაციური სეგმენტისა (~68 კბ) და მაღალპათოგენური კუნძულისაგან (high-pathogenicity island – HPI; ~35 კბ), რომელიც ატარებს რკინის შეთვისებაში მონაწილე ვირულენტურ გენებს (იერსინიაბაქტინის ბიოსინთეზის გენების კლასტერი). ბაქტერიის გადარჩენა მასპინძლის ორგანიზმში მის რკინის შეთვისების უნარზეა დამოკიდებული (ძუძუმწოვრის ორგანიზმიდან). აღნიშნული ლოკუსის სრული დაკარგვა

ვირულენტობის მკვეთრ შემცირებას იწვევს [1]. ლოკუსის სრული დელეციის აღმოჩენა კონგოს წითელ აგარზე (CRA) ხდება. ბაქტერიის კოლონიების პიგმენტაციით განისაზღვრება, *Y. pestis* სტრუქტურულად რკინის მსგავსი კონგოს წითელი საღებავის შეთვისების უნარი. ლოკუსის სრულ დელეცია განაპირობებს შტამების *Pgm*- ფენოტიპს (თეთრ კოლონიებს) კონგოს წითელ აგარზე (CRA), რაც პიგმენტაციური სეგმენტის დაკარგვის შედეგია. *pgm* - ფენოტიპის მქონე შტამებს მასპინძლის ორგანიზმიდან რკინის შეთვისების უნარი დაკარგული აქვთ, რაც გამოიხატება ვირულენტურობის მკვეთრი დაქვეითებით. ეს შტამები ადამიანისთვის ავირულენტურად ითვლებიან და სწორედ *pgm* - შტამის საფუძველზე შეიქმნა ცოცხალი ვაქცინა (EV76). *pgm* ლოკუსის სპონტანური დელეცია ლაბორატორიაში მაღალი სიხშირით ხდება (10^{-5}). *pgm* ლოკუსის არასტაბილურობა, როგორც ჩანს, განპირობებულია ამ უბნის შემომსაზღვრელ ორ ჩართულ ელემენტს (*IS100*) შორის რეკომბინაციებით [77].

Y. pestis პათოგენურობის პროცესში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ტემპერატურით რეგულირებადი ე.წ. III ტიპის სეკრეციულ აპარატი (T3SS, Ysc Yersinia SeCretion), რომელიც მასპინძლის უჯრედში ბაქტერიის ფაგოციტოზისა და იმუნურ პროცესების მაინჰიბირებელ ციტოტოქსინების და ეფექტორების შეღწევაზეა პასუხისმგებელი. 37°C-ზე (და არა 26°C-ზე), გამდიდრებულ საკვებ არაზე,



სურათი 15. *Yersinia spp.* III ტიპის სეკრეციულ აპარატის (T3SS) სქემატური დიაგრამა [76].

Ca^{2+} დაბალი კონცენტრაციისას *Y. pestis* ვეგეტატიური ზრდა ფერხდება, რაც განპირობებულია III ტიპის სეკრეციული აპარატის ექსპრესიით. არსებობს 29 განსხვავებული Ysc პროტეინი, რომელთა შეკრებით ყალიბდება ფორა ბაქტერიის შიდა და გარეთა მემბრანაში. როცა ბაქტერია უკავშირდება ეუკარიოტულ უჯრედს, რამდენიმე ტრანსლოკაციური გარე მემბრანულ პროტეინი - Yop (Yersinia Outer membrane Proteins - YopB, YopD, *LcrV*) წარმოქმნის ფორას

ეუკარიოტულ უჯრედში. ამის შემდგომ ეფექტორული Yop (YopE, YopH, YpkA/YopO, YopP/YopJ, YopM, YopT) გადის ბაქტერიულ და ეუკარიოტულ მემბრანებს შორის წარმოქმნილ არხში და შეაღწევს ეუკარიოტული უჯრედის ციტოპლაზმაში (სურ. 15). არსებობს სულ ცოტა ექვსი ეფექტორული Yop, რომლებიც ეუკარიოტულ უჯრედში მოხვედრისას აინჰიბირებენ ფაგოციტოზს და იწვევენ აპოპტოზს მაკროფაგებში [76].

pCD პლაზმიდა ასევე აკოდირებს ძირითად ვირულენტობის ფაქტორს - V ანტიგენს (*LcrV*), რომელიც პროტეკციული ანტიგენის სახელით არის ცნობილი. V ანტიგენი მონაწილეობას იღებს T3SS ექსპრესიის რეგულაციაში და ასევე გააჩნია მასპინძლის იმუნურ სისტემაზე იმუნოსუპრესორული მოქმედება. *LcrV* (Low-calcium response stimulon) აინჰიბირებს ნეიტროფილების ქემოტაქსისს, იწვევს ფაგოციტების არაასპეციფიკური აქტივობისათვის აუცილებელი γ -ინტერფერონისა და სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორის α -ციტოკინების სინთეზის სუპრესიას. V ანტიგენი ასევე არეგულირებს Yop –ს სეკრეციას [25, 91, 97, 98, 108].

მიკრობის ვირულენტობას ასევე განაპირობებს 9.5Kb პლაზმიდა (pPCP1) რომელიც აკოდირებს ქსოვილში შეღწევადობაზე პასუხისმგებელ პლაზმინოგენ აქტივატორს (*pla*). *pla* პროტეაზაა რომელიც ხელს უშლის სისხლის კოაგულაციას. მისი ექსპრესია უზრუნველყოფს *Y. pestis* გავრცელებას პერიფერიიდან - საწყისი რწყილის კბენის ადგილიდან - ლიმფური ჯირკვლებისკენ, მის შემდგომ გამრავლებას და სისხლის მიმოქცევაში ინვაზიას.

ვირულენტობის მესამე pMT1 (100 - 110 kb) პლაზმიდა 37°C აკოდირებს ანტიფაგოციტური აქტივობის მქონე კაფსულის პროტეინს, ფრაქცია 1 ანტიგენს (Fraction 1, F1) და ფოსფოლიპაზა D-ს (თაგვის ტოქსინი, Murin Toxin -MT), რომელიც ბაქტერიის რწყილის ორგანიზმში გადარჩენაზე პასუხისმგებელი. MT ლეტალურია თაგვებისა და ვირთაგვების და არა სხვა მასპინძლების მიმართ [68, 73]. მოქმედებს როგორც ადრენერგული ანტაგონისტი გულის და თირკმელების მიტოქონდრიებში და თრგუნავს ჟანგვა - აღდგენით პროცესებს. გააჩნია ფოსფოლიპაზური, ფოსფატაზური, ავტოკინაზური, ფოსფოდიესთერაზული, დეზამინაზური აქტივობა.

შავი ჭირის ბუნებრივი კერები ხშირ შემთხვევაში ერთმანეთთან გეოგრაფიულად არ არიან დაკავშირებულნი, რაც სხვადასხვა გარემო პირობებში მიკროორგანიზმის გადარჩენასა და ტრანსმისიის უზრუნველსაყოფად *Y. pestis*

მნიშვნელოვან ეკოლოგიურ მრავალფეროვნებას მოითხოვს. სხვადასხვა ბუნებრივი კერებიდან გამოყოფილი შტამები ავლენენ განსხვავებულ ვირულენტობას გარეული და ლაბორატორიული ცხოველების მიმართ [1, 9, 10], გააჩნიათ განსხვავებული პლაზმიდური შემადგენლობა ფერმენტული აქტივობა და საკვებ ნივთიერებებზე მოთხოვნა, რაც სათანადოდ აისახება *Y. pestis* გენოტიპსა და ფენოტიპის მრავალფეროვნებზე [10, 15, 85 93, 94].

გენოტიპირება

Y. pestis ტიპირებისთვის მიმართავენ როგორც ფენოტიპურ ასევე გენეტიკურ მეთოდებს. ფენოტიპური მეთოდები დაფუძნებულია მიკროორგანიზმის საკვები ნივთიერებებისადმი მოთხოვნილებაზე, სხვადასხვა სუბსტრატის ფერმენტაციის უნარსა და სხვადასხვა სახეობის ძუძუმწოვრებისადმი ვირულენტობაზე.

ფენოტიპური მეთოდებით *Y. pestis* შტამების დიფერენცირებია საკმაოდ შეზღუდულია, ამასთანავე ფენოტიპური თვისებების არასტაბილურობა, დამოკიდებულება ექსპერიმენტის პირობებზე და ატიპური შტამების არსებობა მნიშვნელოვნად ართულებს შედეგების ინტერპრეტაციას [7]. აღნიშნულიდან გამომდინარე შავი ჭირის მიკრობის ტიპირებისთვის გადამწყვეტი როლი ენიჭება მოლეკულური კვლევის მეთოდებს. ამ მიზნით სხვადასხვა დროს მიმართავდნენ პლაზმიდური სპექტრის ანალიზს, რესტრიქციული საიტების პოლიმორფიზს RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), რიბოტიპირებას, პულსირებად გელ ელექტროფორეზს - PFGE (Pulse Field Gell Elecrtophoresis), IS100 ელემენტებით ტიპირებას [94, 103]. ბოლო ხანებში, მიკროორგანიზმის გენომის სრული ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების ხელმისაწვდომობამ შესაძლებელი გახადა ახალი, თანამედროვე, მაღალი გარჩევადობის მქონე მოლეკულურ - გენეტიკური მეთოდების განვითარება, როგორც არის ერთნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის ანალიზი SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) ტიპირება, მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი MLVA – (Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analisis) [116].

ბოლო დრომდე *Y. pestis* თითოეული ბიოვარიანტის დიფერენცირება შეზღუდული იყო. ტექნოლოგიურმა წინსვლამ მოლეკულურ ბიოლოგიაში გააიოლა შტამების ერთმანეთისაგან გარჩევა. სხვადასხვა ლოკუსის გენოტიპირების მეთოდი არა მხოლოდ შტამების ბიოვარიანტებად დაჯგუფების და ცალკეული იზოლატის დიფერენცირების საშუალებას იძლევა, არამედ ადგენს მათ შორის არსებული ფილოგენეტიკურ კავშირებს.

შავი ჭირის გამომწვევის უნარი, გადარჩეს, შეეგუოს და შეინარჩუნოს ტრანსმისიის უნარი განსხვავებულ ეკოლოგიურ პირობებში, განპირობებულია ორგანიზმის განსაკუთრებული ადაპტაციის უნარით. *Y. pestis* გენომში მრავლად გვხვდება ჩართული თანამიმევირობები (Insertion Sequences- IS), რამაც დიდი მნიშვნელობა იქონია მიკროორგანიზმის გენომის მაღალ პლასტიურობაზე [101]. გენომური გადანაცვლებების, რეკომბინაციების უნარი სავარაუდოდ შავი ჭირის მიკრობის ახალ ეკოლოგიურ ნიშაში ადაპტაციისათვის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანეს თვისებაა.

IS ელემენტები წარმოადგენენ პროკარიოტებში ზომით ყველაზე მცირე მობილურ გენეტიკურ ელემენტებს. მათ აქვთ ქრომოსომაში, პლაზმიდებში დამოუკიდებელი, თვითკონტროლირებადი გადაადგილების უნარი. IS – ელემენტები ატარებენ მხოლოდ ტრანსპოზიციისთვის საჭირო ინფორმაციას. სხვა მობილური გენეტიკური ელემენტების მსგავსად IS ელემენტებს შეუძლიათ ჩაერთონ დნმ-ის სხვადასხვა უბანში და გამოიწვიონ ინსერციული მუტაციები, მეორადი გადანაცვლებები და რეპლიკონების კონტეგრაცია. გარდა ამისა ჰომოლოგიურ IS – ელემენტების წყვილს აქვს უნარი წარმოქმნას შედგენილი ტრანსპოზონები, რომლებშიც ჩართულია წამლისადმი რეზისტენტობის, შაქრების უტილიზაციის და ა.შ. გენები. ამ თვისებების გამო IS ელემენტები გვევლინება როგორც მნიშვნელოვანი ფაქტორი მოლეკულურ ევოლუციაში, ასევე წარმოადგენს გენეტიკურ ანალიზის ეფექტურ ინსტრუმენტს.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ *Y. pestis* გენეტიკურად ძალიან ახლოს დგას *Y. pseudotuberculosis* –თან, თუმცა IS ელემენტების რაოდენობით ეს ორი სახეობა მკვეთრად განსხვავდება ერთმანეთისგან. *Y. pseudotuberculosis* -თან შედარებით *Y. pestis* გაცილებით მეტ ჩართული ელემენტები აქვს. *Y. pestis* გენომის 3.7% IS

ელემენტებს უკავიათ (IS100, IS285 და IS1541, IS1661). *Y. pseudotuberculosis* შტამებში IS100 და IS1541 მხოლოდ 5 ასლის, IS285 - შვიდი - IS1661 და სამი ასლია აღმოჩენილი [7, 41, 70]. *Y. pestis* რეფერენს შტამის CO92 (Colorado92) გენომში IS1541 - 66, IS100-ის 44, IS285-ის 21 და IS1661-ის ცხრა სრული ასლი ან ფრაგმენტი აღმოჩენილი. სხვადასხვა შტამები განსხვავდებიან ქრომოსომასა თუ პლაზმიდებში ამ ელემენტების ასლების რაოდენობითა და ლოკალიზაციით. IS100-ით და სხვა ჩართული ელემენტებით (IS285, IS1541, IS1661) განპირობებული რეკომბინაციები და რიგი გენების ინაქტივაცია, სავარაუდოდ, გახდა *Y. pestis* ვირულენტობის გაზრდის ერთ-ერთი მთავარი მიზეზი. *Y. pestis* გენომში IS – ელემენტების მდებარეობის შესწავლა შტამებს შორის ევოლუციური კავშირის დადგენის და შიდასახეობრივი მოლეკულური ტიპირების საშუალებას იძლევა [94].

ბაქტერიული შტამების მოლეკულური დიფერენცირების ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებულ მეთოდად გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (PFGE), რომელიც სხვადასხვა პათოგენების მოლეკულური ტიპირების მეთოდების “ოქროს სტანდარტად” მიიჩნევა; მეთოდი ხასიათდება მაღალი გარჩევადობის უნარით და ფართოდ გამოიყენება მსოფლიოს სხვადასხვა კუთხეში იზოლირებული *Y. pestis* შტამებს შორის გენეტიკური ვარიაციულობის აღმოსაჩენად [80].

მეთოდი დაფუძნებულია გენომური დნმ-ის ექსტრაქციაზე და შემდეგ მისი რესტრიქციული ენდონუკლეაზით დამუშავებაზე, რის შედეგადაც მიიღება 10-20 მაღალმოლეკულური მასის მქონე ფრაგმენტი. ამ ფრაგმენტების დაცილება ხდება პულსირებად ველში გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით. ფრაგმენტებით მიღებული პროფილი ყველა შტამისთვის უნიკალურია.

ერთნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (Single-Nucleotide Polymorphism, SNP) რომელიც მრავლად გვხვდება ყველა სახეობის გენომში, წარმოადგენს დიდი ინფორმაციის მქონე ბიოლოგიურ მარკერს, რომელიც ხშირად გამოიყენება სხვადასხვა ტიპის სამეცნიერო კვლევებში. SNP ხშირად განიხილება როგორც წერტილოვანი მუტაცია, რომელიც ევოლუციურად წარმატებული აღმოჩნდა იმდენად, რამდენადაც დამკვიდრდა სახეობის პოპულაციაში. SNP-ის გამომწვევი შესაძლოა იყოს ერთი ნუკლეოტიდის ტრანსვერსია, ტრანსციზია, ინსერცია ან

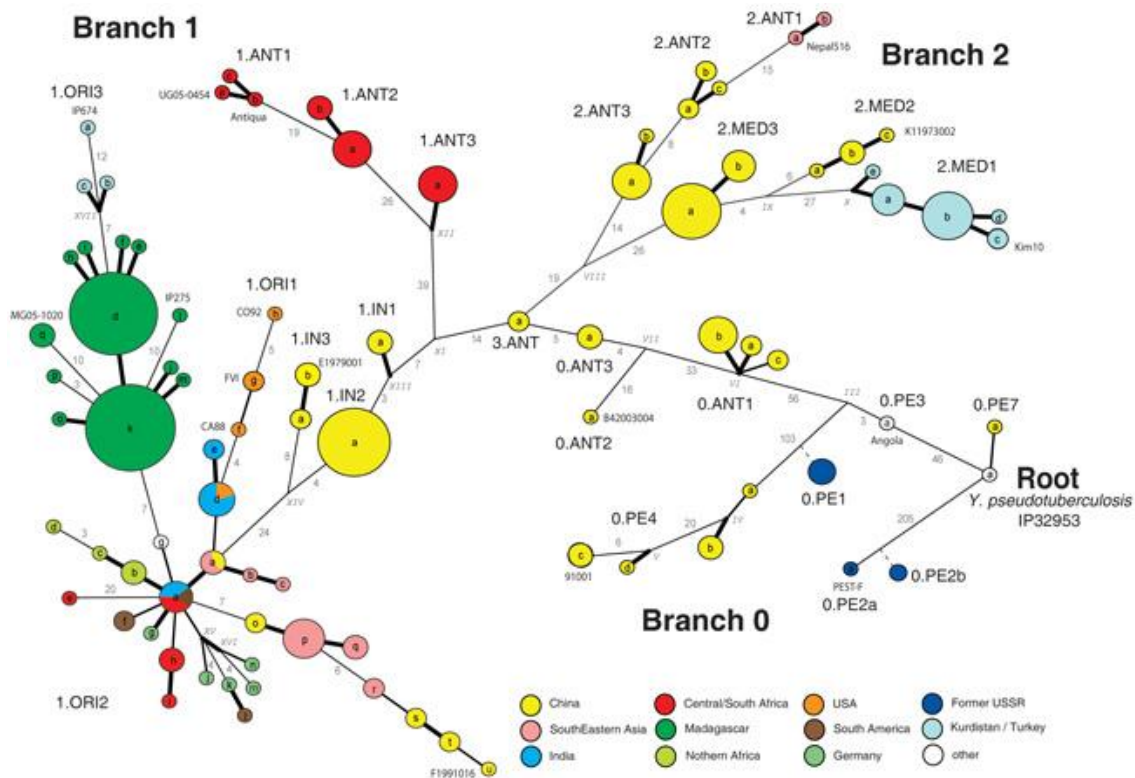
დელეცია. SNP მრავლად გვხვდება ბაქტერიულ გენომში და ფართოდ გამოიყენება პათოგენური ბაქტერიების, მათ შორის *Y. pestis* გენოტიპირებასა და ევოლუციურ კვლევებში.

ერთნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი გენომში არათანაბრად არის განაწილებული, გვხვდება როგორც კოდირებად ასევე არაკოდირებად და გენთაშორის უბნებში. SNP რომელიც არ იწვევს ამინომჟავური თანმიმდევრობის შეცვლა სინონიმური SNP ეწოდება (sSNP), ხოლო ის SNP, რომელიც გენეტიკური კოდის ცვლილების გამო იწვევს ახალი, განსხვავებული ამინომჟავის ჩართვას ან სტოპ კოდონის გაჩენას არასინონიმური SNP (nsSNP) ეწოდება. თეორიულად შესაძლებელია SNP-ის 4 განსხვავებული ალელის არსებობა. თუმცა რეალურად ბაქტერიულ პოპულაციებში მსგავსი შემთხვევების გამოვლენა ძალიან იშვიათია [81]. პოპულაციაში SNP-ები უმეტესწილად ორი ალტერნატიული ალელით არის წარმოდგენილი. სახეობის სხვადასხვა წარმომადგენლებს შორის მსგავსი გენეტიკური ვარიაციების საშუალებით მიიღება დნმ-ის ანაბეჭდი, რაც შემდგომ შესაძლოა გამოყენებულ იქნას როგორც ეპიდემიოლოგიურ კვლევებში, ასევე კრიმინალისტიკაში.

SNP შედარებით დაბალი სიხშირით გვხვდება ისეთ ახალგაზრდა და ჰომოგენურ ორგანიზმის გენომში როგორიც არის *Y. pestis*. თუმცა, სრული გენომის პირველადი თანმიმდევრობების (სექვენსების) შედარებისას ახლომდგომ შტამებშიც კი შესაძლოა ასობით ახალი SNP იქნას აღმოჩენილი. სრული გენომების შედარებაზე დაფუძნებული SNP ფილოგენეტიკა მაღალი სიზუსტით განსაზღვრავს ევოლუციურ ხეზე ტოტების განლაგების თანმიმდევრობას და სიგრძეს.

მსოფლიოს სხვადასვა კუთხის ბუნებრივი კერებიდან იზოლირებული შტამების სრული გენომის სექვენირების საფუძველზე ჩატარებული SNP ტიპირებით, განისაზღვრა შავი ჭირის გამომწვევის გლობალური ფილოგენია, რომლის მიხედვითაც ბიოვარ. Antiqua წარმოდგენილია 0.ANT ტოტით, საიდანაც გამოდიან ბიოვარის სხვა განშტოებები 1.ANT, 2.ANT, 3.ANT, და 4.ANT. თავის მრივ 1.ANT გამოდის ბიოვარ Orientalis განშტოება (1.ORI), ხოლო 2.ANT- დან bv. Medievalis 2.MED განშტოება. ე.წ. პესტოიდესების ატიპიური შტამები „0“ ღეროდან გამომავალ ყველაზე ღრმა ტოტებზე (0.PE2-დან 0.PE7 ჩათვლით) განლაგდნენ (სურ. 16). ჩინეთის

ტერიტორიაზე იზოლირებული შტამების სხვადასხვა პოპულაციები მთელ ევოლუციურ ხეზეა მიმოფანტული, რის საფუძველზე ითვლება, რომ *Y. pestis* სწორედ ჩინეთში წარმოიშვა და შემდგომ სხვადასხვა მიმართულებით გავრცელდა (დასავლეთით - აბრეშუმის გზით, აფრიკაში - ჩინეთის საზღვაო ხომალდებით) [3, 50, 93].



სურათი 16. *Y. pestis* SNP ევოლუციური მოდელი. *Y. pestis* 282 იზოლატის 933 SNP ტიპირების შედეგებზე დაყრდნობით აგებული *Y. pestis* გლობალური ფილოგენეტიკური ხე [93].

SNP გენოტიპირების მეთოდების დიდი ნაწილი პჯრ ამპლიფიკაციაზე და მის თანმდევ იდენტიფიკაციის ეტაპებზეა დაფუძნებული. ასევე შექმნილია მაღალი სიმჭიდროვის SNP მიკროარეზები, რომლებზეც დატანილია მიკროორგანიზმების სრული გენომის სექვენირების საფუძველზე აღმოჩენილი ათობით ათასი SNP ვარიაციები. მეთოდი მაღალი სანდოობით და სიზუსტით გამოირჩევა და გამოიყენება დიდი რაოდენობით ბაქტერიული შტამების ერთდროულად დასახასიათებლად/ დასატიპირებლად, ზუსტი ფილოგენეტიკური ანალიზისთვის და ასევე გენეტიკურად ახლოს მდგომ შტამებში გარჩევა-განსხვავების გამოსავლენად. SNP

მიკროარეთი ტიპირებას სხვა, ლოკუს სპეციფიკურ ტიპირების მეთოდებთან შედარებით (IS100, MLST, MLVA) ბევრად უფრო მაღალ რეზოლუციით გამოირჩევა. SNP მიკროარეთი ტიპირება სექვენირების ალტერნატივად შეიძლება იყოს განხილული, ვინაიდან გამოავლენს მთლიანი გენომის პოლიმორფიზმს.

მრავალ პროკარიოტულ გენომში აღმოჩენილია ტანდემური განმეორებების განსაკუთრებული ოჯახი, როგორც არის კლასტერული მოკლე პალინდრომული განმეორებადი უბნები (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR). CRISPR ელემენტები შედგებიან კონსერვატული 21–37 bp პირდაპირი განმეორებებისგან (Direct repeats - DRs), რომლებიც არაგანმეორებადი ე.წ. „სპეისერებით“ ("spacers") არიან ერთმანეთისგან გამოყოფილნი. სპეისერები ხშირ შემთხვევაში ვირუსული წარმოშობისაა და დნმ-ის რეკომბინაციასა და რეპარაციაში არიან ჩართულნი. CRISPR კლასტერის ერთერთ ბოლოსთან მდებარეობს არაკოდირებადი, AT- მდიდარი უბანი, ე.წ. ლიდერული თანმიმდევრობა (leader sequences), რომელიც პრომოტორის ფუნქციას ასრულებს. CRISPR ელემენტები, მასთან დაკავშირებულ Cas პროტეინებთან (CRISPR-associated proteins -Cas) და ლიდერულ თანამიმდევრობასთან ერთად ბაქტერიოფაგის შეჭრის საწინააღმდეგო, პროკარიოტულ იმუნურ სისტემის ნაწილს წარმოადგენენ (სურ. 17). *Y. pestis* გენომში სამი CRISPR ელემენტი YP1, YP2 and YP3 და 137 სპეისერია იდენტიფიცირებული. *Y. pestis* გენომში სპეისერების და პირდაპირი განმეორებების (DR) განაწილებით სხვადასხვა კერიდან იზოლირებული შტამები განსვავებებს ავლენენ, რაც სათანადოდ გამოყენებულია მიკრობის გენოტიპირებისთვის და ევოლუციურ კვლევებში.



სურათი 17. CRISPR-Cas სისტემის წყობა.

სრული გენომის სექვენირება (WGS) მძლავრი ტექნოლოგიაა, რომელიც სწრაფად იძენს პოპულარობას და მისი გამოყენება სულ უფრო ხელმისაწვდომი ხდება სხვადასხვა ტიპის სამეცნიერო კვლევებში, დიაგნოსტიკისა და კლინიკური მიკრობიოლოგიაში. ბაქტერიული პათოგენების WGS გენომის სტრუქტურული ორგანიზების განსაზღვრის და მეტაბოლური თავისებურებების გაანალიზების შესაძლებლობას იძლევა. მისი საშუალებით არა მხოლოდ ცალკეული გენების შედარება, გენომში IS ელემენტების რაოდენობის და ლოკალიზაციის განსაზღვრა, არამედ იმ გენების გამოვლენა შესაძლებელი, რომლებიც შტამების განსხვავებულ ვირულენტობაზე არიან პასუხისმგებელნი.

Y. pestis სრული გენომის სექვენირების მონაცემები სულ უფრო სწრაფი ტემპით გროვდება. პირველი *Y. pestis* შტამი, რომლის სრული გენომის სექვენირება ჩატარდა, იყო ჩრდილოეთ ამერიკიდან გამოყოფილი შტამი bv. Orientalis CO92 [101]. სწორედ ამ შტამის თანმიმდევრობის საფუძველზე მოხდა მრავალი პოლიმორფული უბნების იდენტიფიცირება, რამაც მრავალ სუბტიპირების მეთოდს ჩაუყარა საფუძველი [87, 94]. ახალი პოლიმორფიზმების აღმოსაჩენად სხვა შტამების სრული გენომების სექვენირება იყო საჭირო. ამ მიზნით მოხდა *Y. pestis* მეორე შტამის სექვენირება KIM10 (bv. Medievalis, 2.MED) [51], რასაც შემდგომ მოჰყვა *Y. pestis* ყველა ძირითადი პოპულაციის/ბიოვარების მინიმუმ ერთი წარმომადგენლის სექვენირება. ზემოხსენებული გენომების შედარებით შესაძლებელი გახდა *Y. pestis* ევოლუციური კვლევებისა და გავრცელების შესახებ მნიშვნელოვანი ინფორმაციის მოპოვება.

2.3. კვლევის მეთოდები

კვლევაში გამოყენებული მასალა

ჩვენ მიერ შესწავლილია საქართველოს ტერიტორიაზე არსებული შავი ჭირის ბუნებრივი კერებიდან, სხვადასხვა ობიექტებიდან და სხვადასხვა დროს იზოლირებული *Y. pestis* 40 შტამთან ერთად, დაავადებათა კონტროლის და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის ბაქტერიების და ვირუსების ეროვნულ კოლექციაში არსებული სომხეთის (2), აზერბაიჯანის (1), რუსეთის ფედერაციის (დაღესტანი-1, ყაზარდო-ბალყარეთი -1) და ყირგიზეთის (1), ტერიტორიაზე გამოყოფილი შტამები (იხ. ცხრილი #1).

ცხრილი 1. დესჯეც -ის ცოცხალი ვირუსებისა და ბაქტერიების ეროვნულ კოლექციაში დაცული *Y. pestis* შტამები

შტამის No.	გამოყოფის წელი	გამოყოფის წყარო	გამოყოფის ადგილი
C771	1966	<i>Meriones erythourus</i>	აღმოსავლეთ საქართველოს ვაკე-მთისწინა კერა, კახეთი, დედოფლისწყარო, ელდარის დაბლობი, 100 მეტრი #1 ფერმიდან
G1390	1979	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 5-6 კმ. მთა მადატაფადან
G1391	1979	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 5-6 კმ. მთა მადატაფადან
G1392	1979	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 5-6 კმ. მთა მადატაფადან
G1393	1979	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 5-6 კმ. მთა მადატაფადან
G1412	1979	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 4 კმ. მთა დალიდაგიდან
G1413	1979	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 3-3.5 კმ. სოფ. გორელოვკადან
G1670	1979	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 5 კმ. მთა მადატაფადან
G1851	1980	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 5 კმ. მთა მადატაფადან
G1852	1980	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 1-1.5 კმ. მთა მადატაფადან
G1853	1980	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 1-1.5 კმ. მთა მადატაფადან
G1952	1980	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2-2.5 კმ. მთა მადატაფადან
G1953	1980	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2-2.5 კმ. სოფ. გორელოვკადან
G1954	1980	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2-2.5 კმ. სოფ. გორელოვკადან
G2095	1981	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 5-6 კმ. სოფ. გორელოვკადან
G3064	1982	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, ახალქალაქი, 5 კმ. სოფ. ოკამიდან

G3065	1982	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, ახალქალაქი, 5 კმ. სოფ. ოკამიდან
G3066	1982	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, ახალქალაქი, 5 კმ. სოფ. ოკამიდან
G3067	1982	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, ახალქალაქი, 5 კმ. სოფ. ოკამიდან
G3072	1982	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, ახალქალაქი, 5 კმ. სოფ. ოკამიდან
G3073	1982	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, ახალქალაქი, 5 კმ. სოფ. ოკამიდან
G3082	1982	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, ახალქალაქი, 5 კმ. სოფ. ოკამიდან
G3083	1982	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, ახალქალაქი, 5 კმ. სოფ. ოკამიდან
G3757	1983	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 3-3.5 კმ. მთა მადატაფადან
G3758	1983	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 3-3.5 კმ. მთა მადატაფადან
G3768	1983	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 3-3.5 კმ. მთა მადატაფადან
G3769	1983	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 1 4 კმ. მთა გეკედაკიდან
G3770	1983	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 3-3.5 კმ. მთა მადატაფადან
G8786	1992	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2 კმ. მთა მადატაფადან
G8787	1992	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2 კმ. მთა მადატაფადან
G8788	1992	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2 კმ. მთა მადატაფადან
G8789	1992	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2 კმ. მთა მადატაფადან
G8790	1992	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2 კმ. მთა მადატაფადან
G8791	1992	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2 კმ. მთა მადატაფადან
G8792	1992	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 2 კმ. მთა მადატაფადან
G8793	1992	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 3 კმ. მთა მადატაფადან
G8794	1992	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 3 კმ. მთა მადატაფადან
G8906	1997	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 4 კმ. მთა დალიდაგიდან
G8907	1997	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 4 კმ. მთა დალიდაგიდან
G8908	1997	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა, სამცხე ჯავახეთი, 3.5 კმ. მთა დალიდაგიდან
C790	1961	<i>Marmota caudata</i>	ყირგიზეთი, ოშის რეგიონი, ალაის ველი
C2944	1975	<i>Citellus musicus,</i>	ცენტრალური კავკასიის მაღალმთიანი კერა, რუსეთი, ყაზარდო-ბაღყარეთი, ბაქსანის რაიონი, სოფ. ბილიმი
C2619	1975	<i>N. setosa</i>	დაღესტანის ვეკე-მთისწინა კერა, რუსეთი, დაღესტანი, ბაზაურტის ოლქი, სოფელი ჰუტ-კუმ აული
C1045	1976	<i>Meriones libicus</i>	გობუსტანის ვაკე-მთისწინა კერა, აზერბაიჯანი, აშერონის ნახევარკუნძული, სოფ. შუველიანი
C14735	1975	<i>Microtus arvalis</i>	ზანგეზურ-ყარაბაღის მთისკერა, სომხეთი, სუნიკის რეგიონი, სისიანის რაიონი, 2კმ ჩრდილოეთით სოფ. სარნაკუკიდან
C1522	1975	<i>Microtus arvalis</i>	გიუმრის (ყოფილი ლენინაკანის) მაღალმთიანი კერა, სომხეთი, შირაქის რეგიონი, აშოცკის რაიონი, 2კმ სოფ. ცოგომარგიდან



სურათი 18. დსკჯეც-ის კოლექციაში არსებული *Y. pestis* შტამების იზოლაციის ადგილები. რუკა შექმნილია ArcGIS 10.3.პროგრამის საშუალებით.

უსაფრთხოების წესები შავი ჭირის გამომწვევზე მუშაობისას

ცოცხალ კულტურაზე მუშაობის ყველა პროცედურა ტარდებოდა ბიოუსაფრთხოების მეორე და მესამე დონის (BSL-2, BSL-3) ლაბორატორიებში ბიოუსაფრთხოების სტანდარტების დაცვით. სამუშაოები წარმოებდა ჯანმო-ს და აშშ საფრთხის შემცირების სააგენტოს (DTRA) მიერ მოწოდებული რეკომენდაციებით შემუშავებული ალგორითმის მიხედვით. გამოიყენებოდა პირადი დამცავი აღჭურვილობა: ლაბორატორიული ხალათები, ერთჯერადი ხელთათმანები; სათვალეები. მუშაობის დასრულების შემდეგ ლაბორატორიული ნარჩენების ავტოკლავირება ხდებოდა 121°C -ზე 30 წუთის განმავლობაში და შემდგომ ნადგურდებოდა ინსცენერატორში.

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში

საქართველოში შავი ჭირის ბუნებრივ კერებზე ეპიდზედამხედველობის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან რგოლი, აღნიშნული კერებიდან მოპოვებული საველე მასალაში გამომწვევის დროული და ზუსტი იდენტიფიკაციაა. ამ მიზნით გამოიყენება

რამდენიმე კომერციული თუ არაკომერციული პ.ჯ.რ რეალურ დროში real-time PCR სარეაქციო ნაკრები.

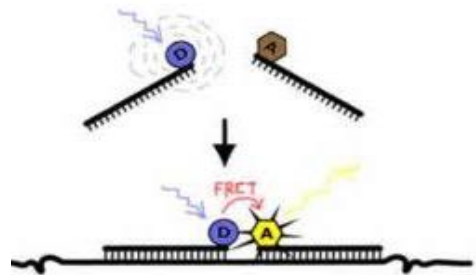
დნმ-ის ექსტრაქცია

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციისთვის დნმ-ის ექსტრაქცია, ბაქტერიების და ვირუსების ეროვნულ კოლექციაში არსებული კულტურებიდან და სხვა მასალიდან, QIAamp DNA Mini ნაკრების საშუალებით, მწარმოებლის ინსტრუქციის შესაბამისად ხდებოდა (QIAamp® DNA Mini Handbook; QIAGEN Inc. www.qiagen.com.):

პჯრ რეალურ დროში - Idaho Technology ნაკრების გამოყენებით

დსჯეც ცოცხალი კულტურების კოლექციაში არსებული *Y. pestis* 46 შტამზე მოხდა *Y. pestis*-ის real-time PCR სადიაგნოსტიკო ნაკრები - Idaho Technology, *Y. pestis* - Target1, Target2 გამოცდა. აღნიშნულ სარეაქციო ნაკრებში ამპლიფიკაციის პროდუქტის დეტექცია ემყარებოდა ჰიბრიდიზაციული ზონდების (HybProbe) ფლუორესცენტრულ რეზონანსული ენერგიის გადაცემის (fluorescence resonance energy transfer - FRET) პრინციპს (სურ. 19).

მზა ლიოფილიზირებულ სარეაქციო არეს, რომელიც შეიცავდა ამპლიფიკაციისათვის აუცილებელ Mg^{+2} -ის იონებს, *Taq*-პოლიმერაზას, დეზოქსინუკლეოზიდტრიფოსფატები (dNTPs), გამომწვევის სპეციფიკურ პრაიმერებსა და ფლუორესცენტული საღებავით მონიშნულ ზონდებს, ემატებოდა 40 მკლ დნმ-ი. ნარევი თანაბრად ნაწილდებოდა ორ 20 მკლ-იან კაპილარში. რეაქცია მიმდინარეობდა კაპილარულ, რეალური დროის



სურათი 19. ჰიბრიდიზაციული ზონდების ფლუორესცენტრულ რეზონანსული ენერგიის გადაცემის პრინციპის ილუსტრაცია.

პ.ჯ.რ აპარატში - Light Cycler 2.0 (Roche). ყველა რეაქცია იდგმებოდა დადებით და უარყოფით კონტროლთან ერთად. რეაქციის პირობები მოცემულია მე-2 ცხრილში:

ცხრილი 2. Idaho Technology *Y. pestis* რეალურ დროში პჯრ პირობები

პროგრამა	ციკლების რაოდენობა	ტემპერატურა (°C)	დრო	ტემპერატურის ცვლილების სისწრაფე (°C/sec)
საწყისი დენატურაცია	1	94	2 წთ	20
ამპლიფიკაცია	45	94	12 წმ	20
		60	25 წმ	20
არხი/ტალღა	640/530 ნმ			

Idaho Technology *Y. pestis* real-time PCR ნაკრების მგრძნობელობის დასადგენად ხდებოდა დადებითი ნიმუშების დნმ-ის სერიული ათჯერადი განზავებების (30 ნგ, 3 ნგ, 0.3 ნგ, 30 პგ, 3 პგ, 0.3 პგ, 30 ფგ და 3 ფგ) მომზადება. დნმ-ის საწყისი კონცენტრაციის განსაზღვრა ხდებოდა NanoDrop 2000-ზე. აღნიშნულ განზავებებზე პჯრ რეაქცია *Y. pestis* ორ სამიზნე უბანზე (*Y. pestis* T1, T2) დუბლიკატებში იდგმებოდა.

Y. pestis-ის სპეციფიკური TaqMan პჯრ: პლაზმიდური სპექტრის განსაზღვრა

საქართველოს ბუნებრივ კერებში იზოლირებული *Y. pestis* შტამების დეტექციისთვის ასევე გამოიყენა TaqMan-ის პრინციპზე დაფუძნებული არაკომერციული პჯრ რეალურ დროში პრაიმერები და ფლუორესცენტული ზონდები [120]. ვირულენტობის განმსაზღვრელი პლაზმიდური (pMT1/*cafI*; pCD1/*lcrV* და pPCP1/*pla*) და ქრომოსომული (*yihM*) გენების დეტექციისთვის ცოცხალი კულტურების მუზეუმში არსებულ 46 *Y. pestis* ასევე *Y. pseudotuberculosis* (12) და *Y. enterocolitica*-ს (5) შტამებზე დაიდგა პჯრ რეაქცია შემდეგი პრაიმერებით (ცხრ. 3)

ცხრილი 3. *Y. pestis* -ის ქრომოსომული და პლაზმიდური გენების სპეციფიკური პრიმერების და ფლუორესცენტული ზონდების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა.

