Ю.М.Евченко¹, Д.В.Ефременко¹, И.В.Кузнецова¹, В.М.Мезенцев¹, Л.И.Белявцева¹, М.Е.Платонов²,
В.В.Евсеева², С.В.Дентовская², А.П.Анисимов², А.Н.Куличенко¹

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

¹ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация; ²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Российская Федерация

Изучены методом MLVA по 25 VNTR-локусам штаммы *Yersinia pestis*, изолированные в Центральном-Кавказском высокогорном природном очаге чумы с 1971 по 2012 год. Анализ приуроченности кластеров дендрограммы к определенным территориям, объектам и срокам изоляции штаммов проводили с использованием программы Arc GIS 10.1. Установлена взаимосвязь MLVA25-типов *Y. pestis* с участками и временем выделения штаммов в Центральном-Кавказском высокогорном природном очаге чумы, потребностью в пролине. Кластеры, группы и подгруппы штаммов приурочены к определенным территориям: группы – к ландшафтно-эпизоотологическим районам, подгруппы – к поселениям горных сусликов. Периодически группы штаммов распространяются в другие ландшафтно-эпизоотологические районы очага. Генетические варианты штаммов возбудителя чумы в пределах поселений горных сусликов меняются с течением времени, что является косвенным свидетельством действия механизма микроэволюции.

Ключевые слова: Центральном-Кавказский природный очаг чумы, *Yersinia pestis*, генотипирование, генетические варианты.

Yu.M.Evchenko¹, D.V.Efremenko¹, I.V.Kuznetsova¹, V.M.Mezentsev¹, L.I.Belyavtseva¹, M.E.Platonov²,
V.V.Evsheeva², S.V.Dentovskaya², A.P.Anisimov², A.N.Kulichenko¹

Studies of Genetic Diversity of *Yersinia pestis* Strains Isolated in Central-Caucasian High-Mountain Natural Plague Focus

¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; ²State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Studied have been *Yersinia pestis* strains isolated in Central-Caucasian high-mountain natural plague focus within the period of 1971–2012 using MLVA typing on 25 VNTR-loci. Analysis of dendrogram cluster association with certain areas, objects, and periods of the strain isolation has been carried out by means of Arc GIS 10.1 software. Established has been the connection between 25 MLVA *Y. pestis* types and spatial and temporal characteristics of strains isolation in the Central-Caucasian high-mountain natural plague focus, and proline requirement too. Clusters, groups and subgroups of the strains are confined to particular territories as it follows: groups are attributed to landscape-epizootiological regions, subgroups – to mountain souslik settlements. Occasionally groups of the strains disseminate onto the other landscape-epizootiological regions of the focus. Genetic variations of plague agent strains within the limits of mountain souslik settlements evolve over time which can be viewed as indirect evidence of microevolution mechanism effect.

Key words: Central-Caucasian high-mountain natural plague focus, *Yersinia pestis*, genotyping, genetic variations.

Центральном-Кавказский высокогорный природный очаг чумы отличается гетерогенностью циркулирующих в нем штаммов по потребности в факторах роста, вирулентности, генетическим и некоторым другим свойствам. С учетом указанных особенностей очаг условно делят на восточную и западную части с границей по р. Малка. Отмечена приуроченность аукоотрофных по пролину штаммов чумного микроба к западной части очага [5]. Функционирование природного очага в многолетнем аспекте характеризуется наличием трех периодов эпизоотической активности, обусловленных мощным воздействием на паразитарную систему очага факторов природного и антропогенного порядка [4].

В настоящее время для изучения геномного полиморфизма штаммов возбудителя чумы широкое применение получил многолокусный анализ вариативных тандемных повторов (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis – MLVA 25).

Данный метод позволяет проводить внутривидовую дифференциацию штаммов, согласующуюся с классическими методиками, определять их принадлежность к географическому региону, природному очагу, а также формировать отдельные группы внутри очага [3, 7, 8, 9].

