

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-68-76

УДК 616.98:579.841.95(292.81)

П.А. Горюнова, Г.А. Ерошенко, А.Н. Балыкова, А.В. Коврижников, К.С. Шевченко,
Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, Н.С. Червякова, В.В. Кутырев

MLVA25- и CRISPR-генотипы штаммов *Yersinia pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы

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

Цель работы – изучение генетического разнообразия и пространственно-временной структуры *Yersinia pestis* в Прикаспийском песчаном очаге чумы с использованием методов MLVA25- и CRISPR-типирования. **Материалы и методы.** В работе использовано 98 штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Прикаспийского песчаного очага чумы в 1925–2015 гг. Полногеномное секвенирование выполняли на платформах Ion GeneStudio S5 System (ThermoFisher Scientific) и MGI (DNBSEQ-G50RS). Фрагментное секвенирование проводили с помощью ABI PRISM 3500XL. Поиск VNTR- и CRISPR-локусов с последующим выравниванием нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе MEGA X. Полученные последовательности вносили в созданную базу данных в программе Bionumerics v7.6 (Applied Maths). Построение филогенетического дерева осуществляли методом UPGMA. **Результаты и обсуждение.** По результатам проведенного MLVA25- и CRISPR-анализа 98 штаммов *Y. pestis* разделились на 60 генотипов (CS1 – CS60). Выявлена вариабельность по 23 VNTR-локусам. Описаны 7 новых CRISPR-спейсеров: 5 – в *YPa* и 2 – в *YPb* (размер – 31–33 п.н., GC-состав – 34–58 %). Описанные спейсеры получили названия a108, a109, a110, a111, a112, b53, b54. Выявлена взаимосвязь изменения копийности VNTR-локусов в зависимости от места и времени выделения штаммов. Полученные данные могут быть использованы для проведения молекулярно-генетической паспортизации территории Прикаспийского песчаного очага чумы и для изучения направлений и закономерностей эволюции и пространственно-временной циркуляции популяций *Y. pestis* в очагах чумы Прикаспия.

Ключевые слова: чума, штаммы *Yersinia pestis*, Прикаспийский песчаный очаг, MLVA- и CRISPR-генотипирование.

Корреспондирующий автор: Горюнова Полина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Горюнова П.А., Ерошенко Г.А., Балыкова А.Н., Коврижников А.В., Шевченко К.С., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Червякова Н.С., Кутырев В.В. MLVA25- и CRISPR-генотипы штаммов *Yersinia pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:68–76. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-68-76

Поступила 28.11.2023. Принята к публ. 01.12.2023.

P.A. Goryunova, G.A. Eroshenko, A.N. Balykova, A.V. Kovrizhnikov, K.S. Shevchenko,
L.M. Kukleva, E.A. Naryshkina, N.S. Chervyakova, V.V. Kutryev

MLVA25 and CRISPR Genotypes of *Yersinia pestis* Strains from the Caspian Sandy Plague Focus

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

Abstract. The aim of the work was to study the genetic diversity and spatial-temporal structure of *Yersinia pestis* in the Caspian sandy plague focus using MLVA25 and CRISPR typing methods. **Materials and methods.** 98 *Y. pestis* strains isolated in the territory of the Caspian sandy plague focus in 1925–2015 were used in the study. Whole genome sequencing was performed on Ion GeneStudio S5 System (ThermoFisher Scientific) and MGI (DNBSEQ-G50RS) platforms. Fragment sequencing was conducted using “ABI PRISM 3500XL”. The search for VNTR and CRISPR loci with subsequent alignment of nucleotide sequences was carried out in the MEGA X program. The obtained sequences were entered into the created database in the Bionumerics v7.6 (Applied Maths) software. The phylogenetic tree was constructed using the UPGMA method. **Results and discussion.** According to the results of MLVA25 and CRISPR analysis, 98 *Y. pestis* strains are divided into 60 genotypes (CS1 – CS60). Variability by 23 VNTR loci has been discovered. 7 new CRISPR spacers are described: 5 in *YPa* and 2 in *YPb* (size 31–33 bp, GC composition 34–58 %). The described spacers are designated as a108, a109, a110, a111, a112, b53, b54. The interrelation of changes in the copy number of VNTR loci depending on the place and time of isolation of strains has been revealed. The data obtained can be used to carry out molecular-genetic certification of the territory of the Caspian sandy plague focus and to study the routes and patterns of evolution and spatiotemporal circulation of *Y. pestis* populations in the Caspian plague foci.

Key words: plague, *Yersinia pestis* strains, Caspian sandy focus, MLVA and CRISPR genotyping.

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

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

Corresponding author: Polina A. Goryunova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Balykova A.N., Kovrizhnikov A.V., Shevchenko K.S., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Chervyakova N.S., Kutryev V.V. MLVA25 and CRISPR Genotypes of *Yersinia pestis* Strains from the Caspian Sandy Plague Focus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:68–76. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-68-76

Received 28.11.2023. Accepted 01.12.2023.

