

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-50-61

УДК 616.98:579.842.23(575.2)

С.К. Бердиев¹, Г.А. Ерошенко², А.Н. Балыкова², Н.Т. Усенбаев¹, Н.Т. Кебекбаева¹, А.К. Джапарова¹,
Ж. Муканметесен уулу³, Д. Жумашов⁴, А.Ш. Ражапбаева⁵, А.М. Юлдашева¹, Е.Г. Оглодин²,
А.Д. Катышев², А.А. Кузнецов², А.В. Фадеева², В.В. Кутырев²

Современные диагностические технологии в исследовании полевого материала 2023 г. из природных очагов чумы Кыргызской Республики

¹Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика; ²ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ³Ат-Башиинское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР, Ат-Баши, Кыргызская Республика; ⁴Каракольское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР, Каракол, Кыргызская Республика; ⁵Ошское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР, Ош, Кыргызская Республика

Цель работы – анализ результатов исследования полевого материала, полученного в 2023 г. в природных очагах чумы Кыргызской Республики (КР), с помощью современных диагностических технологий. **Материалы и методы.** Изучено 1435 биологических образцов из Тянь-Шаньского, Алайского и Таласского высокогорных очагов КР с использованием традиционных методов лабораторной диагностики чумы: микробиологических, иммунологических, биологических, а также современных молекулярно-генетических методов. Индикацию полученных образцов на наличие ДНК возбудителя чумы проводили с помощью ПЦР-РВ, а наличие антител к чумному микробу выявляли методом иммуноферментного анализа. Молекулярную идентификацию штаммов *Yersinia pestis* по их принадлежности к подвидам, биоварам, филогенетическим линиям проводили методом ПЦР-РВ с применением способа выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов. **Результаты и обсуждение.** Разработан и прошел практическую проверку способ молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* из очагов чумы КР методом выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов (HMR-анализ) с использованием комплекта сконструированных праймеров. Установлена принадлежность выделенных в Сарыджазском автономном очаге Тянь-Шаньского высокогорного очага штаммов *Y. pestis* к античному биовару основного подвида, филогенетической ветви 0.ANT5. Исследовано филогенетическое родство выделенных в 2023 г. штаммов *Y. pestis* по данным полногеномного SNP-анализа. Установлены участки эпизоотической активности в Восточном Алае. Полученные данные свидетельствуют о продолжающейся активизации очагов чумы КР. Также обсуждаются участки территории КР, перспективные для проведения палеогеномных исследований.

Ключевые слова: чума, природные очаги Кыргызской Республики, штаммы *Y. pestis*, диагностика.

Корреспондирующий автор: Бердиев Сталбек Кабылович, e-mail: berdiev.1962@mail.ru.

Для цитирования: Бердиев С.К., Ерошенко Г.А., Балыкова А.Н., Усенбаев Н.Т., Кебекбаева Н.Т., Джапарова А.К., Муканметесен уулу Ж., Жумашов Д., Ражапбаева А.Ш., Юлдашева А.М., Оглодин Е.Г., Катышев А.Д., Кузнецов А.А., Фадеева А.В., Кутырев В.В. Современные диагностические технологии в исследовании полевого материала 2023 г. из природных очагов чумы Кыргызской Республики. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:50–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-50-61

Поступила 28.11.2023. Принята к публ. 05.12.2023.

S.K. Berdiev¹, G.A. Eroshenko², A.N. Balykova², N.T. Usenbaev¹, N.T. Kebekbaeva¹,
A.K. Dzhaparova¹, Zh. Mukanmetesen uulu³, D. Zhumashov⁴, A.Sh. Razhapbaeva⁵,
A.M. Yuldasheva¹, E.G. Oglochin², A.D. Katyshev², A.A. Kuznetsov², A.V. Fadeeva², V.V. Kutyrev²

Modern Diagnostic Technologies in the Study of the Field Material Collected from the Natural Plague Foci of the Kyrgyz Republic in 2023

¹Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic;

²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;

³At-Bashinsky Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, At-Bashi, Kyrgyz Republic;

⁴Karakol Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Karakol, Kyrgyz Republic;

⁵Osh Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Osh, Kyrgyz Republic

Abstract. The aim of the work was to analyze the results of investigating the field material obtained from natural plague foci of the Kyrgyz Republic (KR) in 2023, using modern diagnostic technologies. **Materials and methods.** 1435 biological samples from the Tien Shan, Alai and Talas high-mountain foci of the Kyrgyz Republic were studied using conventional methods of laboratory diagnosis of plague: microbiological, immunological, biological; as well as modern molecular-genetic methods. Testing of the obtained samples for the presence of plague pathogen DNA was carried out using RT-PCR; and the presence of antibodies to the plague microbe was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Molecular identification of *Yersinia pestis* strains according to their appurtenance to subspecies, biovars, and phylogenetic lineages was performed by RT-PCR using the method of identifying single-nucleotide substitutions based on the analysis of melting curves of products. **Results and discussion.** An approach to the molecular identification of *Y. pestis* strains from plague foci of the KR has been developed and validated through identifying single-nucleotide substitutions using the analysis of product melting curves (HMR-analysis) with a set of designed primers. It

has been established that *Y. pestis* strains isolated in the Sarydzhas autonomous focus of the Tien Shan high-mountain focus belong to the biovar *antiqua* of the main subspecies, phylogenetic branch 0.ANT5. The phylogenetic relation of *Y. pestis* strains isolated in 2023 was studied based on genome-wide SNP analysis. Areas of epizootic activity in Eastern Alai have been identified. The data obtained indicate the sustained activation of plague foci in the KR. Areas of the territory of the KR that are promising for paleogenomic research are also discussed.

Key words: plague, natural foci of the Kyrgyz Republic, *Y. pestis* strains, diagnostics.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Acknowledgements: We thank V.A. Kol'chenko, a research officer at the Institute of History, Archeology and Ethnology of the National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic, for consultations on the localization of archaeological sites on the territory of Kyrgyzstan.

Corresponding author: Stalbek K. Berdiev, e-mail: berdiev.1962@mail.ru.

Citation: Berdiev S.K., Eroshenko G.A., Balykova A.N., Usenbaev N.T., Kebekbaeva N.T., Dzhaparova A.K., Mukanmetesen uulu Zh., Zhumashov D., Razhapbaeva A.Sh., Yuldasheva A.M., Ogolodin E.G., Katyshev A.D., Kuznetsov A.A., Fadeeva A.V., Kutryev V.V. Modern Diagnostic Technologies in the Study of the Field Material Collected from the Natural Plague Foci of the Kyrgyz Republic in 2023. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:50–61. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-50-61

Received 28.11.2023. Accepted 05.12.2023.

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

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

Dzhaparova A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1067-0940>

Ogolodin E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>

Katyshev A.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8260-4670>

Kuznetsov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0677-4846>

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

В Кыргызской Республике (КР) находятся три природных очага чумы: Тянь-Шаньский, Алайский и Таласский, – пространственно изолированные друг от друга и занимающие площадь более 320 тыс. га, что составляет 16,3 % от территории страны [1]. Эпизоотии впервые выявлены в Тянь-Шаньском высокогорном очаге в 1942–1943 гг., в Таласском – в 1977 г. Вспышки и случаи чумы регистрировались в Тянь-Шаньском высокогорном очаге в 1907, 1910, 1914, 1928, 1942, 1947, 1952, 1958, 1962, 1981, 2013 гг. [2]. Комплексный анализ фенотипических и генетических свойств штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в природных очагах КР в период 1928–1984 гг., показал, что они преимущественно относились к ветвям 0.ANT3 и 0.ANT5 античного биовара основного подвида, встречались также штаммы филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара основного подвида [3]. В Таласском высокогорном очаге установлена циркуляция штаммов филогенетической ветви 0.PE4t, которая в соответствии с усовершенствованной подвидовой классификацией относится к таласскому биовару центральноазиатского (неосновного) подвида [4]. В этом же очаге был изолирован штамм средневекового биовара основного подвида филогенетической ветви 2.MED1.

