

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал
Выходит четыре раза в год
Основан в 1968 году

Главный редактор академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор **В.В. Кутырев**

*Журнал входит в перечень ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий,
в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций
на соискание ученой степени доктора и кандидата наук
Журнал индексируется в Scopus*

Выпуск 4

2022

САРАТОВ

**Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 29448**
Цена на издание за минимальный
подписной период – 686,52 руб.

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи и массовых
коммуникаций
Свидетельство ПИ № ФС77-74153
от 29 октября 2018 г.

Журнал «Проблемы особо опасных
инфекций» является рецензируемым
изданием

Все рукописи проходят проверку
системой «Антиплагиат»

Журнал «Проблемы особо опасных
инфекций» индексируется в РИНЦ
и Scopus

Ответственность за достоверность
информации, содержащейся
в рекламных материалах,
несут рекламодатели

Адрес издателя и редакции:
ФКУН Российский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора
410005, Саратов,
ул. Университетская, 46
E-mail: jour@microbe.ru
Сайт: <http://journal.microbe.ru>

Начальник
редакционно-издательского отдела
ФКУН Российский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора
Е.С. Герасимова
Тел. (845-2) 51-82-22
Факс (845-2) 51-52-12

Редактор
Е.Ю. Лашкова
Технический редактор *Т.К. Меркулова*
Перевод на английский
А.П. Ножкиной, Т.Б. Караваевой

Проблемы особо опасных инфекций.
2022. Вып. 4. 116 с.

Подписано в печать 26.12.2022
Формат 60×84 1/8
Бумага мелованная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 13,9
Заказ 385-23

Журнал отпечатан в типографии
ООО «Амирит». 410004, Саратов,
ул. Чернышевского, д. 88, литер У

© Федеральное казенное учреждение науки
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»
Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека, 2022

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Кутырев В.В., докт. мед. наук, академик РАН (Саратов, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Акимкин В.Г., докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)
Балахонов С.В., докт. мед. наук, профессор (Иркутск, Россия)
Бондарев В.П., докт. мед. наук, профессор (Москва, Россия)
Борисевич С.В., докт. биол. наук, профессор, академик РАН
(Сергиев Посад, Россия)
Гинцбург А.Л., докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)
Дятлов И.А., докт. мед. наук, академик РАН (Оболensk, Россия)
Куличенко А.Н., докт. мед. наук, академик РАН (Ставрополь, Россия)
Львов Д.К., докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)
Малеев В.В., докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)
Онищенко Г.Г., докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)
Рудаков Н.В., докт. мед. наук, профессор (Омск, Россия)
Сергиев В.П., докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)
Топорков А.В., докт. мед. наук (Волгоград, Россия)

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

Абдикаримов С.Т., докт. мед. наук, доцент (Бишкек, Кыргызстан)
Мотин В.Л., профессор (Галвестон, США)
Титов Л.П., докт. мед. наук, профессор, член-корр. НАН Беларуси,
иностранн. член РАН (Минск, Беларусь)
Цогбадрах Нямдорж, канд. мед. наук (Улаанбаатар, Монголия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Альховский С.В., докт. биол. наук, член-корр. РАН (Москва, Россия)
Андаев Е.И., докт. мед. наук (Иркутск, Россия)
Бугоркова С.А., докт. мед. наук (Саратов, Россия)
Гулий О.И., докт. биол. наук (Саратов, Россия)
Ерошенко Г.А., докт. биол. наук (Саратов, Россия)
Жарникова И.В., докт. биол. наук (Ставрополь, Россия)
Карпунина Л.В., докт. биол. наук, профессор (Саратов, Россия)
Кругликов В.Д., докт. мед. наук, с. н. с. (Ростов-на-Дону, Россия)
Малецкая О.В., докт. мед. наук, профессор (Ставрополь, Россия)
Микеров А.Н., докт. биол. наук (Саратов, Россия)
Пеньевская Н.А., докт. мед. наук, доцент (Омск, Россия)
Попов Н.В., докт. биол. наук, профессор (Саратов, Россия)
Саяпина Л.В., докт. мед. наук (Москва, Россия)
Смирнова Н.И., докт. биол. наук, профессор (Саратов, Россия)
Топорков В.П., докт. мед. наук, профессор (Саратов, Россия)
Шемякин И.Г., докт. биол. наук, профессор (Оболensk, Россия)
Щербакова С.А., докт. биол. наук (Саратов, Россия)

