

Л.М.Куклева, Г.Н.Одинок, Н.Ю.Шавина, Г.А.Ерошенко, В.В.Кутырев

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПИТАТЕЛЬНЫХ ПОТРЕБНОСТЕЙ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРИЧИНЫ ИХ АУКСОТРОФНОСТИ**

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

Проведено изучение потребностей в факторах роста у 185 штаммов возбудителя чумы основного и неосновных (алтайского, кавказского, гиссарского и улегейского) подвигов, выделенных в 38 природных очагах чумы России и сопредельных государств. Установлено, что все штаммы основного подвида *Yersinia pestis* проявляют одинаковую зависимость в росте от трех аминокислот – метионина, фенилаланина, треонина, а штаммы из некоторых природных очагов дополнительно нуждаются в цистеине, лейцине и аргинине. Штаммы неосновных подвигов отличаются по питательным потребностям от штаммов основного подвида и между собой. Штаммы кавказского подвида нуждаются в тиамине, а также в аминокислотах – фенилаланине, тирозине и аргинине, штаммы алтайского подвида – в фенилаланине, аргинине и лейцине, гиссарского – в фенилаланине, лейцине, аргинине и метионине, а улегейского – в фенилаланине. Определен ряд мутаций, являющихся причиной ауксотрофности штаммов *Y. pestis* разных подвигов.

*Ключевые слова:* возбудитель чумы, факторы роста, ауксотрофность.

L.M.Kukleva, G.N.Odinokov, N.Yu.Shavina, G.A.Eroshenko, V.V.Kutyrev

**Comparative Analysis of the Nutrient Requirements among *Yersinia pestis* Strains of the Main and Non-Main Subspecies as well as Genetic Causes of Their Auxotrophy**

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

Studied is the nutrient demand for growth factors among 185 *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies (*altaica*, *caucasica*, *hissarica*, and *ulegeica*) isolated in 38 natural plague foci of Russia and neighboring states. Revealed is the fact that all the strains of *Yersinia pestis* main subspecies manifest equal dependence in growth on three amino-acids such as methionine, phenylalanine, and threonine, while strains isolated from certain natural foci have an additional demand for cysteine, leucine, and arginine. Strains of non-main subspecies differ in their nutrient requirements both from the strains of the main subspecies and among themselves. Strains of subspecies *caucasica* stand in need of thiamine and such amino-acids as phenylalanine, tyrosine and arginine; subspecies *altaica* – phenylalanine, arginine and leucine; subspecies *hissarica* – phenylalanine, leucine and methionine; *ulegeica* – phenylalanine. Detected is a number of mutations that lead to auxotrophy in *Yersinia pestis* strains of different subspecies.

*Key words:* plague agent, growth factors, auxotrophy.

Эволюционный процесс становления вида *Yersinia pestis* сопровождался целым комплексом генетических событий, в том числе приобретением нового генетического материала за счет горизонтального переноса, и утратой функций некоторых генов [11, 12]. Освоение богатых питательными ресурсами условий – организмов млекопитающего и насекомого, а также переход к облигатному паразитизму привели к потере у возбудителя чумы функций некоторых ферментных систем метаболического обмена, что определило потребность *Y. pestis* в дополнительных факторах роста. Возбудитель чумы не может развиваться при отсутствии в среде ряда органических соединений, в первую очередь аминокислот, являясь природным ауксотрофом.

Изучению питательных потребностей возбудителя чумы посвящено большое количество исследований [1, 9, 14]. Установлено, что штаммы из различных природных очагов чумы отличаются по зависимости от некоторых факторов роста [7, 10, 14]. Однако имеющиеся в литературе сведения о питательных потреб-

ностях штаммов *Y. pestis* из различных природных очагов недостаточно полны и противоречивы.

Между тем потребности в факторах роста штаммов возбудителя чумы могут служить дополнительной характеристикой *Y. pestis* из отдельных природных очагов. Такие данные могут быть использованы для дифференциации штаммов по очаговой принадлежности, а выяснение генетических причин ауксотрофности создаст предпосылки для установления тех этапов эволюции вида, на которых была приобретена та или иная мутация.

Целью настоящей работы был сравнительный анализ питательных потребностей штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов различного происхождения.

**Материалы и методы**

В работе использовано 185 штаммов *Y. pestis* основного (133) и неосновных (52) (алтайского, кавказского, гиссарского и улегейского) подвигов, изоли-

рованных в природных очагах чумы России и сопредельных государств (таблица). Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий, где они хранились в лиофильно высушенном состоянии. Исследованные штаммы *Y. pestis* относились к античному и средневековому биоварам основного подвида. Определение питательных потребностей штаммов проводили по способу, предложенному R.Brubaker [13], с некоторыми модификациями [6]. Условия постановки ПЦР и секвенирования описаны ранее [5, 6].