Благодаря проведенным в 1971–1989 гг. оздоровительным мероприятиям методом глубинной дезинсекции нор сурков эпизоотическая активность Тянь-Шаньского природного очага значительно снизилась. Эпизоотии чумы в популяциях сурков не регистрировали до 23 и более лет. В дальнейшем в результате активизации эпизоотических процессов в 2012 г. в Сарыджазском автономном очаге Тянь-Шаньского высокогорного очага чумы от грызунов было изолировано 6 культур чумного микроба *Y. pestis*. В 2013 г. в этом же очаге зарегистрирован 1 случай бубонной чумы с летальным исходом. В 2014 г. от сурков – основных носителей чумы и от их специфических паразитов изоли-

ровано 3 культуры чумного микроба [5]. В 2015 г. от сурков в Верхненарынском автономном очаге Тянь-Шаньского очага выделено 2 культуры *Y. pestis*, в 2016 г. в Сарыджазском автономном очаге от серых сурков и блох получено 4 культуры возбудителя. Впоследствии в 2019 г. в Сарыджазском и Верхненарынском автономных очагах от серых сурков и их эктопаразитов получено 5 культур *Y. pestis*, а в 2020 г. 6 культур изолировано в Сарыджазском очаге от серых сурков и блох *Oropsylla silantiewi*. По данным комплексного исследования свойств штаммов *Y. pestis*, выделенных в XXI в. в Сарыджазском и Верхненарынском очагах, была установлена их принадлежность к античному биовару основного подвида, филогенетической линии 0.ANT5 [6, 7]. Постоянное выделение культур возбудителя чумы в 2012–2020 гг. после длительного межэпизоотического периода свидетельствует об активизации этих территорий Тянь-Шаньского высокогорного очага, что требует проведения расширенных мероприятий, направленных на обеспечение эпидемиологического благополучия и предупреждения распространения чумы.

В 2023 г. сотрудниками Республиканского центра карантинных и особо опасных инфекций Минздрава КР (РЦКиООИ) и сотрудниками Атбашинского, Каракольского, Ошского и Таласского противочумных отделений (ПЧО) при участии специалистов ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора проведено расширенное обследование природных очагов чумы КР. При лабораторном исследовании полевого материала, добытого в Сарыджазском высокогорном очаге, выделены три штамма *Y. pestis*.

Цель работы – анализ результатов исследования полевого материала сезона 2023 г. из природных очагов чумы КР с помощью современных диагностических технологий и комплексное изучение свойств выделенных здесь штаммов *Y. pestis*.

Материалы и методы

Изученные биологические образцы получены во время полевого сезона 2023 г. на различных территориях высокогорных очагов чумы КР. Исследования полевого материала проводились с помощью микробиологических, иммунологических, биологических, молекулярно-генетических методов. Для проведения микробиологического анализа и выделения культур использовались суспензии внутренних органов, для иммуноферментного анализа (ИФА) на наличие антител – смывы из грудной полости отловленных грызунов. Подозрительные на чуму культуры изучались с помощью традиционных методов лабораторной диагностики чумы [8]. Детекцию ДНК возбудителя чумы во всех полевых образцах проводили методом ПЦР-РВ с применением набора «Ген *Yersinia pestis* индикация – РГФ» и методом иммуноферментного анализа с помощью тест-набора «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*» (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Россия). Молекулярную идентификацию выделенных штаммов *Y. pestis* выполняли методом ПЦР-РВ в традиционном формате и с применением способа выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов ПЦР – HMR-анализ (от англ. high resolution melt) [9, 10]. В последнем варианте ПЦР-РВ проводили с использованием красителя EVA Green (ООО «Синтол», Россия). ПЦР-РВ в традиционном формате выполняли с помощью набора Encyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Россия). Для выявления специфических делеций и аллельных полиморфизмов, маркерных для филогенетических линий *Y. pestis* из очагов чумы КР, был разработан комплект праймеров, включающий сконструированные нами ранее и в рамках этой работы олигонуклеотидные праймеры. ДНК для проведения ПЦР-РВ выделяли набором «РИБО-преп» (AmpliSens, Россия).

Для полногеномного секвенирования ДНК штаммов *Y. pestis* получали с использованием набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Полногеномное секвенирование выполняли в системе Ion S5 XL System (Thermo Fischer Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Обработку данных, контроль качества и сборку последовательностей сырых ридов *de novo* проводили с помощью Ion Torrent Suite software package, 5.12, FastQC v0.12.0, unicycler v0.5.0. Полученные риды собирали в контиги со средним покрытием на геном 98,56 % (50х глубина прочтения). Средний размер собранного генома составил 4,55 м.п.н. Коровые SNPs выявляли путем выравнивания контигов штаммов *Y. pestis* на геноме CO92 (номер доступа в NCBI GenBank – NC_003143) с помощью программы Snippy 4.6, затем удаляли 28 гомоплазий SNPs. Полученный набор SNPs содержал только коровую область генома (1527 SNPs). Дендрограмму строили по алгоритму Maximum Likelihood с применением программы FastTree, встроенной в Snippy 4.6,

модели GTR, подобранной в программе Jmodeltest2 с учетом АИС-критерия. Использовали 500 бутстреп-реплик. Визуализацию филогенетического дерева выполняли в программе FigTree v1.4.4.

Результаты и обсуждение

Всего в полевой сезон 2023 г. в результате расширенного обследования территорий природных очагов КР получено и исследовано 1435 биологических образцов, включая 380 образцов из Центрального Аксая (Ат-Башинское ПЧО, обследовано 80 тыс. га), 385 – из участка Энилчек-Кайанды (Каракольское ПЧО, обследовано 90 тыс. га), 315 – из Восточно-Алайского участка очаговости (Ошское ПЧО, обследовано 100 тыс. га), 355 – из всех четырех участков очаговости Таласского очага (Таласское ПЧО). В том числе весной и осенью 2023 г. в Таласском очаге получено 75 и 280 образцов соответственно. Методом ПЦР среди образцов из обследованного участка Сарыджазского автономного очага выявлено 3 положительные пробы, Таласского – 2. В биологических образцах из Аксайского и Алайского очагов положительных ПЦР-проб не выявлено. Положительные по результатам ПЦР пробы использованы для заражения биопробных животных. Из трех положительных в ПЦР образцов из Сарыджазского очага микробиологическими методами выделено три культуры *Y. pestis*. Два штамма – *Y. pestis* 107 и 133 – получены от серых сурков *Marmota baibacina* в урочище Чон-Карабел в Сарыджазском очаге, сектор 114407512(31), в мае 2023 г. и один штамм – *Y. pestis* 136 – получен там же от пищухи. Места выделения культур *Y. pestis* на территории Сарыджазского высокогорного автономного очага представлены на рис. 1.

Биохимические характеристики выделенных культур *Y. pestis*. По комплексу культурально-морфологических и иммунологических лабораторных тестов выделенные культуры принадлежали к виду *Y. pestis*. Изучение биохимических свойств показало, что они не ферментируют рамнозу, но активны в отношении сахарозы, мальтозы, лактозы, маннита, арабинозы. Штаммы также были способны к редукции нитратов. Эти данные свидетельствовали о том, что выделенные штаммы относились к основному подвиду (рамнозо-негативные), античному биовару (позитивны по ферментации глицерина и редукции нитратов) чумного микроба.

Молекулярно-генетическая идентификация штаммов *Y. pestis*. Для проведения молекулярно-генетической идентификации по принадлежности к подвидам, биоварам и филогенетическим линиям штаммов *Y. pestis* из природных очагов КР нами разработан способ, основанный на методе определения различий температур плавления продуктов ПЦР, отличающихся по одному нуклеотиду, с помощью анализа кривых плавления – HRM [9, 10]. Преимущество использования этого метода в полевых условиях заключается в отсутствии необходимости исполь-

