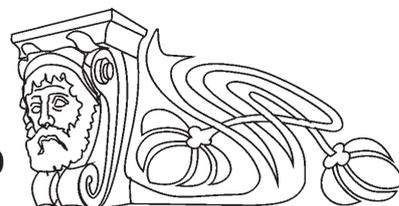




Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 437–446
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 437–446
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-437-446>, EDN: PYHRCY

Научная статья
УДК 616.98:579.842.23

Молекулярно-генетический анализ штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в различные эпизоотические периоды на территории Урало-Эмбенского пустынного природного очага чумы в XX веке



А. В. Коврижников , А. Н. Балыкова, Л. М. Куклева, Е. А. Нарышкина,
А. В. Федоров, Н. С. Червякова, Г. А. Ерошенко, В. В. Кутырев

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Россия, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

Коврижников Александр Викторович, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии, alexander.kovrizhnikov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>

Балыкова Алина Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, alinabalnik@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>

Куклева Любовь Михайловна, кандидат биологических наук, старший сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>

Нарышкина Екатерина Александровна, научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>

Федоров Андрей Витальевич, младший научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Червякова Надежда Сергеевна, кандидат биологических наук, старший сотрудник отдела «Государственная коллекция патогенных бактерий», rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>

Ерошенко Галина Александровна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Кутырев Владимир Викторович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Аннотация. Проведен молекулярно-генетический анализ штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в различные эпизоотические периоды на территории Урало-Эмбенского пустынного природного очага чумы в XX в. В работе изучено 24 штамма *Y. pestis*, выделенных на территории данного очага с 1945–1991 гг., а также 21 штамм *Y. pestis* с сопредельных территорий. Все исследованные штаммы из Урало-Эмбенского природного очага чумы относились к высоковирулентному и эпидемически значимому средневековому биовару основного подвида *Y. pestis*. По результатам WG-SNP-анализа и последующей филогенетической реконструкции на основе 1353 SNPs методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, модель GTR) выявлено 6 ключевых филопопуляций, в которые вошли штаммы, изолированные в различные периоды эпидемической и эпизоотической активности на исследуемой территории. Установлено, что на территории Урало-Эмбенского природного очага происходило три волны распространения ветви 2.MED1 средневекового биовара: 1) штаммы, выделенные до 1945 г., которые относились к первой волне распространения ветви 2.MED1 на территорию очагов Северного Прикаспия; 2) штаммы, периода 1968–1974 гг., которые имеют близкое генетическое родство со штаммами из Мангышлакского (1978 г.) и Устюртского пустынных очагов чумы (1962 и 1975 гг.); 3) штаммы, которые начали выделяться после 1966 г. и были генетическими потомками волны распространения ветви 2.MED1 из очагов Северного Приаралья (1945 г.) после межэпизоотического периода. Полученные данные будут использованы для молекулярно-генетической детализации паспортизации очагов, в которых циркулирует этот высоковирулентный средневековый биовар *Y. pestis*. Они важны для определения закономерностей пространственно-временного распространения высоковирулентных штаммов линии 2.MED1 средневекового биовара в XX в. и для долгосрочного прогнозирования эпизоотической активности очагов чумы Северо-Восточного Прикаспия в текущем XXI в.

Ключевые слова: чума, *Yersinia pestis*, SNPs, филогения, природные очаги

Для цитирования: Коврижников А. В., Балыкова А. Н., Куклева Л. М., Нарышкина Е. А., Федоров А. В., Червякова Н. С., Ерошенко Г. А., Кутырев В. В. Молекулярно-генетический анализ штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в различные эпизоотические периоды на территории Урало-Эмбенского пустынного природного очага чумы в XX веке // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 437–446. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-437-446>, EDN: PYHRCY

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)



Article

Molecular genetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated in different epizootic periods on the territory of the Ural-Embensky desert natural plague focus area in the twentieth century

A. V. Kovrizhnikov ✉, A. N. Balykova, L. M. Kukleva, E. A. Naryshkina,
A. V. Fedorov, N. S. Chervyakova, G. A. Eroshenko, V. V. Kutyrev

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russia

Aleksandr V. Kovrizhnikov, alexander.kovrizhnikov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>

Alina N. Balykova, <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>

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

Naryshkina A. Ekaterina, <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>

Andrey V. Fedorov, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Nadezhda S. Chervyakova, <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>

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

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

Abstract. We performed a molecular genetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated in the Ural-Embensky desert natural plague focus area in the twentieth century. We studied 24 strains of *Y. pestis* isolated on this territory since 1945 to 1991, as well as 21 strains of *Y. pestis* from adjacent territories. All of the strains studied from the Ural-Embensky natural focus of plague belonged to the highly virulent and epidemically significant medieval biovar of the main subspecies *Y. pestis*. According to the results of the WG-SNP analysis and subsequent phylogenetic reconstruction based on 1353 SNPs, the maximum likelihood method (Maximum Likelihood, GTR model) revealed 6 key phylopopulations, which included strains isolated during different periods of epidemic and epizootic activity in the study area. It has been established that there were three waves of spread of the 2.MED1 branch of the medieval biovar to the territory of Ural-Embensky desert natural plague focus. Strains isolated before 1945 belong to the first wave of spread of the 2.MED1 branch to the territory of the Northern Caspian Region. The second wave is considered to be the 1968–1974 strains. They have close genetic similarities with strains from the Mangyshlak (1978) and Ustyurt desert plague foci (1962 and 1975). The third wave includes strains isolated after 1966. They are genetically close to the strains from the North Aral foci (1945). The data obtained will be used for molecular-genetic detailing of the certification of foci in which this highly virulent medieval *Y. pestis* biovar circulates. They are important for determining the patterns of spatiotemporal distribution of highly virulent strains of the 2.MED1 branch of the medieval biovar in the 20th century and for long-term forecasting of the epizootic activity of plague foci in the North-Eastern Caspian region in the current 21st century.