Goryunova P.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6522-2606>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Balykova A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>
Kovrizhnikov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>
Shevchenko K.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3170-9827>

Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>
Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>
Chervyakova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>
Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Прикаспийский песчаный очаг чумы занимает западную часть Прикаспийской низменности вдоль берега Каспийского моря от Волги до Терека. Административно очаг располагается в Астраханской области, республиках Калмыкия и Дагестан, Чеченской Республике и Ставропольском крае. На основании эколого-эпизоотологических характеристик территория Прикаспийского песчаного очага подразделена на пять ландшафтно-экологических районов (ЛЭР): Приволжские пески, Ильменно-Придельтовый район, Приморский район, Черные земли, Терско-Кумское междуречье. Эпидемические проявления в Прикаспийском песчаном очаге регистрировали в 1923–1948 гг. и в 1979 г. Штаммы *Yersinia pestis* выделяли от людей с различной формой чумы: бубонной, легочной, септической. Эпизоотии на территории очага регистрировали в 1924–1925, 1929–1931, 1935–1938, 1946–1954 гг. После 25-летнего межэпизоотического периода в 1979 г. отмечена резкая активизация очага, и в последующий период эпизоотии чумы регистрировали здесь практически ежегодно с выделением большого числа культур *Y. pestis* [1]. Штаммы, полученные на территории Прикаспийского очага, относятся к средневековому биовару основного подвида *Yersinia pestis* subspecies *pestis*, филогенетической ветви 2.MED1 [2]. Это высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы, которые были этиологическими агентами вспышек и отдельных случаев чумы на территории очага в первой половине XX в. Штаммы *Y. pestis* филогенетической ветви 2.MED1 генетически однородны, что затрудняет их разделение по времени и региону выделения.

В настоящее время для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* используют различные методы молекулярно-генетического типирования. Одним из доступных методов, обладающим высоким разрешением в отношении возбудителя чумы, является метод мультилокусного анализа VNTR-последовательностей – MLVA (от англ. multiple loci VNTR analysis). VNTR (от англ. variable number tandem repeats) – варибельное число tandemных повторов – участки генома с повторяющейся несколько раз короткой нуклеотидной последовательностью. Ввиду высокой частоты возникновения мутаций по VNTR-локусам (от $8,5 \cdot 10^{-6}$ до $3,7 \cdot 10^{-4}$ мутаций на поколение) метод MLVA-типирования обладает высокой дискриминационной способностью и эффективностью по отношению к штаммам *Y. pestis*, выделенным на одной географической территории [3, 4].

CRISPR (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – кластеризованные короткие палиндромные повторы с регулярными интервалами, состоят из повторов ДНК, разделенных неповторяющимися элементами, или «спейсерами»,

которые обычно представлены фрагментами чужеродных генетических элементов (бактериофагов или плазмид). Эти локусы и белки Cas (CRISPR-ассоциированные белки) образуют адаптивную иммунную систему, которая защищает бактерии от вторжения фагов и плазмид, а также участвует в механизмах клеточной регуляции [5, 6]. Геном *Y. pestis* содержит три CRISPR-локуса, называемых *YPa* (*YP1*), *YPb* (*YP2*) и *YPc* (*YP3*), в настоящее время сообщается о 173 спейсерных последовательностях [7–10]. Использование нескольких методов типирования позволяет установить связь между штаммами *Y. pestis*, выделенными из различных очагов чумы.

Целью работы является изучение генетического разнообразия и пространственно-временной структуры *Y. pestis* в Прикаспийском песчаном очаге чумы с использованием методов MLVA25- и CRISPR-типирования.

Материалы и методы

В работе использованы 98 штаммов *Y. pestis*, выделенных в Прикаспийском песчаном очаге в период с 1925 по 2015 г. Среди них 15 штаммов первой половины XX в. (1925–1947 гг.). Они получены от малого суслика *Spermophilus pygmaeus* (7 штаммов), домовой мыши *Mus musculus* (2 штамма), верблюда (1 штамм) и людей (5 штаммов). Штаммы *Y. pestis* второй половины XX – начала XXI в. (1979–2015 гг.) выделены от полуденной песчанки *Meriones meridianus* (37 штаммов) и ее блох (10 штаммов), гребенщиковой песчанки *Meriones tamariscinus* (6 штаммов) и ее блох (4 штамма), малого суслика *S. pygmaeus* (7 штаммов) и его блох (7 штаммов), домовой мыши *M. musculus* (4 штамма) и ее блох (2 штамма), серого хомячка *Cricetulus migratorius* (1 штамм) и его блох (2 штамма), обыкновенной полевки *Microtus arvalis* (1 штамм), ондатры *Ondatra zibethicus* (1 штамм), степного хоря *Mustela eversmanii* (1 штамм).

Штаммы *Y. pestis* выращивали при температуре 28 °C в течение 24–48 ч на агаре LB и в бульоне LB. Получение геномной ДНК *Y. pestis* осуществляли с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Данные для проведения MLVA25- и CRISPR-типирования собраны путем анализа результатов полногеномного и фрагментного секвенирования. Полногеномное секвенирование проводили на платформах Ion GeneStudio S5 System (ThermoFischer Scientific, США) и MGI (DNBSEQ-G50RS, Китай). Фрагментное секвенирование проводили с помощью ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, США) при амплификации участков генома методом ПЦР с использованием пар праймеров, описанных ранее [7, 11, 12]. Поиск VNTR-локусов и последующее вы-

равнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA X. Количественный подсчет тандемных повторов выполняли по 25 VNTR-локусам в программе Tandem Repeats Finder 4.09 [13]. Поиск CRISPR-локусов и последующее выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA X. Полученные последовательности сравнивали с опубликованными данными для идентификации спейсеров CRISPR [9, 10]. Для спейсеров, впервые обнаруженных в каждом локусе CRISPR, проведен анализ нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма BLAST в базе данных Gene Bank NCBI (<http://blast.ncbi>). Полученные числовые значения и нуклеотидные последовательности вносили в созданную в программе Bionumerics v7.6 (Applied Maths, Бельгия) базу данных для их последующей систематизации, хранения и проведения биоинформационного анализа. Построение филогенетического дерева для оценки родства штаммов осуществляли методом UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages, невзвешенная попарная группировка с усреднением). Для оценки дискриминирующей способности метода рассчитывали индекс разнообразия Хантера – Гастона (HGDI, Hunter – Gaston discriminatory index) [14]. Для оценки аллельного полиморфизма VNTR-локусов использовали индекс разнообразия PIC (polymorphism information content) [15].