სამიზნე გენი	პრიმერები/ ფლუორესცენტული ზონდები	სექვენსი (5'→ 3')	ფრაგმ. ზომა (bp)
ქრომოს. (<i>yihN</i>)	<i>yihN</i> Fp	CGCTTTACCTTCACCAAACCTGAAC	128
	<i>yihN</i> Rp	GGTTGCTGGGAACCAAAGAAGA	
	<i>yihN</i> ფლრ. ზონდი	FAM-TAAGTACATCAATCACACCGCGACCCGCTT-BHQ1	
pMT1 (<i>cafI</i>)	pMT1 Fp	CCGTTATCGCCATTGCATTATTTGG	194
	pMT1 Rp	GCCAAGAGTAAGCGTACCAACAAG	
	pMT1 ფლრ. ზონდი	FAM--AAGCACCACCTGCAACGGCAACTCTT- BHQ1	
pCD1 (<i>IcrV</i>)	pCD1 Fp	AGTTCCTTGAATCATCGCCGAAT	87
	pCD1 Rp	CGATACGATCGGCGGTTAAAGA	
	pCD1 ფლრ. ზონდი	FAM--ACACAATGGGAATTGCGGGCGTTCAT- BHQ1	
pPCP1 (<i>pla</i>)	pPCP1 Fp	ATTGGACTTGCAGGCCAGTATC	144
	pPCP1 Rp	ATAACGTGAGCCGGATGTCTTC	
	pPCP1 ფლრ. ზონდი	FAM--AAATTCAGCGACTGGGTTCGGGCACA- BHQ1	

რეაქციის ოპტიმიზაციისთვის პრაიმერების, ფლუორესცენტული ზონდების და მაგნიუმის იონების (MgCl₂ - 2mM, 3mM, 4mM, 5mM) სხვადასხვა კონცენტრაცია იყო გამოყენებული. რეაქცია მიმდინარეობდა 20 მკლ-ში. ოპტიმიზაციის შედეგად ცალკეული რეაქციისთვის რეაქტივების შემდეგი კონცენტრაციები იქნა შერჩეული (ცხრ. 4).

ცხრილი 4. *Y. pestis* ქრომოსომული და პლაზმიდური მარკერებისთვის პჯრ რეაქციის ნარევის მომზადების ცხრილი

ქრომ. სამიზნე <i>yihN</i>	კონცენტრაცია	X 10 რეაქციაზე (მკლ)	pPCP 1 (<i>pla</i>)	კონცენტრაცია	X 10 რეაქციაზე (მკლ)
10X პჯრ ბუფერი 40mM MgCl ₂	10x	20	10X პჯრ ბუფერი 40mM MgCl ₂	10x	20
dNTPs	2,5 mM	25	dNTPs	2,5 mM	25
Chrom Fp	100 uM	0,5	pPCP Fp	100 uM	0,5
Chrom Rp	100 uM	1,5	pPCP Rp	100 uM	1
Chrom ფლრ. ზონდი	100 uM	0,2	pPCP ფლრ. ზონდი	100 uM	0,2
Platinum Taq პოლიმერაზა		1	Platinum Taq პოლიმერაზა		1
H ₂ O		101,9	H ₂ O		101,9

pMT 1 (<i>cafI</i>)	კონცენტრაცია	X 10 რეაქციაზე (მკლ)
10X პჯრ ბუფერი 40mM MgCl ₂	10x	20
dNTPs	2,5 mM	25
pMT Fp	100 uM	1
pMT Rp	100 uM	1,5
pMT ფლ. ზონდი	100 uM	0,1
Platinum Taq პოლიმერაზა		1
H ₂ O		101,9

pCD 1 (<i>lcrV</i>)	კონცენტრაცია	X 10 რეაქციაზე (მკლ)
10X პჯრ ბუფერი 40mM MgCl ₂	10x	20
dNTPs	2,5 mM	25
pCD Fp	100 uM	1
pCD Rp	100 uM	1
pCD ფლ. ზონდი	100 uM	0,1
Platinum Taq პოლიმერაზა		1
H ₂ O		101,9

პჯრ რეაქცია მიმდინარეობდა კაპილარულ თერმოციკლერში – Light Cycler 2.0, Roche. რეაქციის პირობები მოცემულია ცხრილში (ცხრ. 5)

ცხრილი 5. *Y. pestis* ქრომოსომული და პლაზმიდური მარკერებისზე პჯრ პირობები

პროგრამა	ციკლების რაოდენობა	ტემპერატურა (°C)	დრო	ტემპერატურის ცვლილების სისწრაფე (°C/sec)
საწყისი დენატურაცია	1	94	2 წთ	20
ამპლიფიკაცია	45	94	15 წმ	20
		58	30 წმ	20
არხი/ტალღა	530 ნმ			

ქრომოსომული მარკერის (*yihM*) მგრძნობელობის დასადგენად *Y. pestis* ორი ნიმუშის (#1413 , #C-2944) დნმ-ის სერიული ათჯერადი განზავებებზე (30 ნგ - 3 ფგ) დაიდგა პჯრ რეალურ დროში, დუბლიკატებში.

საველე ნიმუშებში შესაძლოა პჯრ-ის მაინჰიბირებელი მრავალი ფაქტორი არსებობდეს (სისხლის კომპონენტები -ჰემი, ჰემოგლობინი, IgG; კოლაგენი, უცხო/ეუკარიოტული დნმ-ი), რამაც შეიძლება ხელი შეუშალოს დნმ-ის და Taq პოლიმერაზას დაკავშირებას და იმოქმედოს ამპლიფიკაციის კინეტიკაზე, რაც საბოლოო ჯამში იწვევს რეაქციის მგრძნობელობის დაქვეითებას ან სრულ დათრგუნვას.

იმის გასარკვევად, თუ რამდენად იცვლება ქრომოსომული მარკერზე (*yihM*) რეაქციის კინეტიკა შესაძლო მაინჰიბირებელი ფაქტორების ზეგავლენით, რეაქციაში დადებითი კონტროლის დნმ-ის სერიულ ათჯერად განზავებებს (30მკგ-დან 3 ფგ-

მდე), ემატებოდა საველე ნიმუშებიდან (ექტოპარაზიტები, მღრღნელები) გამოყოფილი დნმ (*Y. pestis* ერთი გენომის დნმ დაახლოებით 5 ფგ შეესაბამება).

Y. pestis yihN მარკერის სპეციფიკურობის დასადგენად პჯრ რეაქციები დაიდგა დესჯეც კოლექციაში არსებულ 14 *Y. pseudotuberculosis* და ხუთი *Y. enterocolitica* შტამებიდან გამოყოფილ დნმ-ზე.

გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში – PFGE

Y. pestis საკოლექციო შტამების PFGE ანალიზისთვის ჩვენს მიერ გამოყენებულ იქნა აშშ-ს დაავადებათა კონტროლის ცენტრის (CDC) მიერ *Y. pestis*-თვის შემუშავებული პროტოკოლი (CDC PulseNet, PFGE Manual).

- ✓ კულტურები იზრდებოდა სისხლიან აგარზე 28°C-ზე 48 საათის განმავლობაში;
- ✓ ბაქტერიული ნაზარდის შეტანა ხდებოდა წინასწარ მომზადებული და გასტერილებულ ბუფერში (100mM Tris; 100mM EDTA; pH_8.0);
- ✓ უჯრედების კონცენტრაციის მიყვანა 1.8 ოპტიკურ სიმკვრივემდე ხდებოდა სპექტროფოტომეტრის 610 ნმ ტალღის სიგრძეზე გაზომვით;
- ✓ 400 მკლ უჯრედების სუსპენზიას ემატებოდა 20 მკლ პროტეინაზა K (20 მგ/მლ);
- ✓ უჯრედების სუსპენზიის შერევა ხდებოდა პიპეტირებით, თანაბარი მოცულობის (400მკლ), წინასწარ მომზადებულ და 56°C -მდე გაგრილებულ 1%-იან SeaKem Gold აგაროზას გელთან, რომელიც შეიცავდა 1%-იან SDS-ს (ნატრიუმის დედოცილსულფატი);
- ✓ მიღებული ნარევის გადატანა ხდებოდა სპეციალურ ყალიბში;
- ✓ აგაროზას გამყარების მერე, ბლოკების გადატანა ხდებოდა 5 მლ ლიზისის ბუფერში (50mM Tris; 50mM EDTA; 1% Sarcosyl; 0.1 mg/ml proteinase K; pH_8.0) და ინკუბირდებოდა 54°C -ზე წყლის აბაზანაში, 2 სთ-ს განმავლობაში;
- ✓ ლიზისის დასრულების შემდგომ ბლოკები ირეცხებოდა 50°C-ზე გამოხდილი წყლით (2-ჯერ) და TE ბუფერით (4-ჯერ). აღწერილი პროცედურის შემდგომ ბლოკებში ჩაყალიბებული სუფთა, ნატიური და დაუზიანებელი ბაქტერიული დნმ მზად იყო რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით შემდგომი დამუშავებისთვის;
- ✓ დნმ-ის რესტრიქციისათვის მიღებული აგაროზას ბლოკიდან იჭრებოდა 1-1.5 მმ სისქის თხელი ნაჭერი, რომელსაც ემატებოდა სარესტრიქციო ბუფფერი (NEBuffer

4 + BSA) და რესტრიქციული ენდონუკლეაზე (Xba1, Spe1, New England BioLabs.) რესტრიქციულ ენდონუკლეაზას. ინკუბაცია მიმდინარეობდა 28°C -ზე 4 სთ-ის განმავლობაში;

- ✓ ბოლო ეტაპზე ხდებოდა მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტები, მოლეკულური წონის მარკერებთან ერთად (λ ladder PFG marker და Low Range PFG Marker -New England BioLabs) 1%-იან აგაროზის გელში (Sea-Kem Gold Agarose, Cambrex) ყალიბდებოდა და იდგმებოდა პულსირებად გელ-ელექტროფორეზის აპარატში (CHEF-DR II, BioRad);

- ✓ ელექტროფორეზი 0.5xTBE ბუფერში მიმდინარეობდა შემდეგი პროგრამით;

საწყისი დრო – 2 წმ.

საბოლოო დრო – 30 წმ.

ვოლტაჟი - 200 V

ტემპერატურა- 14°C -ზე

რეაქციის ხანგრძლივობა - 22 სთ.

- ✓ ფორეზის დამთავრების შემდეგ გელი იღებებოდა ეთიდიუმ ბრომიდის 0.01%-იან ხსნარში და ირეცხებოდა დისტილირებული წყალით 3-ჯერ, 10-10 წთ-ის განმავლობაში. დნმ-ის ფრაგმენტების ვიზუალიზაცია ხდებოდა ილუმინატორზე 254ნმ ტალღის სიგრძის ულტრაიისფერი გამოსხივების ქვეშ. შედეგების დოკუმენტირება ხდებოდა პოლაროიდის აპარატის და გელ დოკუმენტაციის სისტემის - ციფრული ფოტოკამერის საშუალებით;

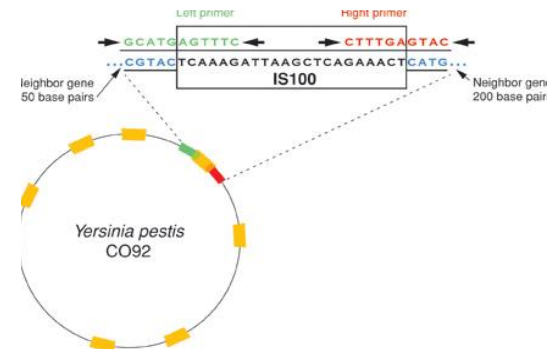
შესაბამისი პროგრამული უზრუნველყოფის უქონლობის გამო, მიღებული პროფილები ფასდებოდა და ანალიზდებოდა ვიზუალური დაკვირვებით. მიღებული პროფილები განსხვავებულ ტიპებად ითვლებოდნენ, თუ ისინი განსხვავდებოდნენ სამი ან მეტი რესტრიქციული ფრაგმენტით. ერთი ან ორი ფრაგმენტით განსხვავებული პროფილები ქვეტიპებად იქნა მიჩნეული. ტიპები რომაული ნომრებით არის აღნიშნული, ხოლო ქვეტიპები ასოებით.

ანალიზისთვის გამოიყენებოდა მხოლოდ მკვეთრი და აშკარად გამოხატული დნმ-ის ფრაგმენტები, ხოლო სუსტი ან გადაფარვადი დნმ-ის ფრაგმენტების იგნორირება ხდებოდა. მეთოდის განმეორებადობის შესაფასებლად, თითოეულ შტამზე PFGE რესტრიქციული ანალიზი მინიმუმ ორჯერ ჩატარდა.

IS100 გენოტიპირება

Y. pestis შტამების ტიპირების მიზნით ასევე გამოყენებულ იქნა პჯრ დამყარებული ე.წ. IS100-ის პოზიციური გენოტიპირების მეთოდი, რომელიც განსაზღვრავს IS100-ის ლოკალიზაციას გენომში და ასევე აღმოაჩენს მის მოსაზღვრე წაკითხვის ღია ჩარჩოს (ORF) პოლიმორფიზმს.

IS100 ტიპირებისათვის 82 ლოკუს სპეციფიკური (სხვადასხვა ლოკუსში IS100 მოსაზღვრე უბნის კომპლემენტარული) და ორი IS100 ელემენტის სპეციფიკური პრაიმერების (ISfor1754 და ISrev216) დიზაინი მოხდა ლოურენს ლივერმორის ეროვნულ ლაბორატორიაში *Y. pestis*-ის რეფერენს შტამის bv. *Orientalis* CO92-ს



სურათი 20. პჯრ-ზე დაფუძნებული IS100 ტიპირება. ილუსტრაცია

(კოლორადო92) სექვენსის მიხედვით (ცხრ. #6). სხვადასხვა შტამის გენოტიპირება დაფუძნებულია შტამის IS100 დაქტილოსკოპიის შედეგად მიღებული სურათის შედარებაზე CO92-ს გენომთან.

ცხრილი 6. IS100 პჯრ გენოტიპირების პრაიმერები

N	პრაიმერები (IS100-CO92)	თანმიმდევრობა 5' → 3'	ზომა (bp)
1	YP0031.Fpr	TTGCATCATAGGCATCTTTTCT	523
2	YP0028.Rpr	CGGCTTTATCAGTATTTTGTTC	295
3	YP0092.Fpr	AAAAACGTAAACTGGGCGATATT	253
4	YP0089.Rpr	CATGATAAACACGCCAATAGACA	295
5	YP0159.Fpr	GATATCATCCATGTCCCGTTTAA	315
6	YP0162.Rpr	ACGGATGAAAAGTGATCCACTTA	193
7	YP0228.Fpr	GGTTGAATTCGGAGTGAGTAGTG	269
8	YP0225.Rpr	CCTAAAGTCGGTGAATGATGAAG	236
9	YP0353.Fpr	AGTCGGGGCTGTATTGATTATTT	339
10	YP0350.Rpr	GTGTGATGTTGAAAGCGTTACAA	553
11	YP0481.Fpr	AAGATGGCATTAAAAATCTGCAA	240
12	YP0478.Rpr	TTTAAATTCAAAACCGCACTGAT	232
13	YP0516.Fpr	ATGTTTCATGAAGAACCTGAGCAT	510
14	YP0513.Rpr	CTATCGAGTAGAGGTGTGGGATG	532
15	YP0570.Fpr	TGTATCAGGGAACCTACAGCCCTA	1293
16	YP0573.Rpr	CTCGTATTCTTCAGGGGGCTAAAT	332
17	YP0708.Fpr	ACGAGTATTACCGAAACTGGTGA	972

18	YP0705.Rpr	TGATGCAACTGGTTCTATTGATG	273
19	YP0741.Fpr	ACTGTAACGAACGGTGCAATAGT	218
20	YP0738.Rpr	TGGTGTTTACCAGCTACTTTGGT	538
21	YP0913.Fpr	CATCAATAAAGTCAGCCACATCA	262
22	YP0916.Rpr	TTGAGTGGGGTAGACAAGACATT	407
23	YP0986.Fpr	ATTCAGGGTCTTCCATAAGAAGC	1117
24	YP0983.Rpr	AAGATATTGTACCAGCCCCAGTT	873
25	YP1028.Fpr	GAAGACGAAATTCTTGAGCTGAA	651
26	YP1025.Rpr	CTGGAAAGTGGTGAACCACTAAC	228
27	YP1215.Fpr	CCGACAGAGGCTAAATTAGGATT	334
28	YP1218.Rpr	ACGGATGAAAAGTGATCCACTTA	193
29	YP1300.Fpr	TCAAAAGAAAATGGATCGCTTTA	294
30	YP1297.Rpr	ACGGATGAAAAGTGATCCACTTA	201
31	YP1383.Fpr	CATTCTGCTTCCAGGATATTCAC	410
32	YP1380.Rpr	AGTGAGACATTTTTCGTTGAAA	404
33	YP1476.Fpr	CGTTTTGATGGTCTCTTTTATCG	381
34	YP1473.Rpr	CCTTTAATACGGTGGCAGTTACA	525
35	YP1538.Fpr	GCCATTAACCACGACAAATATGT	713
36	YP1535.Rpr	ATGGAGGTGCTATTAAAGGAAGC	1117
37	YP1570.Fpr	TATCGCTTATTGTAACGAACGGT	226
38	YP1573.Rpr	TATTTTGAACAATAGGGGTCACG	271
39	YP1587.Fpr	ATCAGCCACTTCCTGTTTATTGA	680
40	YP1590.Rpr	AATACCATTGACCCAACAACTG	258
41	YP1716.Fpr	GCATTCAGAAGATCAGAACTGG	1184
42	YP1719.Rpr	AAAAATATCGGGTTCGAAAACATT	900
43	YP1780.Fpr	GCTCAATACCAGTTTGAGAATGG	254
44	YP1783.Rpr	GTGCAACTAGAATTAGCGCAGTT	855
45	YP1838.Fpr	GTATGAGCCTCACCGTATTGTTC	240
46	YP1835.Rpr	GGGTGAGCAACTCACTGAATATC	389
47	YP1894.Fpr	TTGAAGTTGCCTATCTTGATGGT	330
48	YP1897.Rpr	ATGTTTTGTCTGGGAGTAAAGCA	891
49	YP1970.Rpr	TTATTGGTGGCAATGAAAGCTAT	583
50	YP1973.Fpr	ACCAAAAAGTAATTGTTGCCTGA	681
51	YP2143.Rpr	TACCACTTTTAGCTGGTCAGCAT	336
52	YP2146.Fpr	CAATGCTGAAATCTAGTCCTGCT	461
53	YP2274.Fpr	AGTGTAACGAACGGTGCAATAGT	218
54	YP2277.Rpr	TGAATGCTGCCTTAAAAGAATTC	853
55	YP2393.Fpr	GCACGAGTTCATATTCGTAAAG	257
56	YP2390.Rpr	TTGCCGGTAGTTTTGACTAATGT	221
57	YP2463.Fpr	ACCTTTAAAGAGTCGCGAGCTAT	323
58	YP2466.Rpr	AAACCTCTAAACCATCCGCATAT	223
59	YP2540.Fpr	GCTCTGCAGTTCATTGAAGTTTT	256
60	YP2543.Rpr	GCTATGTTCTCACTTATTGCGCT	981
61	YP2644.Fpr	ATGAATATGCTGTAACGAACGGT	226
62	YP2641.Rpr	GTAGTGTGCGGATGTGATCAATA	373
63	YP2818.Fpr	TTTCTGTACTCATAGCGCTCTCC	703
64	YP2816.Rpr	TTGTGCTGTCTTAGATGCAGAAA	581

65	YP2892.Fpr	TGACCGCTTGTATGACACATTAC	1006
66	YP2889.Rpr	ATAAGCCATGTAGAGGCAATGAA	276
67	YP2926.Fpr	ACCAAAGTCATTCAACAGCAGTT	367
68	YP2929.Rpr	AGTGATATTAGAGGAAGGGCTGG	255
69	YP2957.Fpr	AGTGTAAACGAACGGTGCAATAGT	218
70	YP2960.Rpr	GAAGATAATCTGGCGCTGATTAA	726
71	YP3102.Fpr	GATCCACACAGTATTCTGCTTCC	421
72	YP3105.Rpr	ATTCACTACAGCGGTAGCTCAAG	246
73	YP3203.Fpr	TGGTAGAAGAAAATGGTCGGTAA	239
74	YP3206.Rpr	ACGGATGAAAAGTGATCCACTTA	192
75	YP3354.Fpr	ACTGTAACGAACGGTGCAATAGT	218
76	YP3351.Rpr	GGTATTAATAACCAAGTGCGCAG	279
77	YP3409.Fpr	GTGGAAATAACCCCTCAGCTTCTT	366
78	YP3406.Rpr	AGTGCATTCTGAATGGCTAATA	324
79	YP3427.Fpr	ATTGTAACGAACGGTGCAATAGT	218
80	YP3424.Rpr	GGAGCATCAGTTTCCAACAATAG	343
81	YP3639.Fpr	ATACACCTGAACCCCTTGAATCT	267
82	YP3636.Rpr	AGCAGACCTGTTAGACTTTGTGC	228
	ISfor1754	GGTGATGCAGCACTGACCTC	
	ISrev216	GCTCAGATTTTGCCTGCAAA	

თითოეულ შტამზე პჯრ იდგმებოდა 82 ლოკუს და IS სპეციფიკური პრაიმერების (ISrev216, ISfor1754) გამოყენებით. 25 მკლ პჯრ ნარევი შეიცავდა 2X სარეაქციო ბუფერს (Taq PCR Master Mix Kit -QIAGEN), 50pmol ერთ-ერთ IS100 სპეციფიკურ პრაიმერს ISfor1754 ან ISrev216, 5pmol ლოკუს სპეციფიკურ პრაიმერს (82-დან ერთს) და 4 მკლ კულტურიდან გამოყოფილ დნმ-ს (1-3ნგ). ამპლიფიკაცია მიმდინარეობდა თერმოციკლერში (Techne Flexigen) შემდეგი პირობებით:

ცხრილი 7. IS100 ტიპირების პჯრ პირობები

პროგრამა	ციკლების რაოდენობა	ტემპერატურა (°C)	დრო
დნმ - ის საწყისი დენატურაცია	1	95	5 წთ
ამპლიფიკაცია	35	95°C	1წთ
		55/60°C	1წთ
		72°C	3წთ
საბოლოო ელონგაცია		72°C	10 წთ
დაყოვნება		4°C	∞

ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების დეტექცია ხდებოდა ჰორიზონტალური გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით, 1.5%-იან აგაროზას გელზე, TBE ბუფერში. პჯრ პროდუქტს ემატებოდა 5 მკლ გელში ჩასატვირთ საღებავი (6x, Sigma), რის მერეც

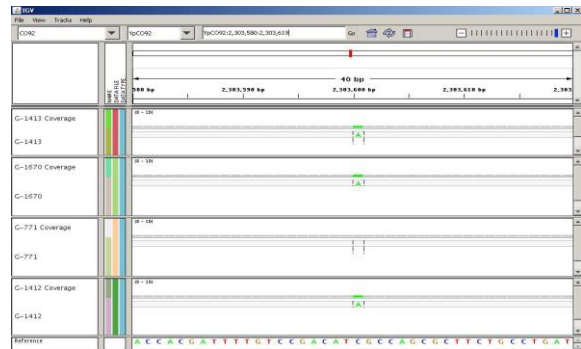
ხდებოდა 10-10 მკლ პროდუქტის გელში შეტანა. ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების ზომის განსაზღვრისათვის გამოიყენებოდა 100 bp მოლეკულური წონის მარკერი (New England BioLabs - NEB). ელექტროფორეზი მიმდინარეობდა დაახლოებით 60-90 წთ, 100V ძაბვის პირობებში. გელი იღებებოდა 0.01% ეთიდიუმ ბრომიდის ხსნარით (100 მგ/ლ). დნმ-ის ფრაგმენტების ვიზუალიზაცია ტრანსილუმინატორზე, 254 ნმ ტალღის სიგრძის ულტრაიისფერი გამოსხივების ქვეშ ხდებოდა. მიღებული შედეგების საფუძველზე, Free Tree და Tree View პროგრამების საშუალებით აიგო დენდროგრამა

ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი - SNP:

დესჯეც-ის ეროვნულ კოლექციაში არსებული *Y. pestis* 46 შტამის გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე განთავსება, ასევე ქართული შტამებისათვის სპეციფიკური SNP ლოკუსების აღმოჩენა რამდენიმე ეტაპად ჩატარდა. თავდაპირველად *Y. pestis* ყველა შტამის გამოკვლევა მოხდა ჩრდილოეთ არიზონას უნივერსიტეტში (Northern Arizona University – NAU) შემუშავებულ ე.წ. კანონიკურ SNP (canSNP) მარკერებზე, რომლებიც მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყნიდან გამოყოფილი საკოლექციო შტამების შედარებით აღმოჩენილი SNP პოზიციების საფუძველზე შეიქმნა [93]. TaqMan ორმაგი ზონდების პრინციპზე დამყარებული რეალურ დროში პჯრ მომზადდა რამდენიმე შერჩეულ მარკერზე (s85, s20, s29, s30, s31, s24), რომლებიც ფილოგენეტიკური ხის ძირითად განშტოებებს გამოავლენდნენ (დანართი 2). canSNP ტიპირების შედეგად *Y. pestis* შტამები - ხის სამ გენეტიკურად დაშორებულ განშტოებაზე განთავსდნენ (0.PE2, 2MED, ANT3).

შემდგომ ეტაპზე ფილოგენეტიკური ხის მოცემულ განშტოებებზე *Y. pestis* სამუზეუმო შტამების ზუსტი განლაგების დასადგენად, უკვე გამოქვეყნებული SNP-ების საფუძველზე [93], შემუშავდა ახალი პრაიმერები და SYBR Green პლატფორმაზე დამყარებული ე.წ. melt-MAMA (Mismatch Amplification Mutation Assay) პჯრ ტესტები (იხ. ქვემოთ - SNP შერჩევა, პრაიმერების დიზაინი). ვალიდაციის შედეგად შეირჩა 33 რეაქცია, რომლის მიხედვითაც მოხდა შტამების შემდგომი გენოტიპირება (დანართი 2).

ახალი SNP ლოკუსების აღმოჩენის მიზნით, ლოს ალამოსის ნაციონალურ ლაბორატორიაში (Los Alamos National Lab - LANL) და ვოლტერ რიდის სახელობის სამხედრო კვლევით ინსტიტუტში (WRAIR- Walter Reed Army Institute of Research) ილუმინას (Illumina's Genome Analyzer II) და 454 სექვენირების პლატფორმების გამოყენებით მოხდა კოლექციაში არსებული შვიდი *Y. pestis* შტამის (#1412, #1413, #1670, #3067, #3770, #8787, #1045) სრული გენომის სექვენირება (WGS). ახალი SNP ლოკუსების გამოსავლენად, *Y. pestis* შვიდივე სექვენირებული შტამის დნმ-ის თანმიმდევრობის შედარება მოხდა რეფერენს შტამთან CO92 და ასევე



სურათი 21. სავარაუდო SNP-ების გადამოწმება მოხდა Integrative Genomic Viewer (IGV) პროგრამით.

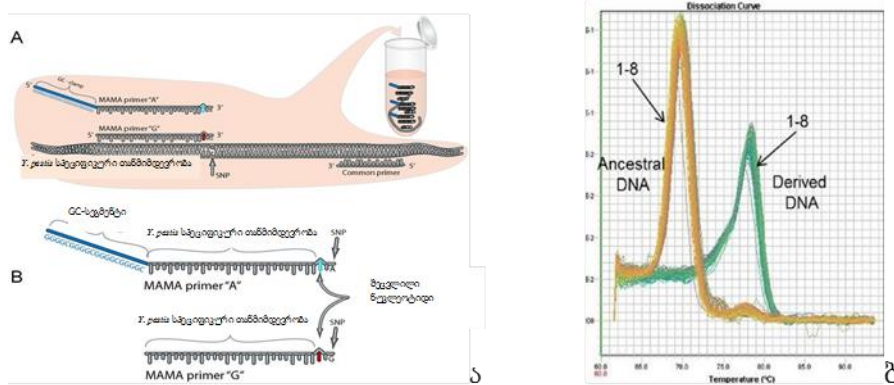
მონაცემთა ბაზაში არსებული *Y. pestis* ექვსი შტამის სრულ გენომურ თანმიმდევრობასთან (PestoidesF, YpsIP32953, YpAngola., YpKIM, YpNepal516, YpK1973002), კომპიუტერული პროგრამის MUMmer 3.0 საშუალებით. შედეგად, ათასობით SNP გამოვლინდა. სავარაუდო SNP-ების გადამოწმება/დადასტურება ხდებოდა Integrative Genomic Viewer (IGV) პროგრამის საშუალებით (სურ. 21).

სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერიდან იზოლირებული ექვსი შტამის სექვენსის საფუძველზე (#1412, #1413, #1670, #3067, #3770, #8787) 77 SNP ლოკუსი შეირჩა, ხოლო #1045 შტამის სექვენსის საფუძველზე - 13 SNP ლოკუსი. რეაქციების ვალიდაციის და ოპტიმიზაციის შედეგად ფილოგენეტიკური ხის სხვადასხვა განშტოებისათვის 52 ტესტი შეირჩა, რის მიხედვითაც ჩატარდა კოლექციაში არსებული შტამების შემდგომი გენოტიპირება.

SNP შერჩევა, პრაიმერების დიზაინი

SNP ლოკუსები შემდეგი კრიტერიუმებით შეირჩა: მოცემული SNP ლოკუსი ყველა სექვენირებული შტამის გენომში უნდა ყოფილიყო წარმოდგენილი; მხოლოდ უნიკალური SNP შეირჩა, რომელთაც არ ჰქონდა SNP-ის ორ ალელზე მეტი ვარიაცია; ასევე შერჩეულ SNP პოზიციის მახლობლად (100 ნუკლეოტიდზე ახლოს) არ უნდა

ყოფილიყო სხვა SNP. ამ კრიტერიუმების გათვალისწინებით შერჩეულ 90 SNP-ის და ასევე უკვე ცნობილი, გამოქვეყნებული SNP-ების საფუძველზე [93] შემუშავდა SYBR Green real-time PCR-ის პლატფორმაზე დამყარებული ე.წ. melt-MAMA (allele-specific Mismatch Amplification Mutation Assay) SNP გენოტიპირების ტესტები.



სურათი 22. melt-MAMA პჯრ-ის SNP ალტერნატიული ფორვარდ პრაიმერების კონკურენციის პრინციპის ილუსტრაცია. ა. SNP ალტერნატიული პრაიმერები ბ. ლლობის პიკები

შერჩეული SNP ლოკუსებისთვის პრაიმერების დიზაინი CO92 გენომის საფუძველზე მოხდა DNASTAR Lasergene 8 და Primer PREMIER პროგრამების გამოყენებით. პრაიმერების ზომა 18 – 30 bp ფარგლებში მერყეობდა, ხოლო მთლიანი ამპლიკონის სიგრძე დაახლოებით 80 bp (GC სეგმენტის გარეშე) უნდა ყოფილიყო. შეძლებისდაგვარად ყველა პრაიმერის ლლობის ტემპერატურა გათანაბრებული იყო (T_m 60°C). პრაიმერებს არ უნდა ჰქონოდათ ურთიერთ და თვით კომპლემენტრული სტრუქტურები, განსაკუთრებით პრაიმერის 3' ბოლოსთან ახლოს.

melt-MAMA PCR მეთოდი ეყრდნობა SNP ალელების სპეციფიკური ორი ფორვარდ პრაიმერის კონკურენტულ ამპლიფიკაციას. ალტერნატიულ ფორვარდ პრაიმერების 3' ბოლოზე ცალკეული ალელის შესაბამისი ნუკლეოტიდი იყო ჩართული; რეაქციაში ორ ალელს შორის განსხვავების გასაზრდელად ორივე ალტერნატიულ ფორვარდ პრაიმერის 3' ბოლოდან -2 ან -3 პოზიციაზე არასწორად შეწყვილებული ფუძის ჩართვა ხდებოდა (სურ. 22). 3' ბოლოსთან ორი გაუწყვილებელი ნუკლეოტიდი ზრდიდა რეაქციის სპეციფიკურობას, ვინაიდან

არასპეციფიკური ამპლიფიკაცია ძალიან დაბალი კინეტიკით ან საერთოდ არ მიმდინარეობდა.

melt-MAMA პჯრ-ში, ღლოზის მრუდების ანალიზის ეტაპზე, ალტერნატიულ ალელებს შორის სხვაობის გასაზრდელად, ერთ-ერთ სპეციფიკურ ფორვარდ პრაიმერს 5' ბოლოზე ემატებოდა 20bp სიგრძის GC სეგმენტი, რაც იწვევდა ამპლიფიცირებული ფრაგმენტის საწყისი ღლოზის ტემპერატურის დაახლოებით 4°C-ით მომატებას.

პრიმერების ვალიდაცია

ვალიდაციის დროს პარარელურად პჯრ იდგმებოდა როგორც ინდივიდუალური (ფორვარდ და რევერს პრაიმერების წყვილით), ასევე კონკურენტული პრაიმერებით (ორივე ალტერნატიული ალელსპეციფიკური ფორვარდ და საზიარო რევერს პრიმერით) (ცხრ. 8, 9). კონკურენტული რეაქციების ვალიდაციისას იცვლებოდა ალტერნატიული ფორვარდ პრაიმერები კონცენტრაცია (1/1, 1/4), ხოლო რევერს პრაიმერი და რეაქციის სხვა კომპონენტები უცვლელი რჩებოდა. საბოლოოდ ყველა რეაქციისთვის მოხდა პრაიმერების ოპტიმალური კონცენტრაციების შერჩევა.

melt-MAMA პჯრ-თვის გამოყენებულ იქნა ABI SYBR Green universal PCR Master Mix კომერციული ნაკრები, რომელშიც შედიოდა გაცხელებით ინაქტივირებადი AmpliTaq Gold® დნმ პოლიმერაზა, დეზოქსირიბონუკლეოზიდტრიფოსფატებთან (dNTPs) ერთად დეზოქსირიბონუკლეოზიდტრიფოსფატები (dUTPs), და SYBR Green. ნარევის ემატება დაახლოებით 15-40 ნგ გენომური დნმ-ი. პირველადი და ალტერნატიული SNP ფორვარდ პრაიმერების კონცენტრაციები იცვლებოდა (ცხრ. 8.) მიხედვით. შესაბამისად იცვლებოდა რეაქციაში წყლის რაოდენობა. სარეაქციო არეს საბოლოო მოცულობა 10 მკლ იყო. რეაქციებში კონტროლებად გამოყენებული იყო სექვენირებული ქართული შტამები (შეცვლილი SNP ვარიანტს კონტროლად), ასევე რეფერენს შტამები: CO92, KIM, pestoides F, pestoides E, pestoides G და სავაქცინე შტამი -EV სარეაქციო ნარევის მომზადება ქვემოთ მოცემული ცხრილების მიხედვით ხდებოდა:

ცხრილი 8. SNP ტიპირებისთვის პჯრ სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი. კონკურენტული რეაქცია.

დასახელება	საწყისი კონცენტრაცია		მოცულობა 1X რეაქციაზე (მკლ)	საბოლოო კონცენტრაცია	
H ₂ O	--	--	3.10-3.55	--	--
ABI SG un.PCR M- Mix	2	X	5.0	1	ჯერადი
Fp პირველადი SNP (Ancestral)	10	μM	0.15	0.15	μM
Fp შეცვლილი SNP (Derival)	10	μM	0.15- 0.60	0.15-0.60	μM
Rp	10	μM	0.15	0.15	μM
დნმ	10	ng/ul	1	1	ng/ul
სარეაქციო არეს ჯამური მოცულობა:			10 მკლ		

ცხრილი 9. SNP ტიპირებისთვის პჯრ სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი; არაკონკურენტული რეაქცია.

დასახელება	საწყისი კონცენტრაცია		მოცულობა 1X რეაქციაზე (მკლ)	საბოლოო კონცენტრაცია	
H ₂ O	--	--	3.7	--	--
ABI SG un.PCR M-Mix	2	X	5.0	1	X
Fp (Ancestral ან Derival)	10	μM	0.15	0.15	μM
Rp	10	μM	0.15	0.15	μM
დნმ	10	ng/ul	1	1	ng/ul
სარეაქციო არეს ჯამური მოცულობა:			10 მკლ		

ამპლიფიკაცია მიმდინარეობდა Applied Biosystems 7900HT (ABI-7900) Real-time PCR აპარატში შემდეგი პირობებით (ცხრ. 10):

ცხრილი 10. SNP ტიპირება; პჯრ პირობები

პროგრამა	ციკლების რაოდენობა	ტემპერატურა (°C)	დრო
UNG აქტივაცია	1	50	2 წთ
დნმ - ის საწყისი დენატურაცია	1	95	10 წთ
ამპლიფიკაცია	45	95	15 წმ
		55 - 60	60 წმ
დისოციაცია (0.2°C/წთ)	45	95	15 წმ
		60	15 წმ
		95	15 წმ

გენოტიპის განსაზღვრა ხდებოდა იმისდა მიხედვით თუ რომელი ალელის შესაბამისი პროდუქტი ამპლიფიცირდებოდა უფრო ადრე (ჰქონდა ამპლიფიკაციის

ზღურბლის კვეთის დაბალი ნიშნული - CP) და ასევე ლღობის მრუდების მიხედვით. პირველადი SNP ვარიანტის მქონე შტამის პროდუქტი ლღობის უფრო დაბალი ტემპერატურით ხასიათდებოდა, ვიდრე შეცვლილი SNP მუტაციის მქონე შტამი, რომლის პროდუქტსაც პრაიმერზე მიმაგრებული GC სეგმენტი ჰქონდა დამატებული (ცხრ. ხხხხხ). პირველად (Ancestral) SNP ალელად მიიჩნეოდა ის SNP ვარიაცია, რომელიც გვხვდებოდა *Y. pseudotuberculosis* IP32953 შტამში, ხოლო შეცვლად (Derival) - ალტერნატიულ SNP ალელი.

SNP მიკროარე

46 *Y. pestis* შტამის გენოტიპირება ასევე ჩატარდა მაღალი სიმჭიდროვის SNP მიკროარის გამოყენებით, რომელიც მოიცავდა *Y. pestis* და *Y. pseudotuberculosis* გენომის და პლაზმადების 13 525 SNP პოზიციისთვის ჰიბრიდიზაციულ ზონდებს. აღნიშნული SNP მიკროარე გამოირჩევა მაღალი გარჩევადობით და მთლიან გენომზე დიდი მოცულობის მონაცემების გენერირების და ანალიზის საშუალებას იძლევა.