Key words: plague, *Yersinia pestis*, SNPs, phylogeny, natural foci

For citation: Kovrizhnikov A. V., Balykova A. N., Kukleva L. M., Naryshkina E. A., Fedorov A. V., Chervyakova N. S., Eroshenko G. A., Kutyrev V. V. Molecular genetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated in different epizootic periods on the territory of the Ural-Embensky desert natural plague focus area in the twentieth century. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 437–446 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-437-446>, EDN: PYHRCY

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Урало-Эмбенский пустынный природный очаг чумы (УЭППО) (№18) расположен на территории Атырауской и Западно-Казахстанской областей Казахстана в пределах Северо-Восточного Прикаспия и занимает 57700 кв. км [1]. Значительная часть УЭППО находится на Прикаспийской низменности и входит в состав Среднеазиатского пустынного природного очага чумы. Впервые эпизоотии чумы на данной территории были зарегистрированы в 1951 г., повышенная эпизоотическая активность отмечалась в 1970–1973, 1975, 1978–1979, 1982, 1984–1987, 1989–1990 гг. [2]. В соответствии с отмечаемой ранее тенденцией развития межэпизоотических периодов в пустынных очагах чумы России и Казахстана, с 1995 г. эпизоотическая активность в УЭППО значительно снизилась. Очаг разделен

на 8 ландшафтно-экологических районов (ЛЭР), индекс эпизоотической активности которых варьирует от 0,34 до 0,86 [3]. На территории Атырауской области заболеваемость чумой человека регистрировалась в 1955 г. (летальный случай, бубонная форма), в 1958 г. (4 случая бубонной формы), в 1961 г. (летальный случай, септическая форма), в 1968 г. (1 случай бубонной формы). С 1964 г. проводится истребление песчанок и уничтожение их блох, что способствует снижению эпизоотической активности очага. В современных границах очага последняя эпизоотия отмечалась в 2002 г. [4].

Основным носителем в очаге является большая песчанка (*Rhombomys opimus*), которая в середине прошлого века начала активно расширять свой ареал обитания на север, за счет чего произошло расширение границ УЭППО.



Кроме большой песчанки, носителями также являются малый суслик (*Spermophilus pygmaeus*), полуденная песчанка (*Meriones meridianus*) и еще более 20 видов мелких млекопитающих [3, 4]. В качестве основного переносчика выступает паразит большой песчанки – блоха *Xenopsylla skrjabini*. Кроме *X. skrjabini* переносчиками являются также *Nosopsyllus laeviceps*, *Coptopsylla lamellifer* и еще более 10 видов блох. Таким образом, УЭППО характеризуется как полигостальностью, так и поливекторностью. Особенностью Урало-Эмбенского пустынного очага чумы является повышение эпизоотической активности в летний период, в отличие от других очагов песчаночьевого типа, с преимущественным повышением эпизоотической активности в весенний и осенний периоды [4].

По данным молекулярно-генетического и биохимического анализов, на территории УЭППО циркулируют высоковирулентные лейциннезависимые штаммы, относящиеся к средневековому биовару филогенетической ветви 2.MED1. Несмотря на имеющиеся данные по фенотипическим и молекулярно-генетическим характеристикам возбудителя чумы из очагов Северного и Восточного Прикаспия, малоизученными остаются особенности организации генома средневекового биовара разных периодов активности УЭППО, отсутствуют данные о причинах активизации этого очага после межэпизоотического периода середины XX в. [5]. Также не проводилась филогенетическая реконструкция штаммов *Yersinia pestis* в целях определения генетического родства с популяциями *Y. pestis* из сопредельных очагов чумы, что важно для выяснения пространственно-временных закономерностей циркуляции возбудителя чумы в этом регионе. Наличие протяженных границ и развитие торгово-экономические отношения создают предпосылки для заноса эпидемически опасных штаммов возбудителя чумы на территорию России. В связи с этим возникает необходимость тщательного изучения молекулярно-генетических характеристик популяций *Y. pestis*, циркулирующих на этих территориях, для совершенствования методов дифференциации и отслеживания эпидемических штаммов возбудителя чумы.

С учетом активных экономических связей между Россией и Казахстаном, а также для детализации молекулярно-генетической паспортизации этого региона, повышения эффективности мониторинга и прогнозирования активизации

сопредельных с границами России природных очагов чумы целью данной работы стал анализ пространственно-временной циркуляции *Yersinia pestis* на территории УЭППО в XX в. на основе молекулярно-генетических данных.