### Результаты и обсуждение

*Питательные потребности штаммов основного подвида Y. pestis.* Питательные потребности в отдельных факторах роста были изучены у 133 штаммов *Y. pestis*, представляющих 38 природных очагов чумы различного ландшафтно-географического типа России, других стран СНГ и Монголии.

При культивировании штаммов основного подвида *Y. pestis* на искусственных питательных средах с различным составом аминокислот были выявлены некоторые общие закономерности проявления потребностей в факторах роста у штаммов возбудителя чумы. Так, общим свойством для всех штаммов основного подвида возбудителя чумы, независимо от их биоварной и очаговой принадлежности, является зависимость по фенилаланину, метионину и треонину (таблица), что, по-видимому, свидетельствует о наличии повреждений структурно-функциональной

целостности генов, участвующих в биосинтезе этих аминокислот.

Анализ полученных данных позволил выявить особенности проявления зависимости от различных факторов роста у штаммов из отдельных очагов или их групп.

Штаммы античного биовара (27 штаммов), циркулирующие в высокогорных очагах Киргизии (Сарыджаский, Верхненарынский, Аксайский и Алайский), помимо потребности в фенилаланине, метионине и треонине, проявляют дополнительную зависимость роста от лейцина (Аксайский и Сарыджаский природные очаги) или цистеина (Верхненарынский и Алайский очаги).

Штаммы средневекового биовара, распространенные в большинстве очагов чумы на территории России и сопредельных государств, также зависят от наличия в среде фенилаланина, метионина и треонина. Однако, помимо этих общих потребностей, были выявлены потребности в других факторах роста.

Так, для всех изученных штаммов *Y. pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы характерна общая для всего основного подвида ауксотрофность по метионину, фенилаланину и треонину. Однако в левобережье р. Баксан в Верхне-Кубанском и Кубано-Малкинском районах выделяют штаммы с дополнительной зависимостью от пролина, как это описывали другие авторы [10]. Такой тип питательных потребностей не встречается у штаммов *Y. pestis* из других природных очагов чумы.

**Питательные потребности штаммов основного подвида возбудителя чумы из природных очагов с различной ландшафтно-географической принадлежностью**

Тип очага	Биовар циркулирующих штаммов	Название очага (кол-во изученных штаммов)	Питательные потребности (помимо фенилаланина, метионина и треонина)
Высокогорный	Античный	Сарыджаский (4)	Лейцин, цистеин
		Верхненарынский (3) Алайский (4)	Цистеин
		Аксайский (16)	Лейцин
	Средневековый	Центрально-Кавказский (8)	*
Горный	Средневековый	Тувинский (4)	Цистеин
Равнинно-предгорный	Средневековый	Бозчельский (1) Кобыстанский (4) Мильско-Карабахский (1) Дагестанский (3)	Цистеин, аргинин
		Джейранчельский (3)	Лейцин
Низкогорный	Средневековый	Приараксинский (3)	Цистеин
Степной	Средневековый	Прикаспийский Северо-западный (4) Волго-Уральский (7) Зауральский (3)	Лейцин, цистеин
		Античный	Забайкальский (3)
Песчаный	Средневековый	Прикаспийский (15) Волго-Уральский (6)	Лейцин
Пустынный	Средневековый	Предустюртский (2) Мангышлакский (3)	Лейцин, цистеин
		Устюртский (3) Кызылкумский (5)	Лейцин
		Урало-Эмбенский (6) Северо-Приаральский (3) Муюнкумский (3) Таукумский (2) Прибалхашский (3)	Цистеин
		Приаральско-Каракумский (3)	–
		Каракумский (3)	–

\*В Верхне-Кубанском и Кубано-Малкинском районах очага циркулируют штаммы, зависящие от пролина.

Штаммы из Приараксинского низкогорного (3) и Тувинского горного (4) очагов проявляют дополнительную зависимость роста от присутствия в среде цистеина. Для штаммов *Y. pestis*, циркулирующих в равнинно-предгорных (9 штаммов) (Бозчельский, Кобыстанский, Мильско-Карабахский, Дагестанский) очагах чумы, характерно наличие дополнительных потребностей в цистеине и аргинине. Кроме того, отдельные штаммы из Джейранчельского равнинно-предгорного очага не способны синтезировать лейцин.