დნმ-ის ექსტრაქცია

Y. pestis შტამები იზრდებოდა მიულერ-ჰინტონის აგარზე, 28°C 24 საათის განმავლობაში. გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია QIAGEN Genomic DNA Buffer Set და Genomic-tip 500/G ნაკრებით, მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით მიმდინარეობდა. დნმ-ის კონცენტრაცია შეესაბამებოდა ~ 500 ნგ/მკლ.

გენოტიპირების მიკროარის SNP შერჩევა

კვლევაში გამოყენებული SNP გენოტიპირების მიკროარის სამიზნე პოზიციების შერჩევისთვის გამოყენებულ იქნა ორი მეთოდი: (1) სექვენირებული რეფერენს შტამების სრული გენომების კომპიუტერული (*in silico*) შედარება და (2) მსოფლიოს სხვადასხვა კუთხიდან გამოყოფილი 147 შტამის რე-სექვენირება. პირველ შემთხვევაში SNP-ების აღმოჩენა და შერჩევა მოხდა 12 გამოქვეყნებული რეფერენს გენომის შედარებით [134]. SNPs-ების აღმოსაჩენად ასევე მოხდა მსოფლიოს სხვადასხვა კუთხიდან იზოლირებული 147 (136 *Y. pestis* და 11 *Y. pseudotuberculosis*) შტამის რე-

სექვენირება მიკროარეზე, რომელზეც ექვსი რეფერენს შტამის გენომის უნიკალური უბნების შესაბამისი ზონდები იყო დატანილი CO92, KIM, Antiqua, Microtus 91001, Nepal 516, and *Y. pseudotuberculosis* IP32953, რის საფუძველზე შეირჩა 2975 SNP, რომლებიც გარჩევადობის მაღალი სანდობით და სიზუსტით გამოირჩეოდნენ [41, 42, 51, 101, 118, 134].

მაღალი სიმჭიდროვის SNP გენოტიპირების მიკროარეზე, რომელიც აფიმეტრიქსის (Affymetrix, Santa Clara, CA) მიერ იქნა დამზადებული, საბოლოოდ 13 525 SNP ვარიაცია იქნა დატანილი.

Y. pestis გენოტიპირება

ნიმუშების და გენოტიპირების მიკროარეზების დამუშავება ხდებოდა მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით. (<http://www.affymetrix.com/support/supportresult.affx>). გენომური დნმ (3 - 6 მკგ) დანაწევრებულ იქნა DNase I- ით (Invitrogen, Grand Island, NY) 50-200 bp ზომის ფრაგმენტებად. ნიმუშების მონიშვნის და მიკროარის დამუშავების პროცედურები მთლიანად აღწერილია Affymetrix Genome SNP Nsp / Sty 6.0 მომხმარებლის სახელმძღვანელოში (<http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>). ფრაგმენტირებული დნმ-ის მონიშვნა ხდებოდა ბიოტინით (Affymetrix, Santa Clara, CA) და ტერმინალური ტრანსფერაზას გამოყენებით (Promega, Madison, WI). ბიოტინით მონიშნული ნიმუშების ჰიბრიდიზაცია მიკროარეზე ხდებოდა 50°C მთელი ღამის განმავლობაში. მიკროარის გარეცხვის და შეღებვის შემდგომ სკანირება Affymetrix Scan3000 7G საშუალებით ხდებოდა. გენოტიპების განსაზღვრა Affymetrix Power Tools- ის კოლექციის apt-probeset- გენოტიპირების პროგრამის საშუალებით მოხდა. (<http://www.affymetrix.com/partnersprograms/programs/developer/tools/powertools.affx>). ტიპირების შედეგები გაანალიზდა იერარქიული კლასტერიზაციით [134], სტატისტიკური პროგრამა - R საშუალებით (<http://www.r-project.org/>). SNP-ების კლასიფიკაცია მოხდა სინონიმური (sSNP), არასინონიმური (nsSNPs) და არაკოდირებადი უბნების მიხედვით. სხვადასხვა ჯგუფის იზოლატების შედარებით შეირჩა canSNP-ების.

სრული გენომის სექვენირება

დკსჯეც-ის, ლოს ალამოსის ნაციონალურ ლაბორატორიის (Los Alamos National Lab - LANL) და ვოლტერ რიდის სახელობის სამხედრო კვლევით ინსტიტუტის (WRAIR- Walter Reed Army Institute of Research) ერთობლივი კვლევის ფარგლებში განხორციელდა დკსჯეც ბაქტერიებისა და ვირუსების ეროვნულ საცავში არსებული განსხვავებული წარმოშობის *Y. pestis* 11 შტამის სრული გენომის სექვენირება (სურ. 24). სექვენირება ჩატარდა ახალი თაობის სექვენირების სხვადასხვა პლატფორმის: ილუმინას (Illumina's Genome Analyzer II) და 454 პიროსექვენირების ტექნოლოგიის და PacBio გამოყენებით.

თითოეული შტამიდან მოხდა მაღალი ხარისხის დნმ-ის მიღება. მომზადდა გენომური ბიბლიოთეკები. 454 პლატფორმაზე სექვენირებისთვის გენომური ბიბლიოთეკა ტიტანიუმ გაუწყვილებელი-ბოლოებით (Titanium library of unpaired reads) მომზადდა მწარმოებლის ინსტრუქციის შესაბამისად (Roche, Branford, CT). წაკითხული ფრაგმენტების გადაფარვის მაჩვენებელი 17-42X იყო. 454 სექვენირების შედეგად მიღებული მონაცემების ანალიზი, გენომის აწყობა, ტარდებოდა Roche GS Assembler პროგრამის (Newbler) გამოყენებით.

Illumina პლატფორმისთვის მოკლე ფრაგმენტების გენომური ბიბლიოთეკის მომზადება მოხდა მწარმოებლის ინსტრუქციის შესაბამისად (Illumina, San Diego, CA), რეაქტივების ნაკრების v2 ვერსიის 300 ციკლის გამოყენებით. სექვენირებული ფრაგმენტების გადაფარვის მაჩვენებელი იყო 57- 995X. პირველადი მონაცემები დამუშავდა პროგრამა ველვეტის (Velvet) საშუალებით. *Y. pestis* ორი შტამის სექვენირებისთვის (#1670 და #14735) მომზადდა 454 ტიტანიუმ ბიბლიოთეკა გრძელი გაწყვილებულ-ბოლოებით (Titanium long-insert paired-end library), 3.8 - 9.1 Kb-მდე ჩართული ფრაგმენტების ზომით. გენომის გადაფარვის მაჩვენებელი იყო 2.1-21X. *Y. pestis* #790 ყირგიზული შტამისთვის დამატებით მოხდა PacBio გრძელი ფრაგმენტების გენერირება. სექვენირებული ფრაგმენტების საშუალო ზომა 3,5Kb იყო, გადაფარვის მაჩვენებელი 108X. PacBio მონაცემები აიწყო HGAP (Hierarchical Genome Assembly Process) პროგრამის გამოყენებით [36, 133, 135]. გენომის დახურვის მიზნით,

არსებული გამოტოვებული უბნების და სავარაუდოდ არასწორად აწყობილი უბნების შესასწორებლად გამოიყენებოდა პჯრ.

11 *Y. pestis* სრული გენომის სექვენირების შედეგად მიღებული მონაცემები გამოქვეყნდა და აიტვირთა გენომური ბანკის მონაცემთა ბაზაში [135] (სურ. 23).

Listing of *Yersinia pestis* strains, their accession numbers, and genome sizes in this data set

Code	Strain	Country of origin	Accession no. ^a	Assembly status	Size (% G+C) ^b
BYA	1412	Georgia	CP006783 (Chr) CP006780 (pCD) CP006779 (pMT)	Finished	4,733,482 (47.6)
CAY	1413	Georgia	CP006762 (Chr) CP006761 (pCD) CP006760 (pMT)	Finished	4,736,923 (47.6)
DYA	1670	Georgia	AYLR00000000 (unscaffolded)	Improved high-quality draft	4.71 Mb (est) (47.6)
FKY	790	Kyrgyzstan	CP006806 (Chr) CP006807 (pMT) CP006808 (pPCP)	Finished	4,785,488 (47.6)
PYA	1522	Armenia	CP006758 (Chr) CP006757 (pCD) CP006756 (pMT)	Finished	4,738,644 (47.6)
RYP	2944	Russian Federation	CP006792 (Chr) CP006791 (pCD) CP006790 (pMT) CP006793 (pPCP)	Finished	4,672,740 (47.5)
VIP	3067	Georgia	CP006754 (Chr) CP006753 (pCD) CP006752 (pMT)	Finished	4,736,090 (47.5)
WYP	8787	Georgia	CP006748 (Chr) CP006747 (pCD) CP006746 (pMT)	Finished	4,675,987 (47.6)
YAE	3770	Georgia	CP006751 (Chr) CP006750 (pCD) CP006749 (pMT)	Finished	4,735,667 (47.6)
YPY	14735	Armenia	AYLS00000000 (unscaffolded)	Improved high-quality draft	4.69 Mb (est) (47.6)
ZPY	1045	Azerbaijan	CP006794 (Chr) CP006795 (pCD) CP006797 (pMT) CP006796 (pPCP)	Finished, noncontiguous (1 gap)	4.68 Mb (est) (47.5)

^aChr, chromosome; pCD, pMT, and pCP are plasmids.
^bValues for the genome sizes are shown in bp, unless otherwise indicated. est, estimated.

სურათი 23. გენომურ ბანკში ატვირთული 11 *Y. pestis* შტამის გენომებისათვის მინიჭებული ნუმერაცია [135].

აღნიშნული შტამების გარდა დამატებით ჩატარდა ექვსი *Y. pestis* შტამის სექვენირება (#771, #2619, # 1369, #1391, #2095, #8786) დკსჯეც ლუგარის სჯ კვლევით ცენტრში არსებული ახალი თაობის სექვენირების ტექნოლოგიის - Illumina, MiSeq პლატფორმის (Illumina Genome Analyzer II, San Diego, CA,) გამოყენებით.

გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია

სექვენირებისთვის *Y. pestis* გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია ხდებოდა QIAGEN Genomic DNA და QIAGEN Genomic-tip 100/G, 500/G ნაკრებების გამოყენებით მწარმოებლის ინსტრუქციის შესაბამისად (QIAGEN Inc. - USA). ექსტრაქციის შედეგად მიიღებოდა მაღალი ხარისხის, მაღალკონცენტრირებული და მაღალმოლეკულური გენომური დნმ-ი, რომელიც შემდგომ მოწმდებოდა სტერილობაზე: გამოყოფილი დნმ-ის 5% დატანა ხდებოდა ცხვრის სისხლიან აგარზე

და ინკუბირდებოდა 28°C-ზე 72 სთ-ის განმავლობაში. დნმ-ის კონცენტრაცია იზომებოდა NanoDrop 2000 და Qubit® 2.0 ფლუორომეტრზე.

დნმ ბიბლიოთეკის მომზადება, სექვენირება და მონაცემთა ანალიზი

Y. pestis ექვსი იზოლატის გენომური დნმ-ის ფრაგმენტების ბიბლიოთეკა მომზადდა ლოს ალამოსის ნაციონალური ლაბორატორიის მიერ მოწოდებული Illumina MiSeq ახალი თაობის სექვენირების პროტოკოლის მიხედვით NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep რეაქტივების ნაკრების გამოყენებით. თავდაპირველად *Y. pestis* დნმ ნიმუშების ფრაგმენტაცია (~300bp) Covaris M220 ულტრაბგერის აპარატის საშუალებით ტარდებოდა. ადაპტორების ლიგაციის, ინდექსების დამატების და პჯრ-ის შემდგომ დნმ-ბიბლიოთეკის ფრაგმენტების ზომა განისაზღვრა Bioanalyzer 2100 აპარატის გამოყენებით. სექვენირება ჩატარდა MiSeq რეაქტივების ნაკრებით v2, 300 ციკლისათვის. სექვენირების შედეგად მიღებული პირველადი მონაცემები დამუშავდა EDGE Bioinformatics და CLC bio Genomics Workbench პროგრამების მეშვეობით. საშუალოდ 54 - 143 კონტიგი იქნა მიღებული. გადაფარვის მაჩვენებელი - 80-250X. აწყობილი გენომის ზომა დაახლოებით 4.5 Mb იყო.

სრული გენომის სექვენირებამ *Y. pestis* იზოლატების კიდევ უფრო ღრმა დახასიათების საშუალება მოგვცა; შესწავლილ იქნა სხვადასხვა ვირულენტობის განმაპირობებელი უბნები/გენები, როგორც არის *pgm* ლოკუსი, *LcrV* (V ანტიგენი), ჩატარდა სპეისერების შიდასახეობრივ პოლიმორფიზმზე დაფუძნებული CRISPR ტიპირება.

სრული გენომის სექვენსების საფუძველზე ასევე აიგო ფილოგენეტიკური ხე ფილოგენეტიკური და მოლეკულური ევოლუციის ანალიტიკური პროგრამის PhaME (phylogenetic and molecular evolutionary; <https://github.com/LANL-Bioinformatics/PhaME>) საშუალებით. ანალიზში სამუზეუმო და რეფერენს შტამებთან ერთად აღმოსავლეთ კავკასიის მთის კერიდან (დაღესტანი, რუსეთის ფედერაცია) ბოლო დროს სექვენირებული რვა შტამი იქნა ჩართული, ქართულ შტამებთან მათი ფილოგენეტიკური კავშირის დადგენის მიზნით.

პროტეომიკული კვლევები

შედარებითი პროტეომიკული კვლევებისათვის *Y. pestis* ოთხი შტამი იქნა გამოყენებული: #1390, #1853, #8787 (საქართველოს მაღალმთიანი კერა- 1979, 1980 და 1992 წწ) და #2944 (ყაზარდო-ბაღყარეთი, რუსეთი).

Y. pestis ზრდა ტემპერატურისა და კალციუმის კონცენტრაციის ცვალებადობით:

თითოეული შტამის ოთხ-ოთხ პარალელურ ნიმუშად გაზრდა ხდებოდა მიულერ-ჰინტონის ბულიონში 28°C-ზე, ღამის განმავლობაში, მუდმივი ნჯღრევის პირობებში. ამის შემდგომ თვითოეული კულტურიდან 0.1მლ გადაგვქონდა 15 მლ ახალ ბულიონში. ორი ალიქვოტი ინკუბირდებოდა 37°C-ზე და ამათგან ერთს ემატებოდა 15მკლ 0.4M CaCl₂ და მისი საბოლოო კონცენტრაცია შეადგენდა 4mM. მეორე ალიქვოტს ემატებოდა 15მკლ სტერილური წყალი. კიდევ ორი ალიქვოტი განიცდიდა იგივე ტიპის დამუშავებას, ოღონდ მათი ინკუბაცია 28°C -ზე ხდებოდა. ყველა ალიქვოტის ინკუბაცია მითითებულ ტემპერატურაზე 4 სთ-ს განმავლობაში ხორციელდებოდა. უჯრედების შეგროვება ექსპონენციალურ ფაზაში ხდებოდა. ალიქვოტები ცენტრიფუგირდებოდა 3,000×g 10 წუთის განმავლობაში და თითოეული მდგომარეობის სინჯი დუპლიკატში მზადდებოდა 1-განზომილებიანი ნატრიუმის დოდეცილსულფატთან (SDS) ან 2-განზომილებიანი გელ-ელექტროფორეზისათვის.

1-განზომილებიან გელ-ელექტროფორეზისათვის ნიმუშების მომზადება

1-განზომილებიან გელ-ელექტროფორეზის შემთხვევაში, ბაქტერიებს ემატებოდა 5% SDS და ხდებოდა ამ ხსნარის ინკუბაცია 10 წუთის განმავლობაში 95°C-ზე. ლიზატები ცენტრიფუგირდებოდა 15,000 × g 15 წუთის განმავლობაში. სუპერნატანტი მოწმდებოდა სტერილურობაზე: ხდებოდა ინაქტივირებული ნიმუშების ინოკულაცია ტრიპსინიზირებულ სოიოს ბულიონზე, რომელიც შეიცავდა 0.0125% ფენოლის წითელს. ინკუბაცია გრძელდებოდა 72 სთ-ს განმავლობაში 28°C-ზე და იმ შემთხვევაში თუ არ შეიმჩნეოდა ფერის ცვლილება და/ან სიმღვრივე/ტურბიდულობა - ნიმუშები განიხილებოდნენ სტერილურად.

2-განზომილებიან გელ-ელექტროფორეზისათვის მომზადება

2-განზომილებიან გელ-ელექტროფორეზის შემთხვევაში ბაქტერიული ნალექები რესუსპენდირდებოდა შემდეგი შემადგენლობის ბუფერში: 25 მმოლი ტრის-აცეტატი pH 7.8, 5 მმოლი EDTA, 150 მკგ/მლ ლიზოციმი, 2 მმოლი პმსფ, 0.05% ტრიტონ (Triton) X-100 და 1 მმოლი ბენზამიდინი. ნიმუშები ინკუბირდებოდა 20°C-ზე, 30 წთ-ის განმავლობაში სანჯღრევლაზე. ლიზატები ცენტრიფუგირდებოდა $20,000 \times g$ -ზე 60 წთ გამავლობაში 4°C-ზე. სუპერნატანტს ემატებოდა 20% -იანი CHAPS-ის ხსნარი, ისე რომ საბოლოო კონცენტრაცია ყოფილიყო 2%, რასაც თან ახლდა ინკუბაცია 95°C-ზე 10 წუთის განმავლობაში. ინკუბაციის შემდეგ ადგილი ჰქონდა სუპერნატანტის სტერილურობაზე შემოწმებას, ისე როგორც ზემოთ არის აღწერილი.

ცილის რაოდენობის განსაზღვრა

სუპერნატანტში ცილის რაოდენობა ისაზღვრებოდა მიკრობიქინონის მჟავას ნაკრების საშუალებით (micro-BCA kit Pierce, Thermo Scientific). ყოველი ნიმუშისათვის ცილის განსაზღვრა ხორციელდებოდა 4 პარალელურ სინჯში, შესაბამისი ბუფერული კონტროლებით.

2-განზომილებიანი ელექტროფორეზი, ნიმუშების მომზადება და იზოელექტრული ფოკუსირება

იზოელექტროფოკუსირების სტრიპები (ხაზობრივი pH 3–10) რეჰიდრატაციას განიცდიდნენ 8 M შარდოვანას, 0.5% ტრიტონ X-100-ისმ 0.5% ფარმალიტების (pH 3–10.0) და 30 მილიმოლი დტტ-ს ხსნარში ღამის განმავლობაში. რეჰიდრირებულ ფირფიტებზე დაგვქონდა 30 მიკროგრამი ცილის შემცველი ნიმუშები ბუფერში, რომელიც შეიცავდა 7 M შარდოვანას, 2 მოლარულ თიოშარდოვანას, 2% CHAPS-ს, 2% ტრიტონ X-100-ს, 0.1% ASB-14-ს, 2-ბეტა მერკაპტოეთანოლს, 2% pH 3–10.0-ს და ბრომფენოლის ლურჯს. იზოელექტრული ფოკუსირება ტარდებოდა 500 V-ზე 3 საათი და 3500 V-ზე 18 საათი $\pm$ 30 წუთის განმავლობაში.

გაწონასწორება

ფირფიტების გაწონასწორებას ვახორციელებდით 15 წუთის განმავლობაში 0.05M Tris- HCl (pH 6.8), 6 M შარდოვანას, 30% გლიცეროლის, 3% SDS-ის და 1% დტტ-ს შემცველ ხსნარში. ამ პროცედურას თან სდევდა ინკუბაცია ისევ 15 წუთით იგივე შემადგენლობის ხსნარში, ოღონდ რომელშიც 1% დტტ ჩანაცვლებული იყო 2.5%-იანი იოდოაცეტამიდით.

SDS-ელექტროფორეზი

SDS ელექტროფორეზს ვატარებდით 1მმ სისქის, 12.5% პოლიაკრილამიდის გელზე 25°C-ზე, თავდაპირველად 10 mA თითოეულ გელზე (ერთდროულად 6 გელის ფორეზი მიმდინარეობდა) 80 V-ზე 1 სთ და შემდეგ 12 mA გელზე 150 V-ზე 17 საათის განმავლობაში.

გელების შეღებვა, სკანირება და გამოსახულების ანალიზი

პოლიაკრილამიდის გელები იღებებოდა ვერცხლის შესაღები ნაკრებით (GE-Healthcare), მაგრამ ამოღებული იყო გლუტარალდეჰიდის საფეხური. ვერცხლით შეღებული გელების სკანირება ხორციელდებოდა სკანერით Labscan 6.0. მიღებული გამოსახულებების ციფრული დამუშავება ხორციელდებოდა სპეციალური პროგრამით Image Master 2D platinum 7.0. ექსპერიმენტების ყოველ სერიაში *Y. pestis* 4 შტამის სუპერნატანტები, ერთიდაიგივე ფიზიოლოგიური მდგომარეობისათვის ანალიზდებოდნენ ერთდროულად. ვარჩევდით იმ ცილოვან ლაქებს, რომელთა შორის განსხვავება სულ მცირე 1.5-ის ჯერადი იყო. სხვადასხვა ექსპერიმენტებში იზოელექტრული პოზიციის და მოლეკულური წონის მიხედვით იდენტური ლაქების ფარდობითი ინტენსივობის შედარება ხორციელდებოდა *t*-ტესტის საშუალებით. სარწმუნოდ განსხვავებული ცილოვანი ლაქები ამოიჭრებოდა, ირეცხებოდა და ინახებოდა -20°C-ზე მასს-სპექტრომეტრულ ანალიზამდე.

ცილების ფრაგმენტაცია გელში და მასს-სპექტრული ანალიზი

გელიდან ამოჭრილი ცილების აღდგენას ვახორციელებდით TCEP რეაქტივის საშუალებით, ხოლო ალკილირებას იოდოაცეტამიდით. ამის შემდეგ ნიმუშები მუშავდებოდა აცეტონიტრილით, შრებოდა და განიცდიდა რეჰიდრირებას გააქტივებული ტრიფსინით (Thermo Scientific, Pierce) ფრაგმენტაციის

ინიცირებისათვის. ფრაგმენტაცია გრძელდებოდა 4 სთ 37°C -ზე. ფრაგმენტირებული ნიმუშები ექვემდებარებოდა ნანოშესხურებით იონიზაციას ტანდემური მაღალი წნევის ქრომატოგრაფ-მს/მს სისტემით (Finnigan LTQ, Thermo Scientific). მს/მს სპექტრული მონაცემები მუშავდებოდა პროგრამით SEQUEST (Proteome Discoverer 2.0) უნიპროტის UniRef100 მონაცემთა ბაზის მიხედვით.

ანტისხეულები

ანტისხეულები F1 ანტიგენის წინააღმდეგ მიღებული იყო კომპანია Life Science Meridian-იდან (კატალოგის ნომერი C86308M). პოლიკლონური ანტისხეულები დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS-ის, ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილის და გარეთა მემბრანული ცილა C-პორინის წინააღმდეგ გამომუშავებული იქნა შემდეგი პეპტიდების წინააღმდეგ: დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS: EMLEKLEVVVN (ამინომჟავები 28–38); ტელურიუმ-რეზისტენტული: PADVDKIVFVVT (ამინომჟავები 99–110), გარეთა მემბრანული ცილა C -პორინის: NTDDIVAVGMVYQ (ამინომჟავები 332–344).

ანტისხეულები დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS და ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილის წინააღმდეგ გასუფთავებულ იქნა შესაბამისი პეპტიდის აფინურ ფისებზე, ხოლო ანტისხეულები გარეთა მემბრანული ცილა C -პორინის წინააღმდეგ პროტეინ-A სეფაროზას სვეტზე. ანტისხეულების სპეციფიკურობა შემოწმებული იქნა ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით შესაბამისი პეპტიდების ინჰიბირების მიხედვით.

1-განზომილებიანი ელექტროფორეზი და ვესტერნ იმუნობლოტინგი

30 მკგ ცილის შემცველ ნიმუშებს ემატებოდა ლემლი-SDS-ის ბუფერი. ნიმუშების შემდეგი ანალიზი ხორციელდებოდა SDS-პოლიაკრილამიდის გელ-ელექტროფორეზით და შემდგომი ვესტერნ იმუნობლოტინგით. ნიტროცელულოზის მემბრანებზე ელექტროფორეზული გადატანის შემდეგ ცილების ვიზუალიზაცია ხდებოდა პონსე S საღებავით, რითაც ასევე დასტურდებოდა გელზე ცილების თანაბარი რაოდენობის ნიმუშების დატანა. ნიტროცელულოზის მემბრანები იჭრებოდა მოლეკულური წონის სტანდარტების პოზიციის მიხედვით და შემდეგ

ხდებოდა ინკუბაცია პირველად ანტისხეულებთან შემდეგი ცილოვანი მოლეკულების წინააღმდეგ: F1, ტელურიუმ რეზისტენტული ცილა, გარეთა მემბრანული ცილა C -პორინის და დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS. რადგან F1 ცილას და გარეთა მემბრანული ცილა C -პორინს მსგავსი მოლეკულრი წონა აქვთ, თვითოეული ამ ანტიგენისათვის ცალკე ელექტროფორეზი ტარდებოდა.

სტანდარტულ იმუნოქიმიური პროცედურისთვის და ცილოვანი ხაზების ვიზუალიზაციისთვის ხორციელდებოდა პეროქსიდაზით მონიშნული მეორეული ანტისხეულებით და სუპერსიგნალ ვესტ პიკო ქემინოლუმინესციური სუბსტრატით ((Thermo Scientific, Pierce). ქემინოლუმინისცენციის ხაზობრივი სიგნალისათვის რენტგენული ფირები განიცდიდნენ წინასწარ დასხივებას სპეციალური დამასხივებლით Sensitize (Amersham). ცილოვანი ხაზების ინტენსივობა იზომებოდა პროგრამით - LabWorks 4.0 (UVP). აუტორადიოგრამების კალიბრირებას ვახორციელებდით ოთხივე შტამის გაერთიანებული ცილოვანი ნაკრებით და თითოეულ გელზე დაიტანებოდა 15, 30, 45 და 60 მკგ ცილოვანი ნარევი. ცალკეული ცილისათვის, თითოეულ გელზე მზადდებოდა სტანდარტული მრუდი - ცილის სიმკვრივის დამოკიდებულება ცილის რაოდენობაზე. უმცირეს კვადრატთა რეგრესიით ნაჩვენები იყო სარწმუნო წრფივი დამოკიდებულება ყოველი სტანდარტისათვის. ექსპერიმენტულ ნიმუშებში ცილის რაოდენობის დათვლისათვის თითოეული ცილის ოპტიკური სიმკვრივის მაჩვენებელი იყოფოდა 30 მკგ სტანდარტის შესაბამის ოპტიკურ სიმკვრივეზე და ეს მაჩვენებელი აღინიშნებოდა როგორც ცილის ფარდობითი რაოდენობა (მაგალითად F1, ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილის ან ცილა H-NS-ის ფარდობითი რაოდენობა).

ინ ვიტრო ციტოტოქსიკურობის განსაზღვრა

საკვლევი *Y. pestis* შტამების და სავაქცინო EV შტამის ციტოტოქსიკურობა ინ ვიტრო სისტემაში ფასდებოდა მაკროფაგების კულტურაში მათი აპოპტოზის გამოწვევის უნარით. აპოპტოზი ფასდებოდა კასპაზა-3-ის კოლორიმეტრული ნაკრების საშუალებით (Sigma-Aldrich, cat. #CASP-3-C) მწარმოებლის ინსტრუქციის

მიხედვით. ამ ნაკრებით ხდებოდა აპოპტოზის ერთ-ერთი მთავარი ფერმენტის კასპაზა-3-ის აქტივობის გაზომვა.

მაკროფაგების კულტივირება ხდებოდა აღწერილი მეთოდის მიხედვით [83, 99]. თავის J774A.1 მაკროფაგები იზრდებოდა DMEM არეში, რომელსაც ემატებოდა ტემპერატურით ინაქტივირებული ხარის ფეტალური შრატი 10% საბოლოო კონცენტრაციით. კულტურების ინკუბაცია ხორციელდებოდა 72 სთ განმავლობაში 37°C-ზე 5% CO₂-ის თანაობისას. ამ პერიოდის გავლის შემდეგ ხდებოდა ფირფიტების გარეცხვა მიუმაგრებელი უჯრედების მოსაშორებლად.

ფირფიტის თითოეულ ფოსოს ემატებდა *Y. pestis*-ის 100 მკლ ხსნარი, რომელშიც უჯრედების კონცენტრაცია შეადგენდა 3×10^8 -ს, რის შემდეგაც გრძელდებოდა ინკუბაცია 37°C-ზე 3 სთ განმავლობაში. ფირფიტებს ცენტრიფუგირდებოდა $600 \times g$ 5 წთ განმავლობაში 4°C-ზე და ირეცხებოდა 1 მლ ფოსფატ-ბუფერით თვითოეულ ფოსოზე. ამის შემდეგ თვითოეულ ფოსოს ემატებოდა 100 მკლ ლიზის ბუფერი. ყინულზე 15 წთ ინკუბაციის შემდეგ ლიზატები ცენტრიფუგირდებოდა $3,000 \times g$ 5 წთ 4°C-ზე და სუპერნატანტი ინახებოდა -70°C-ზე. ამის შემდგომ სუპერნატანტი იფილტრებოდა, იყოფოდა ალიქვოტებად და ტარდებოდა ტესტი სტერილობაზე როგორც უკვე ზემოთ არის აღწერილი.

უჯრედული ლიზატები და პოზიტიური კონტროლები 1X ესსეის ბუფერით მიგვყავდა მოთხოვნილ მოცულობამდე და ხორციელდებოდა ინკუბაცია კასპაზა-3-ის სუბსტრატთან 2 სთ 37°C-ზე. ყოველი ალიქვოტისათვის გამოიყენებოდა პარალელური ნიმუში, რომელიც პეპტიდური სუბსტრატის გარდა შეიცავდა კასპაზა-3-ის ინჰიბიტორს. გამონთავისუფლებული *p*- ნიტროანილინი იზომებოდა სპექტრომეტრულად 405 ნმ ტალღის სიგრძეზე და რაოდენობა ისაზღვრებოდა სტანდარტული საკალიბრო მრუდის მიხედვით. მიღებულ მონაცემებს აკლდებოდა ის მონაცემები, რომლებიც მიღებული იყო ინჰიბიტორის თანაობისას შესაბამის პარალელურ ნიმუშებში. ლიზატებში ისაზღვრებოდა ცილის რაოდენობა და ფერმენტის აქტივობა გამოისახებოდა გამონთავისუფლებული *p*- ნიტროანილინის რაოდენობით ნანომოლებში 1 წთ განმავლობაში ლიზატის 1 მგ ცილაზე

სტატისტიკური ანალიზი

ცილის ფარდობითი რაოდენობები ანალიზდებოდა ორფაქტორიან ცვლადთა ანალიზით (ANOVA) შემდეგი ფაქტორების მიხედვით: შტამი (#1390, #1853, #2944 და #8787) და ფიზიოლოგიური მდგომარეობა (28°C , 28°C Ca^{2+} -ით, 37°C , 37°C Ca^{2+} -ით). მონაცემებს, რომლებიც მიიღებოდა სხვადასხვა შტამებისათვის ერთიდაიგივე ფიზიოლოგიური მდგომარეობისათვის ვადარებდით t -ტესტის საშუალებით.

კასპაზა-3-ის აქტივობის მონაცემები მუშავდებოდა ერთ-ფაქტორიან ცვლადთა ანალიზით. დაგეგმილი შედარებები ტარდებოდა t -ტესტის საშუალებით. ყველა t -ტესტი იყო 2-კუდიანი. 1-კუდიანი ტესტის გამოყენების შემთხვევაში მოცემულია შესაბამისი მითითება.

2.4. მიღებული შედეგები

პჯრ რეალურ დროში. დეტექცია

პჯრ რეალურ დროში real-time PCR Idaho Technology ნაკრების გამოყენებით

Y. pestis სამუზეუმო შტამების გამოკვლევამ real-time PCR Idaho Tech., ნაკრების გამოყენებით გამოავლინა, რომ საქართველოს და სომხეთის ტერიტორიიდან გამოყოფილი შტამები (40 შტამი) უარყოფითი აღმოჩნდნენ ორივე სამიზნე უბანზე (*Y. pestis* Target 1, *Y. pestis* Target 2). ოთხი შტამი - #1045 (აზერბაიჯანი), #2619 (დაღესტანი), #2944 (ყაზარდო-ბალყარეთი), #790 (ყირგიზეთი) დადებითი აღმოჩნდა ორივე სამიზნეზე (T1, T2) (ცხრ.). Idaho Tech., ნაკრების ორივე სამიზნეს *Y. pestis* pPCP პლაზმიდის გენები წარმოადგენდა (*pla*, *pst*). მიღებული შედეგები მიუთითებს რომ ქართულ და სომხურ შტამებს არ აქვთ pPCP პლაზმიდა.

Idaho Technology *Y. pestis* real-time PCR ნაკრების მგრძნობელობა განისაზღვრა ერთ-ერთი დადებითი ნიმუშის #C-2944 (ყაზარდო ბალყარეთი) დნმ-ის სერიული (10X) განზავებებზე პჯრ-ით ორივე სამიზნეზე (*Y. pestis* Target 1, *Y. pestis* Target 2). ნაკრების სამიზნე 1-თვის (Target 1) დეტექციის ლიმიტი 3 ფგ აღმოჩნდა, ხოლო სამიზნე 2-თვის (Target 2) 30 ფგ. მიუხედავად იმისა, რომ Idaho Tech., ნაკრების მგრძნობელობა *Y. pestis* ძალიან მაღალია ორივე სამიზნესთვის, აღნიშნული ნაკრები არ გამოდგება საქართველოს ტერიტორიაზე არსებული შავი ჭირის კერებზე ზედამხედველობის განსახორციელებლად.

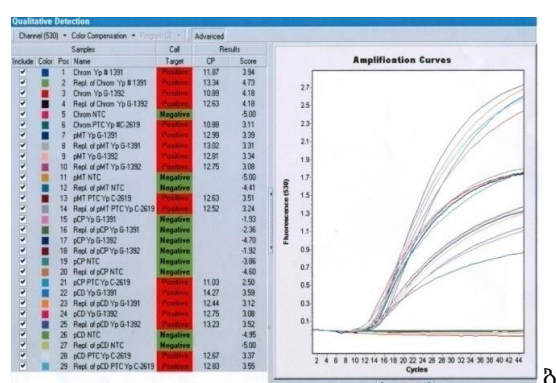
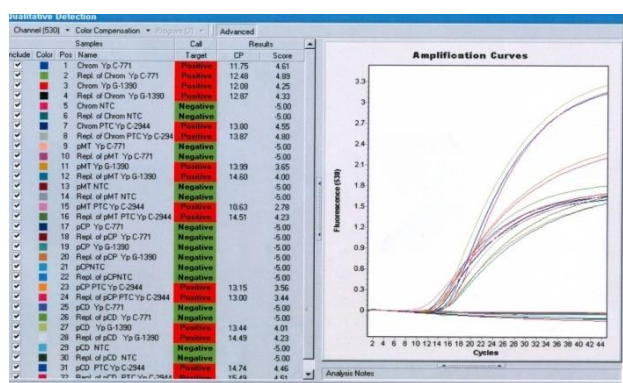
Y. pestis-ის სპეციფიკური TaqMan Real-time PCR; პლაზმიდური სპექტრის განსაზღვრა

საქართველოს ბუნებრივ კერებში იზოლირებული *Y. pestis* შტამების დეტექციისთვის, ასევე შტამების პლაზმიდური სპექტრის განსაზღვრად ცოცხალი კულტურების მუზეუმში არსებულ 46 *Y. pestis* შტამიდან გამოყოფილ დნმ-ზე, დაიდგა TaqMan-ის პრინციპზე დაფუძნებული პჯრ რეალურ დროში ოთხ სამიზნეზე: ქრომოსომული (*yihN*) და პლაზმიდური გენებისთვის (pMT1 /*cafI*, pCD1 /*lcrV* და

pPCP1/pla). პჯრ რეაქცია ასევე ჩატარდა დესჯეც-ის კოლექციაში არსებულ *Y. pseudotuberculosis* (12) და *Y. enterocolitica*-ს (5) შტამებზე.

Y. pestis ყველა შტამი დადებითი აღმოჩნდა *yihN* ქრომოსომულ მარკერისთვის. საქართველოს მაღალმთიანი კერიდან (39) და სომხეთიდან (2) გამოყოფილი subsp. *microtus* შტამები დადებითები აღმოჩნდნენ ყველა მარკერზე, pPCP1 (*pla*) მარკერის გარდა. მიღებული შედეგები ემთხვევა Idaho Tech- ნაკრებით მიღებულ შედეგებს, რაც ადასტურებს, რომ *Y. pestis* ქართულ და სომხურ იზოლატებს არ გააჩნიათ pPCP პლაზმიდა.

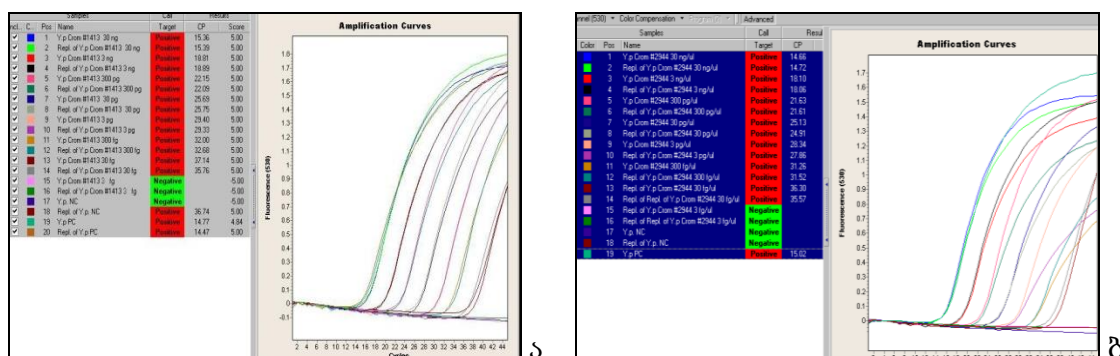
ყირგიზეთის, აზერბაიჯანის და რუსეთის ტერიტორიიდან გამოყოფილი შტამები დადებითი აღმოჩნდნენ ოთხივე მარკერზე (*yihN*, pMT1 /*cafI*; pCD1 /*lcrV* და pPCP1/*pla*). #C-771 (ვაკე-მთისწინა კერა, საქართველო) შტამი მხოლოდ ქრომოსომულ (*yihN*) მარკერზე აღმოჩნდა დადებითი, რაც მიუთითებს, რომ შტამს არ აქვს არცერთი ძირითადი ვირულენტობის განმსაზღვრელი პლაზმიდა (სურ. 24). უნდა აღინიშნოს, რომ #C-771 შტამი უმველესია კოლექციაში (1966წ.) და შესაძლოა ხანგრძლივი დროის განმავლობაში ლაბორატორიაში შენახვისა და მრავალჯერადი გადათესვების შედეგად პლაზმიდები დაკარგულიყვნენ.