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Красько А.Г., канд. мед. наук, доцент (Минск, Беларусь)
Мека-Меченко Т.В., докт. мед. наук (Алматы, Казахстан)
Усенбаев Н.Т., канд. мед. наук (Бишкек, Кыргызстан)
Цэрэнноров Дамдиндорж, канд. мед. наук (Улаанбаатар, Монголия)

Ответственный секретарь

Т.Б. Караваева
Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12
E-mail: jour@microbe.ru

Problemy Osobo Opasnykh Infektsii

Problems of Particularly Dangerous Infections

2022, Issue 4

Scientific and Practical Peer-Reviewed Journal. Issued quarterly. Founded in 1968

Problems of Particularly Dangerous Infections is published by Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Editor-in-Chief: *Kutyrev V.V.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS

Editorial Council

Abdikarimov S.T., Doctor of Medical Science,
Associate Professor (Bishkek, Kyrgyzstan)

Akimkin V.G., Doctor of Medical Science, Professor,
Member of the RAS (Moscow, Russia)

Balakhonov S.V., Doctor of Medical Science, Professor
(Irkutsk, Russia)

Bondarev V.P., Doctor of Medical Science, Professor
(Moscow, Russia)

Borisevich S.V., Doctor of Biological Science,
Professor, Member of the RAS (Sergiev Possad, Russia)

Gintsburg A.L., Doctor of Medical Science, Professor,
Member of the RAS (Moscow, Russia)

Dyatlov I.A., Doctor of Medical Science, Professor,
Member of the RAS (Obolensk, Russia)

Kulichenko A.N., Doctor of Medical Science, Professor,
Member of the RAS (Stavropol, Russia)

Lvov D.K., Doctor of Medical Science, Professor,
Member of the RAS (Moscow, Russia)

Maleev V.V., Doctor of Medical Science, Professor,
Member of the RAS (Moscow, Russia)

Motin V.L., Ph. D., Professor (Galveston, USA)

Onishchenko G.G., Doctor of Medical Science, Professor,
Member of the RAS (Moscow, Russia)

Rudakov N.V., Doctor of Medical Science, Professor
(Omsk, Russia)

Sergiev V.P., Doctor of Medical Science, Professor,
Member of the RAS (Moscow, Russia)

Titov L.P., Doctor of Medical Science, Professor,
Corresponding Member of the NAS of Belarus, Foreign
Member of the RAS (Minsk, Belarus)

Toporkov A.V., Doctor of Medical Science (Volgograd,
Russia)

Tsogbadrakh Namdorj, Ph. D. (Ulaanbaatar, Mongolia)

Editorial Board

Alkhovsky S.V., Doctor of Biological Science,
Corresponding Member of the RAS (Moscow, Russia)

Andaev E.I., Doctor of Medical Science (Irkutsk, Russia)

Bugorkova S.A., Doctor of Medical Science (Saratov,
Russia)

Guliy O.I., Doctor of Biological Science (Saratov,
Russia)

Eroshenko G.A., Doctor of Biological Science (Saratov,
Russia)

Zharnikova I.V., Doctor of Biological Science
(Stavropol, Russia)

Karpunina L.V., Doctor of Biological Science, Professor
(Saratov, Russia)

Kras'ko A.G., Ph. D., Associate Professor (Minsk,
Belarus)

Kruglikov V.D., Doctor of Medical Science (Rostov-on-
Don, Russia)