Результаты и обсуждения

Проведено MLVA25- и CRISPR-типирование 98 штаммов *Y. pestis*, выделенных в 1925–2015 гг. на территории Прикаспийского песчаного очага чумы, в результате которого исследуемые штаммы разделились на 60 генотипов (индекс разнообразия HGDI=0,977), названных CS1 – CS60 (рисунок). Из них 46 были уникальными (т.е. обнаруживались только у одного штамма в изученной выборке), 12 (генотипы CS1, CS5, CS8, CS28, CS29, CS31, CS34, CS35, CS38, CS40, CS45, CS60) объединяли в себе от 2 до 4 штаммов, в состав двух (генотипы CS10, CS36) входило 9 штаммов.

При анализе изменчивости VNTR-локусов выявлена вариабельность по 23 локусам: *yp0120ms01*, *yp1290ms04*, *yp1935ms05*, *yp2769ms06*, *yp2916ms07*, *yp3057ms09*, *yp0559ms15*, *yp1814ms20*, *yp1895ms21*, *yp4042ms35*, *yp4425ms38*, *yp0581ms40*, *yp0718ms41*, *yp1018ms44*, *yp1108ms45*, *yp1335ms46*, *yp3060ms56*, *yp4280ms62*, *yp1118ms69*, *yp1580ms70*, *yp1925ms71*, *yp3236ms73*, *yp3245ms74*, – в то время как по оставшимся двум локусам: *yp2058ms51*, *yp2612ms54* – все исследуемые штаммы были идентичными (табл. 1, рисунок). Индекс разнообразия PIC варьировался от 0 до 0,678. Наибольшее количество аллелей наблюдалось в локусах *yp2769ms06*, *yp3057ms09*, *yp1335ms46*, *yp3060ms56*, *yp4280ms62*, *yp1580ms70*.

В результате проведенного CRISPR-анализа штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного оча-

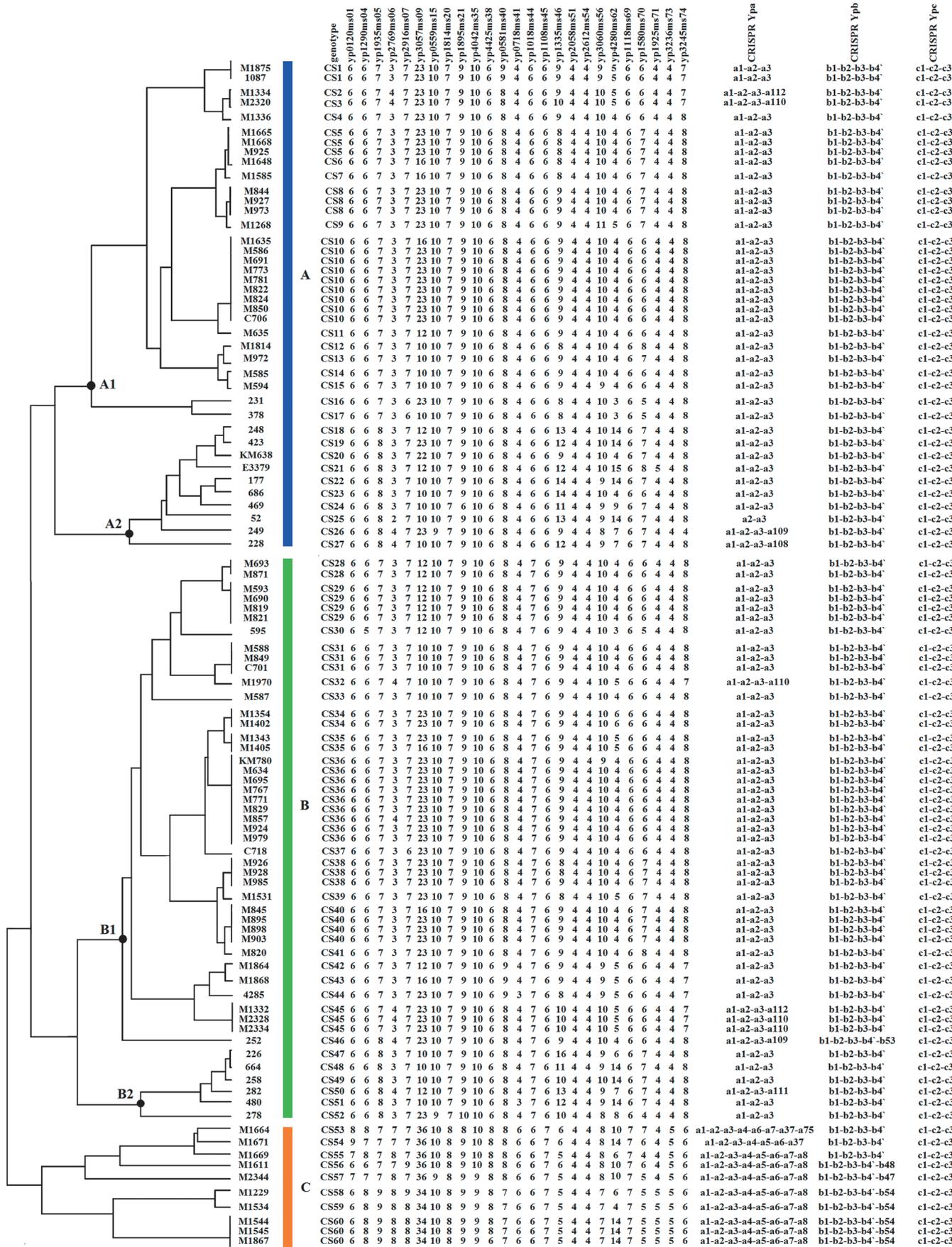
га чумы обнаружено 26 спейсеров. Нами выявлены вставки и делеции спейсерных последовательностей в локусах *YPa*, *YPb*, в то время как по локусу *YPc* все исследуемые штаммы были идентичными. Всего в штаммах *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы обнаружено 7 новых спейсеров: 5 – в *YPa* и 2 – в *YPb*. Их длина составляет от 31 до 33 п.н., а GC-состав варьирует в пределах 34–58 %. Впервые описанные спейсеры получили названия a108, a109, a110, a111, a112, b53, b54. Их характеристика представлена в табл. 2.