Подавляющее большинство штаммов, циркулирующих в степных (Северо-Западный Прикаспийский, Волго-Уральский, Зауральский) и песчаных очагах чумы (Прикаспийский и Волго-Уральский) имеют общую для всего вида *Y. pestis* зависимость от фенилаланина, метионина и треонина. Между тем в этих очагах были выявлены отдельные штаммы, ауксотрофные по лейцину и цистеину, либо по одной из этих аминокислот. Особый интерес представляют штаммы из Забайкальского степного очага чумы, где циркулируют штаммы античного биовара, несмотря на то, что в середине прошлого века там произошла смена основного носителя [1]. Штаммы из этого очага для роста на искусственных средах, помимо фенилаланина, метионина и треонина, нуждаются в цистеине. В изученной коллекции присутствуют отдельные штаммы, зависящие от лейцина.

Для всех штаммов из пустынных очагов Средней Азии – Предустюртский, Устюртский, Северо-Приаральский, Урало-Эмбенский, Мангышлакский, Приаральско-Каракумский, Каракумский, Кызылкумский, Муюнкумский, Таукумский, Прибалхашский – отмечена общая для всего основного подвида *Y. pestis* зависимость от фенилаланина, метионина и треонина. Кроме того, штаммы из Северо-Приаральского, Муюнкумского, Таукумского, Урало-Эмбенского и Прибалхашского природных очагов чумы дополнительно нуждаются в цистеине. Отдельные штаммы *Y. pestis* из Устюртского и Кызылкумского природных очагов чумы ауксотрофны по лейцину. Изоляты из Мангышлакского и Предустюртского очагов не способны самостоятельно синтезировать цистеин и лейцин.

Штаммы из Приаральско-Каракумского и Каракумского пустынных очагов не имеют дополнительных потребностей, помимо фенилаланина, метионина и треонина.

**Питательные потребности штаммов неосновных подвигов *Y. pestis*.** Далее нами были изучены потребности в факторах роста у 52 штаммов неосновных подвигов *Y. pestis*.

**Кавказский подвид.** В результате изучения питательных потребностей у 21 штамма кавказского подвида возбудителя чумы, выделенного в горных очагах Закавказья, установлено, что их уникальной особенностью, отличающей от других подвигов, является потребность в тиамине. Кроме того, все штаммы кавказского подвида нуждаются в фенилаланине, тирозине и аргинине. В отличие от штаммов из Ленинанканского,

Присеванского и Зангезуро-Карабахского очагов чумы, зависимость только от этих четырех факторов роста, штаммы из Восточно-Кавказского высокогорного очага нуждаются в лейцине.

**Гиссарский подвид.** Потребности в дополнительных факторах роста были изучены у 11 штаммов *Y. pestis ssp. hissarica*, выделенных в Гиссарском высокогорном очаге чумы. Все изученные штаммы обладают одинаковыми питательными потребностями и неспособны самостоятельно синтезировать четыре аминокислоты – фенилаланин, лейцин, аргинин и метионин.

**Алтайский подвид.** Была изучена коллекция из 14 штаммов *Y. pestis ssp. altaica*, изолированных в Алтайском горном очаге чумы и в Монголии. Установлено, что все изученные штаммы были неспособны самостоятельно синтезировать фенилаланин, аргинин и лейцин.

**Улегейский подвид.** При изучении питательных потребностей 6 штаммов улегейского подвида, изолированных на территории Южно-Гобийского и Убур-Хангайского аймаков Монголии, установлена их ауксотрофность по фенилаланину.

Далее нами были предприняты исследования по выяснению генетических причин зависимости штаммов *Y. pestis* от некоторых факторов роста. В результате секвенирования варибельного локуса гена *metB* установлено, что ауксотрофность по метионину у штаммов основного и гиссарского подвигов вызвана различными причинами. Зависимость от метионина у штаммов основного подвида обусловлена наличием делеции единичного нуклеотида (-G) в позиции 988 от начала гена *metB*, а у гиссарского подвида – инсерцией единичного нуклеотида (+G) в позиции 989 этого же гена. Нами также определены генетические основы ауксотрофности штаммов кавказского подвида. Показано наличие у всех штаммов этого подвида идентичных мутаций в генах *argA* (инсерция *IS100* после 196 нуклеотида), *aroG* (вставка 10 п.н. в позиции 820–829), *aroF* (вставка *IS100* после 888 нуклеотида), *thiH* (вставка тимина в позиции 552) и *thiG* (делеция 13 п.н. в позиции 384–396). Выявленные мутации являются причиной отсутствия у штаммов кавказского подвида способности синтезировать аргинин, фенилаланин, тирозин и витамин B1 (тиамин).