Целью данной работы было изучение методом MLVA25 генетического разнообразия штаммов *Yersinia pestis* из Центральном-Кавказского высокогорного природного очага чумы, определение взаимосвязи сформированных кластеров с местом, временем, объектом выделения, аукоотрофностью по пролину и периодом активности.

Материалы и методы

В работе были использованы 64 штамма *Y. pestis*, изолированные в Центральном-Кавказском высокогорном природном очаге чумы с 1971 по 2012 год.

MLVA проводили по 25 VNTR-локусам *Y. pestis*, как описано ранее [7]. На основании полученных данных методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA) с помощью компьютерных программ START 2 и Bionumerics 5.1 были построены дендрограммы штаммов возбудителя чумы. Анализ приуроченности кластеров к определенным территориям, объектам и срокам изоляции штаммов проводили с использованием программы Arc GIS 10.1. Места выделения штаммов *Y. pestis* были геокодированы с географической привязкой до уровня сектора первичного района. В атрибутивные таблицы добавлены поля результатов генотипирования и отношения штаммов к долину. Создан слой полигонов ландшафтно-эпизоотологического районирования территории очага. Оценка значимости различия частот наблюдений проводилась по критерию Фишера [6].

Результаты и обсуждение

Исследованные штаммы возбудителя чумы были подразделены на 44 MLVA25-типа. В результате была построена дендрограмма, отображающая сте-

пень филогенетического родства штаммов (рис. 1). Результаты распределения штаммов по различным кластерам при группировке их с помощью компьютерных программ START 2 и Bionumerics 5.1 оказались идентичными.

На дендрограмме выделяются два крупных кластера *A* и *B*. Кластер *A* сформирован штаммами *Y. pestis*, выделенными в восточной части очага в долине реки Баксан. Исключение составляют два штамма С-369 и С-339, которые изолированы в западной части природного очага – Верхне-Кубанском и Кубано-Малкинском ландшафтно-эпизоотологических районах (ЛЭР).

Кластер *B* образован двумя ветвями. Первая ветвь *BI* состоит из двух групп. Группа *BI₁* представлена двумя изолятами из восточной части очага. Группа *BI₂* состоит из штаммов, выделенных в западной части очага в Верхне-Кубанском ЛЭР: в ур. Еникол, Уллу-Хурзук, Битюк-Тюбе, Джубакалыккол.

Вторая ветвь *BII* представлена 35 штаммами. Штамм С-658, выделенный недалеко от аула Хасаут в 1988 г., на дендрограмме располагается отдельно. Остальные штаммы образуют две группы – *BII₁* и *BII₂*. Группа *BII₁* сформирована 18 штаммами, изо-

Рис. 1. Дендрограмма MLVA25-типов штаммов *Y. pestis*, выделенных в Центральном-Кавказском высокогорном природном очаге чумы

лированными в Кубано-Малкинском ЛЭР. Группа BII_2 состоит из 16 штаммов, выделенных в границах между собою Кубано-Малкинском и Малко-Баксанском ЛЭР.

Приведенная кластеризация свидетельствует о приуроченности сформированных на дендрограмме групп MLVA25-типов к определенным территориям природного очага, что согласуется с делением изолированных групп поселений горного суслика – основного носителя чумы в данном очаге.

Каждая группа делится на подгруппы, соответственно конечным ветвям древа. Характерным признаком штаммов, относящихся к одному MLVA25-типу, является их расположение в дендрограмме по вертикали от заключительного «узла». Для установления связи подгрупп с местами, временем и объектами выделения использовали достаточно объемные выборки штаммов, изолированных в одних и тех же урочищах. В кластере A для решения данной задачи были выбраны изоляты ур. Перк. Штаммы С-800, С-776, С-779, относящиеся к одному MLVA25-типу, выделены в 2001 и 2004 гг. от блох *Cit. tesquorum*, добытых из входов нор и очеса горных сусликов. Два других штамма – С-777 и С-816, выделенные в 2001 и 2007 гг. от горного суслика и блох *Cit. tesquorum*, относились к другой подгруппе.