Новые спейсеры имеют гомологичные протоспейсерам последовательности в профаге *YPO2096~YPO2135* в геноме штамма CO92 (NCBI GenBankID AL590842.1). Недавно было показано, что профаг *YpfΦ* (*YPO2271~YPO2281* в геноме CO92) был стабилизирован в штаммах биовара *orientalis* и нестабильно присутствовал в некоторых штаммах трех других биоваров в качестве эписомы [16, 17]. Взаимодействие между *YpfΦ* и *Y. pestis* могло оставить некоторые следы в локусах CRISPR, однако ни один из идентифицированных спейсеров у изученных штаммов из Прикаспийского песчаного очага не имеет гомолога в *YpfΦ*.

Три локуса CRISPR присутствовали во всех изученных штаммах, а количество аллелей, наблюдаемых в *YPa*, *YPb* и *YPc*, составило 10, 5, 1 соответственно (табл. 3). *YPa* является наиболее полиморфным локусом CRISPR у *Y. pestis*, за которым следуют *YPb* и *YPc*, что согласуется с предыдущими результатами [7].

Большинство штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы имеют идентичный CRISPR-профиль, представленный спейсерами *YPa* a1-a2-a3, *YPb* b1-b2-b3-b4', *YPc* c1-c2-c3. Этот массив спейсеров уже был определен как CRISPR-профиль для штаммов средневекового биовара [8]. Однако часть исследуемых штаммов из Прикаспийского песчаного очага чумы имеют делецию спейсера в локусе *YPa* или же удлиненные массивы спейсеров в локусах *YPa* и *YPb*. Ранее T. Barrangou *et al.* предположили, что делеции происходят в результате гомологичной рекомбинации между повторами CRISPR [18]. Мы также идентифицировали вставки спейсеров, специфичные как для группы, так и для единичных штаммов из Прикаспийского песчаного очага чумы (табл. 3).

Большинство (78 %) изученных штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы имеют CRISPR-профиль, характерный для штаммов средневекового биовара. Однако штамм 52 (1925, *S. pygmaeus*) имел делецию a1 спейсера в локусе *YPa*. Для ряда штаммов, выделенных как в первой половине XX в., так и во второй половине XX – начале XXI в. на территории Черных земель, Терско-Кумского междуречья и Приморского района от носителей, переносчиков и людей, характерно наличие дополнительных (ранее не описанных в литературе) спейсеров: a108, a109, a110, a111, a112,



Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы по данным MLVA25- и CRISPR-типирования. Дендрограмма построена методом UPGMA в программе Bionumerics 7.6.3

Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains from the Caspian sandy plague focus according to the results of MLVA25 and CRISPR typing. The dendrogram was constructed using the UPGMA method in the Bionumerics 7.6.3 program

Таблица 1 / Table 1

Характеристика VNTR-локусов штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага
 Characteristics of VNTR loci of *Y. pestis* strains from the Caspian sandy focus