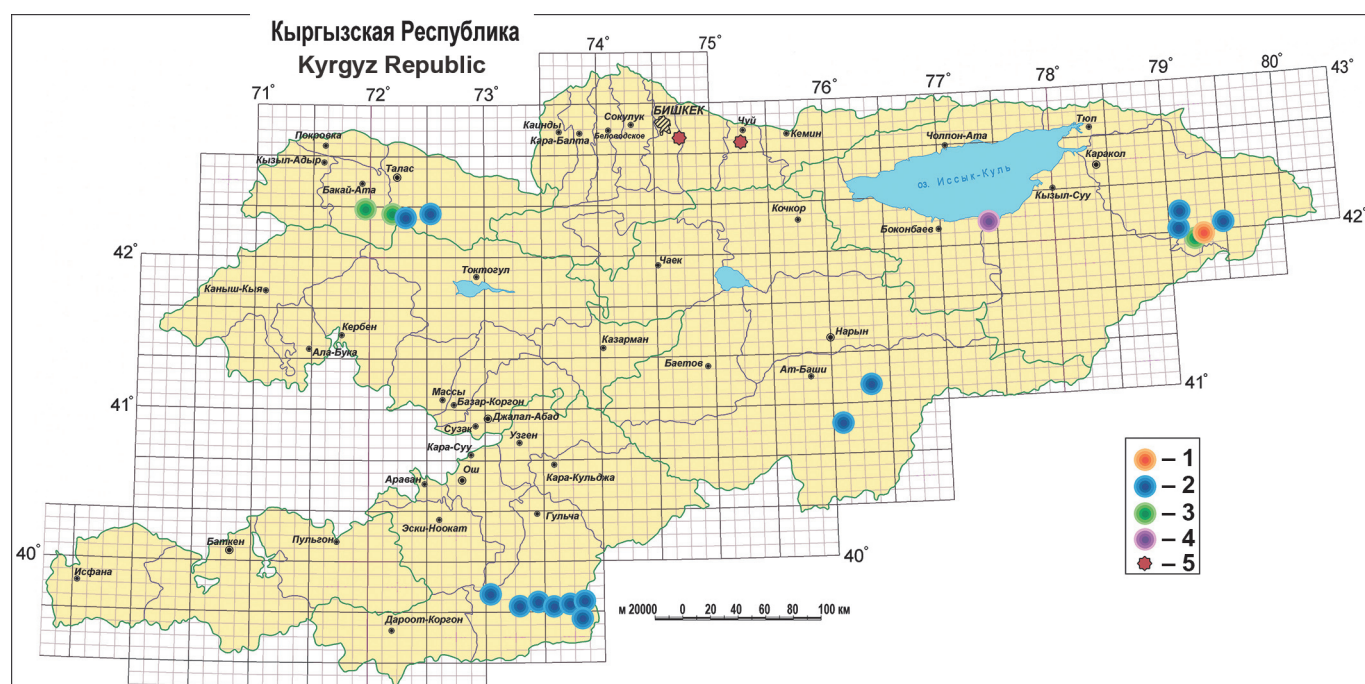


Рис. 1. Результаты обследования природных очагов чумы Кыргызской Республики с помощью современных технологий лабораторной диагностики. Цветными кружками отмечены сектора:

1 – выделение культур (оранжевый); 2 – положительные ИФА-пробы (синий); 3 – положительные ПЦР-пробы (зеленый); 4 – ранее реконструированный геном античного биовара, 120 г. н.э. (лиловый) [11]; 5 – ранее реконструированные геномы античного биовара 1338–1339 гг. (красный) [12]

Fig. 1. Results of survey of natural plague foci in the Kyrgyz Republic using modern laboratory diagnostic technologies. Sectors are marked with colored circles:

1 – isolation of cultures (orange); 2 – positive ELISA tests (blue); 3 – positive PCR tests (green); 4 – previously reconstructed genome of biovar antiqua, 120 AD (purple) [11]; 5 – previously reconstructed genomes of biovar antiqua, 1338–1339 AD (red) [12]

зования флуоресцентных зондов, что значительно удешевляет стоимость исследований и увеличивает сроки годности применения реактивов для проведения реакции. Для молекулярной идентификации штаммов из очагов чумы КР, относящихся к филогенетическим ветвям 0.ANT3 и 0.ANT5 античного биовара, 2.MED1 средневекового биовара и 0.PE4t таласского биовара центральноазиатского подвида, использованы как ранее сконструированные, так и вновь рассчитанные нами для этого исследования олигонуклеотидные праймеры [13–16]. Маркерные ДНК-мишени и последовательности праймеров приведены в табл. 1. В качестве ДНК-мишеней использовались делеции и полиморфные единичные нуклеотиды SNPs, маркерные для подвидов, биоваров и филогенетических ветвей. Для HRM-анализа использовали следующие мишени: делеции в межгенном пространстве *ilvN-ilvB* (45 п.н.) и в гене *terC* (89 п.н.) у основного подвида; делеция (24 п.н.) в межгенном пространстве *gcvT-visC* у средневекового биовара и делеция (33 т.п.н.) у филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара; делеция в гене *YPO2014* (72 п.н.) у таласского биовара центральноазиатского подвида; делеция в гене *YPO2071* (509 п.н.) у всех биоваров центральноазиатского подвида. Также для идентификации филогенетических ветвей 0.ANT5 и 0.ANT3 использовались маркерные SNP-мишени: SNP (C→A) в гене *metJ* у филогенетической ветви 0.ANT5; SNP (C→T) в гене *manX* у филогенетической ветви 0.ANT3 античного биовара.

Режимы амплификации подбирались эмпирическим путем для ДНК амплификатора Rotor-Gene Q 6plex (производство Qiagen). Температура отжига праймеров варьировала ($T_m=56-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), как и количество циклов амплификации (35–40 циклов). Детекцию флуоресцентного сигнала осуществляли на этапе элонгации в присутствии интеркалирующего красителя Eva-Green I (ООО «Синтол», Россия). Диапазон температуры на этапе плавления (MeltA) для делеций составлял 50–99 $^{\circ}\text{C}$, для SNPs – 72–99 $^{\circ}\text{C}$. Наилучший режим определяли по максимальному количеству выхода специфического ПЦР-продукта. Для каждой ДНК-мишени ПЦР ставили в трех повторах совместно с контрольным образцом *Y. pestis* с известной филогенетической принадлежностью. Результат температуры плавления рассчитывался как среднее арифметическое. В качестве контролей применялась ДНК музейных штаммов соответствующих подвидов, биоваров и филогенетических ветвей.

Результаты проведенной идентификации приведены в табл. 2. Рис. 2 иллюстрирует результаты молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* 107, 133 и 136 с использованием ДНК-мишеней для дифференциации основного и неосновных подвидов (45del, 89del), центральноазиатского подвида (509), филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара (2.MED1) и филогенетической ветви 0.ANT5 античного биовара (0.ANT5wild, 0.ANT5mut).

Таблица 1 / Table 1

ДНК-мишени и праймеры для молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* из очагов чумы КР
Target DNA and primers for molecular identification of *Y. pestis* strains from plague foci of the Kyrgyz Republic

