

Г.А.Ерошенко, Я.М.Краснов, Н.Ю.Носов, Л.М.Куклева, К.А.Никифоров, Е.Г.Оглодин, В.В.Кутырев

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДВИДОВОЙ КЛАССИФИКАЦИИ *YERSINIA PESTIS* НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ШТАММОВ ИЗ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ГОСУДАРСТВ

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

Нами проведено полногеномное секвенирование 20 штаммов *Yersinia pestis* из всех 11 природных очагов чумы в России и части очагов сопредельных государств. Филогенетический анализ на основе выявленных 1918 коровых SNPs в геномах этих штаммов и 16 штаммов *Y. pestis* из NCBI GenBank установил наличие 5 кластеров близкородственных штаммов, с учетом которых нами усовершенствована подвидовая классификация возбудителя чумы. Новая классификация включает пять подвидов: основной (*ssp. pestis*), кавказский (*ssp. caucasica*), улегейский (*ssp. ulegeica*) и два новых – центральноазиатский (*ssp. central asiatica*) и ангольский (*ssp. angola*). Центральноазиатский подвид объединяет эволюционно родственные штаммы, ранее отнесенные к алтайскому и гиссарскому подвидам, а также штаммы из Таласского высокогорного очага в Киргизии и Узбекистане и штаммы *microtus* из Китая. В составе центральноазиатского подвида выделено три биовара – алтайский, гиссарский и *microtus*. Предложено удобное обозначение штаммов: 0.PE4a для алтайских, 0.PE4h для гиссарских, 0.PE4t для таласских штаммов и 0.PE4m для штаммов *microtus*, а также 0.PE5 для штаммов улегейского подвида.

*Ключевые слова:* возбудитель чумы, подвиды, совершенствование классификации.

G.A.Eroshenko, Ya.M.Krasnov, N.Yu.Nosov, L.M.Kukleva, K.A.Nikiforov, E.G.Oglodin, V.V.Kutyrev

## Updating of Intra-Specific *Yersinia pestis* Classification, Based on the Results of Whole-Genome Sequencing of the Strains from the Russian Federation and the Neighboring States

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

Carried out has been genome-wide sequencing of 20 *Yersinia pestis* strains from all 11 natural plague foci in Russia and some foci in the neighboring states. Phylogenetic analysis on the basis of 1918 core SNPs, identified in the genomes of these strains and 16 *Y. pestis* strains from NCBI GenBank, has revealed 5 clusters of closely related strains. Taking these clusters into account, up-dated has been subspecific classification of plague agent. New taxonomy has combined 5 subspecies: major (*ssp. pestis*), Caucasian (*ssp. caucasica*), ulegeisk (*ssp. ulegeica*), and two novel ones – Central Asian (*ssp. central asiatica*) and Angolan (*ssp. angola*). Central Asian subspecies comprises evolutionally related strains, earlier classified as *altaica* and *hissarica*, as well as the strains from Talas high-mountain focus in Kirghizia and Uzbekistan, and *microtus* strains from China. *Central asiatica* is divided into three biovars – altai, hissar, and *microtus*. Set forward is a serviceable designation for the strains: 0.PE4a – for altai ones, 0.PE4h – for hissar, 0.PE4t – for talas, and 0.PE4m – for *microtus*, and also for *ulegeica* subspecies – 0.PE5.

*Key words:* plague agent, subspecies, updating of classification.

Бактерия *Yersinia pestis* является возбудителем особо опасной природно-очаговой болезни – чумы, носителями которой являются различные виды грызунов, а переносчиками – блохи, паразитирующие на этих грызунах. Природные очаги чумы расположены во многих странах на территории большинства континентов, в том числе 45 из них – в Российской Федерации и странах ближнего зарубежья [6]. *Y. pestis* – относительно молодой и генетически однородный бактериальный вид, ведущий свое происхождение от возбудителя псевдотуберкулеза *Yersinia pseudotuberculosis* [2, 10]. Однако существование отдельных популяций возбудителя чумы в различных ландшафтно-климатических условиях – в степных, пустынных, горных и высокогорных регионах – привело к накоплению в ходе адаптивной эволюции генетических и фенотипических отличий между штаммами *Y. pestis*, которые могут быть использованы для проведения филогенетического анализа и дифференциации штаммов по географическому региону и очагу происхождения [1, 5, 11, 17].