Материалы и методы

Исследовано 24 штамма *Y. pestis*, выделенных от носителей и переносчиков на территории УЭППО с 1945 по 1990 гг. в различные периоды эпизоотической активности, 21 штамм *Y. pestis* с сопредельных территорий аналогичного периода, а также 8 штаммов из разных очагов мира, относящихся к разным филогенетическим линиям. Штаммы *Y. pestis* выращивали при температуре 28 °С в течение 24–48 ч на среде LB. Анализ биохимических свойств исследуемых штаммов проводили в соответствии со стандартными методами лабораторной диагностики возбудителя чумы. Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* проводили с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Высокопроизводительное секвенирование проводили по технологии Ion Torrent на платформе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США). Для первичной подготовки библиотеки фрагментов использовались наборы Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit and Ion Xpress™ Barcode Adapter 1–96 Kit. Для автоматической подготовки матрицы использовались Ion Chef System, а также Ion 510™ & 520™ & Ion 530™ Chip Kit. Контроль качества полученных прочтений проводили в программе FastQC v0.11.9. Для обработки данных и сборки необработанных коротких прочтений генома *de novo* использовали Ion Torrent Suite software package 5.12, Newbler gsAssembler 2.6, Unicycler v0.4.9 [6, 7]. Определение и анализ VNTR и CRISPR-локусов осуществляли с помощью авторских программ на языке программирования python v3.10 (модули библиотек pandas, Biopython [8]). Однонуклеотидные полиморфизмы выявляли путем выравнивания контигов на штамм CO92 (NCBI AL590842.1) с помощью программы snippy 4.6 с последующим удалением 28 гомоплазий [9–11]. Филогенетическую реконструкцию на основе 1353 SNPs, идентифицированных в коровом геноме 53 штамма *Y. pestis*, осуществляли методом Maximum Likelihood (модель нуклеотидных замен GTR, 500 бутстреп-реплик) [12] с использованием программы gubbins 3.3 [13]. Средний размер собранных геномов составил ~4,5 м.п.н., средняя глубина покрытия была 50×, среднее содержание %GC равнялось 47,5%.



Результаты и их обсуждение

В данной работе изучено 24 штамма *Y. pestis*, выделенных от носителей и переносчиков на территории УЭППО с 1945 по 1990 гг. в различные периоды эпизоотической активности и 22 штамма с сопредельных территорий, в том числе 6 штаммов из Волго-Уральского степного очага чумы (№15), 6 штаммов из Волго-Уральского песчаного очага чумы (№ 16), 3 штамма из Урало-Уильского степного очага чумы (№ 17), 2 штамма из Предустюртского пустынного очага чумы (№ 19) и 4 штамма из очагов Северного Приаралья. Штаммы были получены от человека (6), от верблюда (2), от *S. pygmaeus* (3), от *R. opimus* (16), от *M. tamariscinus* (1), от *M. meridianus* (3), от *C. laeviceps* (2), от клещей без определения (2), от *N. setosa* (1), от блох без определения (3), от *X. scirjabini* (3).

Анализ биохимических свойств показал, что все исследованные штаммы обладали типичным фенотипом средневекового биовара основного подвида возбудителя чумы: ферментировали глицерин и арабинозу и были негативны по редукции нитратов и утилизации рамнозы.

На первом этапе нами был проведен анализ VNTR-локусов 24 штаммов *Y. pestis* из УЭППО для оценки разнообразия генотипов и вариабельности локусов. Наиболее вариабельными оказались локусы ms46 (7 аллелей) и ms62 (6 аллелей). В число вариабельных локусов также вошли ms56, ms70, ms71 и ms74, представленные в трех различных аллелях. Дискриминационный индекс Симпсона составил 0.948, что свидетельствует о высокой разрешающей способности данных локусов для дифференцирования популяций возбудителя чумы с исследуемой территории. Также нами было проведено сравнение CRISPR-элементов, которые отвечают за иммунную систему бактерий и могут сохранять в себе информацию о прошлых интервенциях фагов. Сравнение проводилось по трем CRISPR-локусам: YPa, YPb и YPc. Внутри очага никаких отличий выявлено не было. Размер YPa составил 305 п.н., размер YPc – 321 п.н., следует отметить, что локус YPb отсутствовал у всех штаммов из этого очага.

Для проведения филогенетической реконструкции использовались 45 штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории природных очагов чумы Северо-Восточного Прикаспия за период 1925–1990 гг. Полногеномное секвенирование проводилось для 22 штаммов

из УЭППО, остальные были секвенированы нами ранее. Также в качестве аутгрупп использовались 8 штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI Genbank: Pestoides A (0.PE4a, NZ_ACNT00000000), Pestoides F (0.PE2, NC_009381), 620024 (0.PE7, ADPM00000000), CO92 (1.ORI1, AL590842.1), 351001 (2.ANT2, ADPF00000000), 91 (2.MED2, ADPU00000000), CMCC125002 (2.MED3, ADQN00000000), C-627 (2.MED0, MBSI00000000.1).