Maletskaya O.V., Doctor of Medical Science, Professor
(Stavropol, Russia)

Meka-Mechenko T.V., Doctor of Medical Science
(Almaty, Kazakhstan)

Mikero A.N., Doctor of Biological Science (Saratov,
Russia)

Pen'evskaya N.A., Doctor of Medical Science, Associate
Professor (Omsk, Russia)

Popov N.V., Doctor of Biological Science, Professor
(Saratov, Russia)

Sayapina L.V., Doctor of Medical Science (Moscow,
Russia)

Smirnova N.I., Doctor of Biological Science, Professor
(Saratov, Russia)

Shemyakin I.G., Doctor of Biological Science, Professor
(Obolensk, Russia)

Shcherbakova S.A., Doctor of Biological Science
(Saratov, Russia)

Toporkov V.P., Doctor of Medical Science, Professor
(Saratov, Russia)

Tserennorov Damdindorj, Ph. D. (Ulaanbaatar,
Mongolia)

Usenbaev N.T., Ph. D (Bishkek, Kyrgyzstan)

Editorial Office Address:

46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation
Tel +7(845-2) 51-82-22. Fax +7(845-2) 51-52-12. E-mail: jour@microbe.ru.
<http://journal.microbe.ru>

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

О Международном симпозиуме “Yersinia 14”	6
--	---

Обзоры

Бердиев С.К., Джапарова А.К., Ерошенко Г.А., Кузнецов А.А., Кутырев В.В. Международная интеграция и сотрудничество на современном этапе в борьбе с чумой и другими опасными инфекциями в Кыргызской Республике	7
--	---

Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Исторические и современные классификации возбудителя чумы	14
---	----

Мека-Меченко Т.В., Ерубав Т.К., Бегимбаева Э.Ж., Ковалева Г.Г., Абдел З.Ж., Сутягин В.В., Избанова У.А. Многоуровневая система изучения свойств штаммов чумного микроба в Республике Казахстан	23
--	----

Никифоров К.А. Современные молекулярно-генетические методы и перспективы их применения для индикации и идентификации штаммов <i>Yersinia pestis</i>	29
---	----

Оригинальные статьи

Балыкова А.Н., Куклева Л.М., Горюнова П.А., Шевченко К.С., Коврижников А.В., Краснов Я.М., Червякова Н.С., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. SNP-профили штаммов <i>Yersinia pestis</i> средневекового био-вара из очагов чумы Прикаспия	41
--	----

Гапельченкова Т.В., Шайхутдинова Р.З., Трунякова А.С., Светоч Т.Э., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Борзилов А.И., Копылов П.Х., Дентовская С.В. Динамика антительного ответа морских свинок к белкам <i>Yersinia pestis</i> при чуме	50
--	----

Горюнова П.А., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Девдариани З.Л., Червякова Н.С., Кутырев В.В. Вариабельность генов <i>pgm</i> -области штаммов <i>Yersinia pestis</i> из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы	57
--	----

Ерубав Т.К., Ковалева Г.Г., Мека-Меченко Т.В., Абдел З.Ж., Сутягин В.В., Кислицын Ю.В., Беляев А.И., Ким И.Б. Международное сотрудничество Казахстана в профилактике особо опасных инфекций	63
---	----

On International Symposium “Yersinia 14”	
--	--

Reviews

Berdiev S.K., Dzhaparova A.K., Eroshenko G.A., Kuznetsov A.A., Kutyrev V.V. International Integration and Cooperation at the Present Stage in the Fight Against Plague and Other Dangerous Infections in the Kyrgyz Republic	
--	--

Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Kutyrev V.V. Historical and Modern Classifications of the Plague Agent	
--	--

Meka-Mechenko T.V., Erubaev T.K., Begimbaeva E.Zh., Kovaleva G.G., Abdel Z.Zh., Sutyagin V.V., Izbanova U.A. Multilevel System of Studying Plague Microbe Strains Properties in the Republic of Kazakhstan	
--	--