Общепризнанной внутривидовой классифи-

кации *Y. pestis* не существует. В России и странах ближнего зарубежья широко используется подвидовая классификация, в соответствии с которой штаммы делятся на пять подвидов: основной (*ssp. pestis*) и четыре неосновных – кавказский (*ssp. caucasica*), алтайский (*ssp. altaica*), гиссарский (*ssp. hissarica*) и улегейский (*ssp. ulegeica*). Отечественная подвидовая классификация принята в 1985 г. и основана на отличиях штаммов *Y. pestis* в ряде биохимических свойств – способности ферментировать некоторые сахара – рамнозу, арабинозу, редуцировать нитраты [4, 8]. Штаммы основного подвида отличаются высокой вирулентностью, имеют высокую эпидемическую значимость и вызывают вспышки, эпидемии и даже пандемии чумы. Они широко распространены в природных очагах чумы по всему миру. Штаммы неосновных подвидов вирулентны, в основном для мышевидных грызунов, редко вызывают заболевание у людей. Неосновные подвиды являются древними формами чумного микроба и занимают промежуточное положение между предшественником *Y. pseudotuberculosis* и основным подвидом *Y. pestis*

[2, 14]. Они не имеют глобального распространения и циркулируют в отдельных географических регионах или природных очагах России, Армении, Грузии, Таджикистана, Киргизии и Узбекистана, а также Монголии и Китая, то есть на территории Евразийского континента. Так, штаммы кавказского подвида распространены в очагах Кавказа и Закавказья, алтайского – в Горно-Алтайском высокогорном очаге России, гиссарского – в Гиссарском высокогорном очаге чумы Таджикистана, улегейского – в Монголии. Известен лишь один штамм – *Angola*, относящийся к неосновным подвидам, который выделен в Африке [13]. Для некоторых штаммов *Y. pestis*, принадлежащих к неосновным подвидам, штаммов из Таласского высокогорного очага Киргизии и Узбекистане, штаммов *microtus* из двух природных очагов Китая, а также для штамма *Angola* не определена их подвиговая принадлежность [6, 20].

Используемая за рубежом классификация предложена еще в 1951 г. Она также основана на отличиях штаммов в биохимической активности – способности редуцировать нитраты и ферментировать глицерин [12]. В соответствии с ней штаммы *Y. pestis* делятся на три биовара – античный, средневековый и восточный, каждый из которых послужил причиной одной из трех прошедших в истории пандемий чумы. Все три биовара соответствуют основному подвиду возбудителя чумы по отечественной классификации. Неосновным подвидам зарубежными исследователями не уделяется должного внимания, они обозначаются как «пестоиды». Их долгое время считали редуцированными формами основного подвида.

Анализ популяционной генетики возбудителя чумы стал возможен с проведением полногеномного секвенирования большого числа штаммов *Y. pestis*. Установлено, что штаммы античного биовара принадлежат к нескольким линиям эволюции: 0.ANT, 3.ANT, 4.ANT (Центральная Азия), 1.ANT (Африка), 2.ANT (Юго-Восточная и Центральная Азия). Штаммы средневекового биовара относятся к линии 2.MED и циркулируют в очагах Кавказа, Прикаспия, Центральной Азии. Штаммы восточного биовара распространены в Юго-Восточной и Центральной Азии, Африке, Америке и принадлежат к филогенетической линии 1.ORI. Неосновные подвиды относятся к нескольким филогенетическим линиям: штамм *Angola* – к 0.PE3, кавказский подвид – к 0.PE2, алтайский подвид и штаммы *microtus* – к 0.PE4, а древние штаммы с Тибетского плато в Китае – к 0.PE7 [10, 11, 17].

Выдвинут ряд предложений по изменению классификации возбудителя чумы. В частности, предлагается выделить четвертый биовар – *microtus* с включением в него всех неосновных подвигов, а также новых подвигов *qinghaiensis*, *xilingolensis* [7, 16, 20]. Однако эти предложения носят формальный характер, поскольку не учитывают данных популяционной генетики возбудителя чумы, а также свойства штаммов *Y. pestis* из очагов чумы России и сопредельных стран. В международных базах данных можно найти небольшое количество полногеномных

последовательностей штаммов *Y. pestis* из стран СНГ, некоторые из них с неустановленным происхождением. Положение этих штаммов в глобальном генетическом разнообразии возбудителя чумы остается неясным.

Цель работы – совершенствование подвиговой классификации возбудителя чумы на основе полногеномного секвенирования штаммов из природных очагов России и сопредельных стран.

## Материалы и методы

Штаммы *Y. pestis*, использованные в работе, представлены в таблице. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Культивирование штаммов *Y. pestis* проводили на LB агаре и LB бульоне (pH 7,2) при 28 °С в течение 24–48 ч. ДНК штаммов для полногеномного секвенирования выделяли с помощью набора AxyPrep производства AXYGEM Biosciences (Китай). Секвенирование геномов штаммов проводили в системе Ion PGM (Life Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для обработки данных секвенирования применяли пакет программ Ion Torrent Suite software 4.2. и Newbler gsAssembler 2.6. В анализ брали нуклеотидные последовательности штаммов с не менее чем 30-кратной средней глубиной прочтения. Полногеномный SNP-анализ штаммов *Y. pestis* выполняли с помощью программы Wombac 2.0. Построение дендрограмм штаммов проводили с использованием пакета программ Bionumerics 7.5 и алгоритма Maximum Parsimony.