Подвид, биовар, филогенетическая линия Subspecies, biovar, phylogenetic lineage	ДНК-мишень, локализация и координаты по геному референсного штамма Target DNA, localization and coordinates across the genome of the reference strain	Канал детекции Detection channel	Последовательности праймеров Primer sequences
Дифференциация подвидов и биоваров с использованием маркерных делеций Differentiation of subspecies and biovars using marker deletions			
Основной подвид (п/в) Main subspecies (ssp.)	45del ¹ Делеция (45 п.н.) в межгенном пространстве <i>ilvN-ilvB</i> у основного п/в. 2579997–2580134 ¹ Deletion (45 bp) in the <i>ilvN-ilvB</i> intergenic space in the main ssp. 2579997–2580134	FAM	F: gtggatgagaaagtttacc R: atcacacctggatggttac
Основной п/в Main ssp.	89del ¹ Делеция (89 п.н.) в гене <i>terC</i> у основного п/в ¹ Deletion (89 bp) in the <i>terC</i> gene in the main ssp.	FAM	F: atgaaatgaccgacaacag R: gtctcactgggtgtattag
Средневековый биовар (б/в), 2.MED Medieval biovar (b/v), 2.MED	¹ med24 Делеция (24 п.н.) в межгенном пространстве <i>gcvT-visC</i> у средневекового б/в основного п/в. 996453–996622 Deletion (24 bp) in the <i>gcvT-visC</i> intergenic space in the medieval b/v of the main ssp. 996453–996622	FAM	F: gccagttgtgtctaaag R: cgcaacattcgcgcaaa
Средневековый б/в, 2.MED1 Medieval b/v, 2.MED1	² 2.MED1 Ген <i>YPN_2820</i> расположен в области делеции (33 т.п.н.) между генами <i>YPN_2804</i> и <i>YPN_2838</i> у ветви 2.MED1. 3161933–3195112 The <i>YPN_2820</i> gene is located in the deletion region (33 kb) between the <i>YPN_2804</i> and <i>YPN_2838</i> genes in the 2.MED1 branch. 3161933–3195112	FAM	F: agcggcactctctacgaaat R: tgactccattgaagcgtattg
Центральноазиатский п/в, 0.PE4 ssp. <i>central asiatica</i> , 0.PE4	¹ CA509 Делеция (509 п.н.) в гене <i>YPO2071</i> у центральноазиатского п/в. 2351984–2351475 Deletion (509 bp) in the <i>YPO2071</i> gene in the <i>central asiatica</i> ssp. 2351984–2351475	FAM	F: cggactgggtaataacaag R: cccgtgtctgtttctga
Таласский б/в центральноазиатского п/в, 0.PE4 Talas b/v of the <i>central asiatica</i> ssp. 0.PE4	¹ Tal72 Делеция (72 п.н.) в гене <i>YPO2412</i> у таласского б/в центральноазиатского п/в. 2714350–2714515 Deletion (72 bp) in the <i>YPO2412</i> gene in the talas b/v of the <i>central asiatica</i> ssp. 2714350–2714515	FAM	F: cgcaagagttagggtgga R: cctaccaagatcccacggc
Дифференциация филогенетических линий античного б/в с использованием маркерных SNPs методом аллель-специфических ПЦР Differentiation of phylogenetic lineages of b/v antiqua by allele-specific PCR using marker SNPs			
0.ANT5, дикий тип 0.ANT5, wild type	¹ 0.ANT5wild Отсутствие замены (C→A) в гене <i>metJ</i> в позиции генома 121618 Absence of a substitution (C→A) in the <i>metJ</i> gene at genome position 121618	FAM	F: ttctcgcgcttcgggagc R: cggcaagaaaagcaagcagg
0.ANT5, мутантный тип 0.ANT5, mutant type	¹ 0.ANT5mut Наличие SNP (C→A) в гене <i>metJ</i> в позиции генома 121618 Presence of SNP (C→A) in the <i>metJ</i> gene at genome position 121618	FAM	F: ttctcgcgcttcgggaga R: cggcaagaaaagcaagcagg
0.ANT3, дикий тип АС-ПЦР 0.ANT3, wild type AS-PCR	¹ 0.ANT3wild* Отсутствие замены (C→T) в гене <i>manX</i> в позиции генома 2003542 Absence of a substitution (C→T) in the <i>manX</i> gene at genome position 2003542	FAM	1758F: gctagataccagtaaaagtg 1758R: acgacctcatagttctctt 1758T/C_W: (FAM)cattaaacgggctaccac(RTQ1)
0.ANT3, мутантный тип АС-ПЦР 0.ANT3, mutant type AS-PCR	¹ 0.ANT3mut* Наличие SNP (C→T) в гене <i>manX</i> в позиции генома 2003542 Presence of SNP (C→T) in the <i>manX</i> gene at genome position 2003542	ROX	1758F: gctagataccagtaaaagtg 1758R: acgacctcatagttctctt 1758C/T_M: (ROX)cattaaacgggctactacc(BHQ2)

Примечания: * отмечены результаты, полученные с применением способа выявления однонуклеотидных замен с помощью ПЦР-ПВ в традиционном формате; ¹ координаты ДНК-мишени по геному *Y. pestis* CO92 (NC_003143.1); ² координаты ДНК-мишени по геному *Y. pestis* Nepal615 (NZ_ACNQ00000000).

Notes: * the results obtained applying the method of identifying single-nucleotide substitutions using RT-PCR in a conventional format are noted; ¹ coordinates of target DNA according to the *Y. pestis* genome CO92 (NC_003143.1); ² coordinates of target DNA according to the *Y. pestis* genome Nepal615 (NZ_ACNQ00000000).

Таблица 2 / Table 2

Молекулярная идентификация штаммов *Y. pestis*, выделенных в Сарыджазском высокогорном очаге в 2023 г. методом ПЦР-РВMolecular identification of *Y. pestis* strains isolated in the Sarydzhas high-mountain focus in 2023 using the RT-PCR method

ДНК-мишени Target DNA	Штаммы <i>Y. pestis</i> <i>Y. pestis</i> strains			
	107	133	136	Контрольный образец ДНК Control DNA sample
	Температура плавления продукта ПЦР (T _m) Melting temperature of the PCR product (T _m)			
Дифференциация подвидов и биоваров с использованием маркерных делеций Differentiation of subspecies and biovars using marker deletions				
45del	Положительный: T _m =87,5 °C Positive: T _m =87.5 °C	Положительный: T _m =87,5 °C Positive: T _m =87.5 °C	Положительный: T _m =87,5 °C Positive: T _m =87.5 °C	Отрицательный контроль: неосновной п/в: T _m =88,7 °C Положительный контроль: основной п/в: T _m =87,5 °C Negative control: non-main ssp.: T _m =88.7 °C Positive control: main ssp.: T _m =87.5 °C
89del	Положительный: T _m =83,5 °C Positive :T _m =83.5 °C	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Отрицательный контроль: неосновной п/в: T _m =86,3 °C Положительный контроль: основной п/в: T _m =83,5 °C Negative control: non-main ssp.: T _m =86.3 °C Positive control: main ssp.: T _m =83.5 °C
med24	Отрицательный: T _m =92,2 °C Negative: T _m =92.2 °C	Отрицательный: T _m =92,2 °C Negative: T _m =92.2 °C	Отрицательный: T _m =92,2 °C Negative: T _m =92.2 °C	Положительный контроль 2.MED: T _m =92,7 °C Positive control 2.MED: T _m =92.7 °C
2.MED1	Отрицательный: T _m =84,8 °C Negative: T _m =84.8 °C	Отрицательный: T _m =84,8 °C Negative: T _m =84.8 °C	Отрицательный: T _m =84,8 °C Negative: T _m =84.8 °C	Положительный контроль 2.MED1: отсутствие кривой плавления Positive control 2.MED1: no melting curve
CA509	Отрицательный: T _m =88,2 °C Negative: T _m =88.2 °C	Отрицательный: T _m =88,2 °C Negative: T _m =88.2 °C	Отрицательный: T _m =88,2 °C Negative: T _m =88.2 °C	Положительный контроль 0.PE4: отсутствие кривой плавления Positive control 0.PE4: no melting curve
Tal72	Отрицательный: T _m =90,8 °C Negative: T _m =90.8 °C	Отрицательный: T _m =90,8 °C Negative: T _m =90.8 °C	Отрицательный: T _m =90,8 °C Negative: T _m =90.8 °C	Положительный контроль 0.PE4t: T _m =89 °C Positive control 0.PE4t: T _m =89 °C
Дифференциация филогенетических линий с использованием маркерных SNPs методом аллель-специфических ПЦР Differentiation of phylogenetic lineages using allele-specific PCR with marker SNPs				
0.ANT5wild	Отрицательный Negative	Отрицательный Negative	Отрицательный Negative	Отрицательный контроль 0.ANT5: отсутствие кривой плавления Положительный контроль 0.ANT3: T _m =90,3 °C Negative control 0.ANT5: no melting curve Positive control 0.ANT3: T _m =90.3 °C
0.ANT5mut	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Положительный: T _m =83,5 °C Positive: T _m =83.5 °C	Положительный контроль 0.ANT5: T _m =83,5 °C Positive control 0.ANT5: T _m =83.5 °C
0.ANT3wild *	Положительный Positive	Положительный Positive	Положительный Positive	Положительный сигнал у штаммов дикого варианта Positive signal in wild variant strains
0.ANT3mut *	Отрицательный Negative	Отрицательный Negative	Отрицательный Negative	Положительный сигнал у штаммов 0.ANT3 Positive signal in 0.ANT3 strains

Примечание: * отмечены результаты, полученные с применением способа выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов ПЦР-РВ.

Note: * the results obtained using the method of identifying single-nucleotide substitutions by high-resolution melting (HRM) curve analysis of RT-PCR products are noted.