Nikiforov K.A. Advanced Molecular-Genetic Methods and Prospects for Their Application for the Indication and Identification of <i>Yersinia pestis</i> Strains	
---	--

Original articles

Balykova A.N., Kukleva L.M., Goryunova P.A., Shevchenko K.S., Kovrizhnikov A.V., Krasnov Ya.M., Chervyakova N.S., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. SNP-Profiles of <i>Yersinia pestis</i> Strains of the Medieval Biovar from the Caspian Sea Region Plague Foci	
--	--

Gapel'chenkova T.V., Shaikhutdinova R.Z., Trunyakova A.S., Svetoch T.E., Kombarova T.I., Platonov M.E., Borzilov A.I., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. Dynamics of Antibody Response to <i>Yersinia pestis</i> Proteins in Plague Affected Guinea Pigs	
--	--

Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Devdariani Z.L., Chervyakova N.S., Kutyrev V.V. Variability of <i>pgm</i> -Region Genes in <i>Yersinia pestis</i> Strains from the Caspian Sandy and Adjacent Plague Foci	
--	--

Erubaev T.K., Kovaleva G.G., Meka-Mechenko T.V., Abdel Z.Zh., Sutyagin V.V., Kislitsyn Yu.V., Belyaev A.I., Kim I.B. International Cooperation of Kazakhstan in the Prevention of Particularly Dangerous Infections	
---	--

Копылов П.Х., Дентовская С.В. Прямое количественное определение белковых антигенов в препаратах субъединичных чумных и риккетсиозных вакцин	69	Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. Direct Quantification of Protein Antigens in Subunit Plague and Rickettsial Vaccine Preparations	
Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии <i>Yersinia pestis</i>	75	Kuznetsova D.A., Rykova V.A., Podladchikova O.N. The Role of the Yersiniachelin Siderophore in the Physiology of <i>Yersinia pestis</i>	
Макашова М.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Шарапова Н.А., Нарышкина Е.А., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Длительное сохранение <i>Yersinia pestis</i> в ассоциации с <i>Acanthamoeba castellanii</i> в эксперименте	82	Makashova M.A., Oglozin E.G., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Naryshkina E.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Long-Term Persistence of <i>Yersinia pestis</i> in Association with <i>Acanthamoeba castellanii</i> in Experiment	
Манучарян А., Даниелян Р., Мелик-Андреасян Г., Аветисян Л., Ванян А. Результаты полевых и лабораторных исследований носителей и переносчиков природно-очаговых инфекций на территории Республики Армения	90	Manucharyan A., Danielyan R., Melik-Andreasyan G., Avetisyan L., Vanyan A. Results of Field and Laboratory Studies of Carriers and Vectors of Natural-Focal Infections on the Territory of the Republic of Armenia	
Токмакова Е.Г., Галацевич Н.Ф., Базанова Л.П., Ковалёва Н.И., Чалбакай А.А., Акимова И.С. Зараженность блох длиннохвостого суслика энтомопаразитическими нематодами в Тувинском горном природном очаге чумы	96	Tokmakova E.G., Galatsevich N.F., Bazanova L.P., Kovaleva N.I., Chalbakai A.A., Akimova I.S. The Infestation of Fleas of the Long-Tailed Souslik with Entomoparasitic Nematodes in Tuva Mountain Natural Plague Focus	
Трухачев А.Л., Мелоян М.Г., Воскресенская Е.А., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Подладчикова О.Н., Писанов Р.В., Чеснокова М.В., Рыкова В.А., Кузнецова Д.А., Климов В.Т., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А. INDEL-типирование штаммов <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	102	Trukhachev A.L., Meloyan M.G., Voskresenskaya E.A., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Podladchikova O.N., Pisanov R.V., Chesnokova M.V., Rykova V.A., Kuznetsova D.A., Klimov V.T., Kokorina G.I., Bogumil'chik E.A. INDEL-Typing of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Strains	
Ярыгина М.Б., Витязева С.А., Корзун В.М., Тунгалаг Х., Цэрэнноров Д., Балахонов С.В. Пространственная MLVA25-генотипическая структура <i>Yersinia pestis</i> ssp. <i>pestis</i> в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы	110	Yarygina M.B., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Tungalag H., Tserennorov D., Balakhonov S.V. <i>Yersinia pestis</i> ssp. <i>pestis</i> Spatial MLVA25 Genotypic Structure in the Transboundary Saylyugem Natural Plague Focus	