## Результаты и обсуждение

Для определения современной внутривидовой структуры *Y. pestis* с учетом штаммов из Российской Федерации и сопредельных стран нами проведено полногеномное секвенирование 20 штаммов, включая 13 штаммов из всех одиннадцати очагов России, 2 штаммов из двух очагов в Киргизии и Узбекистане, 2 штаммов из двух очагов в Армении, 1 штамма из Таджикистана, 2 штаммов из двух регионов Монголии, и установлена их филогенетическая принадлежность (таблица). Полногеномные последовательности штаммов из этих очагов чумы практически не представлены в международных базах данных.

В работе также использованы нуклеотидные последовательности 16 штаммов *Y. pestis* различного происхождения из базы данных NCBI GenBank, принадлежащих к основным ветвям эволюции *Y. pestis* (таблица). Анализ популяционной структуры *Y. pestis* проводили на основе выявления коровых SNPs в полногеномных последовательностях отечественных и зарубежных штаммов с помощью программы Wombac 2.0. Всего выявлено 1918 коровых (общих для всех штаммов) полиморфных нуклеотидов, с использованием которых в программе Bionumerics 7.5. с помощью алгоритма Maximum Parsimony построена дендрограмма штаммов *Y. pestis* (рис. 1).

Штаммы *Y. pestis* на дендрограмме разделились

Штаммы *Y. pestis*, полногеномные последовательности которых использованы в работе

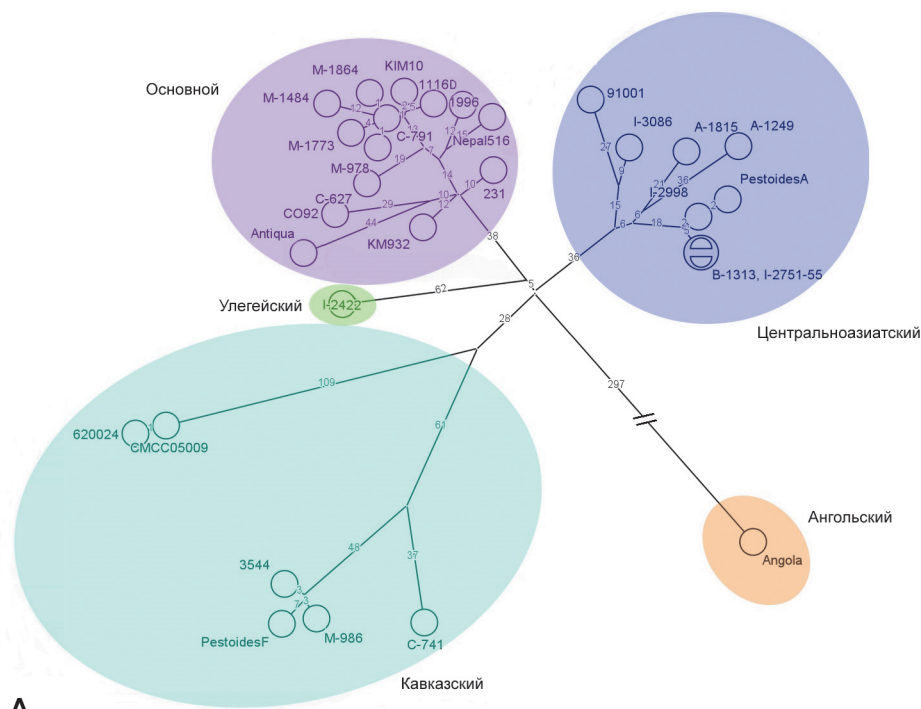
Штамм	Происхождение	Внутривидовая принадлежность		
		Филогенетическая линия	Используемые классификации	Новая классификация
C-627	Центрально-Кавказский высокогорный очаг, Россия, 1986 г.	2.MED	Основной п/в, средневековый б/в	Основной п/в, средневековый б/в
M-978	Прикаспийский Северо-Западный степной очаг, Россия, 1990 г.	«	«	«
M-1773	Волго-Уральский песчаный очаг, Россия, 2002 г.	«	«	«
M-1484	Волго-Уральский степной очаг, 1992 г.	«	«	«
M-1864	Прикаспийский песчаный очаг, Россия, 2009 г.	«	«	«
C-791	Дагестанский равнинно-предгорный очаг, Россия, 2003 г.	«	«	«
1116Д	Терско-Сунженский низкогорный очаг, Россия, 1970 г.	«	«	«
И-1996	Забайкальский степной очаг, Россия, 1970 г.	2.ANT	Основной п/в, античный б/в	Основной п/в, античный б/в
KM932	Тувинский горный очаг, 1987 г.	4.ANT	«	«
231 (708)	Аксайский высокогорный очаг, Киргизия, 1947 г.	0.ANT	«	«
C-741	Восточно-Кавказский высокогорный очаг, Россия, 1998 г.	0.PE2	Кавказский п/в	Кавказский п/в
M-986	Зангезуро-Карабахский горный очаг, Армения, 1975 г.	«	«	«
3544 Арм.	Ленинканский горный очаг, Армения, 1979 г.	«	«	«
И-2998	Горно-Алтайский высокогорный, Россия, 1982 г.	0.PE4a	Алтайский п/в	Центральноазиатский п/в
И-2751-55	Горно-Алтайский высокогорный, Россия, 2012 г.	«	«	«
B-1313	Горно-Алтайский высокогорный, Россия, 2014 г.	«	«	«
A-1249	Гиссарский высокогорный очаг, Таджикистан, 1970 г.	0.PE4h	Гиссарский п/в	«
A-1815	Таласский высокогорный очаг, Киргизия, 1980 г.	0.PE4t	Таласский штамм	«
И-3086	Монголия, 1983 г.	0.PE4m	Штамм <i>microtus</i>	«
И-2422	Монголия, 1974 г.	0.PE5	Улегейский п/в	Улегейский п/в
Nepal516, Antiqua	NCBI GenBank	2.ANT 1.ANT	Основной п/в, античный б/в	Основной п/в, античный б/в
KIM10	«	2.MED	Основной п/в, средневековый б/в	Основной п/в, средневековый б/в
CO92	«	1.ORI	Основной п/в, восточный б/в	Основной п/в, восточный б/в
Pestoides F	«	0.PE2	Кавказский п/в	Кавказский п/в
620024, CMCC05009	«	0.PE7		Кавказский п/в
Pestoides A, Pestoides B	«	0.PE4a	Алтайский п/в	Центральноазиатский п/в
91001, CMCC91090, CMCC93014, CMCC18019, CMCC10025, M0000002	«	0.PE4m	Штаммы <i>microtus</i>	«
Angola	«	0.PE1	«	Ангольский п/в