Как следует из табл. 2, все три выделенные культуры – 103, 133 и 136 – показали себя единообразно и по результатам ПЦР совпадали по температуре плавления с контрольной культурой 0.ANT5 (рис. 2). В ПЦР-РВ в традиционном формате с праймерами и зондом на филогенетическую линию 0.ANT3 все три

исследуемых штамма дали отрицательный результат. С праймерами на участки делеций в 45 и 89 п.н. показана принадлежность исследуемых штаммов к основному подвиду *Y. pestis*. В то же время с праймерами на центральноазиатский подвид и таласский биовар этого подвида получен отрицательный ре-

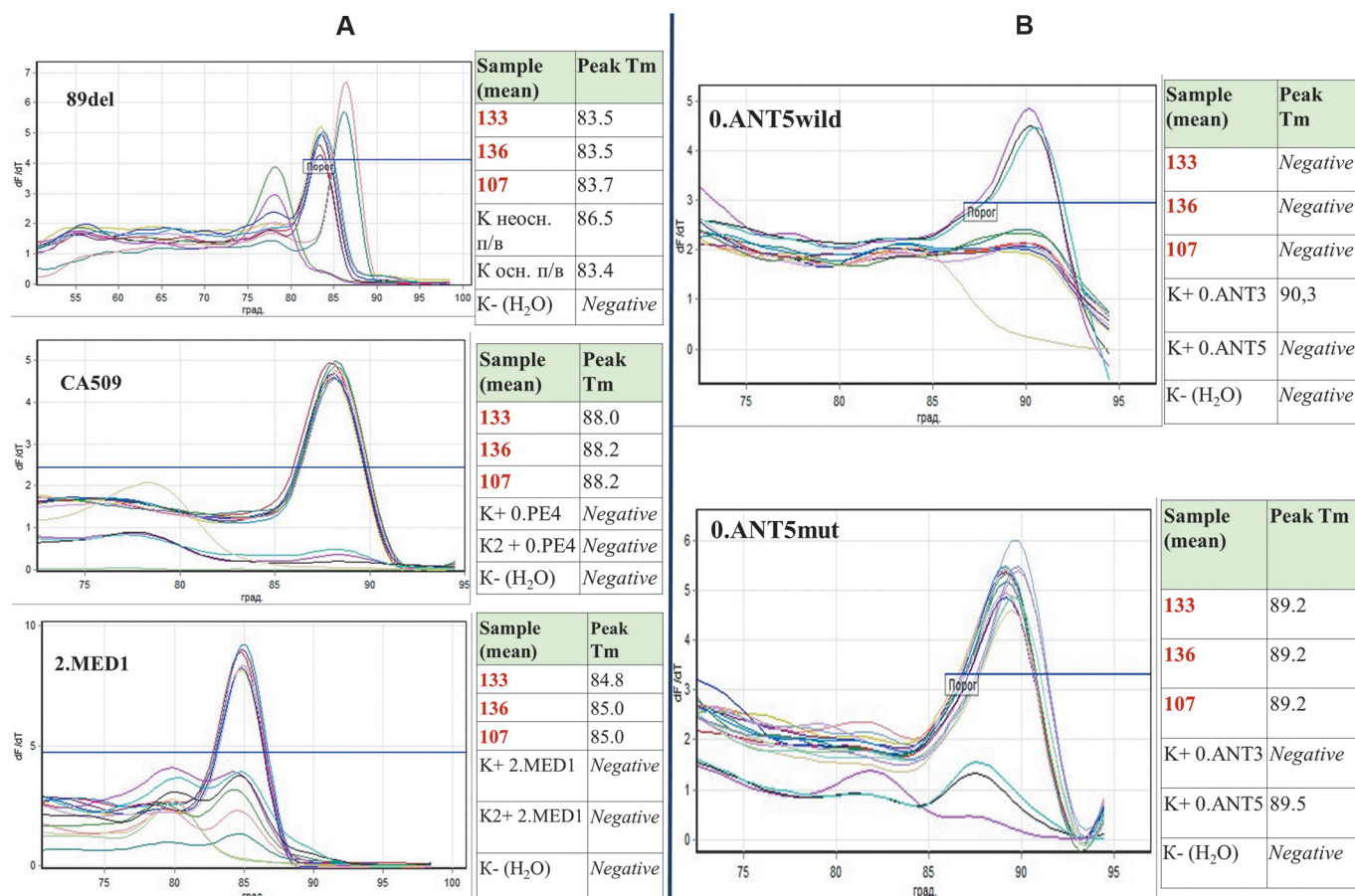


Рис. 2. Определение филогенетической принадлежности штаммов *Y. pestis* из Сарыджазского высокогорного очага (2023 г.) методом анализа кривых плавления продуктов ПЦР-РВ:

A – выделенные культуры; B – контрольная культура 0.ANT5 античного биовара

Fig. 2. Determination of phylogenetic appurtenance of *Y. pestis* strains from the Sarydzhas high-mountain focus (2023) through analyzing melting curves of RT-PCR products:

A – isolated cultures; B – control culture of 0.ANT5 branch, biovar antiqua

зультат. Отрицательным был результат и на средне-вековой биовар основного подвида. Таким образом, по комплексу проведенных исследований все три штамма относились к античному биовару основного подвида, филогенетической ветви 0.ANT5. Эти данные совпадали с результатами фенотипического анализа, а также с ранее полученными данными о распространении на территории Сарыджазского очага штаммов 0.ANT5. Таким образом, разработанный способ молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* из очагов чумы КР методом выявления однонуклеотидных замен с помощью анализа кривых плавления продуктов и комплекта разработанных праймеров показал свою эффективность для определения внутривидовой (подвиды, биовары, филогенетические ветви) принадлежности штаммов, полученных во время полевого сезона 2023 г. в природных очагах чумы КР. Разработанный способ может быть рекомендован для применения в дальнейших обследованиях полевого материала из природных очагов КР.

Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ штаммов *Y. pestis*. Для подтверждения результатов, полученных с помощью разра-

ботанного способа молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* из очагов КР, проведено полногеномное секвенирование трех выделенных в 2023 г. культур – 103, 133 и 136 – из Сарыджазского очага и выполнен их филогенетический анализ (рис. 3).

Как следует из приведенной на рис. 3 дендрограммы, штаммы *Y. pestis* 103, 133 и 136 вошли в ветвь 0.ANT5 вместе с другими ранее выделенными в Тянь-Шаньском очаге 0.ANT5 штаммами. Недавно мы сообщали, что от ранее существовавшей в XX в. популяции 0.ANT5 (на рис. 3 представлена штаммом *Y. pestis* 5M, Верхненарынский автономный очаг, 1958 г.) после длительного межэпизоотического периода в XXI в. отделились два новых клона, один из которых состоял из штаммов 2012–2020 гг. (*Y. pestis* 177, KM2079, KM2066, KM2073, KM2067, 49–50, KM2071, KM2080) (рис. 3, III), полученных в Сарыджазском и Верхненарынском очагах Тянь-Шаня. Второй недавно возникший клон состоял из штаммов 2020 г. из бассейна р. Койлу в Сарыджазском очаге (представлен на дендрограмме штаммом *Y. pestis* 80) (рис. 3, II). Как следует из дендрограммы, три выделенных в урочище Чон-Карабел в Сарыджазском очаге в 2023 г. штамма *Y. pestis* 103,