Локус Locus	Длина повтора, п.н. Repeat size, bp	Размер ампликона, п.н. Allele size range, bp	Количество копий VNTR Number of VNTR copies	Индекс полиморфизма Polymorphism information content
<i>yp0120ms01</i>	18	210–264	6, 7, 8, 9	0,079
<i>yp1290ms04</i>	17	179–230	5, 6, 7, 8	0,188
<i>yp1935ms05</i>	17	257–291	7, 8, 9	0,368
<i>yp2769ms06</i>	60	245–605	2, 3, 4, 7, 8	0,366
<i>yp2916ms07</i>	10	164–194	6, 7, 8, 9	0,172
<i>yp3057ms09</i>	18	286–736	10, 12, 16, 22, 23, 34, 36	0,678
<i>yp0559ms15</i>	15	221–237	9, 10	0,039
<i>yp1814ms20</i>	15	238–253	7, 8	0,183
<i>yp1895ms21</i>	18	224–296	6, 8, 9, 10	0,059
<i>yp4042ms35</i>	15	204–219	9, 10	0,114
<i>yp4425ms38</i>	16	201–233	6, 8	0,116
<i>yp0581ms40</i>	17	214–248	7, 8, 9	0,188
<i>yp0718ms41</i>	17	166–217	3, 4, 6	0,219
<i>yp1018ms44</i>	17	233–254	6, 7	0,499
<i>yp1108ms45</i>	12	149–161	6, 7	0,188
<i>yp1335ms46</i>	7	112–189	5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16	0,621
<i>yp2058ms51</i>	18	207	4	0,00
<i>yp2612ms54</i>	22	281	7	0,00
<i>yp3060ms56</i>	16	220–284	7, 8, 9, 10, 11	0,458
<i>yp4280ms62</i>	9	97–205	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15	0,646
<i>yp1118ms69</i>	16	163–179	6, 7	0,183
<i>yp1580ms70</i>	9	137–173	4, 5, 6, 7, 8	0,602
<i>yp1925ms71</i>	15	157–172	4, 5	0,114
<i>yp3236ms73</i>	18	207–225	4, 5	0,183
<i>yp3245ms74</i>	15	165–225	4, 6, 7, 8	0,375

Таблица 2 / Table 2

Характеристика вновь описанных спейсеров *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы
 Characteristics of newly described spacers of *Y. pestis* from the Caspian sandy plague focus

Локус Locus	Спейсер Spacer	Последовательность Sequence	Длина, п.н. Length, bp	GC-состав, % GC-content, %	Позиция протоспейсера по геному CO92 (AL590842.1) Position of the protospacer across the CO92 genome (AL590842.1)	Ген Gene	Кодируемый продукт Encoded product
<i>YPa</i>	a108	TTGCTGAAGATGTAGTGG CGGCCGGTGTTCAT	31	55	2382262..2382292	YPO2110	Предполагаемый фаговый белок Putative phage protein
	a109	ATGGACAGGCTCCGGAA GGACGAGCAGGTTATT	33	55	2376960..2376992	YPO2103	Предполагаемая фаговая терминаза (псевдоген) Putative phage terminase (pseudogene)
	a110	GCAACCATTCGCTATATG TAGTTCCCGCTGGAT	33	48	2380215..2380246	YPO2108	Гипотетический фаговый белок Hypothetical phage protein
	a111	TGGCTAAAAACATATGAAA CAGAAGTGGCCGTA	32	41	2384756..2384787	YPO2116	Предполагаемый фаговый белок Putative phage protein
	a112	GCAACCATTCGCTATATG TAGTTCCCGCTGGA	32	50	2380199..2380266	YPO2108	Предполагаемый фаговый белок Putative phage protein
<i>YPb</i>	b53	TTGTCGCTCAATGGAAAC ATTAATCACTAAGT	32	34	2380113..2380144	YPO2108	Гипотетический фаговый белок Hypothetical phage protein
	b54	AACGAACCCACGTAGAAT TGCCATCACCGCCGG	33	58	2382982..2383016	YPO2111	Гипотетический фаговый белок Hypothetical phage protein

Таблица 3 / Table 3

CRISPR-профиль штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы
CRISPR profile of *Y. pestis* strains from the Caspian sandy plague focus

Штаммы, годы и регионы выделения Strains, years, and regions of isolation	CRISPR <i>YPa</i>	CRISPR <i>YPb</i>	CRISPR <i>YPc</i>
M1875, 1087, M1336, M1665, M1668, M925, M1648, M1585, M844, M927, M973, M1268, M1635, M586, M691, M773, M781, M822, M824, M850, C706, M635, M1814, M972, M585, M594, 231, 378, 248, 423, KM638, E3379, 177, 686, 469, M693, M871, M593, M690, M819, M821, M595, M588, M849, C701, M587, M1354, M1402, M1343, M1405, KM780, M634, M695, M767, M771, M829, M857, M924, M979, C718, M926, M928, M985, M1531, M845, M895, M898, M903, M820, M1864, M1868, 4285, 226, 664, 258, 480, 278 (1930–2015; Приволжские пески, Ильменно-Придельтовый район, Приморский район, Черные земли, Терско-Кумское междуречье) (1930–2015; Volga Sands, Il'menno-Delta Region, Primorsky Region, Black Lands, Tersko-Kuma Interfluve)	a1-a2-a3	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
52 (1925; Ильменно-Придельтовый район) 52 (1925; Il'menno-Delta Region)	a2-a3	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
228 (1936; Черные земли) 228 (1936; Black Lands)	a1-a2-a3-a108	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
249 (1936; Черные земли) 249 (1936; Black Lands)	a1-a2-a3-a109	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
252 (1933; Терско-Кумское междуречье) 252 (1933; Tersko-Kuma Interfluve)	a1-a2-a3-a109	b1-b2-b3-b4 [?] -b53	c1-c2-c3
M1970, M2320, M2328, M2334 (2014; Приморский район) M1970, M2320, M2328, M2334 (2014; Primorsky Region)	a1-a2-a3-a110	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
282 (1935; Черные земли) 282 (1935; Black Lands)	a1-a2-a3-a111	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
M1332, M1334 (1985; Черные земли) M1332, M1334 (1985; Black Lands)	a1-a2-a3-a112	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
M1671 (1996; Черные земли) M1671 (1996; Black Lands)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a37	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
M1664 (1997; Черные земли) M1664 (1997; Black Lands)	a1-a2-a3-a4-a6-a7-a37-a75	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
M1669 (1996; Черные земли) M1669 (1996; Black Lands)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8	b1-b2-b3-b4 [?]	c1-c2-c3
M2344 (2014; Приморский район) M2344 (2014; Primorsky Region)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8	b1-b2-b3-b4 [?] -b47	c1-c2-c3
M1611 (1995; Черные земли) M1611 (1995; Black Lands)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8	b1-b2-b3-b4 [?] -b48	c1-c2-c3
M1229, M1534, M1544, M1545, M1867 (1993–2009; Черные земли, Терско-Кумское междуречье) M1229, M1534, M1544, M1545, M1867 (1993–2009; Black Lands, Tersko-Kuma Interfluve)	a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8	b1-b2-b3-b4 [?] -b54	c1-c2-c3