О Международном симпозиуме “Yersinia 14”

26–28 сентября 2022 г. в г. Санкт-Петербурге прошел Международный симпозиум “Yersinia 14”, который стал продолжением традиционных симпозиумов по иерсиниям, проводимых на протяжении уже более пятидесяти лет. Этот авторитетный научный форум состоялся в знаменательный год – 100-летия образования государственной санитарно-эпидемиологической службы России и 125-летия образования системы противочумных учреждений России. Организаторами симпозиума выступили Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». В работе симпозиума “Yersinia 14” приняли участие ведущие ученые мира из 25 стран. Состоялись пленарные и секционные заседания по ключевым фундаментальным и прикладным направлениям исследования иерсиний. Аудитория “Yersinia 14” существенно расширилась за счет онлайн-участников. Симпозиум позволил организовать разностороннее обсуждение актуальных проблем чумы и других иерсиниозов учеными разных стран, укрепить и расширить профессиональные связи между ними.

Одно из наиболее важных научно-практических направлений, представленных на Международном симпозиуме “Yersinia 14”, – современное состояние проблемы чумы в мире и международное сотрудничество по недопущению ее распространения. Ведущими учеными, руководителями противочумных учреждений разных стран были сделаны доклады по современному состоянию природных очагов чумы мира, таких как очаги Монголии, Китайской Народной Республики (КНР), Республики Мадагаскар, Российской Федерации, Республики Казахстан, Кыргызской Республики. Другая важная тема – эпидемиологический надзор и контроль за чумой, которым были посвящены доклады представителей из Исламской Республики Иран, Федеративной Республики Бразилии, Республики Замбии, КНР, Российской Федерации. Обе темы получили дальнейшее развитие в докладах по международному взаимодействию и борьбе с инфекционными болезнями, с которыми выступили ученые и руководители учреждений Российской Федерации, Социалистической Республики Вьетнам, Кыргызской Республики, Республики Казахстан, Республики Беларусь.

Большое внимание было уделено современным технологиям реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера, представленным в выступлениях специалистов из Российской Федерации, республик Казахстан, Беларусь, Армения, Таджикистан.

Ряд пленарных и секционных заседаний на симпозиуме были посвящены фундаментальным направлениям, таким как микробиология чумы и псевдотуберкулеза, многоуровневые системы изучения и молекулярной идентификации штаммов возбудителя чумы, геномное разнообразие *Yersinia pestis* из различных регионов мира. Обсуждены такие ключевые вопросы, как современные технологии выявления и изучения возбудителей инфекционных болезней, использование системного мультиомиксного анализа для выяснения новых механизмов регуляции вирулентности. Также представлены новые данные исследований проблем экологии возбудителя чумы, геномики и эволюции *Yersinia*, реконструкции пространственно-временных закономерностей циркуляции *Y. pestis* на основе филогенетического анализа. Большое внимание уделено совершенствованию лабораторной диагностики и таксономии патогенных иерсиний, разработке современных технологий диагностики особо опасных и природно-очаговых инфекций.

Традиционно большой интерес вызвали доклады по достижениям в области создания чумных вакцин и изучения механизмов взаимодействия возбудителя чумы с макроорганизмом. Участники симпозиума смогли ознакомиться с 80-летним опытом успешного применения живой чумной вакцины *Yersinia pestis* EV НИИЭГ.