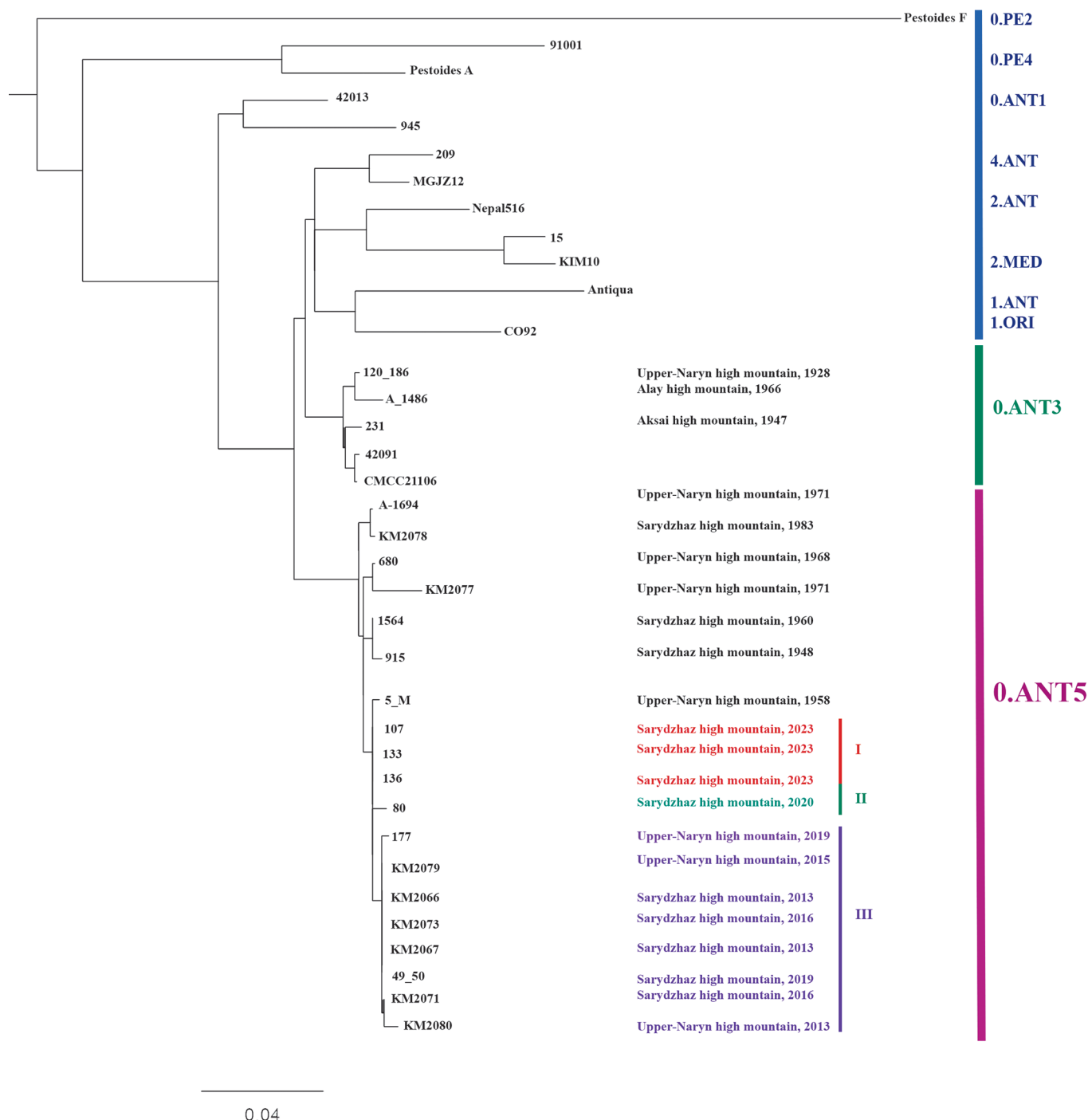


Рис. 3. Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* ветви 0.ANT5 античного биовара, выделенных в 2023 г. в Сарыджазском высокогорном очаге КР, по данным полногеномного секвенирования на основе 1527 коровых SNPs. Дендрограмму строили по алгоритму Maximum Likelihood с применением программы FastTree, встроенной в Snippy 4.6; модели GTR, подобранной в программе Jmodeltest2 с учетом AIC-критерия. Использовали 500 бутстреп-реплик. Визуализацию филогенетического дерева выполняли в программе FigTree v1.4.4. В качестве корня использовали штамм *Y. pestis* 620024 филогенетической линии 0.PE7, который на рисунке не представлен

Fig. 3. Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains of 0.ANT5 branch of the biovar antiqua, isolated in the Sarydzhas high-mountain focus of the Kyrgyz Republic in 2023, according to whole genome sequencing data based on 1527 core SNPs. The dendrogram was constructed using the Maximum Likelihood algorithm with the FastTree program built into Snippy 4.6; the GTR model selected in the Jmodeltest2 program taking into account the AIC criterion. 500 bootstrap replicas were used. Visualization of the phylogenetic tree was performed in the FigTree v1.4.4 software. *Y. pestis* strain 620024 of phylogenetic lineage 0.PE7, which is not shown in the figure, was used as a root

133 и 136 (рис. 3, I) не относятся к этим двум клонам, а принадлежат непосредственно к стволу популяции 0.ANT5, существовавшей здесь до межэпизоотического периода еще в 1958 г. Это свидетельствует о том, что микроочаги чумы сохранялись на этой территории в течение длительного времени и активизи-

ровались при наступлении благоприятных климатических условий.

Иммуноферментный анализ на выявление антител к фракции I *Y. pestis*. Также проведены развернутые исследования полевого материала 2023 г. на выявление антител к возбудителю чумы методом

ИФА. Для этого использовались смывы с грудной полости животных-носителей. Эти образцы исследовались с помощью тест-набора «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*» (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора) для детекции антител на фракцию 1 (Ф1) капсулы *Y. pestis* в соответствии с инструкцией к набору реагентов. При анализе 1435 проб обнаружено 86 положительных проб на наличие антител к фракции 1 капсулы *Yersinia pestis* в диагностическом титре 1/320. В результате установлено, что в полевом материале из Аксайского очага среди 320 проб количество положительных в ИФА было 2, среди 315 из Восточного Алая – положительных 71, среди 385 из Сарыджазского очага – положительных 11, среди 75 из Таласского очага, полученных весной, – положительных 2 и из 280, по-

лученных осенью, положительных проб не выявлено (табл. 3).

Места выявления положительных в ИФА проб представлены на рис. 1. Полученные данные (диагностический титр в ИФА 1/320 в 71 из 315 исследованных проб, 22,5 %) свидетельствуют о том, что на территории Восточного Алая в начале сезона прошла эпизоотия чумы на сурках. Грызуны с антигеном Ф1 встречались также на территории Сарыджазского очага – 11 из 385 исследованных проб (2,9 %), Аксайского очага – 2 из 380 проб (0,5 %) и Таласского очага в мае 2023 г. – 2 из 75 проб (2,7 %). Таким образом, ИФА является полезным диагностическим методом ретроспективного анализа напряженности эпизоотического процесса в очаге. Полученные данные также свидетельствуют о необходимости

Таблица 3 / Table 3

Результаты ИФА-анализа биологических проб полевого материала из природных очагов КР сезона 2023 г.
ELISA results for biological samples of field material from natural foci of the Kyrgyz Republic for the 2023-season

Природный очаг Natural focus	Количество проб Number of samples	Количество положительных проб Number of positive samples	Секторы очага Sectors of the focus
Аксайский Aksai	380	2	322431054,1 уч. Куйоо-Суу 322431054,1 Kujoo-Suu
			332431171,3 уч. Борду 332431171,3 Bordu
Алайский Alai	315	71	3514300331 ур. Катун-Арт 3514300331 Katyn-Art
			3514300343 ур. Туманчы 3514300343 Tumanchy
			3514300344 ур. Шарт 3514300344 Shart
			3514300433 ур. Айланма 3514300433 Ailanma
			3514300434 ур. Митир-Бел 3514300434 Mitir-Bel
			3514300433 ур. Чолок-Теке 3514300433 Cholok-Teke
			3514300343 ур. Калмак-Суу 3514300343 Kalmak-Suu
			3514301621 ур. Кальта-Булак 3514301621 Kal'ta-Bulak
Сарыджазский Sarydzhaz	385	11	3514300443 ур. Кок-Суу 3514300443 Kok-Suu
			114406344 Кайынды ур. Учкун грей 114406344 Kajyndy Uchkun grey
			114406333 ур. Сарлыташ 114406333 Sarlytash
Таласский (весна 2023 г.) Talas (spring 2023)	75	2	114406331 ур. Малый Талды-Суу Тез 114406331 Maly Taldy-Suu Tez
			114306211 ущ. Калба 114306211 Kalba
Таласский (осень 2023 г.) Talas (autumn, 2023)	280	–	–
Итого Total	1435	86	

более раннего выезда эпидотрядов для эпизоотического обследования территории Восточного Алая в Алайском высокогорном очаге. В целом результаты диагностического исследования полевого материала, полученного в 2023 г. в природных очагах КР, с помощью современных диагностических технологий свидетельствуют о продолжающейся активизации очагов чумы КР.