В группе BI_1 штаммы, выделенные в ур. Еникол, относятся к трем разным подгруппам. Штаммы с одинаковым MLVA25-типом – С-559, С-561, выделены в 1983 г., тогда как штаммы С-341 и С-724 изолированы в 1976 и 1996 гг. соответственно. В этой же группе находятся семь штаммов из ур. Битюк-Тюбе, которые вошли в состав трех подгрупп. Так, первые штаммы (С-285, С-300), выделенные в природном очаге, относятся к одному MLVA25-типу. Они изолированы в октябре 1971 г. от блох *Cit. tesquorum* из очеса трупа горного суслика и в апреле 1972 г. от трупа горного суслика. Штаммы С-301, С-302, С-330, выделенные от блох *Cit. tesquorum* из очеса трупа горного суслика, самого трупа в мае 1972 г. и от блох *Cit. tesquorum* из очеса горного суслика в 1975 г., соответственно, вошли в состав другой подгруппы. Штаммы С-765 и С-782, выделенные от блох *Cit. tesquorum* и горного суслика в 1998 и 2001 гг., соответственно, сформировали третью подгруппу.

В группе BII_1 самая представительная часть – семь штаммов из ур. Ипподром, относится к четырем разным подгруппам: 1 – С-729, С-730, С-731, С-735; 2 – С-764; 3 – С-783 и 4 – С-784. Штаммы 1-й подгруппы выделены от блох *Cit. tesquorum* и *F. semura* в течение июня–августа 1998 г. Штаммы 2–4-й подгрупп выделены в 1998 и 2001 гг. от блох *Cit. tesquorum* и *Ct. golovi*.

Из приведенных наблюдений следует, что штаммы, выделяемые из одного и того же урочища с временным промежутком в несколько лет, как правило, на дендрограмме образуют различные подгруппы, тогда как штаммы с одинаковыми адресами и временем выделения обычно имеют одинаковый MLVA25-

тип. При этом объекты выделения и видовая принадлежность переносчиков не имеют значения при формировании ветвей дендрограммы.

Далее нашей задачей было установление связи групп MLVA25-типов с дифференциацией штаммов по зависимости от пролина в разные периоды активности очага. Из таблицы видно, что для штаммов типа A характерны только Pro^+ варианты возбудителя чумы. Для других групп соотношение прототрофов и аустрофов неодинаково на разных этапах активности очага. В первый период (1971–1981 гг.) во всех генетических группах преобладали Pro^+ штаммы, однако с каждым последующим периодом (1982–2000 и 2001–2012 гг.) их доля снижалась. Различие в соотношении Pro^+ и Pro^- штаммов в разные периоды активности очага имеет статистическую значимость (первого со вторым – $\phi_1 = 3,446$; первого с третьим – $\phi_2 = 3,591$).

Следует отметить, что Pro^+ штаммы наиболее часто выделялись в восточной части очага (62,5 %), а Pro^- штаммы – в западной (65 %). При этом Pro^+ штаммы выделены в западной части в течение первого периода активности очага, тогда как Pro^- штаммы в восточной части – во втором и третьем периодах. Это свидетельствует, на наш взгляд, о развитии в первый период экстенсивных эпизоотий, обусловленных Pro^+ штаммами, а во второй и третий – Pro^- штаммами *Y. pestis*.