Примечание: п/в – подвид, б/в – биовар.

на пять четко обособленных кластеров. Отдельный большой кластер составили штаммы основного подвида, выделенные в России, странах ближнего и дальнего зарубежья. В этот кластер вошли все 10 секвенированных штаммов основного подвида из России и сопредельных стран: три штамма античного биовара (И-1996 из Забайкальского степного, KM932 из Тувинского горного и 231(708) из Аксайского высокогорного очагов), семь штаммов средневекового биовара из очагов Прикаспия (M-978, M-1773, M-1484, M-1864) и Кавказа (C-627, C-791, 1116Д). В этот же кластер вошли все использованные штаммы основного подвида из NCBI GenBank: два штамма античного биовара из Непала и Африки (Nepal516, Antiqua), 1 штамм средневеко-

вого биовара из Ирана (KIM10) и один штамм восточного биовара из США (CO92).

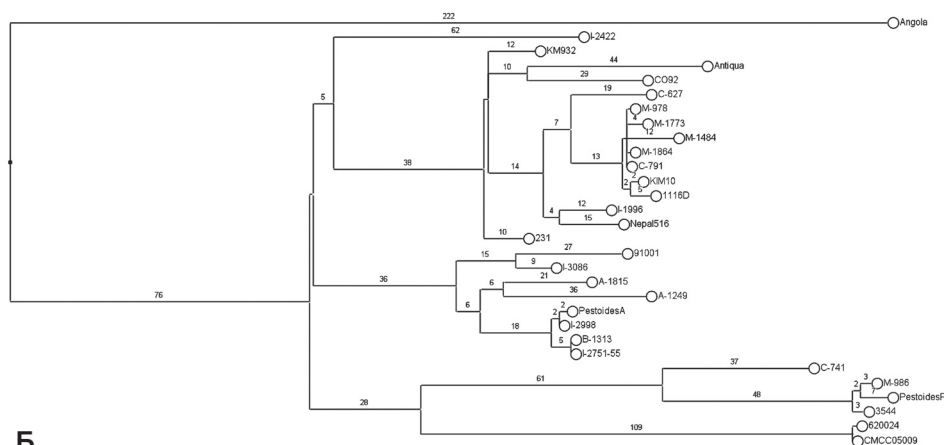
По данным проведенного анализа, все 14 штаммов основного подвида имеют 38 общих нуклеотидных замен, отсутствующих у других штаммов. Из этого следует, что они представляют отдельную внутривидовую систематическую единицу возбудителя чумы. Кластер тесно сгруппирован, что подтверждает близкое родство штаммов основного подвида. Количество взятых в анализ штаммов основного подвида может быть значительно увеличено за счет большого числа штаммов этого подвида, содержащихся в международных генетических базах данных, а также за счет секвенированных нами штаммов средневекового биовара из природных очагов



**A**

Рис. 1. Кластерная структура *Y. pestis*, по данным анализа коровых SNPs, в полногеномных последовательностях штаммов из России, стран ближнего и дальнего зарубежья (программа Bionumerics 7.5, алгоритм Maximum Parsimony):

*A* – неукорененное дерево, *Б* – укорененное дерево



**Б**

Казахстана. Однако это не приведет к изменению кластерной структуры возбудителя чумы, представленной на рис. 1.