b53, b54 в локусах *YPa* и *YPb*. В то же время штаммы 1993–2014 гг., полученные от носителей и переносчиков в Приморском районе, Черных землях и Терско-Кумском междуречье, имеют существенные отличия в локусе *YPa* и *YPb*. Так, локус *YPa* восьми штаммов (M1229, M1534, M1544, M1545, M1611, M1669, M1867, M2344), полученных в 1993–2014 гг. от носителей и переносчиков, представлен спейсерами *YPa* a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8. Для штаммов M1664 (1997, *M. musculus*) и M1671 (1996, *M. meridianus*) характерны спейсеры *YPa* a1-a2-a3-a4-a6-a7-a37-a75 и a1-a2-a3-a4-a5-a6-a7-a8 соответственно. Штаммы M1611 (1995, *S. pygmaeus*) и M2344 (2014, *M. meridianus*) представлены спейсерами *YPb* b1-b2-b3-b4[?]-b48 и b1-b2-b3-b4[?]-b47 соответственно.

В целом метод CRISPR-типирования показал низкую разрешающую способность при дифференцировании штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы, однако может служить дополнительным инструментом при проведении филогенетического анализа в совокупности с такими методами, как SNP- и MLVA-типирование.

По результатам проведенного MLVA25- и CRISPR-типирования штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы построена дендрограмма (рисунок). Результаты филогенетического анализа показывают, что в исследуемой выборке выделяются три кластера (А, В, С), в состав которых входят 40, 49 и 10 штаммов соответственно. Установлена взаимосвязь изменения копийности VNTR-повторов

в локусах в зависимости от времени и места выделения штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы.

Кластер *A* включает в себя два больших подкластера (*A1* и *A2*). Подкластер *A1* образован 30 штаммами, полученными от носителей и переносчиков во второй половине XX – начале XXI в. на территории Ильменно-Придельтового и Приморского районов, Черных земель, Терско-Кумского междуречья. В свою очередь подкластер *A2* представлен преимущественно штаммами, выделенными до межэпизоотического периода в первой половине XX в. на территории Черных земель и Именно-Придельтового района, среди которых два штамма – 177 и 228 – были получены от больных с легочной и бубонной формой чумы в 1933 и 1936 гг. соответственно. Кластер *A* образовали штаммы с генотипами CS1 – CS27. Большинство генотипов (CS1, CS5, CS8, CS10) представлены штаммами, которые были выделены в пределах нескольких граничащих между собой секторов в течение 5–11 лет.

Кластер *B* разделился на два подкластера (*B1* и *B2*). Подкластер *B1* представлен преимущественно штаммами второй половины XX – начала XXI в., выделенными от носителей и переносчиков на территории всех пяти ЛЭР Прикаспийского песчаного очага чумы. Исключение составил штамм 252, полученный от домового мыши *M. musculus* в 1936 г. Подкластер *B2* образован штаммами, выделенными до межэпизоотического периода в первой половине XX в. на территории Черных земель. Среди них присутствует штамм 226, который был получен в 1936 г. от человека с септической формой чумы. Кластер *B* представлен штаммами с генотипами CS28 – CS52. От штаммов, входящих в состав кластеров *A* и *C*, их отличает наличие семи копий VNTR в локусе *yp1018ms44* вместо шести. В кластере *B*, так же как и в кластере *A*, большинство генотипов (CS28, CS29, CS31, CS35, CS38, CS40) образованы штаммами, полученными в течение 3–7 лет в пределах нескольких граничащих между собой секторов. Однако проявляются и исключения из этой закономерности: штаммы генотипа CS34 получены в течение 5 лет на удаленных друг от друга секторах в Черных землях; генотип CS36 представлен штаммами, выделенными в течение 4 лет на удаленных друг от друга секторах в Приволжских песках, Приморском и Ильменно-Придельтовом районах; а в генотип CS45 вошли штаммы, также полученные на удаленных друг от друга секторах в Приморском районе и Черных землях в течение 29 лет.

Кластер *C* образован 10 штаммами с генотипом CS53 – CS60. Эти штаммы были получены от носителей и переносчиков с 1993 по 2015 г. преимущественно на территории Черных земель. От штаммов, входящих в состав кластеров *A* и *B*, их отличает наличие уникального количества копий VNTR в таких локусах, как *yp1814ms20*, *yp4425ms38*, *yp0718ms41*, *yp1118ms69*, *yp3236ms73*, *yp3245ms74*. Также для

штаммов этого кластера характерны удлиненные массивы спейсеров CRISPR в локусе *YPa*.