სურათი 24. პჯრ რეალურ დროში *Y. pestis* ქრომოსომულ (*yihN*) და პლაზმიდურ (pCD, pMT, pCP) მარკერებზე

yihN მარკერის სპეციფიკურობის დადგენის მიზნით გამოკვლეული 14 *Y. pseudotuberculosis* და 5 *Y. enterocolitica* შტამი უარყოფი აღმოჩნდა ქრომოსომული მარკერზე.

განისაზღვრა *Y. pestis yihN* ქრომოსომული მარკერზე პჯრ მგრძნობელობა. *Y. pestis* დნმ-ის სერიული განზავებებზე *yihN* მარკერის დეტექციის ლიმიტი ≥ 30 ფგ იყო, რაც რეაქციის მაღალ მგრძნობელობაზე მიუთითებს (სურ. 25).



სურათი 25. პჯრ რეალურ დროში *Y. pestis yihN* მარკერზე.

Y. pestis შტამების დნმ-ის სერიული განზავებების პჯრ *yihN* ქრომოსომულ მარკერზე (30 ნგ, 3 ნგ, 0.3 ნგ, 30 პგ, 3 პგ, 0.3 პგ, 30 ფგ და 3 ფგ). ა. #1413-მაღალმთიანი კერა, საქართველო; ბ. #C-2944-ყაზარდო-ბაღყარეთი, რუსეთი;.

yihN ქრომოსომული მარკერზე პჯრ-ის მგრძნობელობა არ შეცვლილა *Y. pestis* კულტურიდან გამოყოფილი დნმ-ის სერიულ განზავებებზე სავსე მასალიდან ექსტრაგირებული დნმ-ის დამატებისას. დეტექციის ლიმიტი ერთნაირი იყო (~30 ფგ), როგორც სავსე მასალიდან (ექტოპარაზიტების ემულსია, მღრღნელების ორგანოების ნიმუშები) გამოყოფილი დნმ-ის დამატების შემთხვევაში, ისე მის გარეშე. აქედან გამომდინარე შეგვიძლია დავასკვნათ რომ მოცემული ტესტი შეიძლება გამოყენებულ იქნას სავსე მასალის შავი ჭირის გამომწვევზე გამოსაკვლევად.

ცხრილი 11. პჯრ შედეგები.

შტამის #	Idahoo tech. (T1)	Idahoo tech. (T2)	Chromosome (<i>yihN</i>)	pCD (<i>lcrV</i>)	pMT (<i>cafI</i>)	pPCP (<i>pla</i>)
771	-	-	+	-	-	-
1390	-	-	+	+	+	-
1391	-	-	+	+	+	-
1392	-	-	+	+	+	-
1393	-	-	+	+	+	-
1412	-	-	+	+	+	-

1413	-	-	+	+	+	-
1670	-	-	+	+	+	-
1851	-	-	+	+	+	-
1852	-	-	+	+	+	-
1853	-	-	+	+	+	-
1952	-	-	+	+	+	-
1953	-	-	+	+	+	-
1954	-	-	+	+	+	-
2095	-	-	+	+	+	-
3064	-	-	+	+	+	-
3065	-	-	+	+	+	-
3066	-	-	+	+	+	-
3067	-	-	+	+	+	-
3072	-	-	+	+	+	-
3073	-	-	+	+	+	-
3082	-	-	+	+	+	-
3083	-	-	+	+	+	-
3757	-	-	+	+	+	-
3758	-	-	+	+	+	-
3768	-	-	+	+	+	-
3769	-	-	+	+	+	-
3770	-	-	+	+	+	-
8786	-	-	+	+	+	-
8787	-	-	+	+	+	-
8788	-	-	+	+	+	-
8789	-	-	+	+	+	-
8790	-	-	+	+	+	-
8791	-	-	+	+	+	-
8792	-	-	+	+	+	-
8793	-	-	+	+	+	-
8794	-	-	+	+	+	-
8906	-	-	+	+	+	-
8907	-	-	+	+	+	-
8908	-	-	+	+	+	-
C-790	+	+	+	+	+	+
C-2944	+	+	+	+	+	+
C-2619	+	+	+	+	+	+
C-1045	+	+	+	+	+	+
C-14735	-	-	+	+	+	-
C-1522	-	-	+	+	+	-

გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში – (PFGE)

დესჯეც კოლექციაში არსებული *Y. pestis* 46 შტამზე ჩატარდა PFGE ტიპირება ორი რესტრიქციული ენდონუკლეაზას (*SpeI* და *XbaI*) გამოყენებით.

Y. pestis 46 შტამის *SpeI* და *XbaI* ენდონუკლეაზებით დამუშავების შედეგად მიღებული PFGE ფრაგმენტების ვიზუალური ანალიზით ექვსი განსხვავებული ჯგუფი გამოიკვეთა. უმეტეს შემთხვევაში, *SpeI* რესტრიქციით განსხვავებული შტამები ასევე განასხვავებდნენ *XbaI* პროფილით.

საქართველოს (#771- ვაკე მთისწინა კერა), აზერბაიჯანის (#1045), ყირგიზეთის (#790) და რუსეთის ფედერაციის (#2619, #2944) შტამები განსხვავებულ PFGE ჯგუფებში მოხვდნენ, როგორც *SpeI* ასევე *XbaI* - რესტრიქციული ანალიზის საფუძველზე. PFGE-ით მიღებული *SpeI* და *XbaI* - მაკრორესტრიქციული პროფილების ანალიზმა, საქართველოს მაღალმთიანი კერიდან იზოლატების უმრავლესობაში იდენტური PFGE პროფილი გამოავლინა (*Spe I* ა ტიპი და *Xba I* ტიპი), რაც ამ კერაში პოპულაციის მონომორფულობაზე მიუთითებს. ერთ ქართულ შტამს #771 (ვაკე მთისწინა კერა), სხვა ქართული შტამებისგან მკვეთრად განსხვავებული PFGE პროფილი აღმოაჩნდა.

XbaI-ით რესტრიქციაზე დაფუძნებული ანალიზის საფუძველზე მოხდა გარკვეული შტამების დიფერენცირება, რომლებიც არ განსხვავდებოდნენ *SpeI* ანალიზით და პირიქით. მაგალითად, შტამები #3072, #3768, #8787, #8789, ასევე შტამები #1851 და #8908, რომლებსაც იდენტური $PFGE_{XbaI}$ პროფილი გააჩნდათ, განსხვავებულ $PFGE_{SpeI}$ ქვეტიპებში მოხვდნენ (*SpeI*_ბ, *SpeI*_გ, *SpeI*_დ სუბტიპები შესაბამისად). მეორეს მხრივ, შტამები: #3066 და #3758 $PFGE_{SpeI}$ ანალიზით იდენტურნი იყვნენ, ხოლო $PFGE_{XbaI}$ ანალიზის საფუძველზე *XbaI*_ბ და *XbaI*_გ ქვეტიპებში მოხვდნენ. $PFGE_{XbaI}$ ანალიზის საფუძველზე ორივე სომხური შტამი #14735 და #1522 *XbaI* ტიპს განეკუთვნებოდა, ხოლო *SpeI* რესტრიქციული ანალიზით განსხვავებული PFGE პროფილები გამოავლინეს (*SpeII*_ა, *SpeII*_ბ შესაბამისად) (სურ. XX).

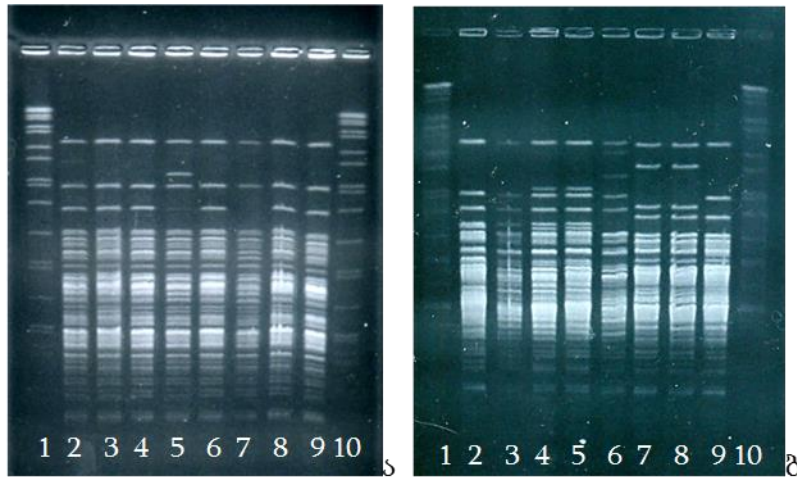
სულ 10 *SpeI* და 8 *XbaI* PFGE პროფილები იქნა იდენტიფიცირებული. *SpeI* -ზე დაფუძნებულ PFGE ანალიზმა *XbaI*-თან შედარებით ოდნავ მაღალი დისკრიმინაციის უნარი გამოავლინა (ცხრ. 12.).

ცხრილი 12 *Y. pestis* შტამების *SpeI* და *XbaI* რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით PFGE ანალიზი

PFGE _{<i>SpeI</i>} I	ა. 33 შტამი (მაღალმთიანი კერა, საქართველო)
	ბ. #3072, #3768, #8787, #8789 (მაღალმთიანი კერა, საქართველო)
	გ. #1851 (მაღალმთიანი კერა, საქართველო)
	დ. #8908G (მაღალმთიანი კერა, საქართველო)
PFGE _{<i>SpeI</i>} II	ა. #14735 (სომხეთი)
	ბ. #1522 (სომხეთი)
PFGE _{<i>SpeI</i>} III	#771 (ვაკე-მთისწინა კერა, საქართველო)
PFGE _{<i>SpeI</i>} IV	#1045 (აზერბაიჯანი)
PFGE _{<i>SpeI</i>} V	#2619, #2944 (დაღესტანი, ყაზარდო-ბალყარეთი, რუსეთი)
PFGE _{<i>SpeI</i>} VI	#790 (ყირგიზეთი)
PFGE _{<i>XbaI</i>} I	ა. #37 შტამი (მაღალმთიანი კერა, საქართველო)
	ბ. #3066 (მაღალმთიანი კერა, საქართველო)
	გ. #3758 (მაღალმთიანი კერა, საქართველო)
PFGE _{<i>XbaI</i>} II	#14735, #1522 (სომხეთი)
PFGE _{<i>XbaI</i>} III	#771 (ვაკე-მთისწინა კერა, საქართველო)
PFGE _{<i>XbaI</i>} IV	#1045 (აზერბაიჯანი)
PFGE _{<i>XbaI</i>} V	#2619, #2944 (დაღესტანი, ყაზარდო ბალყარეთი, რუსეთი)
PFGE _{<i>SpeI</i>} VI	#790 (ყირგიზეთი)

ცხრილი 13. *Y. pestis* შტამების *SpeI* და *XbaI* რესტრიქციით მიღებული PFGE პროფილები

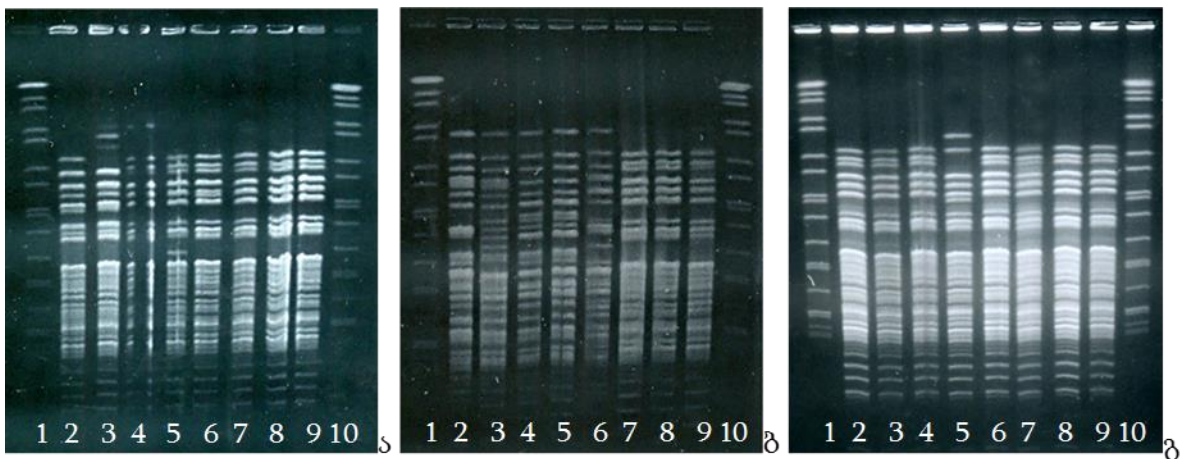
	შტამის #	PFGE _{<i>SpeI</i>}	PFGE _{<i>XbaI</i>}	შტამის იზოლაციის ადგილი
<i>Y. pestis</i>	771	Spe I I I	Xba I I I	ვაკე-მთისწინა კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1390	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1391	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1392	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1393	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1412	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1413	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1670	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1851	Spe I გ	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1852	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1853	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1952	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1953	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	1954	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	2095	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3064	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3065	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3066	Spe I ა	Xba I ბ	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3067	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3072	Spe I ბ	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3073	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3082	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3083	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3757	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3758	Spe I ა	Xba I გ	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3768	Spe I ბ	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3769	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	3770	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8786	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8787	Spe I ბ	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8788	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8789	Spe I ბ	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8790	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8791	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8792	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8793	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8794	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8906	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8907	Spe I ა	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	8908	Spe I დ	Xba I ა	მალღმთიანი კერა, საქართველო
<i>Y. pestis</i>	C-790	Spe VI	Xba VI	ყირგიზეთი
<i>Y. pestis</i>	C-2944	Spe V	Xba V	დაღესტანი, რუსეთი
<i>Y. pestis</i>	C-2619	Spe V	Xba V	ყაზარდო-ბალყარეთი, რუსეთი
<i>Y. pestis</i>	C-1045	Spe IV	Xba IV	აზერბაიჯანი
<i>Y. pestis</i>	C-14735	Spe I I ა	Xba I I	სომხეთი
<i>Y. pestis</i>	C-1522	Spe I I ბ	Xba I I	სომხეთი



სურათი 26. *Y. pestis* შტამების რესტრიქციული ანალიზი *XbaI* ენდონუკლეაზით

ა. 1,10 *XbaI*-დაჭრილი *Salmonella enterica* Braenderup დნმ-ი, 2 -9 *Y. pestis* შტამები, მაღალმთიანი კერა, საქართველო, 5 - 3066, 7 - 3758

ბ. 1,10 *XbaI*-დარეჭრილი *Salmonella enterica* Braenderup დნმ-ი, 2 # C771 (ვაკე-მთისწინა კერა, საქართველო), 3 - #1045(აზერბაიჯანი), 4 - #2619 (დაღესტანი), 5 - #2944(ყაზარდო ბაღყარეთი), 6 - #790 (ყირგიზეთი); 7,8 - #14735, #1522 (სომხეთი) 9 - 1390 (მაღალმთიანი კერა, საქართველო)



სურათი 27. *Y. pestis* შტამების რესტრიქციით მიღებული PFGE პროფილები. *Y. pestis* შტამების რესტრიქციული ანალიზი *SpeI* ენდონუკლეაზით

ა. 1,10 *XbaI*-დაჭრილი *Salmonella enterica* Braenderup დნმ-ი, 4 - 9, *Y. pestis* შტამები, მაღალმთიანი კერა, საქართველო, 2-3 - C14735, C1522 (სომხეთი)

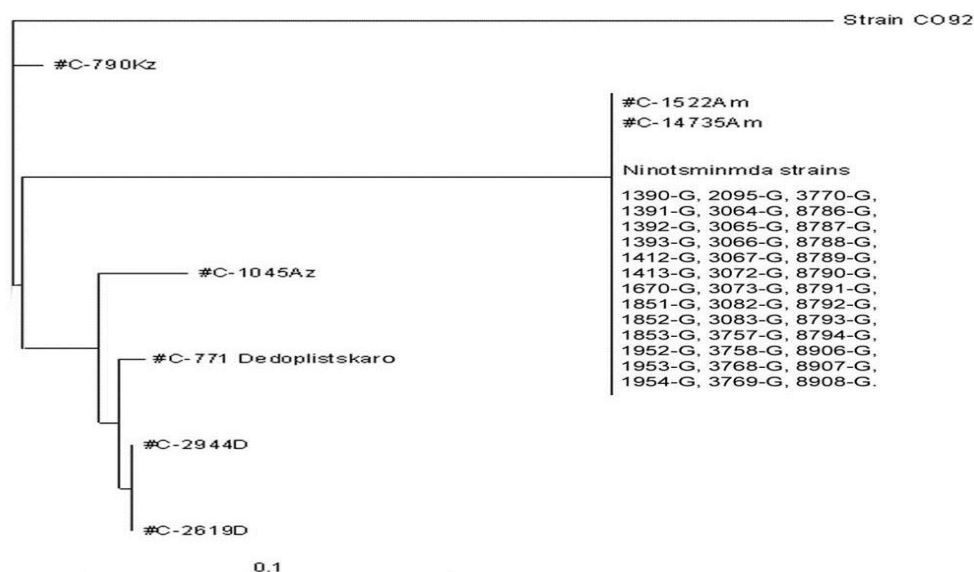
ბ. 1,10 *XbaI*-დაჭრილი *Salmonella enterica* Braenderup დნმ-ი, 2 #771 (ვაკე-მთისწინა კერა, საქართველო), 3 - #1045 (აზერბაიჯანი), 4 - #2619 (დაღესტანი), 5 - 32944 (ყაზარდო ბაღყარეთი), 6 - #790 (ყირგიზეთი); 7- 9 - 1390G (მაღალმთიანი კერა, საქართველო)

გ. ბ. 1,10 *XbaI*-დაჭრილი *Salmonella enterica* Braenderup დნმ-ი, 2-9 *Y. pestis* შტამები, მაღალმთიანი კერა, საქართველო, 4 - 8908G

IS100 გენოტიპირება

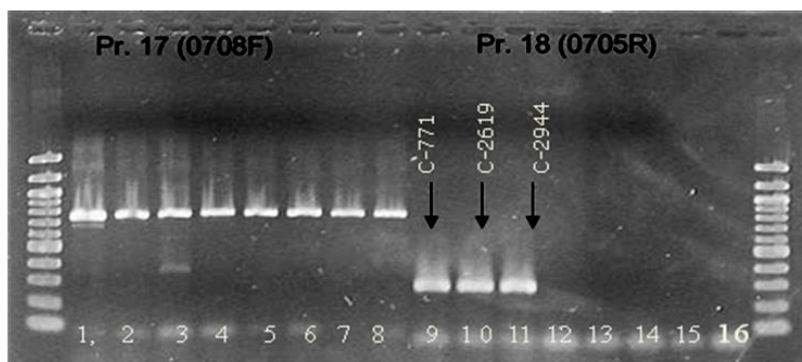
Y. pestis 46 სამუზეუმო შტამის IS100-ზე მეთოდით გენოტიპირებამ ხუთი განსხვავებული ჯგუფი გამოავლინა (სურ. 28).

- ✓ *Y. pestis* 39 შტამმა სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერიდან და ორმა სომხურმა კულტურამ იდენტური გენოტიპის მქონე ჰომოგენური ჯგუფი ჩამოაყალიბეს (82-დან 36 უბანზე აღინიშნა ამპლიფიკაცია).
- ✓ ვაკე-მთისწინა კერიდან გამოყოფილი შტამი (#771) მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდა სხვა ქართული იზოლატებისაგან (47 ლოკუსპეციფიკურ პრაიმერზე დადებითი ამპლიფიკაციით);
- ✓ დალესტნიდან (#2619) და ყაზარდო ბაღყარეთიდან (#2944) მიღებულმა შტამებმა #771 -ის შტამის მსგავსი IS100 პროფილი მოგვცეს, განსხვავდებოდნენ რა მხოლოდ ერთი დამატებითი უბნის (0831-F) ამპლიფიკაციით;
- ✓ აზერბაიჯანული შტამი რომელმაც 45 ლოკუსზე მოგვცა ამპლიფიკაცია, ასევე ახლოს განთავსდა #771 შტამთან, თუმცა #771 შტამისგან განსხვავებით უარყოფითი აღმოჩნდა pr0983-R უბანზე, ხოლო ორი უბანზე (pr0831-F, pr0225R) არასპეციფიკური მრავლობითი ფრაგმენტები დაასინთეზირა;
- ✓ განცალკევებით განთავსდა ყირგიზული შტამი, რომელიც დადებითი აღმოჩნდა 51 ლოკუსსპეციფიკურ პრაიმერზე;



სურათი 28. 46 *Y. pestis* შტამის IS100 გენოტიპირების საფუძველზე აგებული დენდროგრამა. დენდროგრამის ასაგებად გამოყენებულ იქნა FreeTree და TreeView პროგრამები.

IS100-ზე დაფუძნებული პოზიციური გენოტიპირებით ვაკე-მთისწინა კერიდან გამოყოფილმა შტამმა (#771), რომელიც მკვეთრად განსხვავდებოდა სხვა ქართული იზოლატებისაგან, მსგავსება გამოავლინა ჩრდილოკავკასიურ და აზერბაიჯანულ შტამების მიმართ და დენდროგრამაზე ამ იზოლატებთან ახლოს განთავსდა (სურ. 28). IS100 ტიპირების მეთოდით ვერ მოხერხდა მაღალმთიანი კერიდან გამოყოფილ ქართულ (39) და სომხურ შტამებს შორის განსხვავების აღმოჩენა, რაც მიუთითებს ამ შტამების ახლონათესაურ კავშირზე. IS100 გენოტიპირებით მიღებული შედეგები ახლოს დგას PFGE შედეგებთან, თუმცა უნდა აღინიშნოს რომ PFGE-ის გაარჩევადობის უნარი აღემატებოდა პჯრ-ზე დაფუძნებულ IS100 გენოტიპირებას.

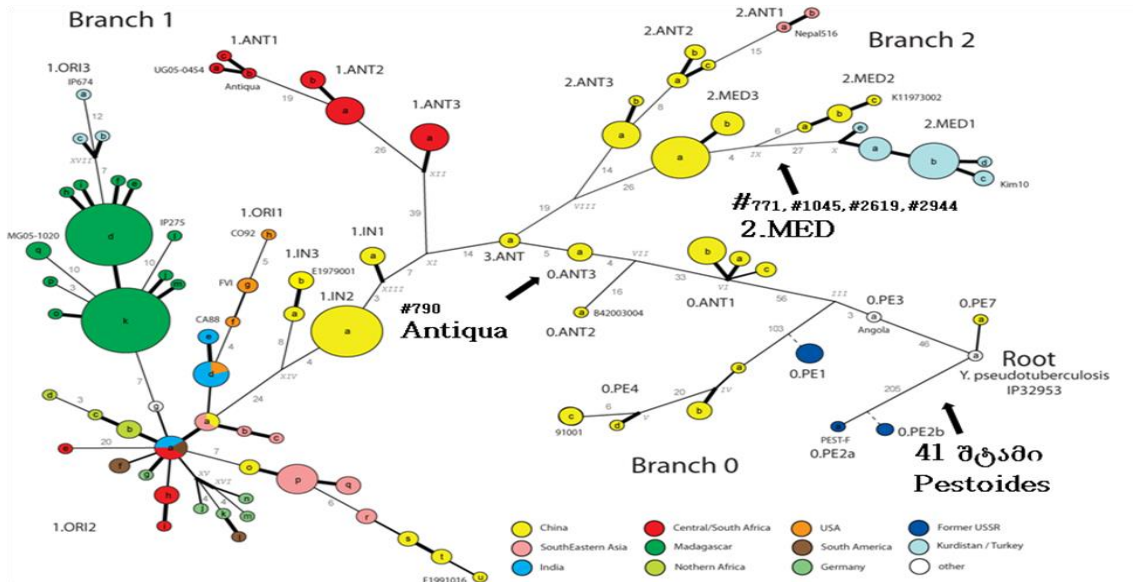


სურათი 29. IS100 გენოტიპირება. პჯრ. 0708F და 0705R პრაიმერებზე; 1, 9- #771 (აღ. საქ. ვაკე მთისწინა კერა), 2, 3, 10, 11- ჩრდილოეთ კავკასიური იზოლატები, 4-8, 12-16 - შტამები სამხ. საქ. მაღალმთიანი კერიდან.

პჯრ-ზე დაფუძნებული - SNP ტიპირება

Y. pestis სამუზეუმო შტამების SNP ტიპირება რამდენიმე ეტაპად ჩატარდა; თავდაპირველად, შტამების შესწავლა მოხდა ჩრდილოეთ არიზონას უნივერსიტეტში შემუშავებულ ე.წ. კანონიკურ SNP (canSNP) მარკერებზე, რის შედეგადაც 46 შტამი ფილოგენეტიკური ხის სამ განსხვავებულ შტოზე აღმოჩნდა (სურ. 30). ყირგიზული შტამი #790 O.ANT3 ჯგუფში bv. Antiqua შტამებთან ერთად მოხვდა (O.ANT3), ოთხი შტამი: #771 (ვაკე-მთისწინა კერა, #1045 აზერბაიჯანი, #2619, #2944 - რუსეთი) ხის მეორე ტოტზე/განშტოებაში (Branch 2), (სურ. 30, 31) bv. Medievalis-ის შტამებთან განთავსდა. *Y. pestis* 41 შტამი (39- მაღალმთიანი კერა, საქართველო, ორი - სომხეთი) O.PE2 განშტოებაზე მოხვდა, რომელიც O.PE7 განშტოებასთან ერთად

ფილოგენეტიკურ ხეზე უძველესია და ყველაზე ახლოს დგას წინაპარ *Y. pseudotuberculosis* 32953 შტამთან.



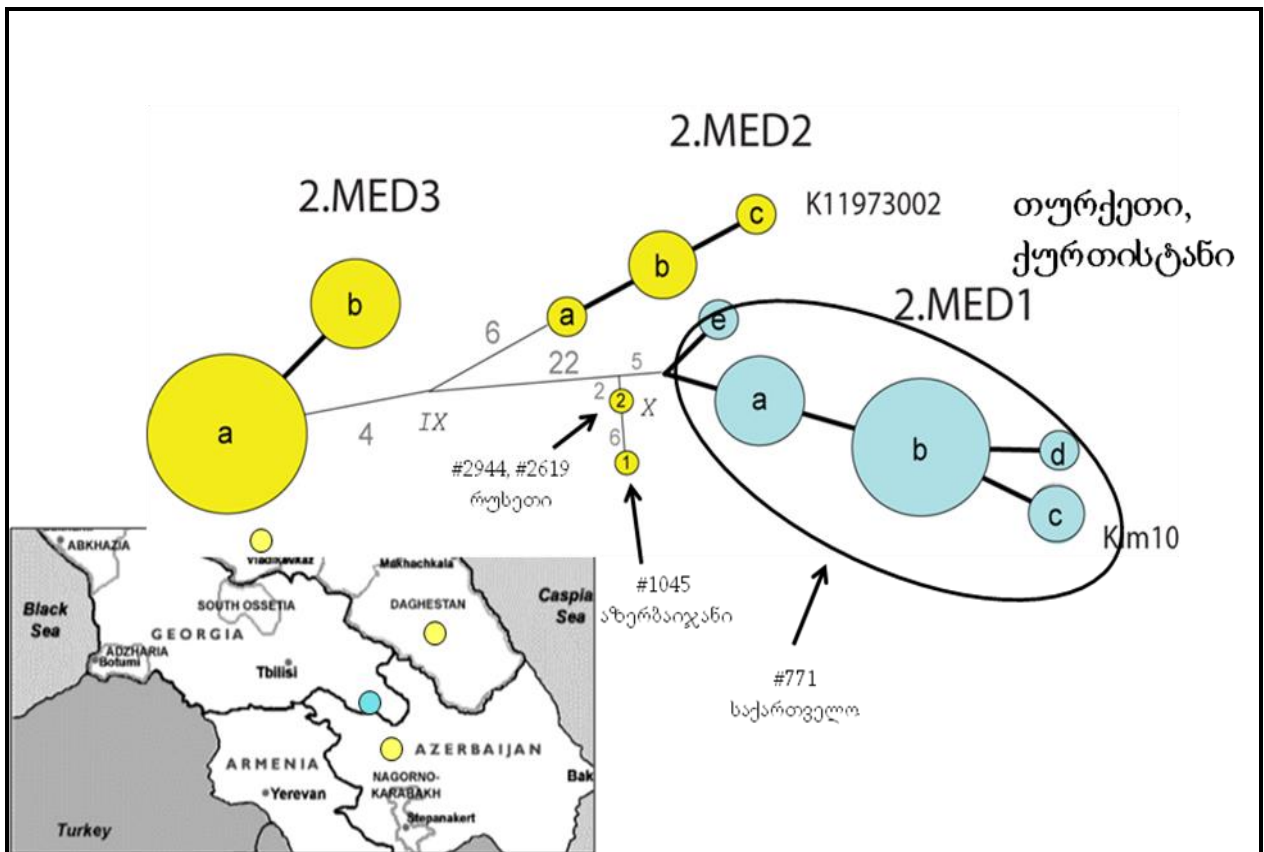
სურათი 30. canSNP გენოტიპირების საფუძველზე სამუხეუმო შტამების *Y. pestis* ევოლუციურ მოდელზე განთავსება

შემდგომ ეტაპზე მოხდა შტამების გენოტიპირება Medievalis 2Med და 0.PE2 განშტოებებისთვის გამოქვეყნებული SNP ლოკუსების საფუძველზე [93] ახლად შექმნილი რეაქციებით. melt-MAMA პჯრ ვალიდაციის შედეგად 2MED განშტოებისთვის 21, ხოლო 0.PE2a განშტოებისთვის 12 ტესტ/რეაქცია შეირჩა, რომლებზეც მოხდა საკოლექციო შტამების გენოტიპირება (იხ. დანართი 2).

2Med განშტოების 21 SNP ლოკუსზე ტიპირების შედეგად კოლექციაში არსებული ოთხი bv. Medievalis შტამი (#771, #1045, #2619, # 2944) გლობალური ფილოგენეტიკური ხის (სურ. 31) 2Med1 IX-X ჯგუფში მოხვდა, რაც მიანიშნებს იმაზე რომ აღნიშნული შტამები გენეტიკურად ახლოს დგანან თურქეთიდან, კერძოდ ქურთისტანიდან გამოყოფილ შტამებთან (KIM10).

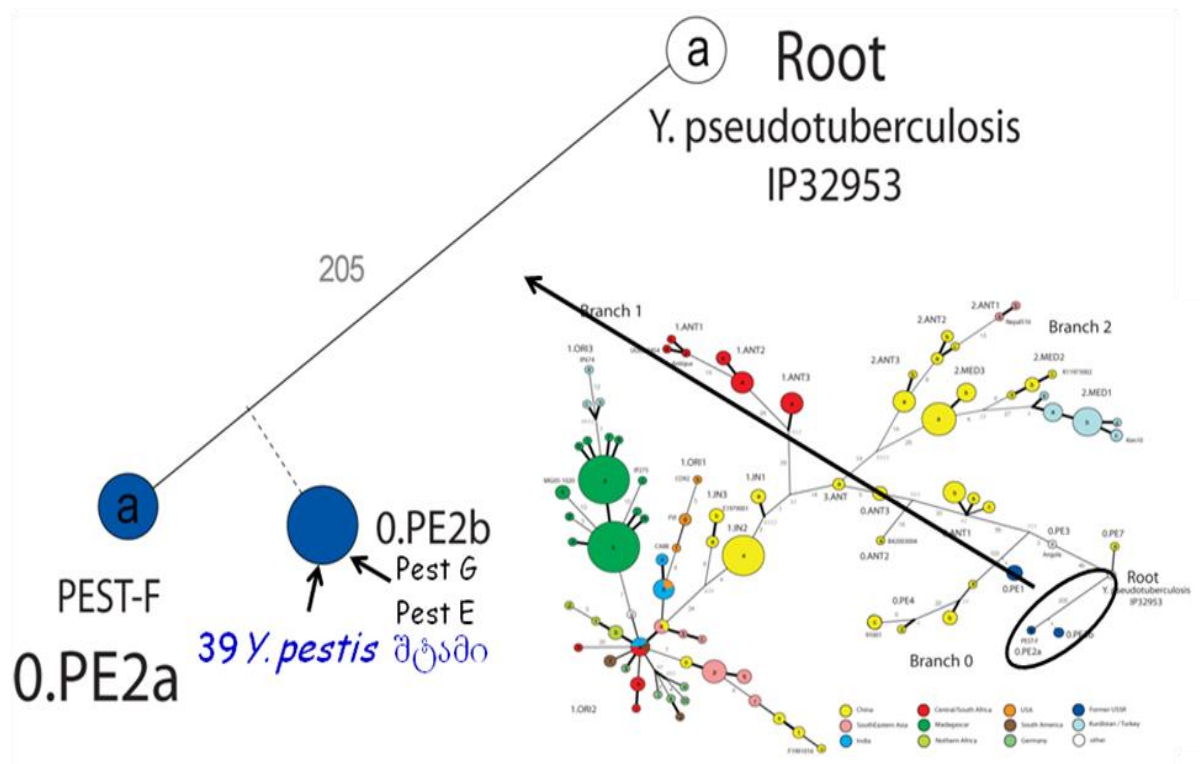
#1045 შტამის სექვენირების საფუძველზე ახლად აღმოჩენილი SNP-ებზე შექმნილი melt-MAMA პჯრ რეაქციების ანალიზის შედეგად Medievalis IX-X განშტოებიდან ახალი ტოტი წარმოიქმნა, რომელიც ბოლოვდებოდა სექვენირებული

#1045 შტამით (აზერბაიჯანი). ჩრდილოეთ კავკასიიდან გამოყოფილი ორი შტამი (#2619, #2944) ამ განშტოების შუაში განთავსდა და კვანძი შექმნა. ტიპირების შედეგად #771 ქართული შტამი ყველაზე ახლოს მოხვდა თურქეთის ტერიტორიაზე იზოლირებულ Kim10 შტამთან, ხოლო ჩრდილოეთ კავკასიიდან და აზერბაიჯანიდან გამოყოფილი შტამები განთავსდნენ Medievalis IX-X ტოტზე, რომელიც წარმოდგენილია ჩინეთიდან თურქეთის მიმართულებით გავრცელებული *Y. pestis* შტამებით.



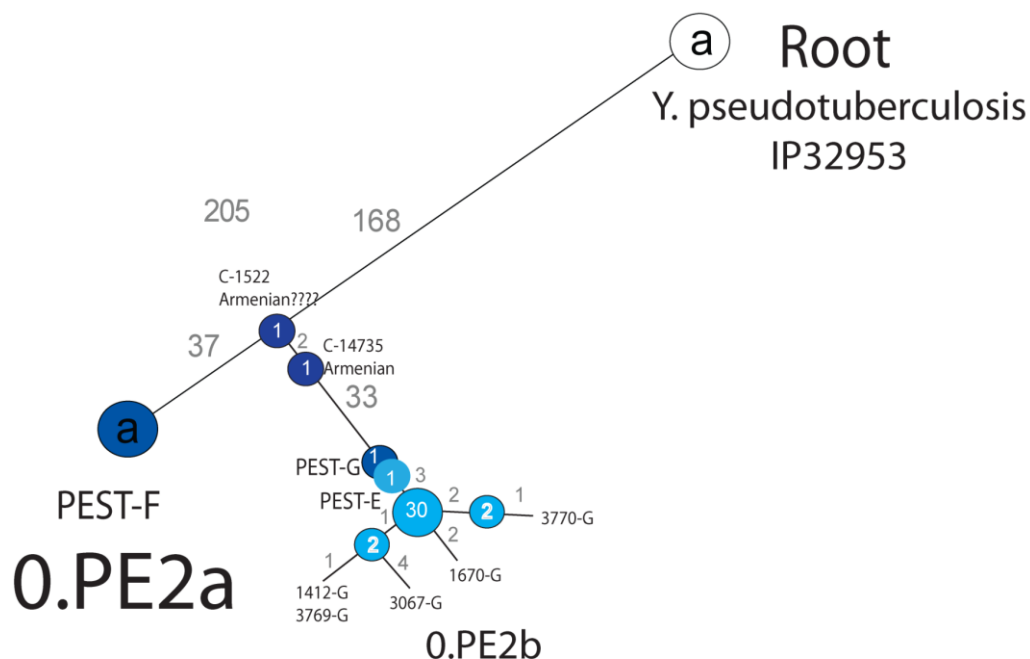
სურათი 31. SNP ფილოგენეტიკური ხის 2MED1 განშტოება

Y. pestis 39 შტამი სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერიდან და ორი სომხეთიდან გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე Pestoides ჯგუფში, კერძოდ 0.PE2 განშტოებაში (ტოტზე) მოხვდნენ, რომელიც PestoidesF სექვენსის საფუძველზე წარმოიქმნა. გამოქვეყნებული SNP ლოკუსების საფუძველზე შემუშავებულ 12 SNP melt-MAMA პჯრ ტიპირების შედეგად აღნიშნულ ტოტზე (IP32953 ფესვიდან - 0.PE2a) შტამების ზუსტი მდებარეობა განისაზღვრა (სურ. 32).



სურათი 32. გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხის 0.PE2 განშტოება.

სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერიდან გამოყოფილი ექვსი შტამის სექვენირების საფუძველზე ახლად აღმოჩენილ SNP-თვის შემუშავებულ და ვალიდირებულ პანელზე (45 melt-MAMA რეაქცია) *Y. pestis* იზოლატების ტესტირების შედეგად 0.PE2b განშტოება გაგრძელდა და ახალი Pestoides/Microtus SNP გენეტიკური ქვეჯგუფები გამოვლინდა. თუმცა ქართული იზოლატების უმრავლესობის დიფერენცირება ვერ მოხერხდა. ჩრდილოეთ არიზონას უნივერსიტეტის კოლექციაში არსებულ subsp. *microtus* bv. *Caucasica* Pestoides E და G შტამებს, რომლებიც 0.PE2b განშტოებას კმნიდნენ, 34-35 საზიარო SNP აღმოაჩნდათ ქართული შტამებთან და გაგრძელებულ 0.PE2b განშტოებაზე კვანძი შექმნეს. ორი სომხური შტამი 0.PE2b განშტოების ბაზალურ ნაწილში განთავსდა (სურ. 33).



სურათი 33. SNP ფილოგენეტიკური ხის 0.PE2b განშტოების ახალი ქვეჯგუფები.

melt-MAMA რეაქციის ხარისხის და ამპლიფიკაციის მრუდების ვიზუალური შეფასების შედეგად, თითოეული გენეტიკური ჯგუფისთვის განისაზღვრა სპეციფიკური canSNP ტესტი (ცხრ. 14). pestoides/microtus შტამებისთვის- ათი, ხოლო Bv. Medievalis შტამების ორი ტესტ რეაქცია.