Таким образом, проведенный анализ зависимости от факторов роста штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвигов позволил выявить некоторые общие закономерности в распределении питательных потребностей у этих штаммов. Незаменимыми аминокислотами для всех изученных штаммов основного подвида, независимо от принадлежности к биовару (античный или средневековый) и природному очагу, являются метионин, фенилаланин и треонин. Ауксотрофность по фенилаланину характерна для всех изученных штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвигов, что позволяет предположить появление мутации, приведшей к зависимости от этой аминокислоты, на ранних этапах эволюции *Y. pestis*. У штаммов основного и гиссарского подви-

дов возбудителя чумы выявлена зависимость от метионина, вызванная двумя различными мутациями в гене *metB* оперона синтеза метионина. Отдельные штаммы основного подвида *Y. pestis* проявляют зависимость в цистеине и лейцине.

Полученные данные не противоречат имеющимся в литературе сведениям о необходимости для роста возбудителя чумы таких аминокислот как метионин, фенилаланин и треонин [2, 9, 10]. Наличие отдельных штаммов, неспособных самостоятельно синтезировать лейцин, описано для высокогорных очагов Средней Азии и песчаных очагов Прикаспия [3, 4, 14]. Уникальные питательные потребности штаммов неосновных подвигов отмечены в ряде исследований [1, 8, 9].

В то же время полученные результаты не во всем совпадают с литературными данными. Так, нами не выявлено универсальной зависимости штаммов *Y. pestis* основного подвида от цистеина, который многими авторами рассматривается как необходимый фактор роста возбудителя чумы [1, 9]. Однако существует мнение, что потребность в цистеине при 28 °С проявляется не всегда [4]. Следует отметить, что возбудитель чумы при выращивании в условиях 28 °С нуждается в ограниченном количестве аминокислот – фенилаланине, метионине, треонине, цистеине, лейцине, аргинине. Уникальными факторами роста являются пролин (часть штаммов из Центрально-Кавказского очага) и тиамин (штаммы кавказского подвида).

Таким образом, полученные данные позволяют дополнить характеристику штаммов возбудителя чумы из отдельных природных очагов. Дальнейшие исследования в направлении выяснения генетических причин ауксотрофности штаммов возбудителя чумы позволят дополнить молекулярную характеристику штаммов из отдельных очагов, что может быть использовано в системе молекулярного типирования штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы России и зарубежных стран, а также учтено при культивировании штаммов на искусственных питательных средах.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 12-04-31098.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы. Иркутск; 1989. 90 с.
2. Аракелян И.С., Мартиневский И.Л. О характере и частоте появления обратных мутаций у штаммов чумного микроба, выделенных в разных природных очагах. Профилактика особо опасных инф. Алма-Ата; 1981. С. 12–8.
3. Майканов Н.С., Гражданов А.К. Биологические свойства популяции возбудителя чумы из Волго-Уральского песчаного очага. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. Алматы, 2001; 4:210–12.
4. Мартиневский И.Л., Хакимов М.Н., Хайдаров Т.Б., Аракелян И.С., Атабабаров Б.Б., Белобородова С.В., Витрищак Т.П. О штаммах чумного микроба из Кызылкумов с пониженной потребностью в факторах роста. В кн.: Биохимия, патофизиология и микробиология особо опасных инфекций. Саратов; 1983. С. 15–8.
5. Одинок Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Павлова А.И., Кутырев В.В. Генетические основы метионинзависимости штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов. Генетика. 2011; 47(3):332–8.
6. Одинок Г.Н., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Определение генетических

основ ауксотрофности штаммов *Yersinia pestis* кавказского подвида. Генетика. 2012; 48(4):457–64.