При оценке полученных результатов филогенетического анализа нами установлена взаимосвязь изменения копийности VNTR-повторов в локусах в зависимости от времени и места выделения штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы. Так, для штаммов, циркулировавших на территории очага с 1925 по 1954 г. до наступления длительного межэпизоотического периода, характерно большее разнообразие копийности фрагментов VNTR в локусах *yp1335ms46* и *yp4280ms62* по сравнению со штаммами, полученными в 1979–2015 гг. после межэпизоотического периода. В геноме штамма *Y. pestis* CO92 (NCBI GenBank ID AL590842.1) локус *yp1335ms46* расположен в межгенной области, а локус *yp4280ms62* находится в пределах нуклеотидной последовательности гена *ftsY*, кодирующего белок клеточного деления.

Также штаммы первой половины XX в. и второй половины XX – начала XXI в. имеют различия копийности фрагментов VNTR в локусе *yp1935ms05*. Штаммы, полученные до межэпизоотического периода, имеют 8 копий VNTR в локусе *yp1935ms05*, в то время как локус *yp1935ms05* штаммов второй половины XX – начала XXI в. представлен 7 и 9 копиями VNTR. В геноме штамма *Y. pestis* CO92 локус *yp1935ms05* расположен в межгенной области.

Также, несмотря на то, что большинство исследуемых штаммов по локусу *yp0559ms15* имеют одинаковый размер ампликона (237 п.н.), при изучении их нуклеотидной последовательности нами установлено, что 11 штаммов (M1875, 1087, M1334, M2320, M1970, M1864, M1868, 4285, M1332, M2328, M2334) имеют единичную замену C → A (559860 – координата по геному CO92 NCBI GenBank ID AL590842.1). Они были получены в 1985–2014 гг. от носителей и переносчиков на территории Приморского района и Черных земель. При сравнении полученной последовательности с последовательностями базы данных GenBank NCBI установлено, что данная замена уникальна и характерна только для этих штаммов. В геноме штамма *Y. pestis* CO92 локус *yp0559ms15* расположен в межгенной области. Эти же 11 штаммов имеют 7 копий VNTR в локусе *yp3245ms74* (вместо 4, 6 и 8 копий VNTR, в отличие от остальных изученных штаммов из Прикаспийского песчаного очага чумы). В геноме штамма *Y. pestis* CO92 локус *yp3245ms74* расположен в пределах нуклеотидной последовательности гена *YPO2903*, кодирующего предполагаемый РНК-связывающий белок.

Десять штаммов (M1664, M1671, M1669, M1611, M2344, M1229, M1534, M1544, M1545, M1867), полученных от носителей и переносчиков преимущественно на территории Черных земель в 1993–2014 гг., имеют уникальное количество копий VNTR в локусах *yp1814ms20*, *yp4425ms38*, *yp0718ms41*, *yp1118ms69*, *yp3236ms73*, *yp3245ms74*, отличающееся от остальных изученных штаммов в данной работе.

В геноме штамма *Y. pestis* CO92 локусы *yp1814ms20*, *yp4425ms38*, *yp0718ms41*, *yp1118ms69* расположены в межгенной области; локус *yp3236ms73* находится в пределах нуклеотидной последовательности гена *hsc*, кодирующего белок-шаперон Hsc-A; локус *yp3245ms74* расположен в пределах нуклеотидной последовательности гена *YPO2903*, кодирующего предполагаемый РНК-связывающий белок. Мы полагаем, что полученные MLVA-профили были характерными для данных участков Прикаспийского песчаного очага чумы в период с 1993 по 2014 г. При анализе связи штаммов, представленных одним генотипом, с объектами, из которых они были выделены, не обнаружено зависимости от видов млекопитающих и эктопаразитов.

Итак, проведено MLVA25- и CRISPR-типирование 98 штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага чумы, выделенных в 1925–2015 гг., в результате которого исследуемые штаммы разделились на 60 генотипов (CS1 – CS60). Большинство штаммов (78 %) из Прикаспийского песчаного очага чумы, независимо от места, времени выделения и принадлежности к филогенетическим подветвям 2.MED1 средневекового биовара, имеют идентичный CRISPR-профиль, представленный спейсерами *YPa a1-a2-a3*, *YPb b1-b2-b3-b4*, *YPC c1-c2-c3*. Полученный массив спейсеров характерен для штаммов *Y. pestis* средневекового биовара. Однако часть штаммов имеют делецию спейсера в локусе *YPa* или же удлиненные массивы спейсеров в локусах *YPa* и *YPb*. Также выявлены вставки спейсеров, специфичные как для группы, так и для единичных штаммов из Прикаспийского песчаного очага чумы. Установлена взаимосвязь изменения копийности локусов VNTR в зависимости от места и времени выделения штаммов. Полученные нуклеотидные последовательности дополнили созданную ранее базу данных. Результаты MLVA25- и CRISPR-типирования могут быть использованы для проведения детализации молекулярно-генетической паспортизации территории Прикаспийского песчаного очага чумы, а также для проведения ретроспективного анализа направлений и закономерностей пространственно-временной циркуляции популяций *Y. pestis* в очагах чумы Прикаспия в XX – начале XI в.

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

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

Список литературы

1. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств. Калининград: РА Полиграфичь; 2022. 348 с.
2. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.