Дендрограмма построена методом WG-SNP-анализа на основе 1353 SNPs, обнаруженных в коровом геноме 53 штаммов *Y. pestis* (рисунок). Данные об аутгруппах на дендрограмме не приводятся для улучшения визуального разрешения филогенетического дерева.

По данным молекулярно-генетического анализа и филогенетической реконструкции все изученные штаммы средневекового биовара представлены 5 филогенетическими ветвями: 2.MED0 (Центрально-Кавказский высокогорный очаг чумы), 2.MED2 и 2.MED3 (Китай), недавно выявленная ветвь 2.MED4, которая по данным ретроспективного анализа существовала в Северном Прикаспии в первой половине XX в. Штаммы из очагов Северо-Восточного Прикаспия, выделенные в период 1945–1990 гг., вошли в наиболее молодую ветвь средневекового биовара 2.MED1, которая получила широкое территориальное распространение в очагах чумы Восточной Европы и Центральной Азии (см. рисунок).

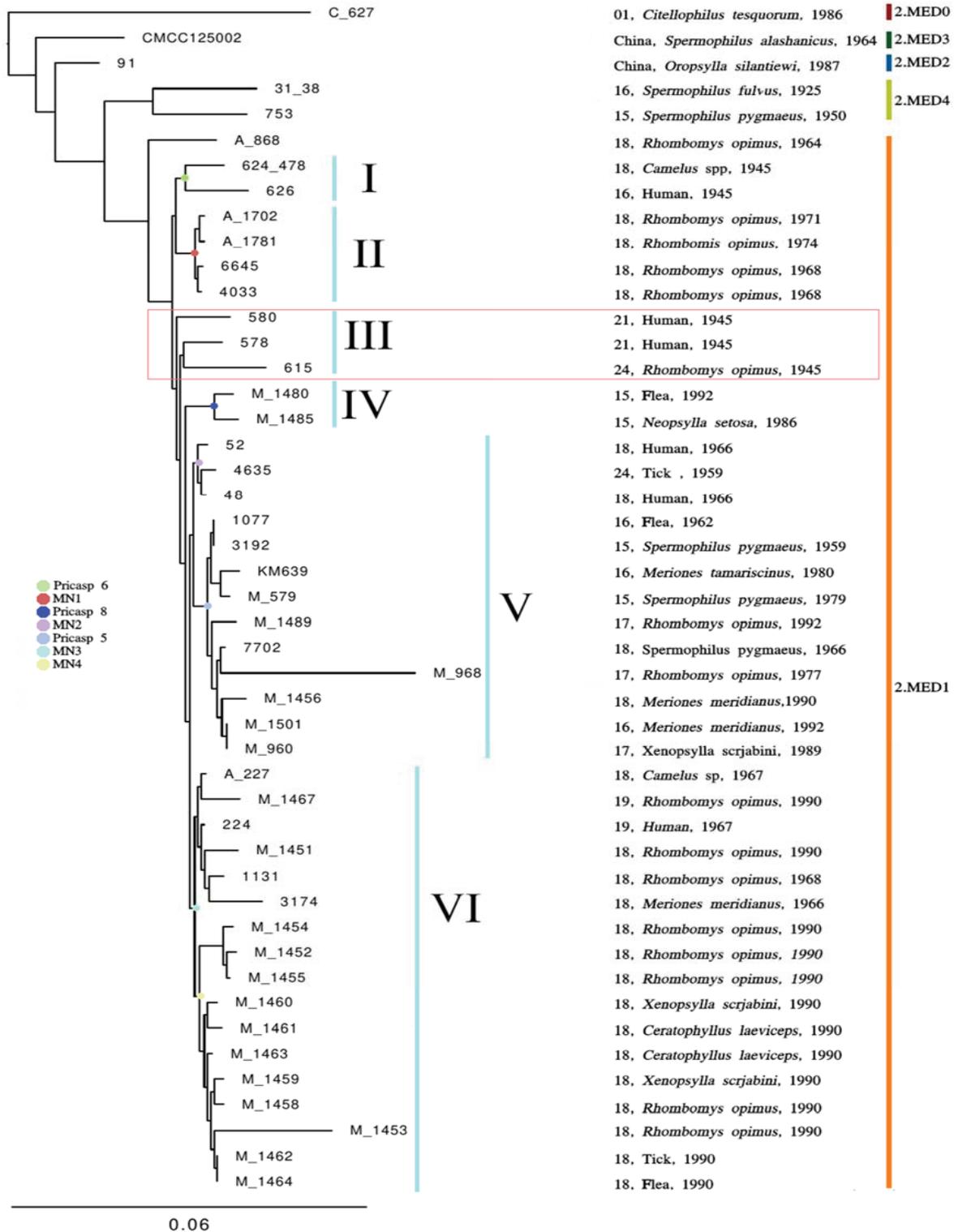
По итогам проведенного филогенетического анализа установлена популяционная структура *Y. pestis* средневекового биовара в УЭППО и сопредельных очагах чумы и выявлено 6 филогрупп, показывающих генетическое родство популяций на территории Северо-Восточного Прикаспия. Первая филогруппа включает в себя два штамма, выделенных в одном году из УЭППО и Волго-Уральского песчаного природного очагов чумы (ВУППО), относящихся к ветви 2.MED1. Данная филогруппа относится к охарактеризованному нами ранее SNP-генотипу Pricasp 6 [14]. Учитывая, что УЭППО и ВУППО являются граничащими между собой очагами, а в 1945–1946 гг. в этом регионе отмечалась крупная эпизоотия, соотносящаяся с первой волной распространения штаммов 2.MED1 на территории Северного Прикаспия [4], можно сделать предположение, что появление этого геноварианта в УЭППО произошло вследствие заноса из ВУППО.