7. Пейсахис Л.А., Степанов В.М. Некоторые итоги изучения потребностей в факторах роста штаммов возбудителя чумы. Probl. osobo opasnkh inf. 1978; 5(63):13–6.
8. Розанова Г.Н., Грамотина Л.И., Сучков Ю.Г., Лалазарова И.Г., Шехикян М.Т., Матевосян Л.Ш., Джафаров Н.И., Абурахманов Г.А., Земельман Б.М. Питательные потребности возбудителя чумы из очагов полевочного типа. В кн.: Селекция и генетика возбудителей особо опасных инфекций. Саратов; 1982. С. 73–6.
9. Султанов Г.В., Козлов М.П. Чума: микробиология, патогенез, диагностика. Махачкала; 1995. 146 с.
10. Сучков Ю.Г., Розанова Г.Н., Елкин Ю.М., Грамотина Л.И. Естественная генетическая маркировка штаммов чумного микроба из природных очагов Кавказа. Probl. prirodnoy ochagovosti chumy. Irkutsk, 1980; 2:35–7.
11. Achtmann M. Insights from genomic comparisons of genetically monomorphic bacterial pathogens. Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci. 2012; 367(1590):860–7.
12. Bearden S.W., Brubaker R.R. Recent findings regarding maintenance of enzootic variants of *Yersinia pestis* in sylvatic reservoirs and their significance in the evolution of epidemic plague. Vector Borne Zoonotic Dis. 2010; 10(1):85–92.
13. Brubaker R. Interconversion of Purine Mononucleotides in *Pasteurella pestis*. Infect. Immun. 1970; 1(5):446–54.
14. Martinevskiy I.L., Atshabar B.B., Aikimbaev A.M. The results of many years study of the requirement in growth factors of the different *Yersinia pestis* strains and their significance in the investigation of the natural plague foci. Chinese journal of control of endemic disease. 1999; 14:79–80.

#### References

1. Aparin G.P., Golubinsky E.P. [Microbiology of Plague]. Irkutsk; 1989. 90 p.
2. Arakelyan I.S., Martinevskiy I.L. [Concerning the character and regularity of occurrence of reverse mutations among the strains of plague agent isolated in various natural foci]. Profilakt. Osobo Opasn. Infek. Alma-Ata; 1981. P. 12–8.
3. Maykanov N.S., Grazhdanov A.K. [Biological properties of plague agent population in the Volga-Ural sand foci]. Karant. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane. Almaty, 2001; 4:210–12.
4. Martinevskiy I.L., Khakimov M.N., Khaydarov T.B., Arakelyan I.S., Atshabarov B.B., Beloborodova S.V., Vitrichchak T.P. [Regarding the strains of plague agent isolated in Kyzylkum, possessing decreased demand for growth factors]. In: [Biochemistry, Pathophysiology, and Microbiology of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1983. P. 15–8.
5. Odnokov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Pavlova A.I., Kutyrev V.V. [Genetic grounds of methionine-dependence in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies]. Genetika. 2011; 47, 3:332–8.
6. Odnokov G.N., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. [Determination of the genetic grounds of auxotroph in *Yersinia pestis* ssp. *caucasica* strains]. Genetika. 2011; 48(4): 457–64.
7. Peysakhis L.A., Stepanov V.M. [Results of the investigations as regards demand for growth factors in plague agent strains]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 1978; (63):13–6.
8. Rozanova G.N., Gramotina L.I., Suchkov Yu.G., Lalazarova I.G., Shekhiyan M.T., Matevosyan L.Sh., Dzhaferov N.I., Abdurakhmanov G.A., Zemel'man B.M. [Nutrient requirement of the plague agent from the vole type foci]. In: [Selection and Genetics of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1982. P. 73–6.
9. Sultanov G.V., Kozlov M.P. [Plague: Microbiology, Pathogenesis, Diagnostics]. Makhachkala; 1995. 146 p.
10. Suchkov Yu.G., Rozanova G.N., Elkin Yu.M., Gramotina L.I. [Natural genetic marking of the plague agent strains from natural foci in the territory of Caucasus]. Probl. Prirod. Ochagov. Chumy. Irkutsk, 1980; 2:35–7.
11. Achtmann M. Insights from genomic comparisons of genetically monomorphic bacterial pathogens. Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci. 2012; 367(1590):860–7.
12. Bearden S.W., Brubaker R.R. Recent findings regarding maintenance of enzootic variants of *Yersinia pestis* in sylvatic reservoirs and their significance in the evolution of epidemic plague. Vector Borne Zoonotic Dis. 2010; 10(1):85–92.
13. Brubaker R. Interconversion of Purine Mononucleotides in *Pasteurella pestis*. Infect. Immun. 1970; 1(5):446–54.
14. Martinevskiy I.L., Atshabar B.B., Aikimbaev A.M. The results of many years study of the requirement in growth factors of the different *Yersinia pestis* strains and their significance in the investigation of the natural plague foci. Chinese journal of control of endemic disease. 1999; 14:79–80.

#### Authors:

Kukleva L.M., Odnokov G.N., Shavina N.Yu., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

#### Об авторах:

Куклева Л.М., Одинок Г.Н., Шавина Н.Ю., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 02.11.12.