В кластер основного подвида на дендрограмме включены основные филогенетические линии античного биовара O.ANT (штамм 231(708) из Аксайского высокогорного очага), 1.ANT (штамм Antiqua из Африки), 2.ANT (штамм И-1996 из Забайкальского степного очага и Nepal516 из Юго-Восточной Азии), 4.ANT (штамм KM932 из Тувинского горного очага), линия 2.MED средневекового биовара (штаммы из очагов Кавказа, Прикаспия, Ирана), линия 1.ORI восточного биовара (штамм CO92 из США). Принадлежность штаммов основного подвида (античный, средневековый и восточный биовары) к одной внутривидовой систематической группе не вызывает сомнения ни у отечественных, ни у зарубежных ученых [7, 11, 14, 17].

Отдельный кластер представлен штаммом улегейского подвида И-2422 из Монголии. Он имеет 62 уникальные замены единичных нуклеотидов, которые отделяют его от остальных кластеров дендрограммы. Нуклеотидная последовательность штаммов улегейского подвида отсутствует в международных базах данных, вследствие чего эта внутривидовая систематическая единица не учитывается при анализе генетического разнообразия *Y. pestis*. Популяция улегейских штаммов обозначена нами как 0.PE5. Несмотря на то, что в анализе использована последовательность только одного улегейского штамма, тем не менее, она может представлять все улегейские штаммы, поскольку эти штаммы из Монголии генетически однородны [3]. Улегейский подвид является наиболее молодым из всех неосновных подвидов, так как занимает наиболее близкое расположение к штаммам основного подвида и



имеет 5 общих с ними замен нуклеотидов, отсутствующих у других штаммов *Y. pestis*.

Отдельный кластер представлен штаммами, относящимися к алтайскому и гиссарскому подвидам, а также штаммами *microtus* и таласским штаммом. В этот кластер вошли три штамма алтайского подвида из Горно-Алтайского высокогорного очага (И-2998, И-2751-55, В1313) России, один штамм из Гиссарского высокогорного очага (И-1249) Таджикистана, один штамм из Таласского высокогорного очага (А-1815) Киргизии и Узбекистана и один штамм (И-3086) из Монголии. В этот же кластер вошли два штамма из NCBI GenBank (*Pestoides A*, 91001 *microtus*). Весь кластер имеет 36 отличительных единичных нуклеотидных замен, не встречающихся у штаммов из других кластеров. Это означает, что входящие в него штаммы составляют отдельную линию эволюции и отдельную внутривидовую систематическую единицу возбудителя чумы. Все штаммы, входящие в этот кластер, имеют одинаковую характеристику по дифференциальным биохимическим признакам. Они не редуцируют нитраты и не ферментируют арабинозу.

В пределах этого большого кластера четко выделяются три подкластера. Тесно сгруппированный подкластер составлен штаммами из Горно-Алтайского высокогорного очага, а также штаммом *Pestoides A* (NCBI GenBank), из чего следует, что последний также относится к алтайскому подвиду. Алтайские штаммы имеют 18 общих маркерных единичных нуклеотидных замен. Отличия между штаммами в пределах этого подкластера невелики и составляют от 2 до 5 замен нуклеотидов, что свидетельствует о высокой генетической однородности алтайских штаммов. Штамм И-3086, который ранее считался штаммом алтайского подвида из Монголии, не вошел в подкластер алтайских штаммов, а образовал отдельный подкластер вместе со штаммом 91001 *microtus* из Китая (NCBI GenBank). Оба штамма имеют 15 общих маркерных мутаций, из чего следует, что штамм И-3086 из Монголии родственен штаммам *microtus*, и штаммы *microtus* циркулируют не только в Китае, но и в Монголии. Возможно также, что штаммы алтайского подвида существуют только в Горно-Алтайском высокогорном очаге, о чем свидетельствует их высокая генетическая однородность. Об этом мы уже сообщали ранее [3].