Таблица 1 / Table 1

Штаммы *Y. pestis* из Урало-Эмбенского пустынный очага чумы, использованные в работе
***Y. pestis* strains from the Ural- Embensky desert plague focus used in this work**

Штамм Strain	Объект выделения Object of isolation	Место выделения Place of isolation
624(478)	<i>Camelus</i> species, 1945 г.	Казахстан, Атырауская обл. Kazakhstan, Atyrau region
7702	<i>Spermophilus pygmaeus</i> , 1966 г.	Казахстан, Атырауская обл., лев. бер. р. Урала, 300 с-в г. Гурьева Kazakhstan, Atyrau region, left bank of the Ural River, 300 s. to the town of Guriev
3174	<i>Meriones meridianus</i> , 1966 г.	Казахстан, Атырауская обл., лев. бер. р. Урала Kazakhstan, Atyrau region, left bank of the Ural River
48	Человек / Human, 1966 г.	Казахстан, Актюбинская обл. Kazakhstan, Aktobe region
52	Человек / Human, 1966 г.	Казахстан, Актюбинская обл. Kazakhstan, Aktobe Oblas.
A-227	<i>Camelus</i> species, 1967 г.	Казахстан, Атырауская обл., Жылыойский р-н, г. Кульсары. Kazakhstan, Atyrau region, Zhylyojskij district, Kulsary city
1131	<i>Rhombomys opimus</i> , 1968 г.	Казахстан, Атырауская обл., лев. бер. р. Урала Kazakhstan, Atyrau region, left bank of the Ural River
4033	<i>Rhombomys opimus</i> , 1968 г.	Казахстан, 19 км от Мунайлинского р-на Kazakhstan, 19 km from the Munaylinskiy district
6645	Блоха без определения / Flea without identification, 1968 г.	Казахстан, 21 км от Мунайлинского р-на Kazakhstan, 21 km from the Munaylinskiy district
A-1702	<i>Rhombomys opimus</i> , 1971 г.	Казахстан Kazakhstan
A-1781	<i>Rhombomys opimus</i> , 1974 г.	Казахстан, Пески Сам, Мангистауская обл. Kazakhstan, Peski Sam, Mangistau region
M-1451	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Макатский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makatsk district
M-1452	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Макатский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makatsk district
M-1453	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1454	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Макатский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makatsk district
M-1455	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Макатский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makatsk district
M-1456	<i>Meriones meridianus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл. Kazakhstan, Atyrau region
M-1458	<i>Rhombomys opimus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1459	<i>Xenopsylla skrjabini</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1460	<i>Xenopsylla skrjabini</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1461	<i>Ceratophyllus laeviceps</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1462	<i>Haemophilus</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1463	<i>Ceratophyllus laeviceps</i> , 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district
M-1464	Блоха без определения / Flea without identification, 1990 г.	Казахстан, Атырауская обл., Махамбетский р-н Kazakhstan, Atyrau region, Makhambet district



Филогенетический анализ 53 штаммов *Yersinia pestis* из Урало-Эмбенского пустынного очага чумы и сопредельных территорий по данным полногеномного секвенирования. Дендрограмма Maximum Likelihood построена на основе выявленных в коровом геноме 1353 SNPs с использованием модели GTR с 500 bootstrap-подкреплением. SNPs в узлах MN1–MN4 (MN – medieval node) приведены в табл. 2. I–VI – выделенные филогруппы, описываемые в тексте.

Красной рамкой отмечена группа штаммов из очагов Северного Приаралья (цвет онлайн)

Figure. Phylogenetic analysis of 53 strains of *Yersinia pestis* from the Ural-Embensky desert plague focus and adjacent territories by whole genome sequencing. The Maximum Likelihood dendrogram is based on 1353 SNPs identified in the core genome (GTR model) with 500 bootstrap replications. SNPs in nodes MN1–4 (MN – medieval node) are presented in the Table 2. I–VI – phyllogroups described in the article. A group of strains from North Aral foci is marked with a red frame (color online)



Вторая филогруппа включает в себя 4 штамма, выделенных в период с 1968–1974 в УЭППО. Они подразделяются на два кластера. Все штаммы этой филогруппы относятся к ветви 2.MED1. Они выделены во второй половине XX в. от основного носителя – большой песчанки. Были обнаружены 4 маркерные SNPs характерных для этой филогруппы (табл. 2, узел MN1 – 4 SNPs). С помощью сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей коллекционных штаммов *Y. pestis* по выявленным SNPs в узле MN1 установлено, что выделенные в этот период в УЭППО штаммы относятся ко второй волне распространения линии 2.MED1 с территорий

Мангышлакского (1978 г.) и Устюртского пустынных очагов чумы (1962 и 1975 гг.) в Северо-Восточный Прикаспий. Согласно данным эпизоотологического и филогенетического анализа, эти штаммы являются потомками первой волны распространения 2.MED1 в первой половине XX в. Интересно, что в самом Северном Прикаспии после 1945 г. данный геновариант уже не выделялся из-за наступления межэпизоотического периода. С определенной долей вероятности можно предположить, что активизация УЭППО в 1968 г. была вызвана распространением штаммов ветви 2.MED1 из очагов чумы, расположенных на Устюртском плато.