На полях симпозиума состоялись два круглых стола, на которых проведены дискуссии по актуальным вопросам мониторинга чумы, экологии возбудителя; заслушаны сообщения по опыту разных стран в эпидемиологическом надзоре и контроле за природно-очаговыми инфекциями, о деятельности национальных институтов здравоохранения по обеспечению эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями.

В данном выпуске журнала «Проблемы особо опасных инфекций» опубликованы материалы по проблемам иерсиниозов, представленные на симпозиуме “Yersinia 14”. Публикации будут продолжены и в последующих выпусках журнала в 2023 г.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-7-13

УДК 616.98:579.842.23+616.98(575.2)

С.К. Бердиев¹, А.К. Джапарова¹, Г.А. Ерошенко², А.А. Кузнецов², В.В. Кутырев²

Международная интеграция и сотрудничество на современном этапе в борьбе с чумой и другими опасными инфекциями в Кыргызской Республике

¹Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика; ²ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Приведены данные по международному сотрудничеству Республиканского центра карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики и Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора по борьбе с чумой и другими опасными инфекциями за период с 2016 по 2022 год. Направления сотрудничества включают: проведение совместного эпизоотологического мониторинга очагов чумы Кыргызской Республики (КР); обмен актуальной информацией по состоянию природных очагов двух стран; оснащение противочумной службы республики современным оборудованием и мобильными лабораториями, диагностическими средствами и технологиями; проведение совместных учений по обеспечению биологической безопасности и оперативному реагированию на чрезвычайные ситуации; оказание консультативно-методической помощи; обучение и усовершенствование профессиональных кадров; проведение совместных научных исследований, конференций; опубликование статей. Обобщены данные по комплексной характеристике свойств и филогеографическому анализу штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в полевых исследованиях в КР в 2012–2020 гг. Намечены перспективы проведения совместных картографических, молекулярно-генетических и палеомикробиологических работ в природных очагах КР.

Ключевые слова: чума, природные очаги, эпизоотологическое обследование, штаммы *Y. pestis*, международное сотрудничество.

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

Для цитирования: Бердиев С.К., Джапарова А.К., Ерошенко Г.А., Кузнецов А.А., Кутырев В.В. Международная интеграция и сотрудничество на современном этапе в борьбе с чумой и другими опасными инфекциями в Кыргызской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:7–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-7-13

Поступила 19.12.2022. Принята к публ. 23.12.2022.

S.K. Berdiev¹, A.K. Dzhaparova¹, G.A. Eroshenko², A.A. Kuznetsov², V.V. Kuttyrev²

International Integration and Cooperation at the Present Stage in the Fight Against Plague and Other Dangerous Infections in the Kyrgyz Republic

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

²Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. The paper contains the data on international cooperation of the Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic and the Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rospotrebnadzor to combat plague and other dangerous infections over the period from 2016 to 2022. Areas of cooperation include conducting joint epidemiological monitoring of plague foci in the Kyrgyz Republic; exchange of up-to-date information on the state of natural foci of the two countries; equipping the anti-plague service of the Republic with modern equipment and mobile laboratories, diagnostic tools and technologies; conducting joint exercises to ensure biological safety and prompt response to emergencies; provision of advisory and methodological assistance; training and strengthening of professional personnel; conducting joint scientific researches, conferences; publication of scientific works. Data on the complex characterization of properties and phylogeographic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated during field studies in the Kyrgyz Republic in 2012–2020 are summarized. The prospects for carrying out joint cartographic, molecular-genetic and paleomicrobiological work in the natural foci of the Kyrgyz Republic are outlined.

Key words: plague, natural foci, epizootiological survey, *Y. pestis* strains, international cooperation.