Из структуры этого кластера становится ясным филогенетическое положение штаммов из Таласского высокогорного очага, расположенного в Киргизии и Узбекистане. Неоднократно выдвигались предложения о необходимости выделения таласских штаммов в отдельный подвид или биовар *Y. pestis* [7]. Данные полногеномного секвенирования таласского штамма А-1815 не поддерживают эти предложения. Штамм А-1815 образовал общий подкластер вместе со штаммом гиссарского подвида А-1249 из Гиссарского высокогорного очага Таджикистана. Оба штамма имеют 6 общих мутаций нуклеотидов, не встречающихся у других штаммов, что подтверждает их эволюционное родство. В то же время штам-

мы А-1815 и А-1249 не так близки между собой, как штаммы алтайского подкластера, и имеют соответственно 21 и 36 уникальных замен нуклеотидов. Это не удивительно, так как штаммы гиссарского подвида и таласские штаммы циркулируют в изолированных высокогорных очагах Киргизии, Узбекистана и Таджикистана. Нуклеотидные последовательности геномов гиссарских и таласских штаммов получены впервые и отсутствуют в генетических базах данных. Филогенетические линии этих штаммов для удобства обозначены нами как 0.PE4h и 0.PE4t, а алтайских штаммов и штаммов *microtus* как 0.PE4a и 0.PE4m.

Весь этот большой кластер штаммов, включающий штаммы алтайского и гиссарского подвигов, таласские штаммы и штаммы *microtus*, на основании их эволюционного родства и обособленности от других штаммов *Y. pestis*, мы предлагаем выделить в новый отдельный подвид с присвоением ему названия центральноазиатский подвид (*ssp. central asiatica*). Выбор такого названия подвида обусловлен тем, что составляющие его штаммы циркулируют на территории Центрально-Азиатской зоны природной очаговости чумы. В пределах этого подвида можно выделить три биовара, соответствующие трем подкластерам. Это алтайский биовар (*bv. altaica*), гиссарский биовар (*bv. hissarica*) с включением в него таласских штаммов, а также биовар *microtus* (штаммы из Китая и Монголии). Единство кластера сохраняется и при включении в него других штаммов из базы данных NCBI GenBank: *Pestoides B* (алтайский штамм) и штаммов *microtus* – CMCC91090, CMCC93014, CMCC18019, CMCC10025 и M0000002, CMCC91090, CMCC93014, CMCC18019, CMCC10025 и M0000002 из Китая (рис. 2).

Некоторые исследователи кроме трех используемых в классификациях биоваров – античного, средневекового и восточного – предлагают выделить новый биовар – *microtus* с включением в него всех неосновных подвигов, а также новых подвигов – *qinghaiensis*, *xilingolensis* – для штаммов из некоторых очагов Китая [7, 16, 19]. На дендрограмме (рис. 1) видно, что штамм M0000002 предлагаемого подвида *qinghaiensis* входит в подкластер *microtus* кластера центральноазиатского подвида и не может быть отнесен к отдельному подвиду *Y. pestis*. То же, по-видимому, касается и близкородственных штаммов *xilingolensis*. Из кластерной структуры *Y. pestis* (рис. 1) также следует, что предлагаемое объединение всех неосновных подвигов в подвид или биовар *microtus* не соответствует популяционной структуре возбудителя чумы. Штаммы *microtus* представляют лишь отдельный подкластер в составе центральноазиатского подвида. Поскольку в одну внутривидовую систематическую единицу не следует включать штаммы, не имеющие близкого родства и не относящиеся к одной филогенетической линии, то выделение биовара или подвида *microtus* с включением в него неродственных неосновных подвигов является формальным, лишенным генетической основы.

Еще один кластер на дендрограмме *Y. pestis* (рис. 1) представлен единственным штаммом не-

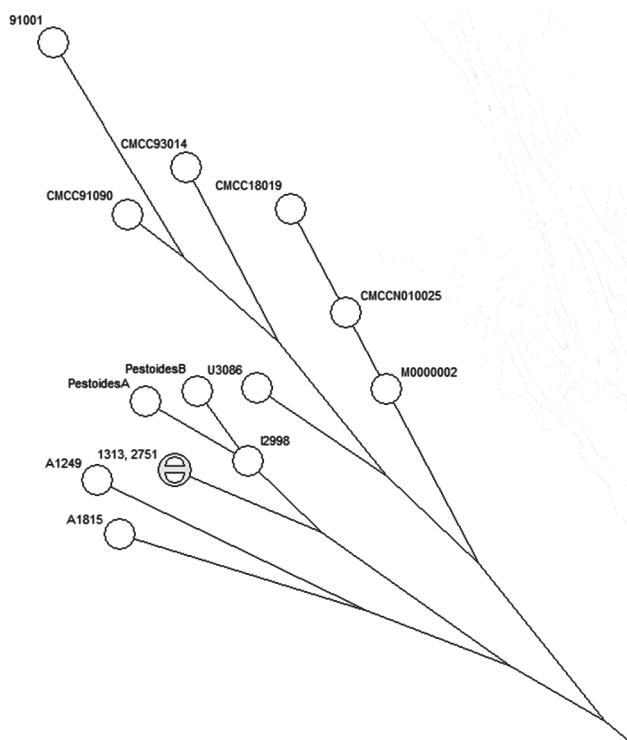


Рис. 2. Кластерная структура центральноазиатского подвида *Y. pestis* по данным анализа коровых SNPs в полногеномных последовательностях алтайских (Pestoides A, Pestoides B, И-2998, В-1313, И-2751-55), гиссарского (А-1249), таласского (А-1815) штаммов и штаммов *microtus* (91001, CMCC91090, CMCC93014, CMCC18019, CMCC10025, M0000002). Программа Bionumerics 7.5, алгоритм Maximum Parsimony с логарифмической обработкой длины ветвей