На рис. 2 показано, что штаммы группы A во все периоды активности очага присутствовали в долине р. Баксан, в секторах 23801442 и 23801531, а в первом периоде проникали также в Верхне-Кубанский и Кубано-Малкинский ЛЭР. Штаммы группы BI_1 (С-775, С-773) были изолированы из Баксано-Чегемского ЛЭР в последний период активности очага. В Верхне-Кубанском ЛЭР распространены штаммы группы BI_2 – они присутствовали здесь во все периоды активности очага, а во втором периоде распространялись и в Кубано-Малкинский ЛЭР. Кубано-Малкинский ЛЭР являлся местом постоянной циркуляции двух групп MLVA25-типов – BII_1 и BII_2 . Штаммы второй группы выделялись и в других ЛЭР, но в каждый период активности очага наблюдалось определенное направление их распростране-

Генетические группы и соотношение Pro^+ и Pro^- штаммов *Y. pestis* в разные периоды активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы

Группы MLVA25-типов	1971–2012		1971–1981		1982–2000		2001–2012	
	Pro^+	Pro^-	Pro^+	Pro^-	Pro^+	Pro^-	Pro^+	Pro^-
A	11	0	3	0	3	0	5	0
BI_1	0	2	0	0	0	0	0	2
BI_2	5	11	4	2	1	7	0	2
BII_1	7	12	4	0	3	10	0	2
BI_2	6	10	3	1	3	3	0	6
Итого	29	35	14	3	10	20	5	12

Примечания: Pro^+ – штаммы *Y. pestis* не зависящие от пролина; Pro^- – штаммы *Y. pestis* зависящие от пролина.

Рис. 2. Распространение групп MLVA25-типов на территориях ЛЭР в разные периоды активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы

ния. Штаммы группы *BII*₁ лишь однократно, во втором периоде, были выделены из Баксано-Чегемского ЛЭР.

Таким образом, в результате анализа филогенетического дерева, построенного на основании результатов генотипирования 64 штаммов *Y. pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы, сформированы группы MLVA25-типов разных уровней дискриминации.

Группы и подгруппы штаммов приурочены к определенным территориям: группы – к ландшафтно-эпизоотологическим районам природного очага, подгруппы – к поселениям горных сусликов. Штаммы группы *A* постоянно циркулируют в восточной части очага, западная часть является местом постоянной циркуляции других групп: в Верхне-Кубанском ландшафтно-эпизоотологическом районе распространены штаммы группы *BI*₂, в Кубано-Малкинском – *BII*₁ и *BII*₂. Вероятно, это является отражением истории расселения носителей чумы – малых сусликов в горах Кавказа. Природный очаг в горах Центрального Кавказа сформировался когда из Предкавказских степей сюда проникли малые суслики. Предположительно это случилось не ранее 4 тыс. лет назад [2]. Первоначально они проникли в горные степи нынешней восточной части очага – в продольные долины горных рек (Чегем, Баксан и др.), затем эти зверьки начали продвигаться на запад в субальпийские и альпийские луга. В горной степи долины р. Баксан до настоящего времени сохранилась пара-

зитарная система, присущая равнинным природным очагам чумы сусликового типа. Выше в горах структура паразитарной системы существенно изменилась [1], обусловив появление специфических для этих мест генотипов возбудителя чумы – групп кластера *B*.

Периодически группы штаммов распространяются в соседние ландшафтно-эпизоотологические районы. Способность вызывать экстенсивные эпизоотии наиболее выражена у штаммов групп *A* и *BII*₂ и зависит от периодов активности очага – в первый период преимущество имела группа *A*, во второй и третий – группа *BII*₂.

Для штаммов типа *A* характерны только *Pro*⁺ варианты возбудителя чумы. Для других групп соотношение *Pro*⁺ и *Pro*⁻ штаммов неодинаково на разных этапах активности очага. В первый период (1971–1981 гг.) во всех генетических группах преобладали *Pro*⁺ штаммы, однако с каждым последующим периодом (1982–2000 и 2001–2012 гг.) их доля снижалась.