Таблица 2 / Table 2

Маркерные SNPs для филогенетических узлов дендрограммы
Marker SNPs for phylogenetic nodes of dendrogram

Узел Node	Координаты SNPs по геному CO92 (AL590842.1) SNPs coordinates by CO92 genome (AL590842.1)	Замена нуклеотида Nucleotide substitution	Локализация Localization
MN1	472490	G→C	Межгенное пространство Intergenic space
	1424616	G→T	<i>bcr</i>
	1961220	A→T	<i>gltP</i>
	4589546	G→A	Межгенное пространство Intergenic space
MN2	2281966	C→T	Межгенное пространство Intergenic space
MN3	2958240	C→T	Межгенное пространство Intergenic space
MN4	2600092	T→C	Межгенное пространство Intergenic space

В третью филогруппу вошли штаммы, выделенные из очагов Северного Приаралья и относящиеся к ветви 2.MED1. В 1960–1970 гг. прошлого века в связи с изменившимися климатическими условиями и флуктуациями уровня Каспийского моря произошло повышение эпизоотической активности и изменение пространственно-временной структуры популяций *Y. pestis*, что послужило отправной точкой для распространения штаммов ветви 2.MED1 из очагов Северного Приаралья в очаги Северного и Северо-Западного Прикаспия, поэтому филогруппы 4–6 предположительно являются потомками штаммов из очагов Северного Приаралья [5]. Четвертая филогруппа включает два штамма, выделенных в 1986 и 1992 гг. в Волго-Уральском степном очаге чумы. Оба штамма

выделены от блох и относятся к SNP-генотипу Pricasp 8, подробная характеристика которого была дана нами ранее [14]. Пятая филогруппа включает в себя 13 штаммов, которые разделяются на два кластера. В малый кластер входит 3 штамма (MN2 – 1 SNPs), один из которых был выделен на территории Северного Приаралья (Приаральско-Каракумский пустынный очаг) в 1959 г., а два других на территории Северо-Восточного Прикаспия (УЭППО) в 1962 и 1966 гг., что также свидетельствует об интродукции штаммов Северного Приаралья на территорию Северо-Восточного Прикаспия и третьей волне распространения штаммов 2.MED1. Второй кластер включает в себя 10 штаммов и относится к охарактеризованному нами ранее SNP-генотипу Pricasp 5 [14]. В шестую филогруппу (MN3 – 1



SNPs) вошли 17 штаммов. Доминирующая часть изолятов (15 штаммов) выделена на территории УЭППО в 1990-е гг. и три штамма выделены в период с 1966 по 1968 гг. Также два штамма выделены в Предустюртском пустынном очаге в 1967 и 1990 гг. По имеющимся данным, эта волна распространения ветви 2.MED1 была вызвана климатическими изменениями, связанными с новым повышением уровня Каспийского моря во второй половине XX в. Штаммы, которые выделялись в 1990 г. на территории УЭППО, имели одну уникальную SNPs (MN4), тем не менее данный геновариант внутри себя подразделяется на несколько кластеров, отличающихся 1-2 SNPs, которые в основном являются уникальными для единичных штаммов, что можно связать с активными эпизоотическими процессами в очаге, которые способствовали внутривидовому генетическому разнообразию.

Таким образом, нами проведен комплексный молекулярно-генетический анализ штаммов *Y. pestis*, выделенных в различные периоды активности УЭППО, методами сравнительного анализа CRISPR/VNTR локусов, а также WG-SNP-анализа и филогенетической реконструкции. Анализ VNTR-локусов выявил, что высоковариабельными локусами в данном очаге являлись ms46 (7 аллелей) и ms62 (6 аллелей), а также ms56, ms70, ms71 и ms74, представленные в трех различных аллелях. Анализ CRISPR-локусов (YP1, YP2 и YP3) не выявил отличий между штаммами с территориями УЭППО. Полученные данные о популяционной структуре на основе филогенетической реконструкции полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis*, циркулирующих на территории УЭППО и сопредельных очагов чумы, в комплексе с эпизоотическими и эпидемиологическими сведениями свидетельствуют о наличии трех волн распространения филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара на территорию УЭППО. Первая волна распространения на территорию УЭППО пришла из Северо-Западного и Северного Прикаспия в первой половине XX в. Далее на территории очагов чумы Северного Прикаспия наступил межэпизоотический период, вызванный климатическими изменениями, влиянием антропогенных факторов, что в совокупности обусловило изменение биоценотической структуры очагов этого региона, падение численности носителей и переносчиков и смену популяции возбудителя. Активизация УЭППО очага после 1966 г. была обусловлена распростра-