Перспективы палеогеномных исследований на территории КР. В рамках расширенного обследования территорий КР проведено рекогносцировочное обследование мест исторических захоронений, связанных со вспышками чумы. Ранее нами было показано, что в Тянь-Шаньском высокогорном очаге широко распространены штаммы древней филогенетической линии 0.ANT. Впервые обнаружена линия 0.ANT5, геном которой оказался наиболее близким геному штаммов Юстиниановой чумы (541–543 гг.) начала первой пандемии чумы [17, 18]. Из этого нами был сделан вывод, что первая пандемия чумы могла начаться на этой территории, что впоследствии подтверждено реконструкцией древнего генома *Y. pestis* из костных останков в захоронении того времени, найденном в Тянь-Шане [11]. В 2022 г. M.A. Spyrou *et al.* реконструировали геном из костных образцов, полученных русскими исследователями в конце XIX в. при раскопках средневековых кладбищ у г. Токмак (Буранинское) и «близ Пишпека» (современный г. Бишкек, Кара-Джигачское кладбище) в Чуйской долине Чуйской области, некоторые из которых оказались чумными [12]. Геном оказался непосредственным предшественником штаммов эпидемии «Черная смерть» (1348–1354 н.э.). Из этого был сделан вывод, что вторая пандемия чумы началась с этой территории. Ранее российский востоковед Д.А. Хвольсон написал, основываясь на текстах части надгробных эпитафий, что вторая пандемия чумы началась с местной вспышки чумы в 1338–1339 гг. и через торговые маршруты Великого шелкового пути достаточно быстро достигла средневековой Европы [19]. В то же время существуют и другие мнения о времени и месте возникновения второй пандемии чумы и о том, что первоначальная диверсификация ветви 0.ANT, предшествовавшая второй пандемии чумы, произошла ранее, не в XIV, а в XIII в., и была связана с территориальными экспансиями монголов [20, 21]. Для подтверждения предположения о том, что вторая пандемия чумы началась на Тянь-Шане, необходима реконструкция других геномов возбудителя этого периода. В настоящее время на территории средневекового городища Бурана, через которое проходил ранее Шелковый путь и известного как место раскопок конца XIX в. средневекового кладбища с чумными погребениями, сохранились остатки мавзолеев и погребений XII–XIV вв. [22, 23]. Эти места могут послужить источником информации, которая позволит подтвердить ранее полученные данные, что важно для выяснения закономерностей пространственно-временного рас-

пространения исторической чумы по торговым путям через Евразийские степи.

Природные очаги Кыргызстана остаются в настоящее время эпизоотически активными, о чем свидетельствуют факт выделения культур *Y. pestis* в Сарыджазском мезоочаге Тянь-Шаньского высокогорного очага в 2023 г., а также наличие на территории Восточного Алая в Алайском высокогорном очаге большого количества грызунов, в крови которых в диагностическом титре содержатся антитела к антигену Ф1. С учетом частого выделения культур *Y. pestis* в Сарыджазском и Верхненаарынском мезоочагах Тянь-Шаньского высокогорного очага чумы можно говорить о наличии напряженного эпизоотического процесса на этих очаговых территориях КР.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Благодарность. Благодарим научного сотрудника Института истории, археологии и этнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики В.А. Кольченко за консультации по локализации археологических объектов на территории Кыргызстана.

Список литературы

1. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств. Калининград: РА Полиграфич; 2022. 348 с.
2. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Кадастр эпизоотических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: ООО «Амирит»; 2016. 248 с.
3. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin Y.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.
4. Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Исторические и современные классификации возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:14–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22.
5. Абдикаримов С.Т., Ибрагимов Э.Ш., Эгембергенов Ч.Э. Современное эпизоотическое состояние природных очагов чумы Кыргызской Республики и мероприятия, направленные на обеспечение эпизоотического благополучия по чуме. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-45-48.
6. Ерошенко Г.А., Джапарова А.К., Оглодин Е.Г., Альхова Ж.В., Куклева Л.М., Кузнецов А.А., Краснов Я.М., Абдикаримов С.Т., Кутырев В.В. Филогеография штаммов *Yersinia pestis* ветви 0.ANT, выделенных в Тянь-Шане и Памиро-Алае в XX–XXI веках. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:76–84. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-76-84.
7. Куклева Л.М., Джапарова А.К., Оглодин Е.Г., Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Кузнецов А.А., Фадеева А.В., Ерошенко Г.А., Бердиев С.К., Кутырев В.В. Комплексная характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Сарыджазском и Верхненаарынском высокогорных очагах в 2019–2020 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:114–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
9. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007; 8(6):597–608. DOI: 10.2217/14622416.8.6.597.

10. Vossen R.H.A.M., Aten E., Roos A., den Dunnen J.T. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* 2009; 30(6):860–6. DOI: 10.1002/humu.21019.
11. Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., Pedersen M.W., Goldberg A., Usmanova E., Baimukhanov N., Loman V., Hedeager L., Pedersen A.G., Nielsen K., Afanasiev G., Akmatov K., Aldashev A., Alpaslan A., Baimbetov G., Bazaliiskii V.I., Beisenov A., Boldbaatar B., Boldgiv B., Dorzhu C., Ellingvag S., Erdenebaatar D., Dajani R., Dmitriev E., Evdokimov V., Frei K.M., Gromov A., Goryachev A., Hakonarson H., Hegay T., Khacha-tryan Z., Khaskhanov R., Kitov E., Kolbina A., Kubatbek T., Kukushkin A., Kukushkin I., Lau N., Margaryan A., Merkyte I., Mertz I.V., Mertz V.K., Mijiddorj E., Moiyesev V., Mukhtarova G., Nurmukhanbetov B., Orozbekova Z., Panyushkina I., Pieta K., Smrčka V., Shevnina I., Logvin A., Sjögren K.G., Stölcová T., Taravella A.M., Tashbaeva K., Tkachev A., Tulegenov T., Voyakin D., Yepiskoposyan L., Undrakhbold S., Varfolomeev V., Weber A., Wilson Sayres M.A., Kradin N., Allentoft M.E., Orlando L., Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature*. 2018; 557(7705):369–74. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.
12. Spyrou M.A., Musralina L., Gneccchi Ruscone G.A., Kocher A., Borbone P.G., Khartanovich V.I., Buzhilova A., Djansugurova L., Bos K.I., Kühnert D., Haak W., Slavin P., Krause J. The source of the Black Death in fourteenth-century central Eurasia. *Nature*. 2022; 606(7915):718–24. DOI: 10.1038/s41586-022-04800-3.
13. Одинокоев Г.Н., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Краснов Я.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ подвидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы методом полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2552611, опублик. 10.06.2015. Бюл. № 16.
14. Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Макашова М.А., Балыкова А.Н., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование системы аллельспецифической ПЦР в режиме реального времени для определения филогенетической принадлежности штаммов *Yersinia pestis*. *Биотехнология*. 2022; 38(3):82–91. DOI: 10.56304/S0234275822030073.
15. Носов Н.Ю., Никифоров К.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ идентификации штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара с последующей дифференциацией по филогенетической принадлежности методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов. Патент РФ № 2705813, опублик. 12.11.2019. Бюл. № 32.
16. Морозов О.А., Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ идентификации *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* и одновременной дифференциации *Yersinia pestis* основного и центральноазиатского подвидов методом мультиплексной ПЦР. Патент РФ № 2737775, опублик. 02.12.2020. Бюл. № 34.
17. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsall D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet. Infect. Dis.* 2014; 14(4):319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
18. Feldman M., Harbeck M., Keller M., Spyrou M.A., Rott A., Trautmann B., Scholz H.C., Paffgen B., Peters J., McCormick M., Bos K., Herbig A., Krause J. A high-coverage *Yersinia pestis* genome from a sixth-century Justinianic plague victim. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(11):2911–23. DOI: 10.1093/molbev/msw170.
19. Хвольсон Д.А. Несторианские надписи из Семиречья. В кн.: Розен В.Р., редактор. Записки Восточного отделения Императорского Русского археологического общества. Т. 1. 1886. СПб.: Тип. Имп. Академии наук; 1887. С. 217–21.
20. Green M.H. The four Black Deaths. *Am. Hist. Rev.* 2020; 125(5):1601–31. DOI: 10.1093/ahr/rhaa511.
21. Fancy N., Green M.H. Plague and the fall of Baghdad (1258). *Med. Hist.* 2021; 65(2):157–77. DOI: https://doi.org/10.1017/mdh.2021.3.
22. Кольченко В.А. Припишпекское (Кара-Джигачское) средневековое христианское кладбище по данным архивных документов о раскопках 1886 года. В кн.: Религии Казахстана и Центральной Азии на Великом Шелковом пути: Материалы международной научно-практической конференции (Алматы, 12–13 июня 2017 г.). Алматы; 2017. С. 167–79.
23. Кольченко В.А. Христианское кладбище монгольского времени на городище Бурана (по данным архивных документов о раскопках 1886 года). В кн.: Бочаров С.Г., Ситдинов А.Г., редакторы. Генуэзская Хазария и Золотая Орда. Казань; Кишинев; 2019. Т. 2. С. 209–21.