3. Adair D.M., Worsham P.L., Hill K.K., Klevytska A.M., Jackson P.J., Friedlander A.M., Keim P. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4):1516–9. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1516-1519.2000.
4. Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: From phenotypes to whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 37:21–36. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.024.
5. Al-Attar S., Westra E.R., van der Oost J., Brouns S.J. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol. Chem.* 2011; 392(4):277–89. DOI: 10.1515/BC.2011.042.
6. Barrangou R., Horvath P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012; 3:143–62. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101134.
7. Pourcel C., Salvygnol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* 2005; 151(Pt. 3):653–63. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
8. Cui Y., Li Y., Gorgé O., Platonov M.E., Yan Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Balakhonov S.V., Wang X., Song Y., Anisimov A.P., Vergnaud G., Yang R. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS One.* 2008; 3(7):e2652. DOI: 10.1371/journal.pone.0002652.
9. Riehm J.M., Projahn M., Vogler A.J., Rajerison M., Andersen G., Hall C.M., Zimmermann T., Soanandrasana R., Andrianaivoarimanana V., Straubinger R.K., Nottingham R., Keim P., Wagner D.M., Scholz H.C. Diverse genotypes of *Yersinia pestis* caused plague in Madagascar in 2007. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003844. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003844.
10. He J., Jin J., Xin Y., Yang X., Li S., Zhang Q., Bai J., Li G., Dai R., Li W. CRISPR genotyping of *Yersinia pestis* in the plague natural foci of Qinghai-Tibet Plateau. *Chin. J. Endemiol.* 2022; 41(9):703–8. DOI: 10.3760/cma.j.cn231583-20220304-00063.
11. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9):3179–85. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3179-3185.2001.
12. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001; 1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2.
13. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(2):573–80. DOI: 10.1093/nar/27.2.573.
14. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
15. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980; 32(3):314–31.
16. Derbise A., Chenal-Francois V., Pouillot F., Fayolle C., Prévost M.C., Médigue C., Hinnebusch B.J., Carniel E. A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(4):1145–57. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05570.x.
17. Li Y., Dai E., Cui Y., Li M., Zhang Y., Wu M., Zhou D., Guo Z., Dai X., Cui B., Qi Z., Wang Z., Wang H., Dong X., Song Z., Zhai J., Song Y., Yang R. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. *PLoS One.* 2008; 3(5):e2166. DOI: 10.1371/journal.pone.0002166.
18. Barrangou R., Horvath P. The CRISPR system protects microbes against phages, plasmids. Palindromic DNA repeat sequences immunize microorganisms against phages and plasmids, while also directing their evolution. *Microbe.* 2009; 4(5):224–30. DOI: 10.1128/MICROBE.4.224.1.

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. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
3. Adair D.M., Worsham P.L., Hill K.K., Klevytska A.M., Jackson P.J., Friedlander A.M., Keim P. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(4):1516–9. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1516-1519.2000.

4. Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: From phenotypes to whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 37:21–36. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.024.
5. Al-Attar S., Westra E.R., van der Oost J., Brouns S.J. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol. Chem.* 2011; 392(4):277–89. DOI: 10.1515/BC.2011.042.
6. Barrangou R., Horvath P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012; 3:143–62. DOI: 10.1146/annurev-fo.od-022811-101134.
7. Pourcel C., Salvginol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005; 151(Pt. 3):653–63. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
8. Cui Y., Li Y., Gorgé O., Platonov M.E., Yan Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Balakhonov S.V., Wang X., Song Y., Anisimov A.P., Vergnaud G., Yang R. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS One*. 2008; 3(7):e2652. DOI: 10.1371/journal.pone.0002652.
9. Riehm J.M., Projahn M., Vogler A.J., Rajerison M., Andersen G., Hall C.M., Zimmermann T., Soanandrasana R., Andrianaivoarimanana V., Straubinger R.K., Nottingham R., Keim P., Wagner D.M., Scholz H.C. Diverse genotypes of *Yersinia pestis* caused plague in Madagascar in 2007. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003844. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003844.
10. He J., Jin J., Xin Y., Yang X., Li S., Zhang Q., Bai J., Li G., Dai R., Li W. CRISPR genotyping of *Yersinia pestis* in the plague natural foci of Qinghai-Tibet Plateau. *Chin. J. Endemiol.* 2022; 41(9):703–8. DOI: 10.3760/cma.j.cn231583-20220304-00063.
11. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9):3179–85. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3179-3185.2001.
12. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoëud F., Ramière V., Sylvestre P., Benson G., Ramière F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001; 1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2.
13. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(2):573–80. DOI: 10.1093/nar/27.2.573.
14. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
15. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980; 32(3):314–31.
16. Derbise A., Chenal-Francoise V., Pouillot F., Fayolle C., Prévost M.C., Médigue C., Hinnebusch B.J., Carniel E. A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(4):1145–57. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05570.x.
17. Li Y., Dai E., Cui Y., Li M., Zhang Y., Wu M., Zhou D., Guo Z., Dai X., Cui B., Qi Z., Wang Z., Wang H., Dong X., Song Z., Zhai J., Song Y., Yang R. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. *PLoS One*. 2008; 3(5):e2166. DOI: 10.1371/journal.pone.0002166.
18. Barrangou R., Horvath P. The CRISPR system protects microbes against phages, plasmids. Palindromic DNA repeat sequences immunize microorganisms against phages and plasmids, while also directing their evolution. *Microbe*. 2009; 4(5):224–30. DOI: 10.1128/MICROBE.4.224.1.

Authors:

Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Balykova A.N., Kovrizhnikov A.V., Shevchenko K.S., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Chervyakova N.S., Kutyrëv V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Горюнова П.А., Ерошенко Г.А., Балькова А.Н., Коврижников А.В., Шевченко К.С., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Червякова Н.С., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.