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

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

Citation: Berdiev S.K., Dzhaparova A.K., Eroshenko G.A., Kuznetsov A.A., Kuttyrev V.V. International Integration and Cooperation at the Present Stage in the Fight Against Plague and Other Dangerous Infections in the Kyrgyz Republic. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:7–13. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-7-13

Received 19.12.2022. Accepted 23.12.2022.

Dzhaparova A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1067-0940>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Kuznetsov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0677-4846>
Kuttyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

В рамках выполнения распоряжений Правительства Российской Федерации и соответствующих научно-исследовательских разработок, закрепленных договорами о сотрудничестве между ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) и Республиканским центром карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики (РЦКиООИ МЗ КР), осуществляется совместное эпизоотологическое обследование высокогорных природных очагов Центральной Азии. Кыргызская Республика расположена в западной и центральной части горной системы Тянь-Шань и в Памиро-Алае, на севере граничит с Республикой Казахстан, на западе – с Республикой Узбекистан, на юго-западе – с Республикой Таджикистан, на юго-востоке – с Китайской Народной Республикой. На территории республики выделено три высокогорных природных очага чумы, пространственно изолированных друг от друга: Тянь-Шаньский, Алайский и Таласский, – история изучения которых насчитывает более 80 лет [1, 2]. В настоящее время общая площадь природных очагов чумы составляет более 3,2 млн га, или 16,3 % территории республики.

В 1950–1989 гг. в результате проведенных широкомасштабных профилактических мероприятий эпизоотическая активность очагов чумы резко снизилась. Однако в начале XXI в. в очагах после длительного межэпизоотического периода вновь возобновились эпизоотии среди сурков, что связано с восстановлением численности сурочьих блох, а также благоприятными климатическими условиями. В результате активизации эпизоотий в августе 2013 г. в Сарыджазском автономном очаге (Тянь-Шаньский высокогорный природный очаг чумы), в Ак-Суйском районе Иссык-Кульской области произошел один случай заражения человека бубонной формой чумы с летальным исходом. В 2012–2020 гг. в Сарыджазском и Верхненарынском очагах сотрудниками Республиканского центра после длительного перерыва были вновь выделены штаммы возбудителя чумы *Yersinia pestis* [2, 3]. При участии сотрудников Российского противочумного института «Микроб» проведена их идентификация.

На фоне активизации природных очагов чумы регулярно проводится комплекс профилактических мероприятий, как на территории природных очагов чумы, так и в целом по республике. Особое внимание обращается на трансграничные районы и пункты пересечения государственных границ (Кокпакский мезоочаг Сарыджазского автономного очага и северная часть Таласского природного очага чумы, расположенные на территории Республики Казахстан). Усилен контроль за очагами чумы путем внедрения новых методов лабораторного исследования, ГИС-технологий и др. В этой работе большую помощь оказывает Роспотребнадзор. В част-

ности, проводится совместный эпизоотологический мониторинг природных очагов чумы Кыргызской Республики. Также осуществляется обмен актуальной информацией по современному состоянию природных очагов двух стран. Проводятся совместные учения по обеспечению биологической безопасности и оперативному реагированию на чрезвычайные ситуации. Продолжает укрепляться оснащение противочумной службы республики современным оборудованием, новыми диагностическими средствами и технологиями. По результатам выполненных совместных научных исследований проводятся конференции и рабочие совещания. Регулярно оказывается консультативно-методическая помощь, проводится обучение и совершенствование профессиональных кадров. Ведется подготовка совместных публикаций и диссертационных работ. Осуществляемая помощь служит укреплению национального потенциала в отношении оперативного выявления и реагирования на чрезвычайные ситуации, а также усилению материально-технической поддержки Министерства здравоохранения Кыргызской Республики в области внедрения Международных медико-санитарных правил (2005) (ММСП).