нением штаммов *Y. pestis* ветви 2.MED1 из очагов Северного Приаралья (1945 г.). Важно отметить, что штаммы возбудителя чумы, выделенные в УЭППО в период 1968–1974 гг., имеют близкое генетическое родство со штаммами из Мангышлакского (1978 г.) и Устюртского пустынных очагов чумы (1962 и 1975 гг.). Согласно данным эпизоотологического и филогенетического анализа, эти штаммы являются потомками первой волны распространения 2.MED1 на территории Северного Прикаспия первой половины XX в., которые после 1945 г. в самом Северном Прикаспии уже не выделялись. После межэпизоотического периода в 1966 г. и в 1968 г. на территории УЭППО одновременно циркулировали потомки двух разных волн распространения ветви 2.MED1: с Устюртского плато и с Северного Приаралья.

Заключение

Полученные данные будут использованы для молекулярно-генетической детализации паспортизации очагов, в которых циркулирует этот высоковирулентный средневековый биовар *Y. pestis*, а также могут повысить эффективность эпидемиологического мониторинга на данной территории. Выяснение пространственно-временных закономерностей циркуляции *Y. pestis* важно для понимания функционирования природных очагов, составления долгосрочных эпидемиологических прогнозов, а также предотвращения заноса из эпизоотически активных очагов чумы сопредельных стран.

Список литературы

1. Абдел З. Ж., Ерубает Т. К., Токмурзиева Г. Ж., Аймаханов Б. К., Далибаев Ж. С., Муссагулиева Р. С., Жумадилова З. Б., Мека-Меченко В. Г., Мека-Меченко Т. В., Матжанова А. М., Абдрасилова А. А., Умарова С. К., Рысбекова А. К., Есимсеит Д. Т., Абделиев Б. З., Кобыратбаев К. К., Искаков Б. Г., Белый Д. Г., Ескермесов М. К., Кулемин М. В., Аскар Ж. С., Калдыбаев Т. Е., Мухтаров Р. К., Давлетов С. Б., Сутягин В. В., Лездиньш И. А. Демаркация границ Центральноазиатского пустынного природного очага чумы Казахстана и мониторинг ареала основного носителя *Rhombomys opimus* // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 2. С. 71–78.
2. Аймаханов Б. К., Куница Т. Н., Бурделов Л. А., Мека-Меченко В. Г., Сагиев З. А., Садовская В. П., Даниярова А. Б., Умбетьярова Л. Б., Далибаев Ж. С., Хамзин Т. Х., Сараев Ф. А., Камзина Ж. К. Анализ эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по чуме в Атырауской области // West Kazakhstan Medical Journal. 2017. № 4 (56). С. 4–13.



3. Паспорт регионов Казахстана по особо опасным инфекциям / под ред. д-ра биол. наук, проф. Л. А. Бурделова. Алматы : NV Print, 2015. 179 с.
4. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 г.) / под ред. акад. РАН В. В. Кутырева и проф. А. Ю. Поповой. Саратов : ООО «Амирит», 2016. 248 с.
5. Eroshenko G. A., Popov N. V., Al'khova Z. V., Kukleva L. M., Balykova A. N., Chervyakova N. S., Naryshkina E. A., Kutyrev V. V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries // PLoS ONE. 2021. Vol. 2. P. e0244615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244615>
6. Wick R. R., Judd M. L., Gorrie L. C., Holt K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // PLoS Computational Biology. 2017. Vol 13, № 6. P. e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
7. Armengol G., Sarhadi V.K., Rönty M., Tikkanen M., Knuutila A., Knuutila S. Driver gene mutations of non-small-cell lung cancer are rare in primary carcinoids of the lung: NGS study by ion torrent // Lung. 2015. Vol. 193. P. 303–308. <https://doi.org/10.1007/s00408-015-9690-1>
8. Cock J. A. P., Antao T., Chang J. T., Chapman B. A., Cox C. J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., de Hoon M. J. L. Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics // Bioinformatics. 2009. Vol. 25, № 11. P. 1422.
9. Motro Y., Moran-Gilad J. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology // Biomolecular Detection and Quantification. 2017. Vol. 14. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.002>.
10. Wu M. C., Kraft P., Epstain M. P., Taylor D. M., Chanock S. J., Hunter D. J., Lin X. Powerful SNP-Set Analysis for case-control genome-wide association studies // The American Journal of Human Genetics. 2010. Vol. 86. P. 929–942. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.002>
11. Wu Y., Hao T., Qian X., Zhang X., Songz Y., Yang R., Cui Y. Small insertions and deletions drive genomic plasticity during adaptive evolution of *Yersinia pestis* // Microbiology Spectrum. 2022. Vol. 10. P. E02242-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02242-21>
12. De Bruyn A., Martin D. P., Lefeuvre P. Phylogenetic reconstruction methods: An overview // Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols. 2014. Vol. 1115. P. 257–277. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_13
13. Croucher N. J., Page A. J., Connor T. R., Delaney A. J., Keane J. A., Bentley S. D., Parkhill J., Harris S. R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins // Nucleic Acids Research. 2015. Vol. 43. P. e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>
14. Балькова А. Н., Куклева Л. М., Горюнова П. А., Шевченко К. С., Коврижников А. В., Краснов Я. М., Червякова Н. С., Ерошенко Г. А., Кутырев В. В. SNP-профили штаммов *Yersinia pestis* средневекового био-вара из очагов чумы Прикаспия // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 4. С. 41–49. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-4-41-49>