основного подвида из Африки – штаммом Angola, относящимся к ветви 0.РЕ3 [13]. Этот штамм имеет более 200 отличительных мутаций, отсутствующих у других штаммов *Y. pestis*. Штамм Angola представляет независимую ветвь эволюции *Y. pestis* и, следовательно, должен быть выделен в отдельный ангольский (*ssp. angola*) подвид. Несмотря на то, что он имеет наиболее длинную ветвь на дендрограмме, он не является самым древним штаммом *Y. pestis* [4, 7]. Скорость эволюции отдельных ветвей *Y. pestis* характеризуется значительной вариабельностью, связанной с различным селективным давлением в процессе адаптивной эволюции. Штамм Angola является ярким примером ускоренной эволюции при освоении новой экологической ниши [9, 13, 18].

По общепризнанному мнению и из данных представленной дендрограммы наиболее древними штаммами *Y. pestis* являются штаммы кавказского подвида и штаммы линии 0.РЕ7 из Китая [11, 14, 15]. Эти древние штаммы составили на дендрограмме один общий кластер и представляют одну ветвь эволюции. Они имеют 28 общих замен нуклеотидов, не встречающихся у других штаммов *Y. pestis*, что доказывает их эволюционное родство и принадлежность к одной внутривидовой группе *Y. pestis*. Однако в пределах кластера эти штаммы образовали два удаленных друг от друга подкластера. Один из них представлен штаммами кавказского подвида С-741, М-986, 3544 Арм. из очагов Кавказа (Россия, Армения) и штам-

мом Pestoides F (NCBI GenBank). Подкластер имеет 61 общую мутацию единичных нуклеотидов. При этом штамм С-741 из Восточно-Кавказского высокогорного очага существенно отличается от других штаммов кавказского подвида.

Отдельный подкластер образовали штаммы 620024 и CMCC05009 линии 0.РЕ7 с Тибетского плато в Китае, в геноме которых присутствует 109 уникальных замен нуклеотидов. Сведения о свойствах этих штаммов достаточно скудны, хотя известно, что они, как и штаммы кавказского подвида, способны вызывать чуму у людей [11]. Мы предлагаем объединить штаммы этого подкластера и подкластера кавказских штаммов в один кавказский подвид на основе их общего эволюционного происхождения. В то же время с учетом различий, существующих между этими штаммами, в дальнейшем при получении более полной информации о штаммах линии 0.РЕ7 возможно выделение их в отдельный подвид.

Из структуры этого кластера не следует, что наиболее древними штаммами *Y. pestis* являются штаммы линии 0.РЕ7, как это утверждается в работе Y. Cui *et al.* [11]. На дендрограмме (рис.1) видно, что они представляют одну эволюционную ветвь с кавказскими штаммами, разделившуюся на линии 0.РЕ2 и 0.ОРЕ7. По количеству отличающихся у них SNPs нельзя судить о большей древности одной из этих ветвей, поскольку скорость эволюции у отдельных популяций *Y. pestis* может значительно отличаться в зависимости от условий существования.

Таким образом, в результате проведенного нами анализа полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* из всех 11 природных очагов Российской Федерации и 7 очагов сопредельных государств, а также зарубежных штаммов различных филогенетических ветвей выявлено наличие пяти обособленных внутривидовых кластеров возбудителя чумы, которые соответствуют пяти подвидам. Это основной (*ssp. pestis*), кавказский (*ssp. caucasica*), центральноазиатский (*ssp. central asiatica*), улегейский (*ssp. ulegeica*) и ангольский (*ssp. angola*) подвиды. Эта классификация во многом совпадает с разработанной ранее отечественной подвидовой классификацией штаммов *Y. pestis*. Нами на основании данных филогенетического анализа с применением технологии полногеномного секвенирования подведена генетическая основа под используемую подвидовую классификацию и проведено ее усовершенствование. При этом учтены генетические особенности штаммов *Y. pestis* из всех очагов России и части очагов сопредельных стран, которые ранее не использовались при анализе глобального разнообразия возбудителя чумы. Предлагаемая подвидовая классификация может быть пополнена новыми подвидами в случае открытия популяций *Y. pestis* с отличающимися свойствами. Новая подвидовая классификация является объективной, поскольку построена на анализе большого числа полиморфных нуклеотидов в геномах штаммов возбудителя чумы различных филогенетических линий. Она отражает структуру вида *Y. pestis*, сформировавшуюся в процессе образования совре-