ცხრილი 14. melt-MAMA ანალიზისათვის შერჩეული კანონიკური SNP (canSNP) პრაიმერები:
 ა. ქართული Pestoides/Microtus შტამებისთვის შერჩეული კანონიკური SNP პრაიმერები:
 ბ. Bv. Medievalis შტამებისთვის შერჩეული კანონიკური SNP პრაიმერები:

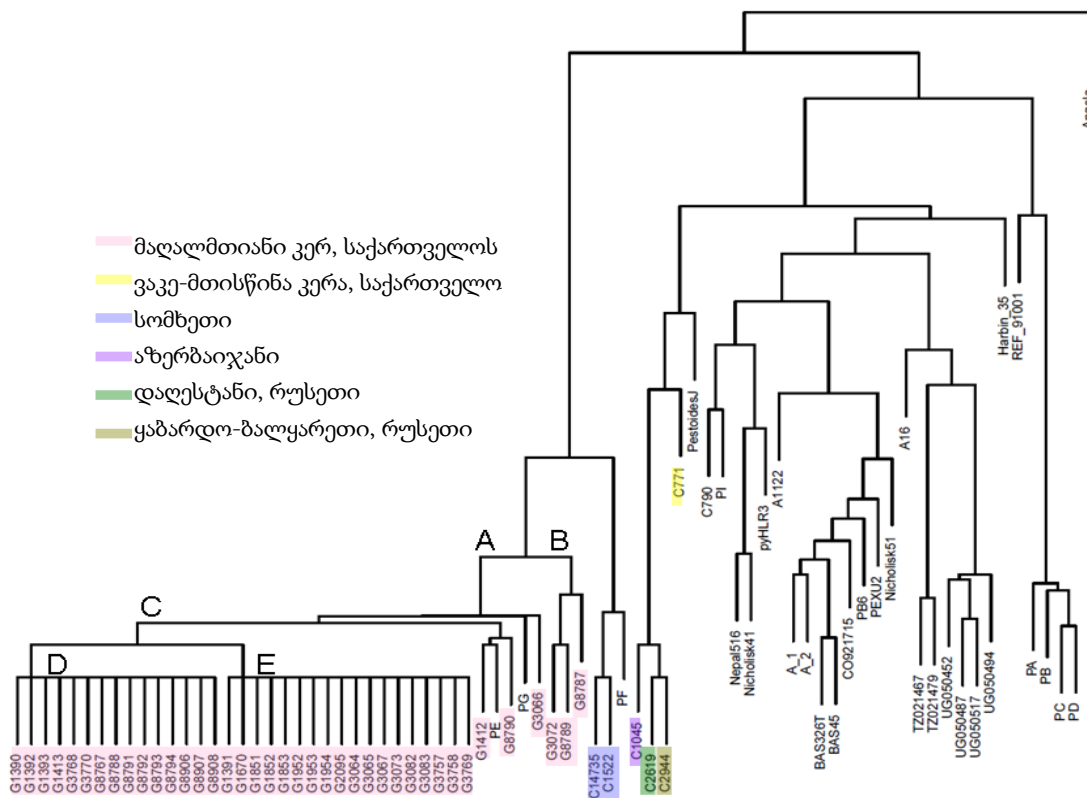
პრაიმერის სახ.	პოზიცია CO92 გენომში †	SNP ნუკლ.(Der/Anc)	melt MAMA პრაიმერები	melt-MAMA პრაიმერების თანმიმდევრობა	პრაიმ. კონც.(μM)	პრაიმ. დაცემ. ტემპ. (°C)	დღობის T _m (°C)
GePest_6	2575311	A/G	Fp_Der*	ccccgccccgccccgccccgCACCGCTAACAGCGTCAATgCT	0.15	60	84.8
			Fp_Anc**	CACCGCTAACAGCGTCAATaCC	0.60		79.7
			Rp_Com****	GCTTCCTTGATCAACGGTCATAC	0.15		
GePest_12	2616266	C/G	Fp_Der	ccccgccccgccccgccccgCCCAAGCAGAGACACGATTATGtAG	0.15	60	83.5
			Fp_Anc	CCCAAGCAGAGACACGATTATGaac	0.15		77.8
			Rp_Com	GCCGCTGGCCAATGATGAT	0.15		

GePest_29	2714541	A/G	Fp_Der	ccccgccccgccccgccccgCAGAGGTTTGCTGTGATACAAC t AA	0.15	60	82.7
			Fp_Anc	CAGAGGTTTGCTGTGATACAAC g AG	0.60		78.2
			Rp_Com	CGCTTGCAACCTACGCCATT	0.15		
GePest_37	435572	A/C	Fp_Der	ccccgccccgccccgccccgCTGCGTTACAGACGCC c GA	0.15	60	84
			Fp_Anc	CTGCGTTACAGACGCC t GC	0.15		80
			Rp_Com	CCCAGAGTAAAGTATGTGGAGCCT	0.15		
GePest_52	52531	C/A	Fp_Der	ggggcggggcggggcggggcCACGAACATCGAGAATCTGATT a GG	0.15	60	81.3
			Fp_Anc	CACGAACATCGAGAATCTGATT t GT,	0.60		74
			Rp_Com	CGTTACGTGAGATCGAAGAAGGC	0.15		
GePest_67	1565773	T/G	Fp_Der	ggggcggggcggggcggggcACACTGATAATAAATCATCTGAAAC a cTT	0.15	60	76.8
			Fp_Anc	ACACTGATAATAAATCATCTGAAACA a tG	0.60		68.8
			Rp_Com	TGCTGTCAGTATAAGTATTTGCACTATT	0.15		
GePest_69	4634211	T/G	Fp_Der	ggggcggggcggggcggggcGGATAGCTTCATCCAGATCCA c CT	0.15	60	82.8
			Fp_Anc	GGATAGCTTCATCCAGATCCA a CC	0.60		76.1
			Rp_Com	GTGCAAATGCTACATGATGTCTTG	0.15		
GePest_70	3568511	T/G	Fp_Der	ggggcggggcggggcggggcAGGCAAACAAAAAAGAGCCAG a TA	0.15	60	80.5
			Fp_Anc	AGGCAAACAAAAAAGAGCCAG g TC	0.60		76.9
			Rp_Com	TGCCGGAAGAATTCGTTGTGTT	0.15		
GePest_75	1887115	T/G	Fp_Der	ggggcggggcggggcggggcGAGGGTATTAATTTGGATTTTATT c TT	0.15	60	80.7
			Fp_Anc	GAGGGTATTAATTTGGATTTTATT g TG	0.60		75.8
			Rp_Com	AATAACCGGTGTTAGTGCCTGG	0.15		
GePest_76	3568312	A/T	Fp_Der	ggggcggggcggggcggggcGTTGCGCAATTGCATCTGAT c TT	0.15	60	83
			Fp_Anc	GTTGCGCAATTGCATCTGAT t TA	0.60		74.7
			Rp_Com	GGAGTTGGGAACCCCTATTTTAC	0.15		
ბ. melt-MAMA canSNP პრაიმერები Medievalis შტამებისთვის							
7_YpGeo	1424616	T/G	Fp_Der	ggggcggggcggggcgTGGCATGTGCGTTGGTG t AT	0.15	60	82.1
			Fp_Anc	TGGCATGTGCGTTGGTG a AG	0.60		76.9
			Rp_Com	TGCAGGAAGCGCATATTAATGAG	0.15		
4_YpGeo	2098691	A/G	Fp_Der	ggggcggggcggggcgATGATTTTATTTCTGACAATATCA t GT	0.15	60	78.3
			Fp_Anc	ATGATTTTATTTCTGACAATATCA a GC	0.60		74.8
			Rp_Com	ACACTTCAATCACCGCCAG	0.15		
† - SNP პოზიცია CO92 გენომში; ‡ - პრაიმერების თანმიმდევრობებში GC სეგმენტი და „არასწორი“ ნუკლეოტიდები აღნიშნულია პატარა სიმბოლოებით. * Fp_Der - ფორვარდ პრაიმერი შეცვლილი SNP-ით (Derival) ** Fp_Anc- ფორვარდ პრაიმერი პირველადი SNP-ით (Ancestral) *** Rp_Com- საზიარო რევერს პრაიმერი							

მაღალი სიმჭიდროვის SNP მიკროარეზე ტიპირება

Y. pestis ის შტამების იერარქიული კლასტერიზაციისთვის შეირჩა 2,654 SNP ლოკუსი, რომლებზეც ყველა გამოკვლეული შტამი 100% სარწმუნო შედეგს იძლეოდა. 46 *Y. pestis* შტამის მაღალი სიმჭიდროვის მიკროარეზი ანალიზმა, ისევე როგორც canSNP ტიპირებამ გვიჩვენა, რომ კავკასიის რეგიონში გავრცელებულია *Y. pestis* ორი, განსხვავებული წარმოშობის პოპულაცია. აზერბაიჯანისა და ჩრდილოეთ კავკასიის იზოლატები ერთ კლასტერში მოხვდნენ (სურ. 34). ამავე კლასტერთან ძალიან ახლოს განთავსდა საქართველოდან გამოყოფილი bv. Medievalis შტამი (#771). ისევე როგორც melt-MAMA PCR SNP ტიპირების შემთხვევაში, ქართული subsp. *microtus* შტამები, ფილოგენეტიკურ ხეზე pestoides E და G ერთად დაჯგუფდნენ (სურ. 34). სომეხური შტამები, #1522 და #14735 ერთ ქვეჯგუფში განთავსდნენ pestoides F- თან ახლოს. ეს შედეგები მიუთითებს იმაზე, რომ კავკასიის რეგიონი, კერძოდ, საქართველოს შავი ჭირის მაღალმთიანი კერა და სომხეთი, სავარაუდოდ, subsp. *microtus* bv. Caucasica შტამების - pestoides E, G და F- ის წარმოშობის ადგილებია, რომლებიც *Y. pestis* უძველეს ფილოგენეტიკურ განშტოებას ქმნიან.

ქართულმა შტამებმა, შავი ჭირის მაღალმთიანი კერიდან, შედარებით მცირე ვარიაციულობა გამოავლინეს, რაც პოპულაციის უკიდურეს მონომორფულობაზე მიუთითებს. ძირითადი ვარიაციები იზოლატების ამ ჯგუფში, წარმოდგენილია ცხრილში (ცხრ. 15). ქართული შტამები მაღალმთიანი კერიდან ორ ჯგუფად დაიყვნენ (სურ. 32. A: #1390 - #3066, B: #3072 - #8787), რომელთაც მხოლოდ 11 SNP განასხვავებდათ. A ჯგუფში 32 შტამი (C: #1390- დან #3769- მდე) 2, 3 და 3 SNP ვარიაციით განსხვავდებოდა ჯგუფებისაგან - (#1412, PE, #8790), PG და G3066. C ჯგუფის შიგნით, შტამები ორ კლასტერში გადანაწილდნენ (D და E), რომელთაც მხოლოდ ერთი SNP განასხვავებდა. აღნიშნული SNP CO92 გენომის 2667041 პოზიციაზე მდებარეობს (ცხრ. 15) და YPO2374 გენის არასინონიმური SNP მუტაციაა (ჰისტიდინის- პროლინში). ეს გენი ანოტირებულია როგორც SlyA ტრანსკრიპციის რეგულატორი, რომელიც ჩართულია ვირულენტობისა და მაკროფაგებში პათოგენის გადარჩენის მექანიზმებში. კვლევებმა აჩვენა, რომ ეს გენი ექსპრესირდება მაკროფაგებში და განაპირობებს ოქსიდაციური სტრესისადმი რეზისტენტობას [134].



სურათი 34. *Y. pestis* სპეციფიკური 2694 SNP გენოტიპირების საფუძველზე აგებული დენდროგრამა. იერარქიული კლასტერიზაციისთვის გამოყენებულ იქნა სტატისტიკური პროგრამა R.

SNP-ებით სახეშეცვლილი გენები

SNP- ვარიაციები განხილულ იქნა რეფერენს შტამების გენომებთან მიმართებით. ქართული subsp. *microtus* bv. *Caucasica* შტამებში მუტაციების მცირე რაოდენობა იქნა აღმოჩენილი, რომელთა ნაწილი პლაზმიდებში გვხვდებოდა. SNP- ები, რომლებიც განასხვავებდნენ subsp. *microtus* bv. *Caucasica* შტამებს (ქართულ და სომხურ) bv. *Medievalis*-ის შტამებიგან (აღ. საქართველოს ვაკე-მთისწინა კერა, აზერბაიჯანი, დაღესტანი და ყაზარდო-ბალყარეთი) (A კატეგორიის) და SNP- ები, რომლებიც განასხვავებდნენ ქართულ და სომხურ subsp. *microtus* bv. *Caucasica* შტამებს (B კატეგორიის) შედარებულ იქნა CO92 და Pestoides F SNP- ებთან. A კატეგორიის SNP ძირითადად ასახავს განსხვავებას subsp. *microtus* bv. *Caucasica* და სხვა ბიოვარებს შორის. ქართული და სომხური bv. *Caucasica* შტამებმა უდიდესი მსგავსება გამოავლინა Pestoides F მიმართ (400 SNP -დან მხოლოდ 27 იყო

განსხვავებული). რაც შეეხება B კატეგორიის SNP-ებს, 44 SNP-დან 41 განსხვავდებოდა Pestoides F გენომისგან. 41 მუტაციიდან 30 არასინონიმური SNPs იყო. სახეცვლილი გენების დაახლოებით 36% ჩართულნი იყვნენ სატრანსპორტო ფუნქციებში, რომლებიც ძირითადად მიკროორგანიზმის გარემოსთან ურთიერთკავშირზე არიან პასუხისმგებლები.

ცხრილი 15. SNP ვარიაციები ქართულ Pestoides/microtus შტამებში

SNP ID	SNP ტიპი ¹	მდებარეობა CO92	გენი	აღწერილობა
--------	-----------------------	-----------------	------	------------

A კლასტერის B კლასტერთან შედარება:

v12925597	nc	1505789		
v12925598	ns	1535515	YPO1368	ატფ-დამოკიდებული Clp პროტეაზა
v12926213	ns	1512930	YPO1348	წამლების/მეტაბოლიტების ოჯახის ეფლუქსის/გამომტანი ტუმბო
v17849613	s	1637141	YPO1362	ჰიპოთეტური პროტეინი
v17849641	s	1493613	YPO1326	ჰიპოთეტური პროტეინი
v17850192	ns	1532894	YPO1365	მიკროლიდების გადამტანი ატფ-დამაკავშირებელი პერმიაზა
v17850291	ns	1494832	YPO1328	ჰიპოთეტური პროტეინი
v17850298	nc	1521615		
v17850428	ns	1512672	YPO1348	წამლების/მეტაბოლიტების ოჯახის ეფლუქსის/გამომტანი ტუმბო
v17850892	nc	1534741		
v17851343	nc	1498571	YPO1332	პუტრესცინის ABS გადამტანი/ტრანსპორტერის ატფ დამაკავშირებელი სუბერთეული

C კლასტერის შედარება G1412, PE და G8790 შტამებთან:

v17852244	ns	89402/pMT	YPMT1.87	პორფირინ ბიოსინთეზის პროტეინი
v17852524	nc	77771/pMT		
C კლასტერის შედარება PG-თან				
v17849513	ns	1178942	YPO1038	სატრანსპორტო რნმ - ფსევდოურიდინ სინთეტაზა
v17850767	nc	2677/pCD		
v17852130	ns	435572	YPO0416	

C კლასტერის შედარება G3066-თან:

v17851076	ns	2392433	YPO2123	ფაგის პატარა კუდის პროტეინი
v17854855	s	2383628	YPO2113	ჰიპოთეტური პროტეინი
v17858165	s	2393962	YPO2125	ფაგური რეგულატორული პროტეინი

D კლასტერის შედარება E კლასტერთან:

v9823190	ns	2667041	YPO2374	ტრანსკრიპციის რეგულატორი SlyA
----------	----	---------	---------	-------------------------------

¹SNP ტიპები: -nc-არაკოდირებადი უბნები, ns-არასინონიმური; s- სინონიმური

კვლევის შედეგად ასევე მრავალი can-SNP კანდიდატი გამოვლინდა, რომლებიც შესაძლოა გამოყენებულ იქნას ზედამხედველობის პროგრამაში, ახალი ტესტ-სისტემების შესამუშავებლად (ცხრ. 16).

ცხრილი 16. ახალი ტესტებისთვის კანდიდატი SNP-ები

SNP	SNP_პოზიცია	გენომი	გენი	s/ ns	ამინომჟავის ცვლილება	ფუნქცია
v17849443	37356	CO92chr	YPO0027	ns	R/A	ფოსფატაზა
v17848723	143347	CO92chr	YPO0132	ns	A/S	რკინის სატრანსპორტო ცილაB
v17850226	167652	CO92chr	YPO0153	ns	S/P	ჰიპოთეტური პროტეინი
v17851213	433408	CO92chr	YPO0415	ns	P/S	თვითმანდუცირებელი-2 (AI-2) კინაზა
v17850192	1532894	CO92chr	YPO1365	ns	A/V	მიკროლიდების სატრანსპორტო ატფ-დამაკავშირებელი /პერმიაზა
v17849852	1881976	CO92chr	YPO1654	ns	D/E	ბეტა-D-გალაქტოზიდაზა
v17849579	2059194	CO92chr	YPO1812	ns	F/L	შაქრების სატრანსპორტო სისტემის პერმიაზა
v17850394	2274399	CO92chr	YPO2001	ns	E/K	ტრანსკრიპციის აქტივატორი
v17849590	2461873	CO92chr	YPO2185	ns	R/Q	ოლიგოპეპტიდების ტრანსპორტერი ატფ დამაკავშირებელი ცომპონენტი
v17850550	2616266	CO92chr	YPO2325	ns	Q/H	მანიტოლ დეჰიდროგენაზა
v17850943	3327953	CO92chr	YPO2980	ns	N/D	იონური არხის პროტეინი
v17849739	3422552	CO92chr	YPO3066	ns	R/W	ჰიპოთეტური პროტეინი
v17851301	4044971	CO92chr	YPO3627	ns	R/S	ალიფატური სულფონატების ტრანსპორტის ატფ დამაკავშირებელი სუბერთეული
v17849732	4431179	CO92chr	YPO3942	ns	G/C	გლიკოგენის განმტოტავი ფერმენტი

სრული გენომის სექვენირება

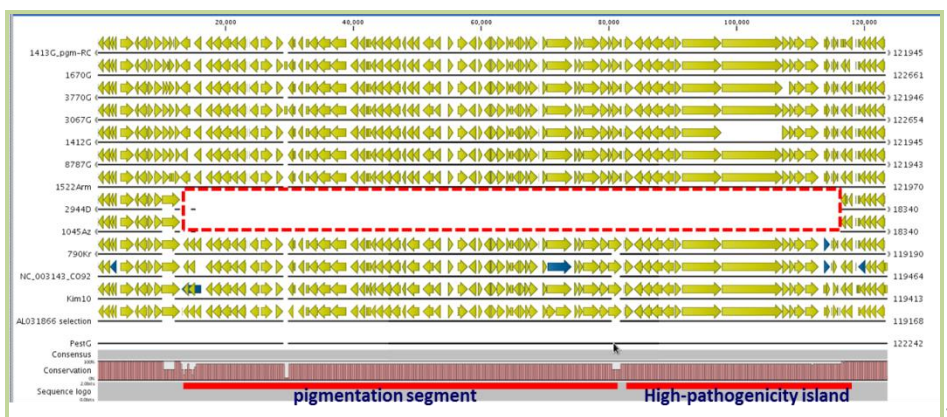
სრული გენომის სექვენირებამ *Y. pestis* იზოლატების კიდევ უფრო ღრმა დახასიათების საშუალება მოგვცა; შესწავლილ იქნა სხვადასხვა ვირულენტობის განმპირობებელი უბნები/გენები, როგორც არის 102Kb არასტაბილური *pgm* ლოკუსი, მრავალფუნქციური ვირულენტობის ფაქტორი, პროტექციული ანტიგენი - *LcrV* (V ანტიგენი), ჩატარდა სპეისერების შიდასახეობრივ პოლიმორფიზმზე დაფუძნებული CRISPR ტიპირება.

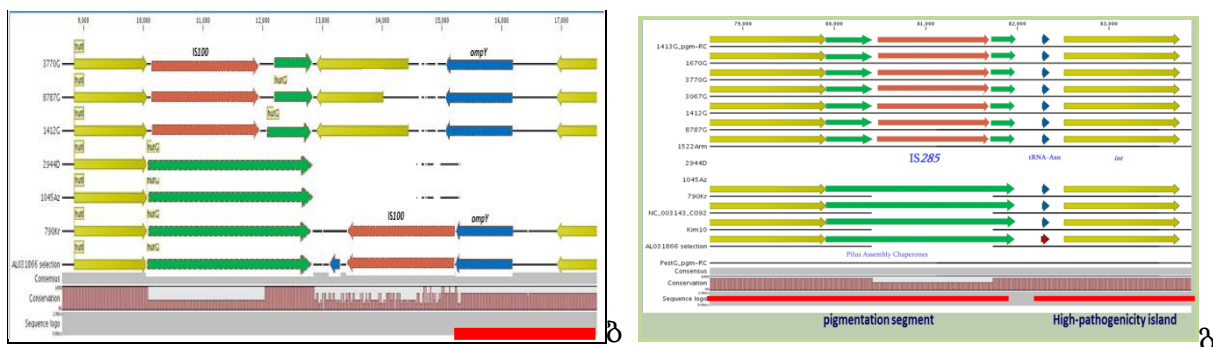
pgm

სრული გენომის სექვენირების საფუძველზე მოხდა 102Kb არასტაბილური *pgm* ლოკუსის და მისი მოსაზღვრე უბნების სტრუქტურის შესწავლა. დკსჯეც კოლექციიდან სექვენირებული 11 *Y. pestis* შტამის და რეფერენს შტამების (CO92, Kim10, PestoidesG) თანმიმდევრობების შედარება მოხდა პროგრამა CLC bio-ს მეშვეობით.

კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ აზერბაიჯანიდან და ჩრილოეთ კავკასიიდან გამოყოფილ bv. Medievalis შტამებს დელეციის შედეგად მთლიანად დაკარგული აქვთ *pgm* უბანი. ეს დელეცია, სავარაუდოდ, გამოწვეულია *pgm* უბნის მოსაზღვრე ორ IS100 ელემენტს შორის ჰომოლოგიური რეკომბინაციით (სურ. 35ა). მსგავსი დელეცია (*pgm*-), რაც იწვევს *Y. pestis* შტამებში ვირულებობის სრულ დაკარგვას, *Y. pestis* ეპიდემიურ შტამებში საკმაოდ მაღალი სიხშირით (10^{-5}) არის გამოვლენილი [77].

გარე მემბრანული ცილა - პორინის გენი (*ompY*), რომელიც ესაზღვრება *pgm* უბანს, IS100 ელემენტის ინსერციის შედეგად დაზიანებულია ყირგიზულ შტამში (#790 - bv. Antiqua). ანალოგიური ინსერცია ასევე გვხვდება *Y. pestis* მრავალ სხვა მაღალვირულენტურ შტამში (სურ. 35ბ). *ompY* ინტაქტურია ქართულ და სომხურ Pestoides შტამებში, ისევე როგორც *Y. pestis* Angola, Pestoides F, microtus 91001 და ზოგიერთ *Y. pseudotuberculosis* შტამებში. *ompY* - პორინის მეზობლად *hutG* (formylglutamate deformylase) გენში აღმოჩენილია IS100 ელემენტი, რომელსაც საწინააღმდეგო ორიენტაცია გააჩნია, რის გამოც მოცემულ შტამებში ლოკუსის დელეცია არ ხდება.





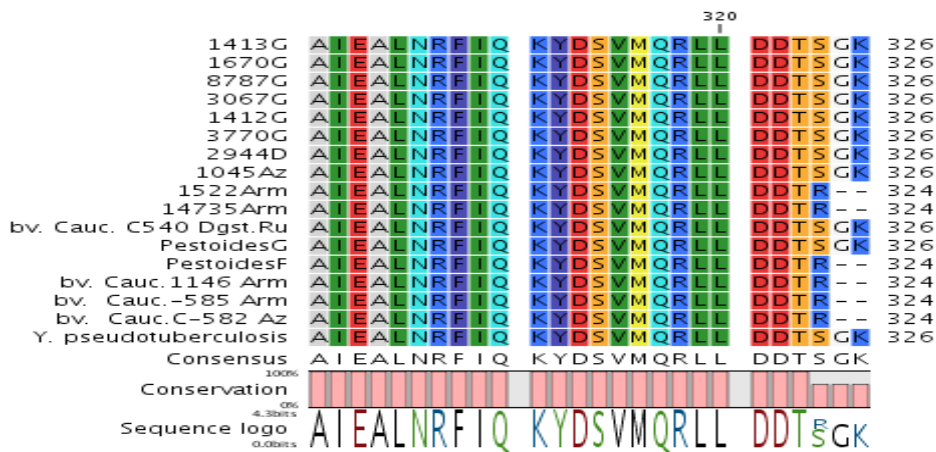
სურათი 35. *pgm*-ლოკუსის და მისი მოსაზღვრე უბნების შედარება.

ა. *pgm* უბნის დელეცია *bv. Medievalis* შტამებში. ბ. ინვერტირებული *IS100* ელემენტი *pgm*-უბნის მოსაზღვრე *hutG* გენში. გ. *IS285* ელემენტით დაზიანებული HPI მოსაზღვრე პილესის/წამწამების აწყობის ჩაპერონი (*Yp40*).

ასევე აღმოჩნდა, რომ ქართულ და სომხურ *subs. microtus* შტამებში პიგმენტაციური სეგმენტის (*pgm*) მაღალპათოგენური კუნძულის საზღვართან (HPI) *Yp40* პილესის/წამწამების აწყობის ჩაპერონი დარღვეულია *IS285* ელემენტის ასლით (სურ. 35გ).

LcrV

Y. pestis 11 სექვენირებული შტამის და რეფერენს შტამებითან შედარებამ *LcrV* გენის ამინომჟავური თანმიმდევრობაში ვარიაციები გამოავლინა. თერთმეტიდან ცხრა შტამის ამინომჟავური თანმიმდევრობა *LcrV* ყველაზე გავრცელებული, 326 ამინომჟავისგან შემდგარი სექვენსის ტიპის იდენტური აღმოჩნდა (CO92, KIM, and Pestoides G). *Y. pestis* ორ სომხურ შტამში *LcrV* გენის 3' ბოლოსთან 16bp დელეცია იქნა აღმოჩენილი (2 x ATGACACG), რამაც ცილის სექვენსის C-ბოლოსთან სამი ამინომჟავის (Ser324Gly325Lys326) ერთით შეცვლა (Arg324) გამოიწვია. *LcrV* მსგავსი ამინომჟავური შემადგენლობა ჰქონდა PestoidesF, *microtus* 91001 შტამებში (სურ. 36).

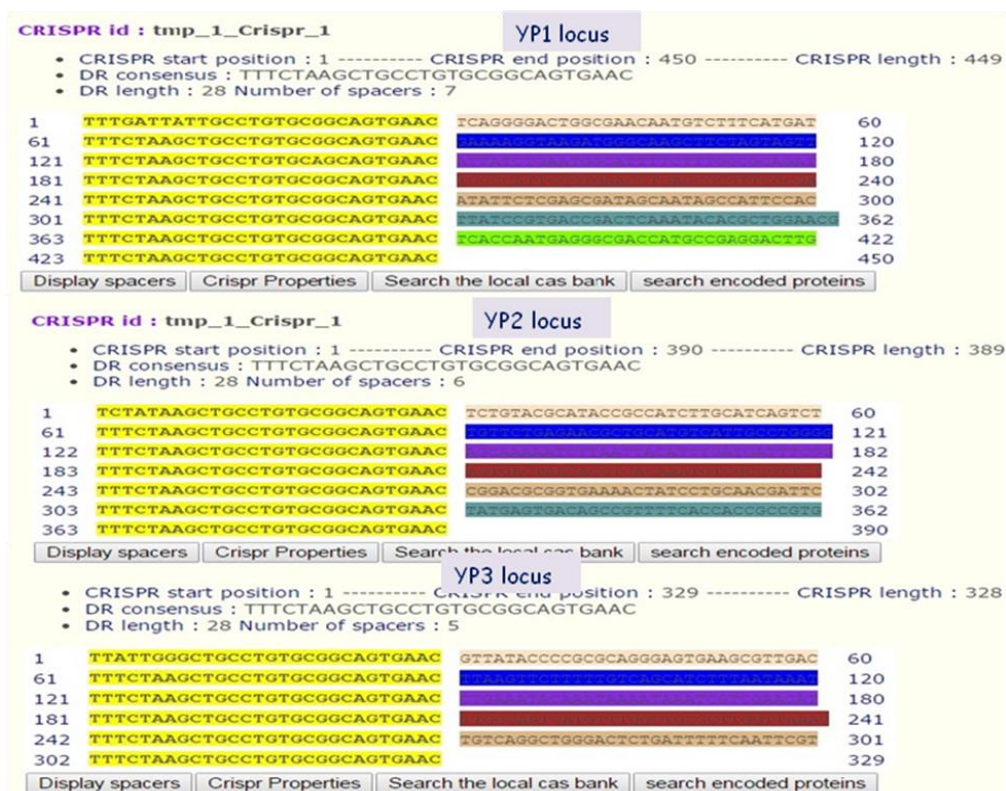


სურათი 36. *IcrV* ამინომჟავური თანამიმდევრობების შედარება (ფრაგმენტი).

CRISPR ტიპირება

კვლევის ფარგლებში მოხდა *Y. pestis* 17 სექვენირებული შტამის CRISPR ტიპირებაზე დაფუძნებული ანალიზი. CRISPR ლოკუსში სპეისერების და DR თანამიმდევრობების იდენტიფიცირებისთვის და ანალიზისთვის CRISPRs მონაცემთა ბაზის პროგრამის “CRISPR Finder” და “spacers dictionary” ფუნქციები იქნა გამოყენებული (<http://crispr.u-psud.fr/>). გამოვლენილი სპეისერები შედარდა გენომურ ბანკში არსებულ მონაცემებთან. თითოეული CRISPR ლოკუსისთვის იდენტიფიცირებულ იქნა ლიდერული თანამიმდევრობები, რომლის სექვენსების ერთმანეთთან შედარება MAFFT პროგრამის გამოყენებით მოხდა. ასევე განისაზღვრა CRISPR-Cas სისტემის ორგანიზების ტიპი. *Y. pestis* იზოლატების განთავსდა CRISPR დაფუძნებულ ევოლუციურ მოდელში [107].

კვლევის შედეგად ყველა გამოკვლეულ შტამში ნაპოვნი იქნა სამი CRISPR ლოკუსი. ყველა ალელს ერთნაირი წყობა ჰქონდათ, 28bp DR - პირდაპირი განმეორებები, რომლებიც სპეისერებით (31-34 bp) იყვნენ გამოცალკევებული (სურ. 37). სულ 22 სპეისერი იქნა აღმოჩენილი: YP1 ლოკუსში ცხრა, YP2 რვა, ხოლო YP3 ხუთი სპეისერი (სურ. 38).



სურათი 37. *Y. pestis* სამი CRISPR ლოკუსის (YP1, YP2, YP3) წყობა. პირდაპირი განმეორებები (DR) ყვითლად არის შეფერილი, ხოლო სპეისერები განსხვავებულ ფერებად.

სპეისერების პოლიმორფიზმის საფუძველზე სექვენირებულ 17 *Y. pestis* შტამში ოთხი განსხვავებული ჯგუფი გამოვლინდა. მაღალმითანი კერიდან იზოლირებულმა *Y. pestis* შტამების YP1 ლოკუსი შვიდი (a1b1c1d1e1m1n1), YP2-ის ექვსი (a2j2b2k2l2m2) და YP3 ხუთი (a3b3c3d3e3) სპეისერების მოტივისგან შედგებოდა. იდენტური სპეისერები აღმოჩენილია PestoidesG შტამში (G-1) (სურ. 38). ქართულ bv. Caucasica შტამებისგან მხოლოდ ერთი სპეისერით ნაკლები (n1) აღმოაჩნდათ სომხურ შტამებს და PestoidesF. j2 და k2 სპეისერები მხოლოდ bv. Caucasica შტამებში იქნა აღმოჩენილი. ქართული, აზერბაიჯანული და ჩრდილოეთ კავკასიური bv. Medievalis შტამების KIM10 შტამის (G - 59) იდენტური სპეისერების მოტივი აღმოჩნდათ (YP1 – a1b1c1, YP2-a2b2c2d2 და YP3 a3b3c3). ყირგიზული შტამის (#790) CRISPR YP1, YP2 და YP3 ლოკუსებში შვიდი, ოთხი და სამი სპეისერი იქნა აღმოჩენილი შესაბამისად. n1, a2, l2, m2, d3, e3 სპეისერების ჰომოლოგები გენომის სხვა უბნებშიც იქნა ნაპოვნი. სპეისერების თანმიმდევრობების მიხედვით გამოკვლეული *Y. pestis* იზოლატები განთავსდა CRISPR დაფუძნებულ ევოლუციურ მოდელში [107].

Y. pestis ყველა გამოკვლეულ შტამში სამივე CRISPR ლოკუსისთვის გამოვლენდა კონსერვატული ლიდერული თანმიმდევრობა (leader sequences) და AT-მდიდარი უბანი (სურ. 39). ყველა სექვენირებულ შტამს CRISPR-Cas სისტემის ორგანიზების I-F ტიპი აღმოაჩნდა (სურ. 41).

strain_spacer	a1	b1	c1	d1	e1	f1	g1	h1	i1	j1	k1	l1	m1	n1
YP01_1045Az														
YP01_1412G														
YP01_1413G														
YP01_14735Arm														
YP01_1522Arm														
YP01_2944_D														
YP01_3067G														
YP01_3072G														
YP01_3770G														
YP01_771G														
YP01_790K														
YP01_8787G														
YP1_3066G														
Ype_Antiqua														
Ype_CO92														
Ype_KIM(Rav-Comp)														
Ype_Microtus91001														
Ype_PestG														

strain_spacer	a2	b2	c2	d2	e2	i2	g2	h2	i2	j2	k2	l2	m2	n2
CO92(Rav-Comp)														
NC_008150_Antiqua-PestG														
YP02_1045Az														
YP02_1412G														
YP02_1413G														
YP02_14735Arm														
YP02_1522Arm														
YP02_1670G														
YP02_2944_D														
YP02_3066G														
YP02_3067G														
YP02_3072G														
YP02_3770G														
YP02_771G														
YP02_790K														
YP02_8787G														
YPestF-														
Yp_KIM10(Rav-Comp)														
Yp_Microtus_91001-														

strain_spacer	a3	b3	c3	d3	e3	i3
YP03_1045Az						
YP03_1412G						
YP03_1413G						
YP03_14735Arm						
YP03_1522Arm						
YP03_2944_D						
YP03_3066G						
YP03_3067G						
YP03_3072G						
YP03_3770G						
YP03_771G						
YP03_790K						
YP03_8787G						
Ype_Antiqua(Rav-Comp)						
Ype_CO92(Rav-Comp)						
Ype_KIM						
Ype_Microtus91001(Rav-Comp)						
Ype_PestF(Rav-Comp)						
Ype_PestG(Rav-Comp)						

სურათი 38. *Y. pestis* შტამების სამი CRISPR ლოკუსის (YP1, YP2, YP3) სპეისერები.

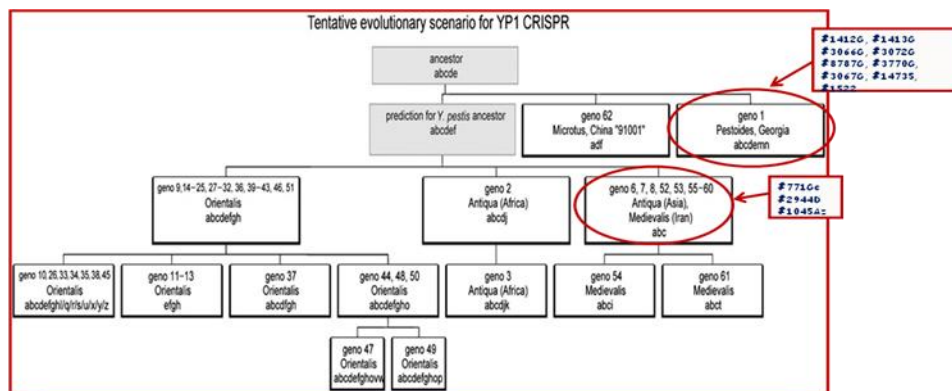
```

CLUSTAL format alignment by MAFFT FFT-NS-i (v7.397)

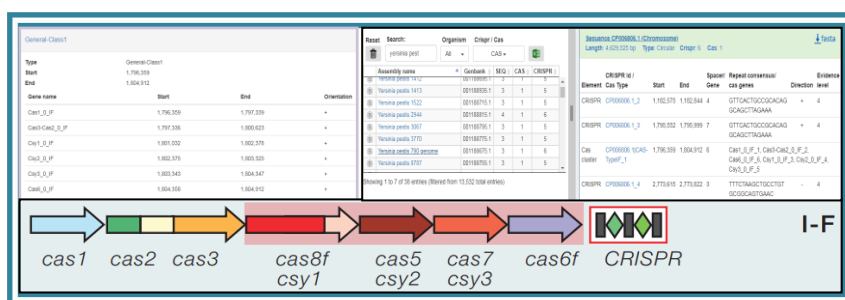
CO92      AGTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
3066_Yp1  AGTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
3072_Yp1  AGTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
771_Yp1   AGTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
1413_Yp1  AGTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
8787_Yp1  AGTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
1522_Yp2  AGTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
1045_Yp2  AGTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
790_Yp1   -GTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
3066_Yp2  -GTAAGATAATAC-GATAACATCCTGTTTGAAAAAATCTATTTTCGCTAATGGGGAAAAA ACCCTTTTTTTTAA--GACCACCGATAACCAATGTAAAAATCAA'
3072_Yp2  AGTAAGATAATACGGGTAAACAGACTGTTTGAAAAAATCTTTTCGCCAAAGGGTAAAAA ATGATTTTTTTT--AAACCTCGGTAAAGCAGGATATAAAATCAA'
1413_Yp2  AGTAAGATAATACGGGTAAACAGACTGTTTGAAAAAATCTTTTCGCCAAAGGGTAAAAA ATGATTTTTTTT--AAACCTCGGTAAAGCAGGATATAAAATCAA'
8787_Yp2  AGTAAGATAATACGGGTAAACAGACTGTTTGAAAAAATCTTTTCGCCAAAGGGTAAAAA ATGATTTTTTTT--AAACCTCGGTAAAGCAGGATATAAAATCAA'
1522_Yp1  AGTAAGATAATACGGGTAAACAGACTGTTTGAAAAAATCTTTTCGCCAAAGGGTAAAAA ATGATTTTTTTT--AAACCTCGGTAAAGCAGGATATAAAATCAA'
771_Yp2   AGTAAGATAATACGGGTAAACAGACTGTTTGAAAAAATCTTTTCGCCAAAGGGTAAAAA ATGATTTTTTTT--AAACCTCGGTAAAGCAGGATATAAAATCAA'
2944_Yp2  AGTAAGATAATACGGGTAAACAGACTGTTTGAAAAAATCTTTTCGCCAAAGGGTAAAAA ATGATTTTTTTT--AAACCTCGGTAAAGCAGGATATAAAATCAA'
1045_Yp1  AGTAAGATAATACGGGTAAACAGACTGTTTGAAAAAATCTTTTCGCCAAAGGGTAAAAA ATGATTTTTTTT--AAACCTCGGTAAAGCAGGATATAAAATCAA'
790_Yp2   -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'
3066_Yp3  -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'
3072_Yp3  -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'
771_Yp3   -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'
2944_Yp3  -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'
1413_Yp3  -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'
8787_Yp3  -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'
1522_Yp3  -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'
1045_Yp3  -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'
790_Yp3   -GTAAGATAATACGGGTAAACCGATGTTTATCAATGAGCAATGGCGCAAAATGCGTAAAAA ACCCTTTTTTTTACGTAAATACC--TGAGTAGCATA-AAAAATCAA'

```

სურათი 39. *Y. pestis* სამი CRISPR ლოკუსის ლიდერული თანმიმდევრობის (leader sequences) შედარება MAFFT პროგრამის გამოყენებით. და AT- მდიდარი უბანი გამოყოფილია წითელი ჩარჩოთი.