References

1. Abdel Z. Zh., Erubaev T. K., Tokmurzieva G. Zh., Ajmahanov B. K., Dalibaev Zh. S., Musagalieva R. S., Zhumadilova Z. B., Meka-Mechenko V. G., Meka-Mechenko T. V., Matzhanova A. M., Abdrasilova A. A., Umarova S. K., Rysbekova A. K., Esimseit D. T., Abdeliev B. Z., Konyratbaev K. K., Iskakov B. G., Belyj D. G., Eskermesov M. K., Kulemin M. V., Askar Zh. S., Kaldybaev T. E., Muhtarov R. K., Davletov S. B., Sutjagin V. V., Lezdin'sh I. A. Demarcation of the boundaries of the Central Asian desert natural plague foci of Kazakhstan and monitoring of the range of the main carrier of *Rhombomys opimus*. *Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2021, no. 2, pp. 71–78 (in Russian).
2. Ajmahanov B. K., Kunica T. N., Burdelov L. A., Mekamechenko V. G., Sagiev Z. A., Sadovskaja V. P., Danijarova A. B., Umbet'jarova L. B., Dalibaev Zh. S., Hamzin T. H., Saraev F. A., Kamzina Zh. K. Analysis of the epizootological and epidemiological situation of plague in the Atyrau region. *West Kazakhstan Medical Journal*, 2017, vol. 4 (56), pp. 4–13 (in Russian).
3. *Passport regionov Kazakhstana po osobo opasnym infektsiyam*. Pod red. L. A. Burdelova [Burdelov L. A., ed. Passport of Regions of Kazakhstan on Particularly Dangerous Infections]. Almaty, NV Print, 2015. 179 p. (in Russian).
4. *Kadastr epidemicheskikh i epizooticheskikh proyavleniy chумы na territorii Rossiyskoy Federatsii i stran blizhnego zarubezh'ya (s 1876 po 2016 g.)*. Pod red. V. V. Kutyreva, A. Yu. Popovoy [Kutyrev V. V., Popova A. Yu., eds. Cadastre of epidemic and epizootic manifestations of plague in the Russian Federation and neighboring countries (from 1876 to 2016)]. Saratov, LLC "Amirit", 2016. 248 p. (in Russian).
5. Eroshenko G. A., Popov N. V., Al'khova Z. V., Kukleva L. M., Balykova A. N., Chervyakova N. S., Naryshkina E. A., Kutyrev V. V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS ONE*, 2021, vol. 2, pp. e0244615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244615>
6. Wick R. R., Judd M. L., Gorrie L. C., Holt K. E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 2017, vol 13, no. 6, pp. e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
7. Armengol G., Sarhadi V.K., Rönty M., Tikkanen M., Knuutila A., Knuutila S. Driver gene mutations of



- non-small-cell lung cancer are rare in primary carcinoids of the lung: NGS study by ion torrent. *Lung*, 2015, vol. 193, pp. 303–308. <https://doi.org/10.1007/s00408-015-9690-1>
8. Cock J. A. P., Antao T., Chang J. T., Chapman B. A., Cox C. J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., de Hoon M. J. L. Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 11, pp. 1422.
 9. Motro Y., Moran-Gilad J. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2017, vol. 14, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.002>
 10. Wu M. C., Kraft P., Epstein M. P., Taylor D. M., Chanock S. J., Hunter D. J., Lin X. Powerful SNP-Set Analysis for case-control genome-wide association studies. *The American Journal of Human Genetics*, 2010, vol. 86, pp. 929–942. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.002>
 11. Wu Y., Hao T., Qian X., Zhang X., Songz Y., Yang R., Cui Y. Small insertions and deletions drive genomic plasticity during adaptive evolution of *Yersinia pestis*. *Microbiology Spectrum*, 2022, vol. 10, pp. E02242-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02242-21>
 12. De Bruyn A., Martin D. P., Lefeuvre P. Phylogenetic reconstruction methods: An overview. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, 2014, vol. 1115, pp. 257–277. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_13
 13. Croucher N. J., Page A. J., Connor T. R., Delaney A. J., Keane J. A., Bentley S. D., Parkhill J., Harris S. R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Research*, 2015, vol. 43, pp. e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>
 14. Balykova A. N., Kukleva L. M., Goryunova P. A., Shevchenko K. S., Kovrizhnikov A. V., Krasnov Y. M., Chervyakova N. S., Eroshenko G. A., Kuttyrev V. V. SNP-profiles of *Yersinia pestis* strains of the medieval biovar from the Caspian Sea Region plague foci. *Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2022, vol. 4, pp. 41–49 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-4-41-49>

Поступила в редакцию 15.06.2023; одобрена после рецензирования 17.06.2023; принята к публикации 01.07.2023
The article was submitted 15.06.2023; approved after reviewing 17.06.2023; accepted for publication 01.07.2023