Подгруппы формируются штаммами возбудителя чумы на уровне урочищ (поселений горных сусликов) или групп урочищ, расположенных поблизости друг от друга. Генетические варианты штаммов возбудителя чумы в пределах поселений горных сусликов меняются с течением времени, что является косвенным свидетельством действия механизма микроэволюции. Говоря о возможностях MLVA25, необходимо отметить, что благодаря своей высокой дискриминирующей способности он существенно

расширяет возможности решения задач эпидемиологической направленности, в том числе при определении источника инфекции в природном очаге чумы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евченко Ю.М. Сезонность эпизоотий на разных участках Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2008; 2(Ч. II):615–6.
2. Ермаков О.А., Титов С.В., Савинский А.Б., Сури В.Л., Зборовский С.С., Ляпунова Е.А., Брандлер О.В., Формозов Н.А. Молекулярно-генетические и палеоэкологические аргументы в пользу конспецифичности малого (*Spermophilus pygmaeus*) и горного (*S. musicus*) сусликов. *Зоол. журн.* 2006; 85 (12):1474–10.
3. Кузнецова И.В., Ефременко Д.В. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis*, изолированных из Восточно-Кавказского высокогорного природного очага чумы в 2010 г. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2013; 8(1):98–99.
4. Куличенко А.Н., Евченко Ю.М., Мозлов Г.А., Григорьев М.П., Ляпустина Л.В., Чурикова Н.В. Эпизоотическая активность Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 4(110):23–5.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: ОАО Изд-во Медицина; 2004. 192 с.
6. Сидоренко Е.В. Методы математической обработки в психологии. СПб: Речь; 2007. 220 с.
7. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Yang R., Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS One*. 2009; 4(6):6000.
8. Platonov M.E., Evseeva V.V., Svetoch T.E., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. Phylogeography of *Yersinia pestis* Vole Strains Isolated from Natural Foci of the Caucasus and South Caucasus. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(3):108–4.
9. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zöller L., Wölfel R., Le Flèche P., Scholz H.C. *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One*. 2012; 7(2):30624.

References

1. Evchenko Yu.M. [Seasonal fluctuations of epizooties in different territories of Central-Caucasian high-mountain natural plague focus]. *Vestnik*

Ros. Voenno-Med. Akad. 2008; 2(Pt. II):615–6.

2. Ermakov O.A., Titov S.V., Savinetsky A.B., Surin V.L., Zborovsky S.S., Lyapunova E.A., Brandler O.V., Formozov N.A. [Molecular-genetic and paleo-economical provisions for con-specificity of little (*Spermophilus pygmaeus*) and mountain souslik]. *Zool. Zh.* 2006; 85(12):1474–10.
3. Kuznetsova I.V., Efremenko D.V. [Genotyping of *Yersinia pestis* strains isolated in East-Caucasian high-mountain natural plague focus in 2010]. *Med. Vestnik Sever. Kavkaza*. 2013; 8(1):98–99.
4. Kulichenko A.N., Evchenko Yu.M., Mozlov G.A., Grigor'ev M.P., Lyapustina L.V., Churikova N.V. [Epizootic activity of the Central Caucasian high-mountain natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 4(110):23–5.
5. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Natural Plague Foci in the Territory of the Caucasus, Pre-Caspian Region, Central Asia and Siberia]. M.: OAO "Meditsina", 2004. 192 p.
6. Sidorenko E.V. [Mathematical Processing in Psychology]. St. Petersburg: Rech'; 2007. 220 p.
7. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Yang R., Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS One*. 2009; 4(6):6000.
8. Platonov M.E., Evseeva V.V., Svetoch T.E., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. Phylogeography of *Yersinia pestis* Vole Strains Isolated from Natural Foci of the Caucasus and South Caucasus. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(3):108–4.
9. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zöller L., Wölfel R., Le Flèche P., Scholz H.C. *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One*. 2012; 7(2):30624.

Authors:

Evchenko Yu.M., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Mezentssev V.M., Belyavtseva L.I., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Евченко Ю.М., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Мезенцев В.М., Белявцева Л.И., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 13.06.13.