სურათი 40. *Y. pestis* იზოლატების განთავსება CRISPR დაფუძნებულ ევოლუციურ მოდელში [107].



სრული გენომის სექვენირებაზე დაფუძნებული ფილოგენეტიკური ანალიზი

კავკასიის სხვადასხვა კერიდან იზოლირებულ შტამებს შორის ევოლუციური/ფილოგენეტიკური კავშირის დადგენის მიზნით, სრული გენომის სექვენსების საფუძველზე აიგო ფილოგენეტიკური ხე, რომელშიც დესჯეც-ის კოლექციიდან 17 სექვენირებულ შტანთან და რეფერენს შტამებთან ერთად, ასევე ჩართული იყო აღმოსავლეთ კავკასიის მთის კერიდან (დაღესტანი) ბოლო დროს გამოქვეყნებული/სექვენირებული რვა შტამი [82].

სრული გენომის სექვენსის საფუძველზე ხის აგება ფილოგენეტიკური და მოლეკულური ევოლუციის ანალიტიკური პროგრამის PhaME (phylogenetic and molecular evolutionary; <https://github.com/LANL-Bioinformatics/PhaME>) საშუალებით მოხდა. ფილოგენეტიკური ხის ძირეულ შტამად (ფესვი) შეირჩა *Y. pseudotuberculosis* IP32953 „წინაპარი“ შტამი.



სურათი 42. *Y. pestis* სრული გენომის სექვენირების საფუძველზე აგებული ფილოგენეტიკური ხე.

სრული გენომის სექვენსების საფუძველზე აგებულ ფილოგენეტიკურ ხეზე სხვადასხვა კერებიდან გამოყოფილი შტამები განსხვავებულ კლასტერებში აღმოჩნდნენ (სურ. 42).

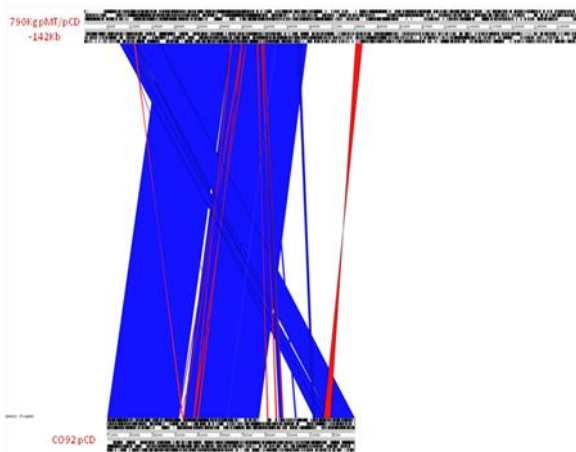
კავკასიური subsp. *microtus* bv. *Caucasica* იზოლატები ორ დამოუკიდებელ ქვეჯგუფში გადანაწილდნენ. პირველი ქვეჯგუფი, რომელშიც დაღესტნიდან იზოლირებული შტამები მოხვდნენ ძლიერი ჰეტეროგენულობით გამოირჩეოდა. ქართული და სომხური bv. *Caucasica* შტამები მოხვდნენ მეორე ქვეჯგუფის სხვადასხვა განშტოებაზე. ისევე როგორც სხვა მეთოდების გამოყენებით (SNP, CRISPR) ქართული შტამები *PestoidesG* ერთად დაჯგუფდნენ, სომხურ შტამები კი *PestoidesF*-თან ახლოს. bv. *Medievalis* ქართული, აზერბაიჯანული და ჩრდილოეთკავკასიური იზოლატები ხეზე ერთმანეთის გვერდზე განთავსდნენ, რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებს მათ ახლონათესაურ კავშირს.

პლაზმიდები

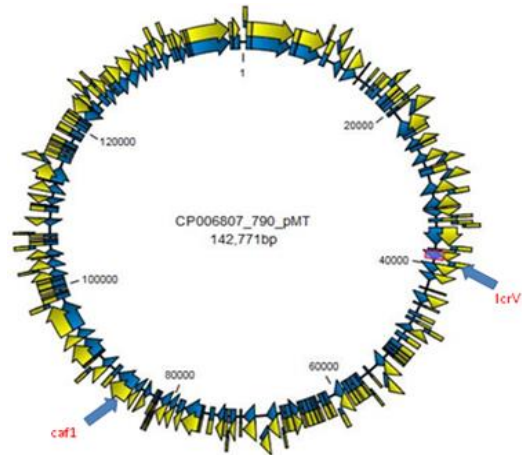
სრული გენომის სექვენირების ანალიზით დადასტურდა მანამდე პჯრ მიღებულ შედეგები, რომ ქართულ და სომხურ subs. *microtus* შტამებს არ აქვთ pPCP პლაზმიდა (ცხრ. 17). ასევე გამოვლინდა რომ ამ შტამების pMT პლაზმიდა *Y. pestis* კლასიკური ბიოვარებისაგან განსხვავებით (96-100 kb) მნიშვნელოვნად უფრო დიდი ზომისაა (137-140 Kb). მსგავსი დიდი ზომის pMT პლაზმიდა აღწერილია *pestoidesF* შტამში.

ყირგიზულ შტამს (#790), რომელიც პჯრ-ის შედეგებით დადებითი იყო სამივე ვირულენტური პლაზმიდის გენზე, მხოლოდ ორი პლაზმიდა აღმოაჩნდა 9,6Kb pPCP და უჩვეულოდ დიდი ზომის -142Kb პლაზმიდა. #790 შტამის PacBio სექვენირების პირველადი მონაცემების CO92-ის პლაზმიდების სექვენსთან შედარებამ, ACT (Artemis Comparison Tool) პროგრამის საშუალებით, ნათლად გამოავლინა, რომ 142Kb პლაზმიდა pCD1 და pMT1 გაერთიანებით მიღებულ ქიმურულ პლაზმიდას წარმოადგენს, სადაც pCD1 ნაწილი ინტეგრირებულია pMT1 პლაზმიდაში (სურ. 43). პროგრამა CLC bio-ს მეშვეობით 142Kb პლაზმიდაში აღმოჩნდა როგორც pCD1

პლაზმიდის სპეციფიკური *lcrV*, ასევე pMT1 სპეციფიკური *cafI* გენები. მსგავსი ქიმერა ლიტერატურაში აღწერილი არ არის, შესაბამისად ინტერესს იწვევს ამ პლაზმიდის უფრო სიღრმისეული შესწავლა და მისი როლი მიკროორგანიზმის პათოგენეზის პროცესში, რაც მომავალი კვლევების საგანს წარმოადგენს.



ა



ბ

სურათი 43. #790 შტამის ქიმერული პლაზმიდის (pMT/pCD) გრაფიკული შედარება. ა. #790 შტამის ქიმერული პლაზმიდას (pMT/pCD) გრაფიკული შედარება CO92 pCD პლაზმიდასთან ACT პროგრამის გამოყენებით. ბ. *lcrV* და *cafI* გენების მდებარეობა #790 შტამის ქიმერული პლაზმიდაში (pMT/pCD).

ცხრილში მოყვანილია სექვენირებული გენომების ძირითადი მახასიათებლები. თერთმეტიდან ცხრა გენომი დახურულია. ორი გენომის #1670 და #14735 შესაბამისად 7 და 29 ფრაგმენტად აეწყო (სკაფოლდი). გენომების ზომა საშუალოდ 4,67-4,78Mb შეადგენდა. *bv. caucasica* ექვსი შტამის ქრომოსომის ზომა 4,52-4,53Mb იყო, ხოლო ერთი შტამის #8787 ქრომოსომა დაახლოებით 60Kb-ით მოკლე აღმოჩნდა (4,46Mb).

სექვენირების შედეგად შტამებს შორის განსხვავებები გამოვლინდა IS ელემენტების რაოდენობებში ქრომოსომასა და პლაზმიდებში, ასევე ანოტირებული გენების (ცილის მაკოდირებელი, უცნობი ფუნქციის გენები, რიბოსომული და რნმ გენების) რაოდენობებში. ამ მოცულობის მასალა გაცილებით დეტალურ შესწავლას საჭიროებს, რაც პათოგენის გენომის კიდევ უფრო სიღრმისეული დახასიათების საშუალებას მოგვცემს.

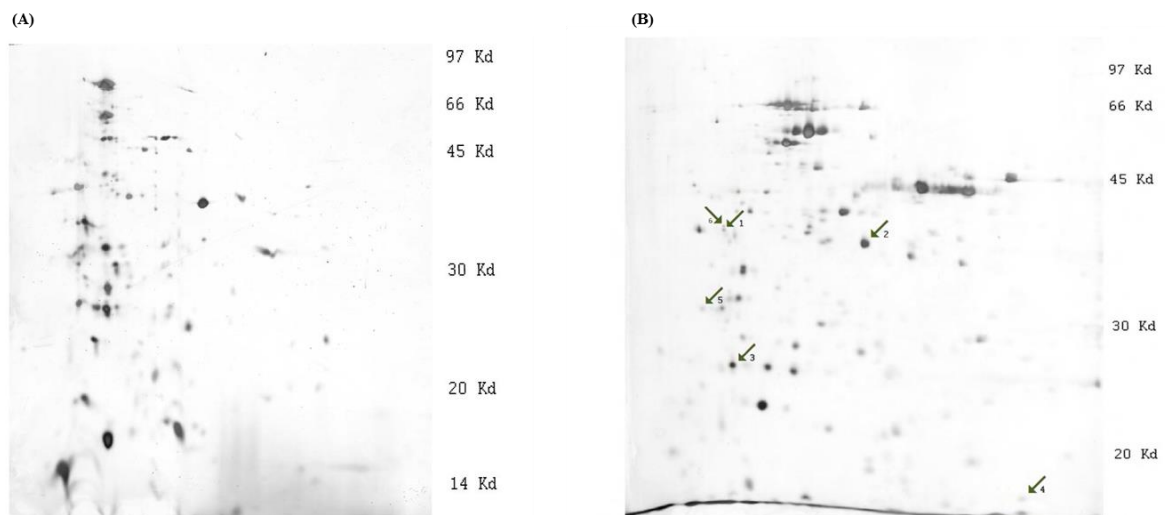
ცხრილი 17. *Y. pestis* 11 სექვენირებული შტამის გენომის ძირითადი მახასიათებლები.

	#790	#2944	#1045	#1522	#14735	#1412	#1670G	#1413G	#3770G	#3067G	#8787G
გენომის ზომა	4,785,488	4,672,740	4,684,080	4,738,644	4,693,748	4,733,482	4,718,815	4,736,923	4,735,667	4,736,090	4,675,987
დნმ აწყობილი ფრაგმენტები (სკაფოლდი)	3	4	4	3	29	3	7	3	3	3	3
ქრომოსომა(Mb)	4,62	4,49	4,50	4,53		4,52		4,52	4,52	4,52	4,46
pMT1 (Kb)	142	101	101	137		137		137	140	137	137
pCD1 (Kb)		70	70	71		71		71	71	71	71
pCP1 (Kb)	9,6	9,6	9,6	-		-		-	-	-	-
DNA G+C %	47.62%	47.59%	47.60%	47.71%	47.68%	47.71%	47.69%	47.72%	47.72%	47.71%	47.64%
გენების რაოდენობა (სულ)	4,550	4,476	4,489	4,526	4,504	4,520	4,519	4,521	4,519	4,527	4,463
ფსევდო გენები	132	172	195	173	208	168	181	181	179	165	191
ცილის მაკოდირებული გენები	4,448	4,379	4,388	4,425	4,417	4,417	4,422	4,419	4,419	4,427	4,361
რნმ გენები	102	97	101	101	87	103	97	102	100	100	102
რ-რნმ გენები	22	19	22	22	13	22	20	22	22	22	22
5S რ-რნმ	8	7	8	8	6	8	7	8	8	8	8
16S რ-რნმ	7	6	7	7	4	7	7	7	7	7	7
23S რ-რნმ	7	6	7	7	3	7	6	7	7	7	7
სატრანსპორტო რნმ გენები	70	68	69	69	63	70	66	69	68	68	70
IS100	ქრომოს.	31	34	34	25		25		25	24	25
	pMT	2	2	2	1		1		1	1	1
	pCD		1	1	1		1		1	1	1
	pPCP	1	1	1							
IS285	ქრომოს.	23	18	18	19		20		20	18	19
	pMT		1	1	2		2		2	2	2
	pCD				1		1		1	1	1
IS1541	ქრომოს.	60	51	51	55		52		51	52	58
	pMT	1	1	2	2		2		2	2	3
IS1661	ქრომოს.	8	7	7	7		7		7	7	7

პროტეომიკული კვლევები

2-განზომილებიანი ელექტროფორეზი

Y. pestis ცილოვანი ექსტრაქტების 2-განზომილებიანი ელექტროფორეზი ტარდებოდა ორი ტიპის იზოელექტრული ფოკუსირების სტრიპებზე: 1. pH გრადიენტით: 3.0–10.0 და 2. pH გრადიენტით: 3.0–5.6 (იხ. სურ. 44A, B). როგორც მოყვანილი სურათებიდან ჩანს ცილათა უმრავლესობა თავმოყრილია pH-საზღვრებში 3.0–6.0 (სურ. 44A). ამის გამო ცილების უკეთესი დაყოფისთვის ექსპერიმენტები გაგრძელდა იზოელექტრული ფოკუსირების სტრიპებზე pH გრადიენტით: 3.0–5.6 (იხ. სურ. 44B). სხვადასხვა შტამების 2-განზომილებიანი ელექტროფორეზის სურათების შედარებამ აჩვენა ის ცილოვანი ლაქები, რომლებიც განმეორებითად განსხვავებულები არიან შტამებს შორის. ყველაზე უფრო სარწმუნო განსხვავებები შეიმჩნეოდა 28°C-ზე გაზრდილ შტამებს შორის. შტამები ორ ჯგუფად დაიყო განსხვავებების მიხედვით: (1) #1853 და #1390 და (2) #2944 და #8787. ზოგიერთი დიფერციულად ექსპრესირებული შტამები უფრო მაღალი ინტენსივობით პირველ ჯგუფში იყო წარმოდგენილი. ამ ლაქების ცილოვანი კომპონენტების იდენტიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ მს ანალიზი (ცხრ. 18).



სურათი 44. *Y. pestis* (შტამი #1853, მდგომარეობა 28°C) ცილოვანი ექსტრაქტის ვერცხლით შეღებილი 2-განზომილებიანი სურათი (A) 2-განზომილებიანი ელექტროფორეზი სტრიპებზე pH-ის ხაზობრივი გრადიენტით 3.0–10.0 (B) 2-

განზომილებიანი ელექტროფორეზი სტრიპებზე pH-ის ხაზობრივი გრადიენტით 3.0–5.6. დანომრილი ისრები მიუთითებს გასხვავებულად ექსპრესირებული ცილების პოზიციებზე: 1, გარეთა მემბრანული ცილა C, პორინი; 2, გარეთა მემბრანული ცილა C2 პორინი; 3, ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილა; 4, დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS; და 5, F1 კაპსულარული ანტიგენი

ცხრილი 18. 2-განზომილებიანი ელექტროფორეზით და მს-ით იდენტიფიცირებული განსხვავებულად ექსპრესირებული ცილები შტამის და ფიზიოლოგიური მდგომარეობის მიხედვით

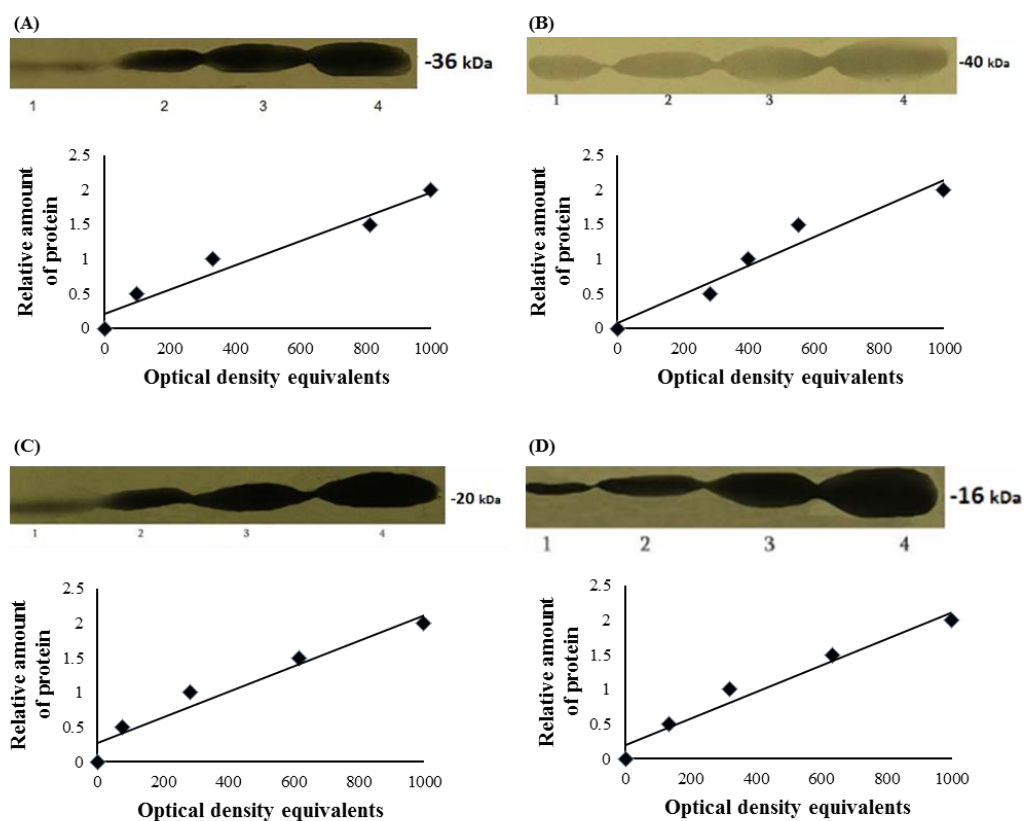
ცილოვანი მოლეკულა	ფიზიოლოგიური მდგომარეობა/შტამი
გარეთა მემბრანული ცილა C, პორინი	28°C, 1853 და 1390 > 2944, 8787
ტელურიუმ რეზისტენტული ცილა	28°C, 1853 და 1390 > 2944, 8787
დნმ-დამაკავშირებელის ცილა H-NS	28°C, 1853 და 1390 > 2944, 8787
F1 ანტიგენი	37°C, 37°C +Ca ²⁺ და 28°C, 1853 and 1390 > 2944, 8787
გარეთა მემბრანული ცილა-C2 პორინი	28°C, 1853 და 1390 > 2944, 8787

ამ ცილებს შორის ექსპრესიის შემდეგი ვალიდაციისათვის გამოყენებულ იქნა რაოდენობრივი ვესტერნ ბლოტინგი. იდენტიფიცირებული ხუთი ცილიდან ჩვენ შევისწავლეთ ოთხი მათგანის ცვლილება. სელექცია შემდეგი ორი პრინციპის მიხედვით განხორციელდა: კომერციული ანტისხეულების არსებობა; ანტისხეულების გამომუშავების ჩვენი შესაძლებლობებით და ზრდის სხვადასხვა პირობებში მათი დიფერენციული ექსპრესიის პროფილით. კანდიდატი ცილებიდან შეირჩა F1 ანტიგენი, ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილა, გარეთა მემბრანული ცილა C, პორინი და დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS.

იმუნოშეღებვა

სტანდარტების (15, 30, 45 და 60 მკგ) მომზადება მეთოდების თავში არის აღწერილი. ამ სტანდარტებისათვის საკვლევი ცილებისთვის (F1 ანტიგენი, გარეთა

მემბრანული ცილა C, პორინი, ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილა და დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS) ოპტიკური სიმკვრივე ხაზობრივ დამოკიდებულებაში იყო ცილის რაოდენასთან (სურ. 45).



სურათი 45. ვესტერნ ბლოტის აუტორადიოგრამები და საკალიბრაციო მრუდები. ყველა ცდაში ვიყენებდით ერთიდაიგივე სტანდარტს, რომელიც წარმოადგენდა ყველა საცდელი *Y. pestis*-ის ცილოვანი ექსტრაქტის ნარევეს. ყველა გელზე დაიტანებოდა ამ სტანდარტის 15, 30, 45 და 60 მკგ. მოცემული საკალიბრო მრუდები აჩვენებენ იმუნომელების წრფივ პასუხს დატანილი ცილის რაოდენობის მიხედვით: (a) F1 ანტიგენი (B) გარეთა მემბრანული ცილა C, პორინი (c) ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილა და (D) დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS

F1 ანტიგენის საწინააღმდეგო ანტისხეულები რეაგირებენ დაახლოებით 36–38 კდა-ს წონის ცილოვან მოლეკულასთან (სურ. 45A). F1 ანტიგენის მონომერის მოლეკულური წონა 17.7 კდა-ს წარმოადგენს, მაგრამ ის როგორც წესი მიგრირებს როგორც დიმერი SDS გელზე. გარეთა მემბრანული ცილა C პორინის საწინააღმდეგო ანტისხეულები ურთიერთქმედებენ მოლეკულასთან წონით 38 კდა, რომელიც შეესაბამება საკვლევი ცილის მოლეკულურ წონას (სურ. 45B). ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილის წინააღმდეგ გამომუშავებული ანტისხეულები რეაგირებენ ცილოვან ხაზთან წონით 20 კდა, ხოლო ანტისხეულები დნმ-დამაკავშირებელი ცილა

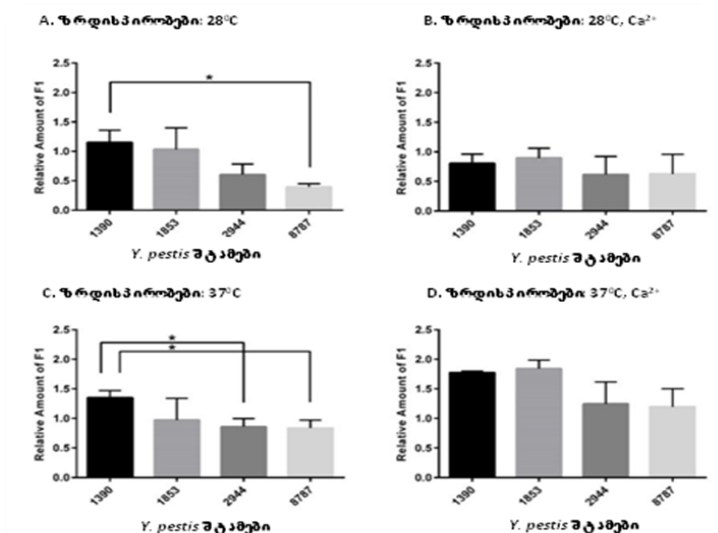
H-NS-ის წინააღმდეგ ცილასთან წონით 15-16 კდა. Immunostaining (სურ. 45C და 45D).
ორივე ეს წონა შეესაბამება სამიზნე ცილების მოლეკულურ წონას.

F1 ანტიგენი

F1 ანტიგენი *Y. pestis* ვირულენტური ფაქტორია, რომელიც pMT პლაზმიდის *cafI* გენი აკოდირებს. ის სინთეზირდება როგორც 15-16 კდა მონომერი და წარმოქმნის დიდ ჰომოპოლიმერებს (> 200კდა-ზე) ბაქტერიული უჯრედის ზედაპირზე. F1 ანტიგენის სეკრეციისათვის და აწყობისათვის აუცილებელია *cafIM* და *cafIA* გენები, რომლებიც ჩაპერონების ჰომოლოგიურები არიან. F1 ანტიგენი აფერხებს მაკროფაგების მიერ ბაქტერიების შთანთქმის უნარს და ამრიგად იცავს ბაქტერიას იმუნური სისტემის მოქმედებისაგან.

ორ-ფაქტორიან ცვლადთა ანალიზის მიხედვით, *Y. pestis*-ის შტამებს და ზრდის პირობებს, ორივეს გააჩნიათ სარწმუნო ეფექტი F1 ანტიგენზე (შესაბამისად $F3, 63 = 5.40, p = 0.002$; $F3, 63 = 9.95 p = 0.0001$). როგორც მოსალოდნელი იყო ყველაზე მკვეთრი განსხვავებები შეიმჩნეოდა 37°C-ზე (სურ. 46C). F1 ანტიგენის საშუალო რაოდენობა #2944 ($t = 2.65, p = 0.038$) და #8787 ($t = 2.85, p = 0.029$) შტამებთან შედარებით #1390 შტამში სარწმუნოდ უფრო მაღალი იყო. ისევე როგორც 28°C გაზრდილ შტამებში F1 ანტიგენის საშუალო რაოდენობა #1390 შტამში ასევე სარწმუნოდ უფრო მაღალი იყო #8787-თან შედარებით ($t = 3.47, p = 0.013$; სურ. 46A).

როგორც 28°C-ზე, ასევე 37°C-ზე კალციუმის იონების თანაობისას გაზრდილ შტამებში, F1 ანტიგენის საშუალო რაოდენობა #1390 შტამში სარწმუნოდ უფრო მაღალი იყო ვიდრე #8787 და #2944 შტამებში ($t = 3.47, p = 0.013$ შესაბამისად სურ. 46 B, D). 37°C-ზე და 37°C-ზე Ca^{2+} -ის თანაობისას გამოვლინდა F1 ანტიგენის განსხვავებული ექსპრესია. ვესტერნ ბლოტინგმა დაადასტურა რომ F1 ანტიგენის საშუალო რაოდენობა სარწმუნოდ უფრო მაღალია #1390 შტამში #2944 და #8787 შტამთან შედარებით 37°C-ზე. ამავე ტემპერატურაზე კალციუმის იონების თანაობისას F1 ანტიგენის საშუალო რაოდენობა არ იყო სარწმუნოდ მომატებული #1390 და #1853 შტამებში #2944 და #8787 შტამებთან შედარებით. ეს მონაცემები დამაჯერებლად მიუთითებს, რომ F1 ანტიგენის რაოდენობა ვარირებს შტამების მიხედვით და ამავე დროს ექსპრესია რეგულირდება ტემპერატურით.



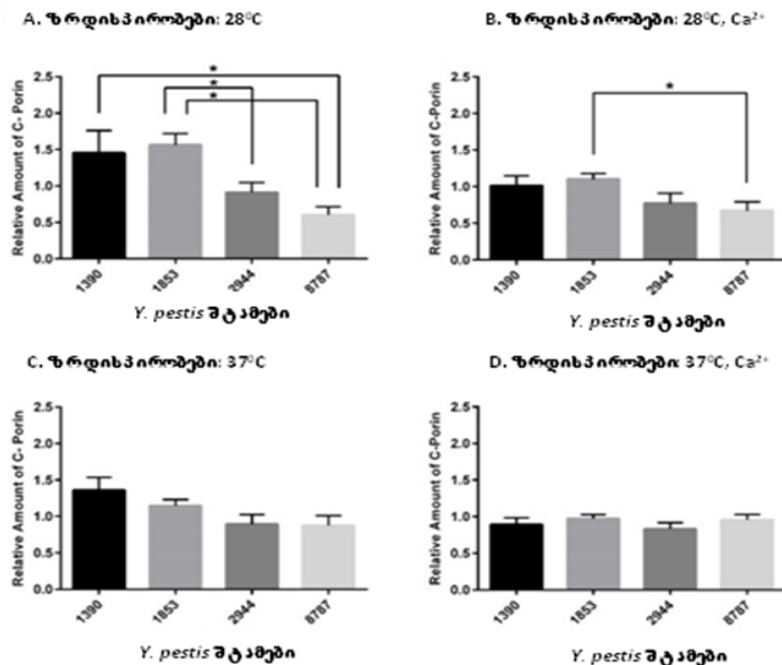
სურათი 46. F1 ანტიგენის ფარდობითი რაოდენობები #1390, #1853, #2944, და #8787 *Y. pestis* -ის შტამებში ზრდის შემდეგი პირობებისას: (A) 28°C; (B) 28°C, Ca²⁺; (C) 37°C; და (D) 37°C, Ca²⁺. ცილების ფარდობითი რაოდენობები ითვლებოდა ნიმუშის იმუნოშელეხილი ხაზის ოპტიკური სიმკვრივის გაყოფით იმ ოპტიკურ სიმკვრივეზე რომელიც შეესაბამებოდა შეასაბამისი სტანდარტის 30 მკგ ცილას. მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს $\pm$ საშუალოს სტანდარტულ ცდომილებას. *-მიუთითებს სარწმუნო გასხვავებაზე ($p < 0.05$).

გარეთა მემბრანული ცილა C, პორინი

რკინა არსებითი ელემენტია ბევრი მიკროორგანიზმის ცხოველყოფელობასათვის და მისი შეთვისების უნარი მნიშვნელოვანია ინფექციური პროცესის წარმართვისთვის. ცნობილია რომ გარეთა მემბრანული ცილები და მათ შორის C ცილაც წარმოადგენენ ტრანსფერინ დამაკავშირებელ ცილებს და მონაწილეობენ ბაქტერიების ზრდისათვის აუცილებელი რკინის მოპოვებაში მასპინძელი ორგანიზმიდან.

ორ-ფაქტორიანმა ცვლადთა ანალიზმა აჩვენა ამ ცილის ექსპრესიის მნიშვნელოვანი განსხვავებები შტამებს შორის ($F_{3, 63} = 8.53$, $p = 0.0001$). ყველაზე უფრო მკვეთრი განსხვავებები შეიმჩნეოდა 28°C-ზე (სურ. 49A). გარეთა მემბრანული ცილა C, პორინის საშუალო რაოდენობა სარწმუნოდ უფრო მაღალი #1853 შტამში იყო, ვიდრე #2944 ($p = 0.02$) და #8787 შტამებში ($p = 0.002$). ასევე ამ ცილის საშუალო რაოდენობა სარწმუნოდ უფრო მაღალი #8787 შედარებით #1390 შტამში იყო ($p = 0.041$). შტამების 28°C -ზე კალციუმის იონების თანაობისას გაზრდის პირობებში,

გარეთა მემბრანული ცილა C, პორინის საშუალო რაოდენობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ უფრო მაღალი იყო #1853, #8787-თან შედარებით ($p = 0.025$, სურ. 47B). სარწმუნო განსხვავებები არ შეიმჩნეოდა შტამებს შორის ზრდის სხვა პირობების დროს (სურ. 47 C,D).



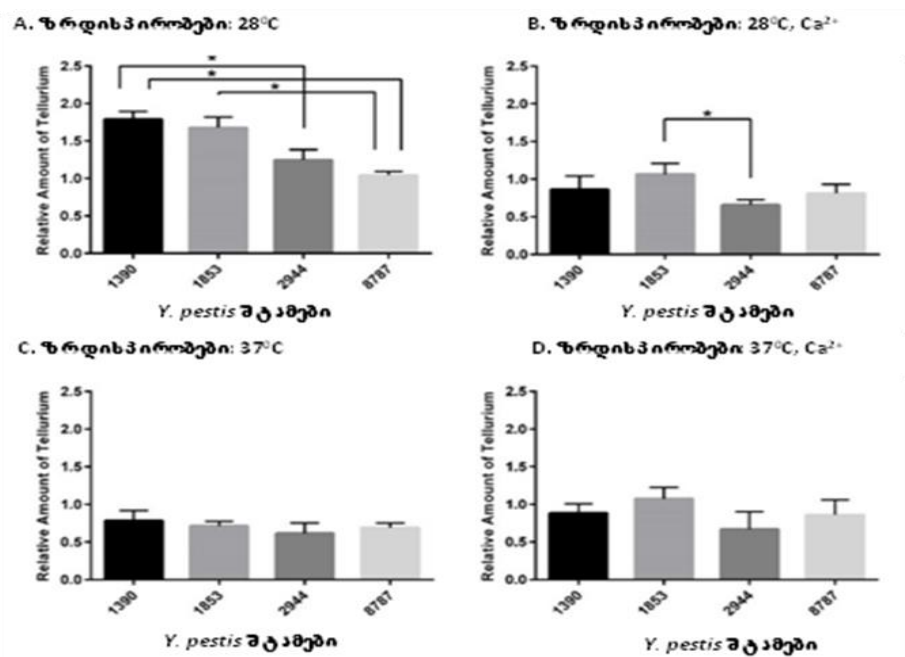
სურათი 47. გარეთა მემბრანული ცილა C პორინის ფარდობითი რაოდენობები 1390, 1853, 2944, და 8787 *Y. pestis* -ის შტამებში შემდეგი ზრდის პირობებისას: (a) 28°C; (B) 28°C, Ca²⁺; (c) 37°C; და (D) 37°C, Ca²⁺. ცილების ფარდობითი რაოდენობები ითვლებოდა ნიმუშის იმუნოშეღებილი ხაზის ოპტიკური სიმკვრივის გაყოფით იმ ოპტიკურ სიმკვრივეზე რომელიც შეესაბამებოდა შეასაბამისი სტანდარტის 30 მკგ ცილას. მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს $\pm$ საშუალოს სტანდარტულ ცდომილებას. *-მიუთითებს სარწმუნო განსხვავებაზე ($p < 0.05$).

ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილა

ტელურიუმი კვალის დონის ელემენტია და მიეკუთვნება ჯგუფს, რომელშიც შედის სელენიუმი, გოგირდი და ჟანგბადი. ტელურიუმის ოქსიანიონები მაღალ ტოქსიკური ნაერთებია ყველა ცოცხალი ორგანიზმისათვის მიკრომოლარული კონცენტრაციებითაც კი. ტელურიუმის ტოქსიკურობა ნაწილობრივ შეიძლება განხორციელდეს ჟანგბადის იმ რეაქტიული სახეობებით, რომლებიც მიიღებიან ტელურიუმის აღდგენით. ტელურიუმ რეზისტენტული ცილების პირველადი ფუნქცია უცნობია, თუმცა ნავარაუდევია რომ ისინი მონაწილეობენ მასპინძელი

ორგანიზმის მაკროფაგების მიერ წარმოებული ანტიმიკრობული აგენტების დეტოქსიფიკაციაში. მღრღნელების ორგანიზმში *Y. pestis* უჯრედები თავიდან მრავლდებიან მაკროფაგების ფაგოლიზოზომებში. ამ დროს გადარჩენისათვის ბაქტერიული უჯრედები იწყებენ სპეციფიკური ცილების სინთეზს. მართლაც ნაჩვენები იქნა რომ ამ დროს ადგილი აქვს 12 სპეციფიკური ცილის სინთეზს და ორ მათგანს წარმოადგენს ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილა და დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS [99]. მაკროფაგებში *Y. pestis* გადარჩენასა და გამრავლებაში მონაწილეობის გამო ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილა ვირულენტურობის ფაქტორად შეიძლება იყოს განიხილული.

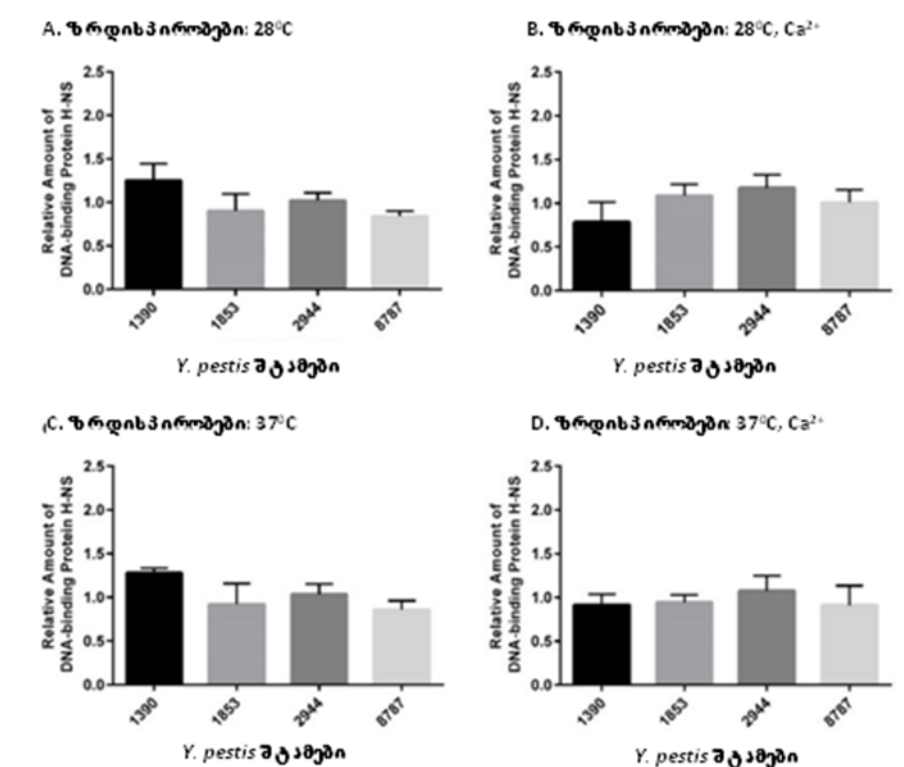
ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილისათვის როგორც შტამის ასევე ზრდის მდგომარეობის ფაქტორების ეფექტი იყო სარწმუნო ორ-ფაქტორიან ცვლადთა ანალიზის მიხედვით (შესაბამისად $F_{3, 63} = 5.49, p = 0.002$; $F_{3, 63} = 21.03, p = 0.0001$). 28°C -ზე ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილის საშუალო რაოდენობა #1390 შტამში სარწმუნოდ უფრო მაღალი იყო ვიდრე #2944 ($p = 0.019$) და #8787 შტამებში ($p = 0.001$). ამავე ტემპერატურაზე #1390 ცილის რაოდენობა სარწმუნოდ უფრო მეტი იყო ვიდრე #8787 ($p = 0.006$). 28°C -ზე კალციუმის იონების თანაობისას ცილის საშუალო რაოდენობა #1853 შტამში სარწმუნოდ უფრო მაღალი იყო ვიდრე #2944-ში ($p = 0.044$) (სურ. 50A–D). სხვა სარწმუნო განსხვავებები არ შეიმჩნეოდა.