References

1. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Atlas of Natural Plague Foci of Russia and Foreign Countries]. Kaliningrad: RA Poligrafich; 2022. 348 p.
2. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague in the Territory of the Russian Federation and Former Soviet Union (1876–2016)]. Saratov: "Amirit" LLC; 2016. 248 p.
3. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin Y.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.
4. Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Kutyrev V.V. [Historical and modern classifications of the plague agent]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (4):14–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-27.
5. Abdikarimov S.T., Ibragimov E.Sh., Egembergenov Ch.E. [Current epizootic condition of natural plague foci in Kyrgyz Republic and measures aimed at provision of epidemiological welfare as regards plague]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (2):45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-45-48.
6. Eroshenko G.A., Dzharparova A.K., Oglodin E.G., Al'khova Zh.V., Kukleva L.M., Kuznetsov A.A., Krasnov Ya.M., Abdikarimov S.T., Kutyrev V.V. Phylogeny of *Yersinia pestis* strains belonging to 0.ANT branch, isolated in Tien-Shan and Pamir-Alai in XX–XXI centuries. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):76–84. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-76-84.
7. Kukleva L.M., Dzharparova A.K., Oglodin E.G., Naryshkina E.A., Krasnov Ya.M., Kuznetsov A.A., Fadeeva A.V., Eroshenko G.A., Berdiev S.K., Kutyrev V.V. [Complex characteristics of *Yersinia pestis* strains isolated in the Sarydzhas and Upper-Naryn high-mountain foci in 2019–2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (2):114–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122.
8. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: JSC "Shiko"; 2013. 560 p.
9. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007; 8(6):597–608. DOI: 10.2217/14622416.8.6.597.
10. Vossen R.H.A.M., Aten E., Roos A., den Dunnen J.T. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* 2009; 30(6):860–6. DOI: 10.1002/humu.21019.
11. Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., Pedersen M.W., Goldberg A., Usmanova E., Baimukhanov N., Loman V., Hedeager L., Pedersen A.G., Nielsen K., Afanasiev G., Akmatov K., Aldashev A., Alpaslan A., Baimbetov G., Bazaliiskii V.I., Beisenov A., Boldbaatar B., Boldgiv B., Dorzhu C., Ellingvag S., Erdenebaatar D., Dajani R., Dmitriev E., Evdokimov V., Frei K.M., Gromov A., Goryachev A., Hakonarson H., Hegay T., Khacha-tryan Z., Khaskhanov R., Kitov E., Kolbina A., Kubatbek T., Kukushkin A., Kukushkin I., Lau N., Margaryan A., Merkyte I., Mertz I.V., Mertz V.K., Mijiddorj E., Moiyesev V., Mukhtarova G., Nurmukhanbetov B., Orozbekova Z., Panyushkina I., Pieta K., Smrčka V., Shevnina I., Logvin A., Sjögren K.G., Stölcová T., Taravella A.M., Tashbaeva K., Tkachev A., Tulegenov T., Voyakin D., Yepiskoposyan L., Undrakhbold S., Varfolomeev V., Weber A., Wilson Sayres M.A., Kradin N., Allentoft M.E., Orlando L., Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature*. 2018; 557(7705):369–74. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.
12. Spyrou M.A., Musralina L., Gneccchi Ruscone G.A., Kocher A., Borbone P.G., Khartanovich V.I., Buzhilova A., Djansugurova L., Bos K.I., Kühnert D., Haak W., Slavin P., Krause J. The source of the Black Death in fourteenth-century central Eurasia. *Nature*. 2022; 606(7915):718–24. DOI: 10.1038/s41586-022-04800-3.
13. Odiokov G.N., Nikiforov K.A., Kuleva L.M., Krasnov Ya.M., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [A method for subspecies differentiation of plague agent strains using polymerase chain reaction]. RF Patent No. 2552611, publ. 06/10/2015. Bull. No. 16.
14. Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Kuleva L.M., Makashova M.A., Balykova A.N., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Construction of an allele-specific real-time PCR system to determine the phylogenetic appurtenance of *Yersinia pestis* strains]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2022; 38(3):82–91. DOI: 10.56304/S0234275822030073.

15. Nosov N.Yu., Nikiforov K.A., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. [A method for identifying *Yersinia pestis* strains of medieval biovar with subsequent differentiation by phylogenetic appurtenance using polymerase chain reaction with hybridization-fluorescent registration of results]. RF Patent No. 2705813, publ. 11/12/2019. Bull. No. 32.
16. Morozov O.A., Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. A method for identifying *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* and simultaneous differentiation of *Yersinia pestis* main and Central Asian subspecies using multiplex PCR. RF Patent No. 2737775, publ. 12/02/2020. Bull. No. 34.
17. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet. Infect. Dis.* 2014; 14(4):319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
18. Feldman M., Harbeck M., Keller M., Spyrou M.A., Rott A., Trautmann B., Scholz H.C., Paffgen B., Peters J., McCormick M., Bos K., Herbig A., Krause J. A high-coverage *Yersinia pestis* genome from a sixth-century Justinianic plague victim. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(11):2911–23. DOI: 10.1093/molbev/msw170.
19. Khvol'son D.A. Nestorian inscriptions from Seven Rivers. In: Rosen V.R., editor. [Notes of the Eastern Branch of the Imperial Russian Archaeological Society. Vol. 1. 1886]. St. Petersburg: Publishing House of the Imperial Academy of Sciences; 1887. P. 217–21.
20. Green M.H. The four Black Deaths. *Am. Hist. Rev.* 2020; 125(5):1601–31. DOI: 10.1093/ahr/rhaa511.
21. Fancy N., Green M.H. Plague and the fall of Baghdad (1258). *Med. Hist.* 2021; 65(2):157–77. DOI: <https://doi.org/10.1017/mdh.2021.3>.
22. Kol'chenko V.A. [Pripishpek (Kara-Dzhigach) medieval Christian cemetery according to archival documents about excavations in 1886]. In: [Religions of Kazakhstan and Central Asia across the Great Silk Road: Materials of the International Scientific and Practical Conference (Almaty, June 12–13, 2017)]. Almaty; 2017. P. 167–79.
23. Kol'chenko V.A. [Christian cemetery of the Mongol era at the site of Burana (according to archival documents about excavations in 1886)]. In: Bocharov S.G., Sitdikov A.G., editors. [Genoese Khazaria and the Golden Horde]. Kazan; Kishinev; 2019. Vol. 2. P. 209–21.

Authors:

Berdiev S.K., Usenbaev N.T., Kebekbaeva N.T., Dzhaparova A.K., Yuldasheva A.M. Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 92, Skryabina St., Bishkek, 720005, Kyrgyz Republic. E-mail: rckooi@mail.ru.

Eroshenko G.A., Balykova A.N., Oglodin E.G., Katyshev A.D., Kuznetsov A.A., Fadeeva A.V., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Mukanmetesen uulu Zh. At-Bashinsky Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 4, M. Salymbekova St., At-Bashi, Naryn Region, Kyrgyz Republic.

Zhumashov D. Karakol Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 114, Zhamansarieva St., Karakol, Kyrgyz Republic.

Razhapbaeva A.Sh. Osh Anti-Plague Department of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 1, Sh. Rustaveli St., Osh, Kyrgyz Republic.

Об авторах:

Бердиев С.К., Усенбаев Н.Т., Кебекбаева Н.Т., Джанпарова А.К., Юлдашева А.М. Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. Кыргызская Республика, 720005, Бишкек, ул. Скрябина, 92. E-mail: rckooi@mail.ru.

Ерошенко Г.А., Балькова А.Н., Оглодин Е.Г., Катышев А.Д., Кузнецов А.А., Фадеева А.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Муканметэсен уулу Ж. Ат-Башинское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР. Кыргызская Республика, Нарынская обл., Ат-Баши, ул. М. Салымбекова, 4.

Жумашиев Д. Каракольское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР. Кыргызская Республика, Каракол, ул. Жамансариева, 114.

Разжапбаева А.Ш. Ошское противочумное отделение РЦКиООИ МЗ КР. Кыргызская Республика, Ош, ул. Ш. Руставели, 1.