менных границ распространения возбудителя чумы.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Одинок Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. *Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол.* 2012; 3:25–35.
2. Куклева Л.М., Проценко О.А., Кутырев В.В. Современные представления о родстве возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2002; 1:3–7.
3. Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Одинок Г.Н., Оглодин Е.Г., Носов Н.Ю., Виноградова Н.А., Гусева Н.П., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Анализ разнообразия и определение геновариантов штаммов возбудителя чумы из Монголии. *Генетика.* 2015; 51(3):298–305.
4. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis*. *Пробл. особо опасных инф.* 1998; 1(78):11–22.
5. Одинок Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Анализ полногеномной последовательности штаммов *Yersinia pestis* на основе ступенчатого 680-SNP алгоритма. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:49–54.
6. Онищенко Г.Г., Кутырева В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
7. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярное типирование *Yersinia pestis*. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2013; 2:3–12.
8. Тимофеева Л.А. О таксономии чумного микроба. *Пробл. особо опасных инф.* 1972; 1(23):15–20.
9. Achtman M. Insights from genomic comparison of genetically monomorphic bacterial pathogen. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2012; 367(1590):860–7.
10. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999; 96(24):14043–8.
11. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo G., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2013; 110(2):577–82.
12. Devignat R. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. *Bull. WHO.* 1951; 4(2):247–63.
13. Eppinger M., Worsham P.L., Nikolich M.P., Riley D.R., Sebastian Y., Mou S., Achtman M., Lindler L.E., Ravel J. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. *J. Bacteriol.* 2010; 192(6):1685–99.
14. Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Biochemical and genetic peculiarities and the phylogenetic relationship of the non-main subspecies in the general scheme of the plague agent evolution. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954(1):45–51.
15. Garcia E., Worsham P., Bearden S., Malfatti S., Lang D., Larimer F., Lindler L., Chain P. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union. *Adv. Exp. Med. Res.* 2007; 603:17–22.
16. 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):e6000.
17. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3.
18. 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., Rheim 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.

19. Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Du Z., Wang J., Guo Z., Wang J., Huang P., Yang E. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and proposal of a new biovar, microtus. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5147–62.

## References

1. Eroshenko G.A., Odiнок G.N., Kukleva L.M., Pavlova A.I., Krasnov Ya.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Standard algorithm for molecular typing of *Yersinia pestis* strains]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2012; 3:25–35.
2. Kukleva L.M., Protsenko O.A., Kutyrev V.V. [Modern views on the kinship of plague and pseudotuberculosis agents]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2002; 1:3–7.
3. Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Odiнок G.N., Oglodin E.G., Nosov N.Yu., Vinogradova N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Analysis of diversity and identification of the genovariants of plague agent strains from Mongolia]. *Genetika.* 2015; 51(3):298–305.
4. Kutyrev V.V., Protsenko O.A. [Classification and molecular-genetic investigations of *Yersinia pestis*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1998; 1(78):11–22.
5. Odiнок G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Shavina N.Yu., Kutyrev V.V. [Analysis of the genome-wide sequence of *Yersinia pestis* strains based on the consecutive 680-SNP algorithm]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3:49–54.
6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia, and Siberia]. M.: "Meditsina", 2004. 192 p.
7. Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [Molecular typing of *Yersinia pestis*]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2013; 2:3–12.
8. Timofeeva L.A. [Regarding taxonomy of plague microbe]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1972; 1(23):15–20.
9. Achtman M. Insights from genomic comparison of genetically monomorphic bacterial pathogen. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2012; 367(1590):860–7.
10. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999; 96(24):14043–8.
11. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo G., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2013; 110(2):577–82.
12. Devignat R. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. *Bull. WHO.* 1951; 4(2):247–63.
13. Eppinger M., Worsham P.L., Nikolich M.P., Riley D.R., Sebastian Y., Mou S., Achtman M., Lindler L.E., Ravel J. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. *J. Bacteriol.* 2010; 192(6):1685–99.
14. Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Biochemical and genetic peculiarities and the phylogenetic relationship of the non-main subspecies in the general scheme of the plague agent evolution. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954(1):45–51.
15. Garcia E., Worsham P., Bearden S., Malfatti S., Lang D., Larimer F., Lindler L., Chain P. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union. *Adv. Exp. Med. Res.* 2007; 603:17–22.
16. 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):e6000.
17. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3.
18. 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., Rheim 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.
19. Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Du Z., Wang J., Guo Z., Wang J., Huang P., Yang E. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and proposal of a new biovar, microtus. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5147–62.

## Authors:

Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 30.11.15.