სურათი 48. ტელურიუმ რეზისტენტული ცილის ფარდობითი რაოდენობები #1390, #1853, #2944, და #8787 *Y. pestis* -ის შტამებში შემდეგი ზრდის პირობებისას: (a) 28°C; (B) 28°C, Ca²⁺; (c) 37°C; და (D) 37°C, Ca²⁺. ცილების ფარდობითი რაოდენობები ითვლებოდა ნიმუშის იმუნოშედლებილი ხაზის ოპტიკური სიმკვრივის გაყოფით იმ ოპტიკურ სიმკვრივეზე რომელიც შეესაბამებოდა შეასაბამისი სტანდარტის 30 მკგ ცილას. მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს $\pm$ საშუალოს სტანდარტულ ცდომილებას. *-მიუთითებს სარწმუნო განსხვავებაზე ($p < 0.05$).

დნმ-დამაკავშირებელის ცილა H-NS

ორ-ფაქტორიანი ცვლადთა ანალიზის მიხედვით არც ბაქტერიული შტამების და არც ფიზიოლოგიური მდგომარეობის მიხედვით დნმ-დამაკავშირებელის ცილა H-NS-ის რაოდენობებს შორის სარწმუნო განსხვავებები არ აღინიშნება (სურ. 49A–D).



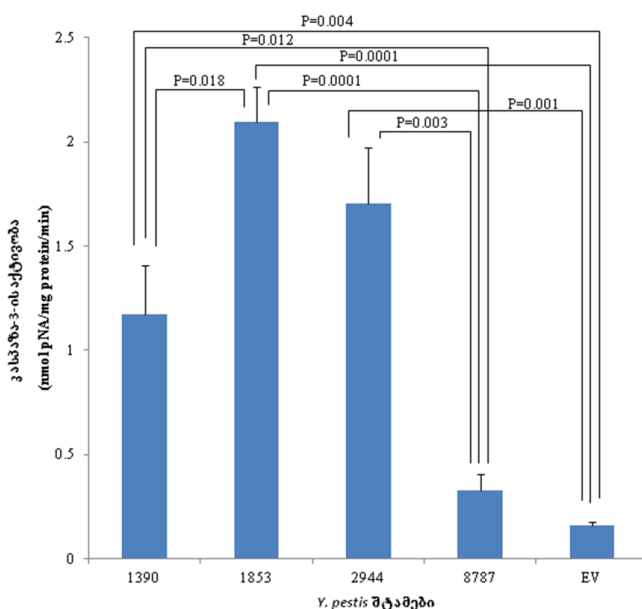
სურათი 49. დნმ-დამაკავშირებელის ცილა H-NS-ის ფარდობითი რაოდენობები 1390, 1853, 2944, და 8787 *Y. pestis* -ის შტამებში შემდეგი ზრდის პირობებისას: (a) 28°C; (B) 28°C, Ca²⁺; (c) 37°C; და (D) 37°C, Ca²⁺. ცილების ფარდობითი რაოდენობები ითვლებოდა ნიმუშის იმუნოშელეპილი ხაზის ოპტიკური სიმკვრივის გაყოფით იმ ოპტიკურ სიმკვრივეზე რომელიც შეესაბამებოდა შესაბამისი სტანდარტის 30 მკგ ცილას. მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს ± საშუალოს სტანდარტულ ცდომილებას.

ინ ვიტრო ციტოტოქსიკურობა

დადასტურებულია, რომ უჯრედის სიკვდილი ცენტრალურ როლს თამაშობს მასპინძელი-პათოგენის ურთიერთქმედებაში. ამ დროს ადგილი აქვს მასპინძლის იმუნური უჯრედების დესტრუქციას და ანტიმიკრობული ეფექტორული მექანიზმების აცილებას. ექსპერიმენტების სპეციალურ სერიაში ინ ვიტრო ჩვენ შევისწავლეთ საკვლევი შტამების ტოქსიკურობა მაკროფაგების უჯრედულ კულტურაზე. მაკროფაგები პასუხისმგებლები არიან პათოგენების დეტექციაზე და განადგურებაზე და მათი აპოპტოზი ასუსტებს მასპინძლის იმუნურ პასუხს. კასპაზა-3 წარმოადგენს *Y. pestis* -ის პათოგენური ეფექტის მედიატორს C57BL/6 თაგვის

ღვიძლში და ამრიგად ამ ფერმენტის აქტივობა შეიძლება წარმოადგენდეს *Y. pestis*-ის ვირულენტობის ერთ-ერთ საზომს.

Y. pestis-ის სხვადასხვა შტამებით ინდუცირებული აპოტოზური აქტივობა შედარებულ იქნა კასპაზა-3-ის აქტივობის მიხედვით. სარწმუნო განსხვავებებს აქვს ადგილი ერთფაქტორიან ცვლადთა ანალიზით, ფაქტორი-შტამის მიხედვით ($F_{4, 19} = 22.15$, $p = 0.0001$; სურ. 50). ყველაზე უფრო მაღალი კასპაზა-3-ის აქტივობა შტამის #1853-ით ინდუცირდება, რომელიც სარწმუნოდ აღემატება #1390 შტამის ($t = 3.24$, $p = 0.018$), #8787 შტამის ($t = 9.35$, $p = 0.0001$), და EV შტამის ($t = 11.20$, $p < 0.0001$) მაჩვენებლებს. #2944 შტამის ინდუცირებული კასპაზა-3-ის აქტივობა სარწმუნოდ უფრო მაღალია ვიდრე #8787 და EV შტამის მაჩვენებლები ($t = 5.69$, $p = 0.001$). კასპაზა-3-ის აქტივობა ასევე სარწმუნოდ უფრო მაღალია #1390-ის შემთხვევაში 8787 შტამთან და ($t = 3.55$, $p = 0.012$) და EV სავაქცინო შტამთან შედარებით ($t = 4.48$, $p = 0.004$) (სურ. 50) ორ-კუდიანი t -ტესტის მიხედვით სხვა სარწმუნო განსხვავებები არ აღინიშნება. ამ ფერმენტის აქტივობა ყველაზე უფრო დაბალი იყო #8787 და EV შტამში და ყველაზე მაღალი #1853-ში.



სურათი 50. #1390, #1853, #2944, #8787 და EV *Y. pestis*-ის შტამებით ინდუცირებული მაკროფაგების კასპაზა-3-ის აქტივობები. მონაცემები წარმოადგენს საშუალოს $\pm$ საშუალოს სტანდარტულ ცდომილებას. *-მიუთითებს სარწმუნო განსხვავებაზე ($p < 0.05$).

2.5. შედეგების განხილვა

მიკროორგანიზმების მოლეკულური ტიპირება მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ინფექციური დაავადებების ეპიდზედამხედველობის სისტემაში. აღნიშნული კვლევების როლი განსაკუთრებით მაღალია ისეთი მიკროორგანიზმის დასახასიათებლად, როგორც არის შავი ჭირის გამომწვევი - *Y. pestis*, რომელმაც ისტორიული პანდემიების დროს ასობით მილიონი ადამიანის სიცოცხლე შეიწირა და წარუშლელი კვალი დატოვა კაცობრიობის ისტორიაში. ადრეული პანდემიების გამომწვევ მიკროორგანიზმთან დაკავშირებით არსებული ეჭვები გაფანტა, უძველესი შავი ჭირის სამარხებიდან, ადამიანის ჩონჩხის ნაშთებში *Y. pestis* სპეციფიკური დნმ-ის აღმოჩენამ [34, 72, 94, 95].

უახლესი მონაცემებით, ევროპისა და აზიის ბრინჯაოს ხანის 101 ინდივიდის კბილებიდან მოპოვებულ დნმ-ის ანალიზის შედეგად შვიდ ადამიანში *Y. pestis* გენომი აღმოჩნდა [112]. კვლევამ აჩვენა, რომ შავი ჭირის გამომწვევი *Y. pestis* ჯერ კიდევ ბრინჯაოს ხანაში არსებობდა, რამაც *Y. pestis* წარმოშობის თარიღი სულ მცირე 5783 წლის წინ გადაწია.

ამ აღმოჩენაზე დაყრდნობით ადამიანები შავი ჭირით, ჯერ კიდევ, პირველ აღწერილ პანდემიებამდე 3000 წლით ადრე ავადდებოდნენ. თუმცა წინაისტორიული *Y. pestis* თანამედროვე შავი ჭირის გამომწვევისგან განსხვავებით, რიგი გენების და მუტაციების არარსებობის გამო, სავარაუდოდ, მიკრობს არ ჰქონდა შეძენილი რწყილით გადაცემის უნარი და არ იწვევდა შავი ჭირის ბუბონურ ფორმას. ეპიდემიური შავი ჭირი, სავარაუდოდ, ნაკლებად ვირულენტური *Y. pestis* შტამების ევოლუციის შედეგად წარმოიშვა.

კავკასია იმ უძველეს სატრანსპორტო გზაჯვარედინზე მდებარეობს, რომელიც საუკუნეების განმავლობაში აკავშირებდა ჩრდილოეთისა და სამხრეთის, დასავლეთისა და აღმოსავლეთის ქვეყნებს. სწორედ მასზე გადიოდა აზიის ევროპასთან დამაკავშირებელი დიდი აბრეშუმის გზის ერთ-ერთი ძირითადი

განშტოება, რაც ხშირ შემთხვევაში, დაკავშირებული იყო სხვადასხვა ეპიდემიების, მათ შორის შავი ჭირის გავრცელებასთან. ამ დაავადებამ დიდი გავლენა მოახდინა მთელი რეგიონის ისტორიაზე და განაპირობა ბუნებრივი კერების ჩამოყალიბება, სადაც შავი ჭირის გამომწვევის უნიკალური წარმომადგენლები ცირკულირებენ. დღეისათვის კავკასიის რეგიონში შავი ჭირის 12 ბუნებრივი კერაა იდენტიფიცირებული. აქედან ორი საქართველოს ტერიტორიაზე მდებარეობს.

ამ კვლევის მიზანი იყო საქართველოს და მიმდებარე ქვეყნებში შავი ჭირის ბუნებრივი კერებში იზოლირებული *Y. pestis* შტამების გენეტიკური მრავალფეროვნებისა და მიკროევოლუციის შესწავლა PFGE, IS100, პჯრ-ზე და მიკროარეზზე დაფუძნებული SNP ტიპირების მეთოდების გამოყენებით, ასევე სრული გენომის სექვენირების საფუძველზე მიკროორგანიზმის ვირულენტობასთან დაკავშირებული ლოკუსების დახასიათება, პლაზმიდური სპექტრის განსაზღვრა, CRISPR ტიპირება, პროტეომიკული კვლევები.

Y. pestis შტამების ტიპირებისთვის სათანადო მეთოდების შერჩევა რიგ სირთულეებთან არის დაკავშირებული, რაც განპირობებულია ახალგაზრდა მიკროორგანიზმისთვის დამახასიათებელი დაბალი გენეტიკური მრავალფეროვნებით. მოცემულ სადისერტაციო ნაშრომში გამოყენებული მეთოდები განსხვავდებიან გარჩევადობის, შედეგების მიღების სისწრაფით, მონაცემების ინტერპრეტაციის და სხვადასხვა ლაბორატორიებში რეპროდუქციის უნარით. გარდა ამისა, გასათვალისწინებელია ანალიზისთვის საჭირო აღჭურვილობის, რეაგენტების ღირებულება. ამრიგად, ყოველ კონკრეტული შემთხვევაში, შესაფერისი გენოტიპირების მეთოდის არჩევისას, აუცილებელია ყველა ამ ფაქტორის ოპტიმალური კომბინაციის განსაზღვრა.

Y. pestis გენოტიპირებისთვის ჩვენ მიერ გამოყენებული IS100 ტიპირების საშუალებით მოხდა *Y. pestis* ძირითადი ჯგუფების - ბიოვარების დიფერენცირება. აღნიშნული მეთოდმა შეზღუდული შესაძლებლობა გამოავლინა ახლო მონათესავე შტამების დიფერენცირებაში (ქართული და სომხური subsp. *Microtus* შტამები ერთ ჯგუფში განთავსდნენ). აქვე უნდა აღინიშნოს რომ IS100 გენოტიპირებს მეთოდით არ ხდება მიკროორგანიზმის გენომში IS100 ელემენტების იმ ასლების აღმოჩენა,

რომლებიც CO92-ისგან განსხვავებულ ლოკუსებში არიან განთავსებულნი. მიუხედავად ამისა, მეთოდის საშუალებით ჩვენს ხელთ არსებული შტამები ხუთ ჯგუფში გადანაწილდნენ.

პჯრ-ზე დაფუძნებულ IS100 ტიპირებასთან შედარებით, მაღალი გარჩევადობის უნარი გამოავლინა *Y. pestis* შტამების PFGE ანალიზმა. სხვადასხვა ქვეყნიდან/რეგიონიდან გამოყოფილმა იზოლატებმა განსხვავებული PFGE პროფილი აჩვენეს. ამ მეთოდით მოხდა გენეტიკურად ახლოს მდგომ ქართულ (მაღალმთიანი კერა) და სომხურ შტამებს შორის განსხვავებების აღმოჩენა. უმნიშვნელო ვარიაციები იქნა ნაპოვნი შავი ჭირის მაღალმთიანი კერიდან გამოყოფილ შტამებს შორის. ამ მეთოდის ნაკლოვანებას წარმოადგენს ის, რომ მიღებული პროფილების მიხედვით ვერ ხერხდება შტამების რომელიმე ბიოვარისთვის მიკუთვნება, ასევე რთულია სხვადასხვა ლაბორატორიაში მიღებული შედეგების შედარება და ინტერპრეტაცია, თუმცა მაღალი გარჩევადობის უნარის გამო მიზანშეწონილია აღნიშნული მეთოდის ეპიდემიოლოგიურ კვლევებში გამოყენება.

პჯრ-ზე დაფუძნებულმა SNP გენოტიპირებამ, ისევე როგორც SNP მიკროარეების გამოყენებით ჩატარებულმა ტიპირებამ, ყველაზე მაღალი გარჩევადობის უნარი გამოავლინა, მოახდინა არა მხოლოდ სხვადასხვა კერიდან გამოყოფილი შტამების, არამედ ერთ კერიდან მიღებული იზოლატების დიფერენცირება და საშუალება მოგვცა ყველაზე მაღალი სიზუსტით განგვეთავსებინა კოლექციაში არსებული შტამები გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე. melt-MAMA პჯრ-ზე დაფუძნებული SNP გენოტიპირებით გამოკვლეული სამუზეუმო შტამები *Y. pestis* ევოლუციური მოდელის ხეზე სხვადასხვა განშტოებაზე განთავსდნენ [93, 134]. ქართულში bv. Medievalis შტამი (#771) ყველაზე ახლოს თურქეთიდან, კერძოდ, ქურთისტანიდან გამოყოფილ შტამთან (KIM10) აღმოჩნდა. ჩრდილოეთ კავკასიიდან და აზერბაიჯანიდან გამოყოფილი შტამები განთავსდნენ Medievalis 2Med1 განშტოების IX-X ტოტზე, რომელიც ასახავს *Y. pestis* შტამების ჩინეთიდან თურქეთის მიმართულებით ფილოგეოგრაფიულ გავრცელებას. canSNP ტიპირების საფუძველზე საქართველოს და სომხეთიდან იზოლირებული subsp. *microtus* შტამები განთავსდნენ 0.PE2 განშტოებაზე, რომელიც 0.PE7-თან ერთად *Y. pestis* ფილოგენეტიკური ხის ყველაზე ძველ განშტოებას მიეკუთვნება.

საქართველოს მაღალმთიანი კერიდან გამოყოფილი შტამები 0.PE2b განშტოებაზე მოხვდნენ. ახლად აღმოჩენილი SNP საფუძველზე მოხდა 0.PE2b გაფართოება და ახალი ქართული Pestoides SNP გენეტიკური ქვეჯგუფის გამოვლენა. თითოეული გენეტიკური ჯგუფისთვის განისაზღვრა ახალი, სპეციფიკური canSNP ტესტი, pestoides შტამებისთვის ათი, ხოლო Bv. Medievalis შტამების ორი ტესტ/რეაქცია (ცხრ. 14).

მიკროარეებით გენოტიპირებამ 2654 SNP ლოკუსის გამოყენებით, ქართული subsp. *microtus* bv. *Caucasica* მონომორფულ პოპულაციაში მანამდე უცნობი ვარიაციები გამოავლინა. შტამები ორ კლასტერში დაჯგუფდნენ, რომელთაც მხოლოდ 11 SNP განასხვავებდათ. მუტაციების ნაწილი (ძირითადად არასინონიმური მუტაციები) პლაზმიდებზე მოდიოდა. მიუხედავად იმისა, რომ melt-MAMA PCR SNP ტიპირება და მიკროარეებით გენოტიპირება სხვა მეთოდებთან ყველაზე უფრო მაღალი გარჩევადობით გამოირჩევა, მაინც ვერ მოხერხდა ქართული ენზოტური bv. *Caucasica* იზოლატების უმრავლესობის დიფერენცირება, რაც პოპულაციის ძლიერ მონომორფულობაზე მიუთითებს. მაღალმთიან კერაში შტამების გამოხატული მონომორფულობა შესაძლოა მიუთითებდეს ბუნებრივ კერაში პათოგენს, მის რეზერვუარებს და გადამტანებს შორის ბიოცენოზური კავშირების სტაბილიზაციაზე და ასევე იმაზე, რომ არ ხდება შტამების აქტიური მიმოცვლა სხვა მოსაზღვრე კერებთან.

SNP მიკროარეზე დაფუძნებულმა გენოტიპირებამ, მცირე დროში მთელი გენომის მასშტაბით ვარიაციების გამოვლენის და დიდი რაოდენობით შტამების ერთდროული, ეფექტურ დახასიათების საშუალება მოგვცა. სხვადასხვა ჯგუფებს შორის მრავალი განმასხვავებელი SNP გამოავლინდა, რომლებიც კორელაციაში არიან გეოგრაფიულ ლოკაციასთან და იდეალურ სამიზნეებს წარმოადგენენ ზედამხედველობისთვის ახალი ტესტ სისტემების შესაქმნელად. მეთოდის ნაკლოვანებად შეიძლება ჩაითვალოს ის, რომ მიკროარეს ტექნოლოგიით შეუძლებელია ახალი, ერთ ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმების აღმოჩენა, რომლებიც მანამდე შესწავლილ შტამებში არ იყო გამოვლენილი. გარდა ამისა მეთოდი მოითხოვს ძვირადღირებულ აპარატურას და რეაქტივებს, რაც მეთოდის გამოყენების შემზღუდავ ფაქტორია.

SYBR Green melt-MAMA PCR დაფუძნებული SNP გენოტიპირება, რომელიც ორი განსხვავებული ალელის ერთ რეაქციაში ანალიზის საშუალებას იძლევა, არ საჭიროებს განსაკუთრებით ძვირადღირებულ რეაქტივებსა და აპარატურას. ამის გარდა, მეთოდი შესაძლოა ადაპტირდეს ჩვეულებრივ პჯრ პლატფორმისთვის (გელ-ელექტროფორეზით), რაც მეთოდს კიდევ უფრო ხელმისაწვდომს ხდის საშუალოდ აღჭურვილი ლაბორატორიებისთვის. ეს ყოველივე დიდ უპირატესობას ანიჭებს აღნიშნულ მეთოდს, რომელიც დროის მცირე მონაკვეთში გამოავლენს დნმ-ის პოლიმორფიზმს. თუმცა ახალი პოპულაციების გამოსავლენად აღნიშნული მეთოდი ასევე საჭიროებს სრული გენომის სექვენირებას.

საქართველოში პირველად გახდა ხელმისაწვდომი *Y. pestis* შტამების სრული გენომური სექვენირება. როგორც უკვე აღვნიშნეთ, დკსჯეც-ის, LANL და WRAIR ერთობლივი კვლევის ფარგლებში განხორციელდა ბაქტერიებისა და ვირუსების ეროვნულ საცავში არსებული *Y. pestis* 11 შტამის სრული გენომის სექვენირება, ახალი თაობის სექვენირების სამი სხვადასხვა პლატფორმის გამოყენებით. აწყობილი თანამიმდევრობები გამოქვეყნდა და აიტვირთა გენომური ბანკის მონაცემთა ბაზაში (GenBank) [135]. აღნიშნული შტამების გარდა, დამატებით ჩატარდა ექვსი *Y. pestis* შტამის სექვენირება დკსჯეც არსებული ახალი თაობის სექვენირების ტექნოლოგიის - Illumina, MiSeq პლატფორმის გამოყენებით. დღეის მდგომარეობით, სექვენირებული და გაანალიზებულია საქართველოში იზოლირებული *Y. pestis* 17 იზოლატი.

სრული გენომის სექვენირების შედეგად შესაძლებელი გახდა *Y. pestis* იზოლატების კიდევ უფრო სიღრმისეული დახასიათება. შესწავლილ იქნა *Y. pestis* ვირულენტობის განმაპირობებელი ფაქტორები, როგორიც არის *pgm* ლოკუსი და V ანტიგენი (*lcrV*), რომლებიც მაღალი ხარისხის კონსერვატულობით გამოირჩევიან. სხვადასხვა წარმოშობის შტამებში მხოლოდ უნიშვნელო სტრუქტურულ განსხვავებებია აღმოჩენილი. მიკროორგანიზმის ვირულენტობაში კრიტიკული მნიშვნელობის გამო, ამ უბნებში აღმოჩენილი სულ მცირე სტრუქტურული და ფუნქციური განსხვავებების იდენტიფიცირება და დახასიათება მნიშვნელოვანია მიკრობების პათოგენურობის უკეთ შესასწავლად.

მოცემულმა კვლევამ უჩვენა, რომ *Y. pestis* მაღალვირულენტურ ყირგიზულ შტამში (#790 bv. Antiqua), ისევე როგორც სხვა ეპიდემიური შტამებში (CO92, Kim10) *Y. pestis* ვირულენტურობის განმსაზღვრელ *pgm* ლოკუსის მოსაზღვრე *ompY* პორინის გენი დაზიანებულია IS100 ასლის ინსერციით. გარე მემბრანული პროტეინები - პორინები (*omp*) მიკროორგანიზმის გარემო პირობებთან ადაპტაციაში დიდ როლს თამაშობენ. ისინი გარე მემბრანული არხების საშუალებით უზრუნველყოფენ მეტაბოლიტების ტრანსპორტირებას და არეგულირებენ იონურ მიმოცვლას. აქედან გამომდინარე, მიკროორგანიზმისთვის ახალი პორინების შეძენა ან დაკარგვა ხშირ შემთხვევაში ევოლუციის გზაზე ეკოლოგიური ნიშის შეცვლის პროცესს ასახავს. მაღალვირულენტურ *Y. pestis* შტამებისგან განსხვავებით, ქართულ და სომხურ subsp. *microtus* შტამებს, ისევე როგორც *Y. pseudotuberculosis* შტამებს, პორინის გენი ინტაქტური (*ompY*) აქვთ. აზერბაიჯანიდან და ჩრილოეთ კავკასიიდან გამოყოფილ bv. *Medievalis* შტამებს დელეციის შედეგად მთლიანად დაკარგული აქვთ *pgm* უბანი. ეს დელეცია, სავარაუდოდ გამოწვეულია *pgm* უბნის მოსაზღვრე ორ IS100 ელემენტს შორის (*ompY* გენში) ჰომოლოგიური რეკომბინაციით. მსგავსი დელეცია (*pgm*-), რაც იწვევს *Y. pestis* შტამებში ვირულენტობის სრულ დაკარგვას, საკმაოდ მაღალი სიხშირით გვხვდება (10^{-5}) *Y. pestis* ეპიდემიურ შტამებში (Fetherston et al., 1992, Jackson and Burrows, 1956).

დაბალვირულენტურ *Microtus* შტამებში *ompY* მოსაზღვრე *hutG* ინვერტირებული IS100 ელემენტის ჩართვა, სავარაუდოდ, განაპირობებს ლოკუსის სტაბილიზაციას მოცემულ შტამებში, ვინაიდან ჰომოლოგიური რეკომბინაციისთვის ერთნაირი მიმართულების მქონე ორი IS100 ელემენტია საჭირო. აღნიშნული მონაცემები კორელაციაშია კონგოს წითელ აგარზე (CRA) ქართული და სომხური შტამების (*pgm*+) ფენოტიპთან, რაც გამოიხატება მხოლოდ პიგმენტირებული კოლონიების (წითელი/ვარდისფერი) წარმოქმნაში (მიმდინარე სამუშაო).

გენეტიკურად ახლოს მდგომ ქართულ და სომხურ bv. *Caucasica* შტამებში გამოვლენდა განსხვავება კონსერვატული V ანტიგენის (LcrV) ზომასა და ამინომჟავურ თანამიმდევრობაში. თუ გავითვალისწინებთ იმას რომ ქართულ subsp. *microtus* შტამებში გამოვლენილი LcrV გენოტიპი, რომელიც ასევე ეპიდემიური შტამებისთვის არის დამახასიათებელი და რომლის ამინომჟავური თანამიმდევრობა

ყველაზე ახლოს დგას *Y. pestis* წინაპარ - *Y. pseudotuberculosis* -თან, შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ სომხური შტამები subsp. *microtus* bv. *Caucasica*-ს შედარებით ახალგაზრდა შტოს განეკუთვნებიან. V ანტიგენის C ბოლოსთან გამოვლენილი სექვენსის პოლიმორფიზმის ზეგავლენა ამ შტამების ვირულენტობაზე შემდგომ კვლევებს საჭიროებს.

CRISPR ტიპირებამ სექვენირებულ შტამებს შორის მხოლოდ ოთხი ჯგუფი გამოავლინა. bv. *Medievalis* ოთხ შტამს, შესწავლილ სამ CRISPR ლოკუსზე Kim10-ის იდენტური სპეისერების მოტივი აღმოაჩნდათ, რაც კიდევ ერთელ ადასტურებს აღნიშნული შტამების ახლონათესაურ კავშირს თურქულ შტამებთან. სომხურ შტამებს ქართული bv. *caucasica* შტამებისგან მხოლოდ ერთი სპეისერით ნაკლები (n1) აღმოაჩნდათ. CRISPR ტიპირებითაც, ისევე როგორც SNP ანალიზის შემთხვევაში, ქართული *Pestoides* შტამები CRISPR ევოლუციური მოდელის უძველეს განშტოებაზე მოხვდნენ [107]. მოცემულმა კვლევამ კონკრეტული კერებიდან იზოლირებული შტამებისთვის დამახასიათებელი სპეისერები ან სპეისერების სხვადასხვა კომბინაცია გამოავლინა, რაც შესაძლოა *Y. pestis* ეფექტური ტიპირებისათვის იქნას გამოყენებული, როდესაც გარჩევადობის მაღალი ხარისხი არ არის აუცილებელი.

სრული გენომის სექვენირების საფუძველზე ჩატარებულმა ფილოგენეტიკურმა ანალიზმა, რომელშიც აღმოსავლეთ კავკასიის მთის კერიდან (დაღესტანი), ბოლო დროს სექვენირებული რვა შტამი იქნა ჩართული, ატიპიური bv. *Caucasica* შტამების ორი დამოუკიდებელი სუბკლასტერი გამოავლინა. დაღესტნიდან იზოლირებული bv. *Caucasica* შტამები ძლიერი ჰეტეროგენულობით გამოირჩეულ პირველ სუბკლასტერში მოხვდნენ, ხოლო სომხეთიდან და საქართველოდან გამოყოფილი შტამები შედარებით ერთგვაროვანი სუბკლასტერის სხვადასხვა განშტოებაზე აღმოჩნდნენ. აღმოსავლეთ კავკასიის მთის კერიდან (დაღესტნი) გამოყოფილი შტამების გენეტიკური მრავალფეროვნება, ქართულ და სომხურ შტამებთან შედარებით, შესაძლოა, გამოწვეული იყოს აღნიშნულ კერაში რეზერვუარების/ /მღრღნელების შედარებით მრავალფეროვანი პოპულაციის არსებობით ან უფრო დიდი ევოლუციური ასაკით, რაც გულისხმობს, რომ კავკასიაში გავრცელებული bv. *Caucasica* შტამებს შორის, აღმოსავლეთ კავკასიის მთის კერიდან გამოყოფილი შტამები, ფილოგენეტიკურად უფრო ძველ განშტოებას წარმოადგენენ.

ყველა ზემოაღწერილი კვლევის მიხედვით, ყირგიზულმა შტამმა C790 (bv. Antique), კავკასიის რეგიონში გავრცელებული შტამებისგან სრულიად განსხვავებული პროფილი აჩვენა და ფილოგენეტიკური ხის განსხვავებულ შტოზე (O.ANT3) განთავსდა.

სრული გენომის სექვენირების ანალიზის შედეგად მიღებულმა მონაცემებმა, რეგიონში გავრცელებული *Y. pestis* შტამების სუბტიპირებისთვის, მნიშვნელოვანი დამატებითი სამიზნეები გამოავლინა. სრული გენომის სექვენირების ანალიზმა დაადასტურა პჯრ-ით მიღებული შედეგები, რომ ქართულ და სომხურ *Pestiodes* შტამებს არ აქვთ *Y. pestis* სამი ძირითადი, ვირულენტურობის განმსაზღვრელი პლაზმიდიდან ერთ-ერთი - pPCP (9Kb), რომელიც აკოდირებს ბაქტერიოცინს-პესტიცინს (*pst*) და პროტეაზას - პლაზმინოგენ აქტივატორს (*pla*), რომელიც ხელს უწყობს მიკრობის გავრცელებას პერიფერიიდან (რწყილის კბენის ადგილიდან) ლიმფური ჯირკვლებისაკენ, მის შემდგომ გამრავლებას და სისხლის მიმოქცევაში ინვაზიას. უნდა აღინიშნოს, რომ pPCP პლაზმიდის არქონის მიუხედავად, *pestoides* F შტამები ლაბორატორიული თავგებში პერიფერიული გზით ინფიცირებისას მაღალ ვირულენტობას ავლენენ [131, 132], თუმცა თავისებრთა ოჯახის (*Muridae*) წევრების გარდა სხვა ძუძუმწოვრების მიმართ ამ შტამების ვირულენტობის შესუსტების მიზეზს, სავარაუდოდ, სწორედ ამ პლაზმიდის (პლაზმინოგენ აქტივატორი) არარსებობა წარმოადგენს.

არსებობს მონაცემები, რომლის მიხედვითაც *Y. pestis* subsp. *microtus* შტამებს შეუძლიათ ადამიანში დაავადების გამოწვევა. აღწერილია ტრანსკავკასიურ მაღალმთიან (გიუმრის/ლენინაკანის კერა, სომხეთი, ესაზღვრება მაღალმთიან კერას) და ზანზეგურ-ყარაბაღის კერებთან დაკავშირებული შავი ჭირის სამი კლინიკური შემთხვევა, საიდანაც მოხდა *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *Caucasica* სუფთა კულტურის იზოლაცია [100]. პაციენტებს აღენიშნებოდა კლასიკური ბუბონური შავი ჭირის კლინიკური ნიშნები, როგორიცაა დაავადების მწვავე სიმპტომების უეცარი გამოვლინება, მაღალი ცხელება (39.5- 40°C), ციება, თავის ტკივილი, გულისრევა და ღებინება, ბუბონის გაჩენა.

Y. pestis-ის შტამებს შორის განსხვავებები გამოვლინდა პროტეომული კვლევებითაც. ოთხი შტამის განსხვავებულად ექსპრესირებული ცილების

იდენტიფიკაცია 2-განზომილებიანი ელექტოფორეზით და შემდგომ მას-სპექტრომეტრული ანალიზით მოხდა. შერჩეული ცილების (F1 ანტიგენი, ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილა, გარეთა მემბრანული ცილა C, პორინი და დნმ-დამაკავშირებელი ცილა H-NS) განსხვავებული ექსპრესიის შემდგომი დადასტურება რაოდენობრივი ვესტერნ იმუნობლოტინგის საშუალებით ხდებოდა. მიღებული მონაცემები დამაჯერებლად მიუთითებს, რომ F1 ანტიგენის რაოდენობა ვარიებს შტამების მიხედვით და ამავე დროს ექსპრესია რეგულირდება ტემპერატურით. სარწმუნო განსხვავებები გამოვლინდა ტელურიუმ-რეზისტენტული ცილის და გარეთა მემბრანული ცილა C, პორინის ექსპრესიაში 28°C-ზე. ასევე შესწავლილ იქნა კასპაზა-3 აქტივობა, რომელიც ყველაზე უფრო დაბალი #8787 და EV (სავაქცინე) შტამში, ხოლო ყველაზე მაღალი #1853-ში აღმოჩნდა. პროტეომული ექსპერიმენტები დამაჯერებლად მიუთითებს შტამებს შორის სხვაობაზე, თუმცა მოლეკულური ტიპირების შედეგებთან პირდაპირი კორელაცია არ იქნა გამოვლენილი. აღსანიშნავია, რომ განსხვავებები SNP-ებს შორის შეიძლება არ აისახოს ცილების ექსპრესიაზე ან პირიქით, მოთავსებული იყოს პრომოტორულ უბნებში და აძლიერებდნენ ან ამცირებდნენ გენის ექსპრესიას. შტამში - #8787 სხვადასხვა ცილების განსხვავებული (დაბალი) ექსპრესია სავარაუდოდ შესაძლოა გამოწვეული იყოს მისი გენომის შედარებით მცირე ზომით (60Kb-ით ნაკლებია სხვა ქართული შტამებთან შედარებით) და ამავე დროს ფსევდოგენების შედარებით დიდი რაოდენობით.

კვლევის ფარგლებში *Y. pestis* შტამების სწრაფი და ზუსტი იდენტიფიკაციისთვის შეირჩა პჯრ სადიაგნოსტიკო ნაკრები. ამჟამად შავი ჭირის კერებზე ზედამხედველობის პროგრამაში, საქართველოს ტერიტორიაზე არსებულ ბუნებრივ კერებში შეგროვებულ საველე ნიმუშებში *Y. pestis* დეტექციისთვის, გამოიყენება მაღალი მგრძნობელობის და სპეციფიკურობის მქონე პჯრ. ქრომოსომულ *yihN* მარკერზე.

კვლევების საფუძველზე მოხდა შტამების განახლებადი მონაცემთა ბაზის შექმნა.

ნაშრომის ფარგლებში შესწავლილი, კავკასიის შავი ჭირის ბუნებრივი კერებიდან იზოლირებული, *Y. pestis* შტამების შედარებით მცირე რაოდენობა არ

იმდევს რეგიონში გავრცელებულ *Y. pestis* პოპულაციებზე სრულყოფილი სურათის შექმნის საშუალებას, რისთვისაც მეზობელი ქვეყნების კერებიდან მოპოვებული მეტი იზოლატის დახასიათებაა საჭირო. თუმცა არსებული ინფორმაცია თამამად გვაძლევს გარკვეული განზოგადების შესაძლებლობას, რომ კავკასიის რეგიონში გავრცელებულია *Y. pestis* დამოუკიდებელი წარმოშობისა და გენეტიკურად შორს მდგომი ორი პოპულაცია, subsp. *pestis* bv. *Medievalis* (2MED1) და subsp. *microtus* bv. *Caucasica* (0.PE2). 0.PE2, რომელიც *Y. pestis* SNP ევოლუციური მოდელის უძველესი განშტოებაა და 0.PE7 განშტოებასთან ერთად ყველაზე ახლოს დგას „წინაპარ“ *Y. pseudotuberculosis*-თან. კავკასიაში გავრცელებული ენზოოტიური შტამების წარმოშობა, სავარაუდოდ *Y. pseudotuberculosis* დივერგენციიდან მცირე დროში მოხდა.

შავი ჭირის ბუნებრივი კერების არსებობა საქართველოს ტერიტორიაზე განაპირობებს ბიოლოგიური საფრთხის რისკის ალბათობას. მიუხედავად იმისა, რომ კერებიდან მოპოვებულ მასალაში ახალი შტამების იზოლაცია საკმაოდ დიდი ხნის განმავლობაში აღარ მომხდარა, კერები იმდენად ახლოსაა დასახლებულ ადგილებთან, რომ მათზე კონტროლის შესუსტება არ შეიძლება, რათა კერის გამოღვიძების შემთხვევაში მოხდეს სწრაფი რეაგირება. შავი ჭირის ორივე კერა მოითხოვს სისტემატიურ ეპიდემიოლოგიურ და ეპიზოოტოლოგიურ ზედამხედველობას, რადგან ეპიზოოტიების გავრცელებისას არ არის გამორიცხული ადამიანთა დაავადებაც და კერიდან ინფექციის გატანაც. ამავე დროს მეზობელ სახელმწიფოებიდან, სადაც ეპიზოოტიებია გამოვლენილი (სომხეთში, ყაზახეთში - ბალყარეთში, ყარაჩაი-ჩერქეზეთში, დაღესტანში, სტავროპოლის მხარეში), შესაძლოა ამ ინფექციის შემოტანა.

ამავე დროს არსებობს ბიოლოგიური დივერსიის შესაძლებლობაც, რაც გულისხმობს შავი ჭირის კერებში ეპიდსიტუაციის ხელოვნური გამწვავებას, რასაც მოჰყვება ბიოტერორისტული აქტის ყველა მოსალოდნელი შედეგი. ამიტომაც, ეჭვს არ იწვევს ბუნებრივ კერებში მოცირკულირე შტამების ყოველმხრივი შესწავლისა და კერებზე ზედამხედველობის სისტემის სრულყოფის აუცილებლობა.

2.6. დასკვნები

1. სხვადასხვა მეთოდებით კვლევამ დაადასტურა კავკასიაში *Y. pestis* ორი გენეტიკურად დაშორებული პოპულაციის არსებობა *Y. pestis* subs. *pestis* bv. *Medievalis* და *Y. pestis* subs. *microtus* bv. *Caucasica*
2. საქართველოდან, აზერბაიჯანიდან და ჩრდილოეთ კავკასიიდან იზოლირებული bv. *Medievalis* შტამები გენეტიკურად ახლოს დგანან, როგორც ერთმანეთთან, ასევე თურქეთის ტერიტორიაზე იზოლირებული შტამების მიმართ და განთავსდნენ ტოტზე (2.MED1 IX-X), რომელიც ასახავს *Y. pestis* შტამების ჩინეთიდან თურქეთის მიმართულებით ფილოგეოგრაფიულ გავრცელებას.
3. SNP ტიპირების საფუძველზე ქართული *Y. pestis* შტამები მაღალმთიანი კერიდან, ისევე როგორც სომხეთის ტერიტორიაზე იზოლირებული შტამები, *Y. pestis* გლობალური SNP ფილოგენეტიკური ხის უძველეს განშტოებაზე 0.PE2-ზე განთავსდნენ, წინაპარ *Y. pseudotuberculosis* ყველაზე ახლოს, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ეს შტამები (bv. *Caucasica*), ჩინეთიდან გამოყოფილ შტამებთან (0.PE7 განშტოება) ერთად, მსოფლიოში გავრცელებული *Y. pestis* შტამებიდან ყველაზე ძველ პოპულაციას წარმოადგენენ და, სავარაუდოდ, *Y. pseudotuberculosis* დივერგენციიდან მცირე ხანში წარმოიშვნენ.
4. ქართულმა შტამებმა მაღალმთიანი კერიდან ძლიერი მონომორფულობა გამოავლინეს, რაც, სავარაუდოდ, მიუთითებს ბუნებრივ კერაში პათოგენს, მის რეზერვუარებს და გადამტანებს შორის ბიოცენოზური კავშირების სტაბილიზაციასა და ასევე იმაზე, რომ არ ხდება შტამების აქტიური მიმოცვლა სხვა მოსაზღვრე კერებთან.
5. სრული გენომის სექვენირების საფუძველზე ჩატარებულმა ფილოგენეტიკურმა ანალიზმა აჩვენა, რომ აღმოსავლეთ კავკასიის მაღალმთიანი კერიდან (დაღესტანი) გამოყოფილ bv. *Caucasica* შტამები, სავარაუდოდ, 0.PE2 ტოტის ყველაზე ძველ განშტოებას წარმოადგენენ.

6. კვლევაში გამოყენებული მოლეკულურ გენეტიკური მეთოდებით (PFGE, IS100, SNP, CRISPR) მოხდა შტამებში განსხვავებების გამოვლენა, ბიოვარების დაჯგუფება და რიგ შემთხვევაში ბიოვარების შემდგომი დიფერენცირება. ყველაზე მაღალი გარჩევადობა SNP ტიპირებამ გამოავლინა.
7. სხვადასხვა ჯგუფებს შორის მრავალი განმასხვავებელი SNP იქნა გამოავლენდა, რომლებიც კორელაციაში არიან გეოგრაფიულ ლოკაციასთან და იდეალურ სამიზნეებს წარმოადგენენ ზედამხედველობისთვის ახალი ტესტ სისტემების შესაქმნელად.
8. შემუშავდა და დაინერგა ქართული შტამებისთვის სპეციფიკური SNP გენოტიპირების პანელი, რაც ახალი იზოლატების ზუსტი გენეტიკური დახასიათების საშუალებას იძლევა.
9. მოცემული კვლევაში ნაჩვენები იყო დაუდგენელი წარმოშობის შტამების კონკრეტული გეოგრაფიულ ადგილთან და შიდასახეობრივ ჯგუფთან მიკუთვნების შესაძლებლობა.
10. ოთხი შერჩეული შტამის პროტეომული შესწავლა ასევე ადასტურებს შტამებს შორის განსხვავებებს ცილოვანი მოლეკულების ექსპრესიის დონეზე და დამატებით მიუთითებს მათ სავარაუდოდ განსხვავებულ ვირულენტობაზე.

მოცემული ნაშრომით ნათელი მოეფინა საქართველოსა და კავკასიის რეგიონში გავრცელებულ *Y. pestis* პოპულაციების თავისებურებებს, თუმცა რეგიონის მასშტაბით სრულფასოვანი დასკვნების გამოსატანად მეზობელი ქვეყნების ბუნებრივი კერებიდან უფრო დიდი რაოდენობის შტამების შესწავლაა აუცილებელი.

ყოველივე ზემოთხსენებულის გათვალისწინებით, წარმოდგენილი კვლევის შედეგებს აქვთ როგორც თეორიული, ისე პრაქტიკული მნიშვნელობა. აღნიშნული ნაშრომის ფარგლებში აღწერილი კვლევები ხელს უწყობს ქვეყანაში მიმდინარე შავი ჭირის კერებზე ეპიდზედამხედველობის შესაძლებლობების გაძლიერებასა და პროგრამის კიდევ უფრო ეფექტურ განხორციელებას.

3.1. გამოყენებული ლიტერატურა

1. Abgaryan, G.P., 1966. Characterization of some *Yersinia pestis* strains, which were isolated on Armenian Highland from common voles (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis. All-Union Research Anti-Plague Institute "Microbe," Saratov, USSR).
2. Achtman, M., 2004. Age, descent and genetic diversity within *Yersinia pestis*. *Yersinia: molecular and cellular biology*. Norwich, UK: Horizon Bioscience, p.432.
3. Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A. and Carniel, E., 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), pp.14043-14048.
4. Adair, D.M., Worsham, P.L., Hill, K.K., Klevytska, A.M., Jackson, P.J., Friedlander, A.M. and Keim, P., 2000. Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *Journal of clinical microbiology*, 38(4), pp.1516-1519.
5. Anisimov, A.P., 2002. Factors of *Yersinia pestis* providing circulation and persistence of plague pathogen in ecosystems of natural foci. Communication 2. Molecular Genetics Microbiology and Virology C/C of Molekuliarnaia Genetika Mikrobiologiia I Virusologiia, (5), pp.1-14.
6. Anisimov, A.P., 2002. *Yersinia pestis* factors, assuring circulation and maintenance of the plague pathogen in natural foci ecosystems. Report 1. Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiia i virusologiia, (3), pp.3-23.
7. Anisimov, A.P., Lindler, L.E. and Pier, G.B., 2004. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), pp.434-464.
8. Aparin, G. P. and E. P. Golubinskii. 1989. Plague microbiology. Manual. Irkutsk State University, Irkutsk, USSR.
9. Aparin, G.P. and Golubinskii, E.P., 1989. Plague Microbiology Manual. Irkutsk, USSR: Irkutsk State University.
10. Aparin, G.P., Balakhonov, S.V., Timofeeva, L.A. and Logachev, A.I., 1987. Numerical analysis of the phenotypic properties and total genomic characteristics of strains of

- Yersinia pestis* related to different subspecies. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii, (11), pp.16-20.
11. Bacon, M. and Drake, C.H., 1958. Comparative susceptibility of various species of mice native to Washington to inoculation with virulent strains of *Pasteurella pestis*. The Journal of infectious diseases, pp.14-22.
 12. Bacot, A.W. and Martin, C.J., 1914. LXVII. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. The Journal of hygiene, 13(Suppl), p.423.
 13. Bahmanyar, M., and D. C. Cavanaugh. 1976. Plague manual. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
 14. Bakanidze, L., Imnadze, P., Chubinidze, S., Tsertsvadze, N., Mgeladze, G., Shalutashvili, I., Tsanova, S., Shavishvili, M., Manvelyan, J., Ninashvili, N. and Katsitadze, G., 2010. Surveillance on plague in natural foci in Georgia. In Emerging and Endemic Pathogens (pp. 21-28). Springer, Dordrecht.
 15. Balakhonov, S.V., 1987. Molecular-biological criteria of genome similarity in taxonomy of bacteria from the genus *Yersinia* (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe," Saratov, USSR).
 16. Baltazard, M. and Bahmanyar, M., 1960. Recherches sur la peste à Java. Bulletin of the World Health Organization, 23(2-3), p.217.
 17. Baltazard, M. and Bahmanyar, M., 1960. Recherches sur la peste en Inde. Bulletin of the World Health Organization, 23(2-3), p.169.
 18. Baltazard, M. and Seydian, B., 1960. Enquête sur les conditions de la peste au moyen-orient. Bulletin of the World Health Organization, 23(2-3), p.157.
 19. Baltazard, M., Bahmanyar, M., Mofidi, C. and Seydian, B., 1952. Le foyer de peste du Kurdistan. Bulletin of the World Health Organization, 5(4), p.441.
 20. Barnes, A. M., and T. J. Quan. 1992. Plague, p. 1285–1291. In S. L. Gorbach, J. G. Bartlett, and N. R. Blacklow (ed.), Infectious diseases. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa
 21. Bazanova, L.P., Maevskiĭ, M.P. and Khabarov, A.V., 1997. An experimental study of the possibility for the preservation of the causative agent of plague in the nest substrate of the long-tailed suslik. Meditsinskaia parazitologiya i parazitarnye bolezni, (4), pp.37-39.

22. Bendiner, E. 1989. Alexandre Yersin: pursuer of plague. *Hosp. Pract.* 24:121–124, 127–128, 131–132, 135, 138, 141–142, 147–148.
23. Ben-Gurion, R. and Shafferman, A., 1981. Essential virulence determinants of different *Yersinia* species are carried on a common plasmid. *Plasmid*, 5(2), pp.183-187.
24. Bercovier, H., Mollaret, H.H., Alonso, J.M., Brault, J., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G. and Brenner, D.J., 1980. Intra-and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Current microbiology*, 4(4), pp.225-229.
25. Bergman, T.H.O.M.A.S., Håkansson, S.E.B.A.S.T.I.A.N., Forsberg, A.A.K.E., Norlander, L.E.N.A., Macellaro, A.N.N.A., Bäckman, A.S.S.A.R., Bölin, I.N.G.R.I.D. and Wolf-Watz, H.A.N.S., 1991. Analysis of the V antigen *lcrGVH-yopBD* operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of *LcrH* and *LcrV*. *Journal of bacteriology*, 173(5), pp.1607-1616.
26. Berlin, A.L. and Borzenkov, A.K., 1938. Fermentative characterization of Mongolian *B. pestis* strains. Fermentation of different carbohydrates, alcohols, and glucosides. Attitude of *B. pestis* strains toward glycerol. *Herald Microbiol. Epidemiol. Parasitol*, 17, pp.215-227.
27. Bezsonova, A. A. 1928. About two varieties of *B. pestis*, which can be distinguished while growing on glycerol-containing media. *Herald Microbiol. Epidemiol. Parasitol*. 7:250-253.
28. Biraben, J.-N., and J. Le Goff. 1975. The plague in the early middle ages, p. 48–80. In R. Forster and O. Ranum (ed.), *Biology of man in history*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.
29. Bramanti, B., Stenseth, N.C., Walløe, L. and Lei, X., 2016. Plague: A disease which changed the path of human civilization. In *Yersinia Pestis: Retrospective and Perspective*(pp. 1-26). Springer, Dordrecht.
30. Brubaker, B., 2006. *Yersinia pestis* and bubonic plague. *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, pp.399-442.
31. Brubaker, R. R. 2000. *Yersinia pestis* and bubonic plague. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackelbrandt (ed.), *The prokaryotes: an evolving*

- electronic resource for the microbiological community. [Online.] Springer Verlag, New York, N.Y. <http://www.prokaryotes.com>
32. Brubaker, R.R., 1972. The Genus *Yersinia*: Biochemistry and Genetics of Virulence With 3 Figures. In Current topics in microbiology and immunology (pp. 111-158). Springer, Berlin, Heidelberg.
 33. Brubaker, R.R., 1991. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clinical microbiology reviews*, 4(3), pp.309-324.
 34. Brubaker, R.R., 2016. Physiology of *Yersinia pestis*. In *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective* (pp. 79-99). Springer, Dordrecht.
 35. Burroughs, A.L., 1947. Sylvatic plague studies. The vector efficiency of nine species of fleas compared with *Xenopsylla cheopis*. *Epidemiology & Infection*, 45(3), pp.371-396.
 36. Butler, J., MacCallum, I., Kleber, M., Shlyakhter, I.A., Belmonte, M.K., Lander, E.S., Nusbaum, C. and Jaffe, D.B., 2008. ALLPATHS: de novo assembly of whole-genome shotgun microreads. *Genome research*, 18(5), pp.810-820.
 37. Butler, T. 1983. Plague and other *Yersinia* infections. Plenum Press, New York, N.Y.
 38. Butler, T., 1989. The black death past and present. 1. Plague in the 1980s. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(4), pp.458-460.
 39. Carmichael, A. G. 1990. Plague, p. 166–168. In *Encyclopedia Americana deluxe library edition*, vol. 22. Grolier Inc., Danbury, Conn.
 40. Cavanaugh, D.C., 1971. Specific effect of temperature upon transmission of the plague bacillus by the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 20(2), pp.264-273.
 41. Chain, P.S., Carniel, E., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Stoutland, P.O., Regala, W.M., Georgescu, A.M., Vergez, L.M., Land, M.L., Motin, V.L. and Brubaker, R.R., 2004. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(38), pp.13826-13831.
 42. Chain, P.S., Hu, P., Malfatti, S.A., Radnedge, L., Larimer, F., Vergez, L.M., Worsham, P., Chu, M.C. and Andersen, G.L., 2006. Complete genome sequence of *Yersinia pestis*

- strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. *Journal of bacteriology*, 188(12), pp.4453-4463.
43. Chanteau, S., Ratsifasoamanana, L., Rasoamanana, B., Rahalison, L., Randriambeloso, J., Roux, J. and Rabeson, D., 1998. Plague, a reemerging disease in Madagascar. *Emerging infectious diseases*, 4(1), p.101.
 44. Cherchenko, I.I. and Dyatlov, A.I., 1976. Broader investigation into the external environment of the specific antigen of the infectious agent in epizootiological observation and study of the structure of natural foci of plague. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology*, 20(2), pp.221-228.
 45. Christie, A.B., 1982. Plague: review of ecology. *Ecology of disease*, 1(2-3), pp.111-115.
 46. Chu MC. 2000. Laboratory manual of plague diagnostics. Geneva: US Centers for Disease Control and Prevention and World Health Organization.
 47. Chu, M. C. 2000. Laboratory manual of plague diagnostic tests. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
 48. Conrad, F.G., LeCocq, F.R. and Krain, R., 1968. A recent epidemic of plague in Vietnam. *Archives of internal medicine*, 122(3), pp.193-198.
 49. Crook, L.D. and Tempest, B., 1992. Plague: a clinical review of 27 cases. *Archives of internal medicine*, 152(6), pp.1253-1256.
 50. Cui, Y., Yu, C., Yan, Y., Li, D., Li, Y., Jombart, T., Weinert, L.A., Wang, Z., Guo, Z., Xu, L. and Zhang, Y., 2013. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), pp.577-582.
 51. Deng, W., Burland, V., Plunkett III, G., Boutin, A., Mayhew, G.F., Liss, P., Perna, N.T., Rose, D.J., Mau, B., Zhou, S. and Schwartz, D.C., 2002. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *Journal of bacteriology*, 184(16), pp.4601-4611.
 52. Dennis, D.T., Gage, K.L., Gratz, N.G., Poland, J.D., Tikhomirov, E. and World Health Organization, 1999. Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control(No. WHO/CDS/CSR/EDC/99.2). Geneva: World Health Organization.
 53. Devignat, R., 1951. *Pasteurella pestis*., nouvelle hypotheses. *Bull WHO*, 4, pp.247-263.

54. Diatlov, A.I., Grizhebovski, G.M., Beĭer, A.P. and Briukhanova, G.D., 2001. Activity of the natural foci of plague in the Northern Caucasus in recent years. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, (6 Suppl), pp.61-63.
55. Domaradskii, I. V. 1993. Plague: contemporary state, assumptions, problems. Saratov Medical Institute Press, Saratov, Russia
56. Domaradskii, I. V. 1998. Plague. Meditsina Press, Moscow, Russia.
57. Douglas, J.R. and Wheeler, C.M., 1943. Sylvatic Plague Studies: II. The Fate of *Pasteurella pestis* in the Flea. *The Journal of Infectious Diseases*, pp.18-30.
58. Drancourt, M., Houhamdi, L. and Raoult, D., 2006. *Yersinia pestis* as a telluric, human ectoparasite-borne organism. *The Lancet infectious diseases*, 6(4), pp.234-241.
59. Dubyanskiy, V.M. and Yeszhanov, A.B., 2016. Ecology of *Yersinia pestis* and the Epidemiology of Plague. In *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective* (pp. 101-170). Springer, Dordrecht.
60. Duplaix, N. 1988. Fleas—the lethal leapers. *Natl. Geogr.* 173:672–694.
61. Duplantier, J.M., Duchemin, J.B., Chanteau, S. and Carniel, E., 2005. From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Veterinary research*, 36(3), pp.437-453.
62. Eisen, R.J., Bearden, S.W., Wilder, A.P., Montenieri, J.A., Antolin, M.F. and Gage, K.L., 2006. Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked fleas as a mechanism explaining rapidly spreading plague epizootics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), pp.15380-15385.
63. Erdenebat, A., 2000. Plasmid content of *Yersinia pestis* isolated in Mongolia (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis. Centre for Control and Research of Natural Infectious Diseases, Ulaanbaatar, Mongolia).
64. Ferber, D.M. and Brubaker, R.R., 1981. Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity*, 31(2), p.839.
65. Gage, K. L., S. E. Lance, D. T. Dennis, and J. A. Montenieri. 1992. Human plague in the United States: a review of cases from 1988–1992 with comments on the likelihood of increased plague activity. *Border Epidemiol. Bull.* 19:1–10.

66. Gage, K.L., Dennis, D.T. and Tsai, T.F., 1996. Prevention of plague; recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).
67. Garner, J.S. and Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, 1996. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 17(1), pp.54-80.
68. Golubov, A., Neubauer, H., Nölting, C., Heesemann, J. and Rakin, A., 2004. Structural organization of the pFra virulence-associated plasmid of rhamnose-positive *Yersinia pestis*. *Infection and immunity*, 72(10), pp.5613-5621.
69. Guiyoule, A., B. Rasoamanana, C. Buchrieser, P. Michel, S. Chanteau, and E. Carniel. 1997. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *J. Clin. Microbiol.* 35:2826–2833
70. Guiyoule, A., Grimont, F., Iteman, I., Grimont, P.A., Lefevre, M. and Carniel, E., 1994. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3), pp.634-641.
71. Haffkine, W. M. 1897. Remarks on the plague prophylactic fluid. *Br. Med. J.* 1:1461–1462.
72. Harbeck, M., Seifert, L., Hänsch, S., Wagner, D.M., Birdsell, D., Parise, K.L., Wiechmann, I., Grupe, G., Thomas, A., Keim, P. and Zöller, L., 2013. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6th century AD reveals insights into Justinianic Plague. *PLoS Pathogens*, 9(5), p.e1003349.
73. Hinnebusch, B.J., Rudolph, A.E., Cherepanov, P., Dixon, J.E., Schwan, T.G. and Forsberg, Å., 2002. Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science*, 296(5568), pp.733-735.
74. Historical Estimates of World Population, U.S. Census Bureau
75. Hull, H.F., Montes, J.M. and Mann, J.M., 1987. Septicemic plague in New Mexico. *Journal of Infectious Diseases*, 155(1), pp.113-118.
76. Izoré, T., Perdu, C., Job, V., Attree, I., Faudry, E. and Dessen, A., 2011. Structural characterization and membrane localization of ExsB from the type III secretion system (T3SS) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of molecular biology*, 413(1), pp.236-246.

77. Jackson, S. and Burrows, T.W., 1956. The virulence-enhancing effect of iron on non-pigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *British journal of experimental pathology*, 37(6), p.577.
78. Justinian's Flea
79. Kartman, L. and Quan, S.F., 1964. Notes on the fate of avirulent *Pasteurella pestis* in fleas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(4), pp.363-36
80. Kaufmann, M.E., 1998. Pulsed-field gel electrophoresis. In *Molecular Bacteriology* (pp. 33-50). Humana Press.
81. Keim, P., Van Ert, M.N., Pearson, T., Vogler, A.J., Huynh, L.Y. and Wagner, D.M., 2004. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(3), pp.205-213.
82. Kislichkina, A.A., Bogun, A.G., Kadnikova, L.A., Maiskaya, N.V., Solomentsev, V.I., Platonov, M.E., Dentovskaya, S.V. and Anisimov, A.P., 2017. Eight Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* Isolated from the Common Vole (*Microtus arvalis*) Plague Focus in Dagestan, Russia. *Genome Announc.*, 5(34), pp.e00847-17.
83. Knowlton, K.U., Jeon, E.S., Berkley, N., Wessely, R. and Huber, S., 1996. A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *Journal of Virology*, 70(11), pp.7811-7818.
84. Kortepeter, M.G. and Parker, G.W., 1999. Potential biological weapons threats. *Emerging infectious diseases*, 5(4), p.523.
85. Kukleva, L.M., Protsenko, O.A. and Kutyrev, V.V., 2002. Modern concepts on the relationship between the agents causing plague and pseudotuberculosis. *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiya i virusologiya*, (1), pp.3-7.
86. Kumar, K., Sharma, S.K., Gill, K.S., KATYAL, R., BISWAS, S. and LAL, S., 1997. Entomological and rodent surveillance of suspected plague foci in agro-environmental and feral biotopes of a few districts in Maharashtra and Gujarat states of India. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 50(6), pp.219-226.

87. Le Flèche, P., Fabre, M., Denoeud, F., Koeck, J.L. and Vergnaud, G., 2002. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC microbiology*, 2(1), p.37.
88. Leal-Balbino, T.C., Leal, N.C., Lopes, C.V. and de Almeida, A.M.P., 2004. Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(7), pp.727-732.
89. Li, Y., Dai, E., Cui, Y., Li, M., Zhang, Y., Wu, M., Zhou, D., Guo, Z., Dai, X., Cui, B. and Qi, Z., 2008. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. *PloS one*, 3(5), p.e2166.
90. Lipson, L. G. 1972. Plague in San Francisco in 1900. *Ann. Intern. Med.* 77:303–310.
91. Matson, J.S. and Nilles, M.L., 2001. *LcrG-LcrV* interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *Journal of bacteriology*, 183(17), pp.5082-5091.
92. Mollaret H. 1963. Experimental preservation of plague in soil. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 56:1168–82.
93. Morelli, G., Song, Y., Mazzoni, C.J., Eppinger, M., Roumagnac, P., Wagner, D.M., Feldkamp, M., Kusecek, B., Vogler, A.J., Li, Y. and Cui, Y., 2010. Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of *Yersinia pestis*. *Nature genetics*, 42(12), p.1140.
94. Motin, V.L., Georgescu, A.M., Elliott, J.M., Hu, P., Worsham, P.L., Ott, L.L., Slezak, T.R., Sokhansanj, B.A., Regala, W.M., Brubaker, R.R. and Garcia, E., 2002. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). *Journal of bacteriology*, 184(4), pp.1019-1027.
95. Nakajima, R., Motin, V.L. and Brubaker, R.R., 1995. Suppression of cytokines in mice by protein AV antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infection and Immunity*, 63(8), pp.3021-3029.
96. Naumov, A. V., and L. V. Samoilova (ed.). 1992. Manual on plague prophylaxis. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe,” Saratov, Russia.

97. Nilles, M.L., Fields, K.A. and Straley, S.C., 1998. The V Antigen of *Yersinia pestis* Regulates Yop Vectorial Targeting as Well as Yop Secretion through Effects on YopB and LcrG. *Journal of bacteriology*, 180(13), pp.3410-3420.
98. Nilles, M.L., Williams, A.W., Skrzypek, E. and Straley, S.C., 1997. *Yersinia pestis* *LcrV* forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca²⁺ response. *Journal of Bacteriology*, 179(4), pp.1307-1316.
99. Nozadze, M., Zhgenti, E., Meparishvili, M., Tsverava, L., Kiguradze, T., Chanturia, G., Babuadze, G., Kekelidze, M., Bakanidze, L., Shutkova, T. and Imnadze, P., 2015. Comparative proteomic studies of *Yersinia pestis* strains isolated from natural foci in the republic of Georgia. *Frontiers in public health*, 3, p.239.
100. Ovasapyan, O. V., Shekhikyan, M. T. 1989. Abstr. Regional Sci. Conf. Epidemiol. Microbiol. Immunol. Bacterial Viral Infect., p. 193-195
101. Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T.G., Prentice, M.B., Sebaihia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L. and Baker, S., 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, 413(6855), p.523.
102. Perry, R.D. and Fetherston, J.D., 1997. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clinical microbiology reviews*, 10(1), pp.35-66.
103. Picard, B., 2000. Molecular epidemiology of large bacterial endemics in Sub-Saharan Africa. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990), 93(3), pp.219-223.
104. Poland J.D., Barnes A.M. Plague. In: Steele J.H., editor. *CRC Handbook Series in Zoonoses. Section A. Bacterial, Rickettsial, and Mycotic Diseases. Vol. 1.* CRC Press; Boca Raton, FL, USA: 1979. pp. 515–559.
105. Poland, J. D. T. J. Quan, and A. M. Barnes. 1994. Plague, p. 93–112. In G. W. Beran (ed.), *Handbook of zoonoses. Section A. Bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic*, 2nd ed. CRC Press, Inc., Ann Arbor, Mich.
106. Pollitzer, R., 1954. *Plague*. Geneva: WHO, pp.409-482.
107. Pourcel, C., André-Mazeaud, F., Neubauer, H., Ramisse, F. and Vergnaud, G., 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC microbiology*, 4(1), p.22.

108. Price, S.B., Cowan, C., Perry, R.D. and Straley, S.C., 1991. The *Yersinia pestis* V antigen is a regulatory protein necessary for Ca²⁺ (+)-dependent growth and maximal expression of low-Ca²⁺ response virulence genes. *Journal of bacteriology*, 173(8), pp.2649-2657.
109. Quan, S.F. and Kartman, L., 1962. Ecological studies of wild rodent plague in the San Francisco Bay area of California. VIII. Susceptibility of wild rodents to experimental plague infection. *Zoonoses research*, 1(7), pp.121-44.
110. Radnedge, L., Agron, P.G., Worsham, P.L. and Andersen, G.L., 2002. Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology*, 148(6), pp.1687-1698.
111. Radnedge, L., Gamez-Chin, S., McCready, P.M., Worsham, P.L. and Andersen, G.L., 2001. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8), pp.3759-3762.
112. Rasmussen, S., Allentoft, M., Nielsen, K., Orlando, L., Sikora, M., Pedersen, A., Schubert, M., VanáDam, A., Kapel, C., Avetisyan, P. and Epimakhov, A., 2015. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago. *Cell*, 163(3), pp.571-582.
113. Riedel, S., 2005, April. Plague: from natural disease to bioterrorism. In *Baylor University Medical Center Proceedings*(Vol. 18, No. 2, pp. 116-124). Taylor & Francis.
114. Sander A., Ruess M., Bereswill S., Schuppler M., Steinbrueckner B. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36, № 10. – P. 2973-2981.
115. Schmid, B.V., Büntgen, U., Easterday, W.R., Ginzler, C., Walløe, L., Bramanti, B. and Stenseth, N.C., 2015. Climate-driven introduction of the Black Death and successive plague reintroductions into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(10), pp.3020-3025.
116. Schork, N.J., Fallin, D. and Lanchbury, J.S., 2000. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clinical genetics*, 58(4), pp.250-264.
117. Shangkuan Y.H., Tsao C.M., Lin H.C. Comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates by polymerase chain reaction fingerprinting and ribotyping // *J. Med. Microbiol.* –1997. – Vol. 46, № 11. – P. 941-948.

118. Shen, X., Wang, Q., Xia, L., Zhu, X., Zhang, Z., Liang, Y., Cai, H., Zhang, E., Wei, J., Chen, C. and Song, Z., 2010. Complete genome sequences of *Yersinia pestis* from natural foci in China. *Journal of Bacteriology*, 192(13), pp.3551-3552.
119. Slack, P., 1989. The black death past and present. 2. Some historical problems. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(4), pp.461-463.
120. Stewart, A., Satterfield, B., Cohen, M., O'Neill, K. and Robison, R., 2008. A quadruplex real-time PCR assay for the detection of *Yersinia pestis* and its plasmids. *Journal of medical microbiology*, 57(3), pp.324-331.
121. Sticker, G., 1908. *Abhandlungen aus der Seuchengeschichte und Seuchenlehre. Band I. Die Geschichte der Pest.*
122. Suchkov, I., Mishan'kin, B.N., Vodop'ianov, S.O., Smolikova, L.M. and Shishiiianu, M.V., 2002. Genotyping of *Yersinia pestis*: variability of locus (CAAA)_n in natural strains isolated in territory of former SSSR. *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiia i virusologiia*, (4), pp.18-21.
123. Tsereteli, D., L. Bakanidze, I. Velijanashvili, L. Beridze, M. Manrikyan, M. Shakhikyan, M. Kekelidze, E. Zangaladze, N. Tsertsvadze, and P. Imnadze. 2002. Plague in Southern Caucasus. *Antibiot. Monitor* 18:14-16
124. Une, T., 1977. Studies on the Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology and immunology*, 21(7), pp.349-363.
125. von Reyn, C.F., Weber, N.S., Tempest, B., Barnes, A.M., Poland, J.D., Boyce, J.M. and Zalma, V., 1977. Epidemiologic and clinical features of an outbreak of bubonic plague in New Mexico. *Journal of Infectious Diseases*, 136(4), pp.489-494.
126. Wagner, D.M., Klunk, J., Harbeck, M., Devault, A., Waglechner, N., Sahl, J.W., Enk, J., Birdsell, D.N., Kuch, M., Lumibao, C. and Poinar, D., 2014. *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *The Lancet infectious diseases*, 14(4), pp.319-326.
127. Wigglesworth, V. B. 1984. *Insect physiology*, p. 54–68, Chapman & Hall, New York.
128. Williamson, E.D., 2001. Plague vaccine research and development. *Journal of applied microbiology*, 91(4), pp.606-608.

129. World Health Organization, 2008. Interregional meeting on prevention and control of plague. Antananarivo, Madagascar: World Health Organization, pp.9-10.
130. World Health Organization, 2010. Operational guidelines on plague surveillance, diagnosis, prevention and control.
131. Worsham, P.L. and Hunter, M., 1998. Characterization of Pestoides F, an atypical strain of *Yersinia pestis*. *Med. Microbiol*, 6(Suppl II), pp.34-35.
132. Worsham, P.L. and Roy, C., 2004. Pestoides F, a *Yersinia pestis* strain lacking plasminogen activator, is virulent by the aerosol route. In *The Genus Yersinia* (pp. 129-131).
133. Zerbino, D.R. and Birney, E., 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), pp.821-829.
134. Zhgenti, E., Hu, P., Chanturia, G., Tsereteli, D., Kekelidze, M., Chubinidze, S., Zangaladze, E., Imnadze, P., Andersen, G. and Torok, T., 2018. Investigation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains from Georgia and neighboring countries in the Caucasus by high-density SNP microarray. *Archives of microbiology*, 200(9), pp.1345-1355.
135. Zhgenti, E., Johnson, S.L., Davenport, K.W., Chanturia, G., Daligault, H.E., Chain, P.S. and Nikolich, M.P., 2015. Genome assemblies for 11 *Yersinia pestis* strains isolated in the Caucasus region. *Genome Announc.*, 3(5), pp.e01030-15.
136. Филиппов А.А. Мобильные генетические элементы патогенных иерсиний: Дисс.. д-ра. мед. наук. Саратов, 2001. – 370 с.
137. ზუბინიძე, ს., 2011. საქართველოს ტერიტორიაზე არსებული შავი ჭირის ბუნებრივი კერების ეპიზოოტიური აქტივობა (Doctoral dissertation, ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი)

3.2. პუბლიკაციები

Zhgenti, E., Hu, P., Chanturia, G., Tsereteli, D., Kekelidze, M., Chubinidze, S., Zangaladze, E., Imnadze, P., Andersen, G. and Torok, T., 2018. Investigation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains from Georgia and neighboring countries in the Caucasus by high-density SNP microarray. Archives of microbiology, 200(9), pp.1345-1355.

Nozadze, M., Zhgenti, E., Meparishvili, M., Tsverava, L., Kiguradze, T., Chanturia, G., Babuadze, G., Kekelidze, M., Bakanidze, L., Shutkova, T. and Imnadze, P., 2015. Comparative proteomic studies of *Yersinia pestis* strains isolated from natural foci in the republic of Georgia. Frontiers in public health, 3, p.239.

Zhgenti, E., Johnson, S.L., Davenport, K.W., Chanturia, G., Daligault, H.E., Chain, P.S. and Nikolich, M.P., 2015. Genome assemblies for 11 *Yersinia pestis* strains isolated in the Caucasus region. Genome Announc., 3(5), pp.e01030-15.

3.3. დანართები

დანართი 1. კვლევაში გამოყენებული დეკსეც-ის კოლექციაში არსებული *Y. pestis* შტამების მახასიათებლები

შტამის N	იზოლაციის წელი	ქვესახეობა ბიოვარი	SNP	პლაზმიდური სპექტრი	CRISPR (YP1, YP2, YP3)	PFGE _{SpeI}	PFGE _{XbaI}	გამოყოფის წყარო	გამოყოფის ადგილი
#771	1966	subsp. <i>pestis</i> . bv. <i>Medievalis</i>	2MED1	-	YP1 – a1b1c1, YP2– a2b2c2d2 YP3– a3b3c3	Spe I I I	Xba I I I	<i>Meriones libicus</i>	აღმოსავლეთ საქართველოს ვაკე-მთისწინა კერა,
#1390	1979	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1391	1979	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1–a1b1c1d1e1m1n1 YP2– a2j2b2k2l2m2 YP3– a3b3c3d3e3	Spe I ა	Xba I ა	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1392	1979	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1393	1979	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1412	1979	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1–a1b1c1d1e1m1n1 YP2– a2j2b2k2l2m2 YP3– a3b3c3d3e3	Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1413	1979	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1–a1b1c1d1e1m1n1 YP2– a2j2b2k2l2m2 YP3– a3b3c3d3e3	Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1670	1979	subsp. <i>Microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1–a1b1c1d1e1m1n1 YP2– a2j2b2k2l2m2 YP3– a3b3c3d3e3	Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1851	1980	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I გ	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1852	1980	subsp. <i>Microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1853	1980	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1952	1980	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა

#1953	1980	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#1954	1980	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#2095	1981	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1-a1b1c1d1e1m1n1 YP2- a2j2b2k2l2m2 YP3- a3b3c3d3e3	Spe I ა	Xba I ა	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3064	1982	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3065	1982	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3066	1982	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ბ	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3067	1982	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1-a1b1c1d1e1m1n1 YP2- a2j2b2k2l2m2 YP3- a3b3c3d3e3	Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3072	1982	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1-a1b1c1d1e1m1n1 YP2- a2j2b2k2l2m2 YP3- a3b3c3d3e3	Spe I ბ	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3073	1982	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3082	1982	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3083	1982	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3757	1983	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3758	1983	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I გ	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3768	1983	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ბ	Xba I ა	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3769	1983	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#3770	1983	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1-a1b1c1d1e1m1n1 YP2- a2j2b2k2l2m2 YP3- a3b3c3d3e3	Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8786	1992	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1-a1b1c1d1e1m1n1 YP2- a2j2b2k2l2m2 YP3- a3b3c3d3e3	Spe I ა	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8787	1992	subsp. <i>Microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD	YP1-a1b1c1d1e1m1n1 YP2- a2j2b2k2l2m2 YP3- a3b3c3d3e3	Spe I ბ	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა

#8788	1992	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8789	1992	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ბ	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8790	1992	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8791	1992	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Microtus arvalis</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8792	1992	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8793	1992	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8794	1992	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8906	1997	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Cer. caspius</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8907	1997	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD		Spe I ა	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#8908	1997	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2b	pMT, pPCD, pMT		Spe I დ	Xba I ა	<i>Ct. teres</i>	სამხრეთ საქართველოს მაღალმთიანი კერა
#790	1961	subsp. <i>pestis</i> . bv. <i>Antiqua</i>	0.ANT3	pMT/pPCD, pPCP	YP1-a1b1c1d1e1f1g1 YP2-a2b2c2d2 YP3 a3b3c3	Spe VI	Xba VI	red marmot	ყირგიზეთი, ალაის მაღალმთიანი კერა
#2944	1975	subsp. <i>pestis</i> . bv. <i>Medievalis</i>	2MED1, IX-X	pMT, pPCD, pPCP	YP1 – a1b1c1, YP2-a2b2c2d2 YP3 a3b3c3	Spe V	Xba V	<i>Citellus musicus</i> ,	რუსეთი, ყაზარდო-ბალყარეთი, ცენტრალური კავკასიის მაღალმთიანი კერა
#2619	1975	subsp. <i>pestis</i> . bv. <i>Medievalis</i>	2MED1, IX-X	pMT, pPCD, pPCP	YP1 – a1b1c1, YP2-a2b2c2d2 YP3 a3b3c3	Spe V	Xba V	<i>N. setosa</i>	რუსეთი, დაღესტანს ვაკე-მთისწინა კერა,
#1045	1976	subsp. <i>pestis</i> . bv. <i>Medievalis</i>	2MED1, IX-X	pMT, pPCD, pPCP	YP1 – a1b1c1, YP2-a2b2c2d2 YP3 a3b3c3	Spe IV	Xba IV	<i>Meriones libicus</i>	აზერბაიჯანი, გობუსტანის ვაკე-მთისწინა კერა
#14735	1975	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2a	pPCD, pMT	YP1-a1b1c1d1e1m1 YP2- a2j2b2k2l2m2 YP3- a3b3c3d3e3	Spe I I ა	Xba I I	<i>Microtus arvalis</i>	სომხეთი, ზანგეზურო-ყარაბაღის მთის კერა
#1522	1975	subsp. <i>microtus</i> bv. <i>Caucasica</i>	0.PE2a	pPCD, pMT	YP1-a1b1c1d1e1m1 YP2- a2j2b2k2l2m2 YP3- a3b3c3d3e3	Spe I I ბ	Xba I I	<i>Microtus arvalis</i>	სომხეთი, გიუმრის (ყოფილი ლენინაკანის) მაღალმთიანი კერა

დანართი 2. პჯრ დაფუძნებულ SNP ტიპირებისთვის გამოყენებული SNP-ები.

SNP	CO92 პოზიცია	განშტოება	Anc/Der
s20*	179896	VIII-2.MED3.a	C/A
s22**	946150	IX-X	C/A
s24*	1586141	IX-X	C/T
s27***	699469	ROOT-0.PE2a	C/T
s28***	2575107	ROOT-0.PE2a	T/-
s29*	2451797	ROOT-0.PE2b	G/A
s30*	3752261	ROOT -0.PE1	G/A
s31*	3739257	ROOT-0.PE2a	G/T
s85*	1450348	VI-III	G/A
s237***	139466	ROOT-0.PE2a	G/A
s266***	766027	ROOT-0.PE2a	C/T
s275**	1040338	IX-X	A/T
s314***	2031718	ROOT-0.PE2a	C/A
s345**	2918692	IX-X	G/A
s385**	3869550	IX-X	C/A
s369***	3431905	ROOT-0.PE2a	G/A
s453***	333394	ROOT-0.PE2a	T/G
s576**	1356492	IX-X	G/A
s616***	1755324	ROOT-0.PE2a	T/G
s650**	2025677	IX-X	G/T
s736***	2679056	ROOT-0.PE2a	G/A
s787**	3030163	IX-X	C/T
s796**	3074598	IX-X	G/A
s827***	3282808	ROOT-0.PE2a	C/A
s861**	3470222	IX-X	G/A
s869**	3551475	IX-X	C/T
s875**	3596834	IX-X	C/T
s905**	3833893	IX-X	C/A
s942***	4152231	ROOT-0.PE2a	T/C
s957**	4258899	IX-X	C/T
s992**	4630765	IX-X	G/C

s1073***	1105812	ROOT-0.PE2a	C/T
s1080**	1261149	IX-X	C/T
s1133**	1996390	IX-X	C/T
s1226**	3342989	IX-X	C/T
s1238**	3448819	IX-X	G/C
s1260**	3805148	IX-X	C/A
s1323**	449523	IX-X	C/A
s1358**	4403326	IX-X	A/G

*-canSNP-გბო, **bv. Medievalis SNP-გბო, ***Pestoides SNP-გბო