На основании Соглашения о сотрудничестве между Российским противочумным институтом «Микроб» Роспотребнадзора и Республиканским центром заключен Административный договор от 20 августа 2020 г. Согласно этому договору РЦКиООИ получил четыре мобильных микробиологические лаборатории экспресс-диагностики (МЛЭД), оснащенные лабораторным оборудованием, расходными материалами и средствами защиты. В 2022 г. дополнительно получен мобильный комплекс – бактериологическая лаборатория и индикационная лаборатория на базе автомобиля КамАЗ. Кроме того, РЦКиООИ ежегодно получает новое оборудование, тест-системы, диагностические препараты и расходные материалы для проведения профилактических мероприятий на территории природных очагов чумы Кыргызской Республики.

26 октября 2021 г. перезаключен Договор о сотрудничестве в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия по актуальным для Кыргызской Республики природно-очаговым инфекционным болезням (чума и другие), а также COVID-19. Целью договора является укрепление национального потенциала в области противодействия угрозам инфекционных болезней, реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера, изучения современного состояния природных очагов чумы и других особо опасных болезней Кыргызской Республики и снижения возможных эпидемиологических рисков. С 16 августа по 6 сентября 2021 г. сотрудниками Российского противочумного института «Микроб» оказана консультативно-методическая помощь в совместном лабораторном исследовании полевого материала на чуму из природных очагов чумы

Кыргызской Республики. Методом полимеразной цепной реакции проведено исследование 1757 проб, из которых 13 оказались положительными.

На основании приказа РЦКиООИ от 19.07.2022 № 29 «О проведении международного тренировочного учения» совместно со специалистами Российского противочумного института «Микроб» 26–28 июля 2022 г. проведено международное тренировочное учение по вопросам биологической безопасности и оперативного реагирования с использованием ресурсов мобильных лабораторий и при участии специалистов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, специалистов РЦКиООИ МЗ КР, Департамента профилактики заболеваний и государственного санитарно-эпидемиологического надзора МЗ КР (ДПЗиГСЭН), Каракольского, Ошского и Ат-Башинского противочумных отделений, Департамента по обращению с хвостохранилищами при Министерстве чрезвычайных ситуаций КР, Центра ветеринарной диагностики и санитарной экспертизы при Министерстве сельского хозяйства КР.

Совместно со специалистами Российского противочумного института «Микроб» ежегодно проводится рекогносцировочное обследование энзоотичных по чуме территорий для предстоящего сезона работ, осуществляется ретроспективный анализ результатов выявления прошлых эпизоотий чумы. В 2017–2022 гг. в соответствии с текущими планами эпизоотологического мониторинга РЦКиООИ и результатами совместных рекогносцировочных обследований осуществлялось выставление полевых эпидотрядов и зоологических групп с участием специалистов Российского противочумного института «Микроб».

Так, в 2017 г. проведено обследование Манасского мезоочага в западной части Таласского высокогорного природного очага чумы. Основной упор был сделан на исследование мелких мышевидных грызунов, участвовавших в эпизоотическом процессе в прошлые годы. В 2018 г. совместную работу вели в Аксайском автономном очаге (участок «Кулжа-Баши») и Верхненарынском автономном очаге (участок «Тарагай – Карасай»). Основными объектами исследования служили серые сурки – основные носители возбудителя чумы. В 2019 г. проведено эпизоотологическое обследование двух участков Сарыджазского автономного очага (участки «Койлю» и «Энильчек») с двумя местами базирования и одного участка Верхненарынского автономного очага (зоогруппа «Иштык – Бешмойнок»). В 2020 г. совместное обследование организовать не удалось в связи с ограничениями по COVID-19. В 2021 г. совместное эпизоотологическое обследование проведено в нескольких высокогорных очагах Кыргызской Республики. Наиболее тесное взаимодействие проходило в месте базирования зоолого-паразитологической группы на территории Алайского высокогорного очага чумы (Гульчинский мезоочаг). Здесь помимо полевой работы проведены семинары по отработке навыков

использования приемников спутниковых сигналов в целях получения и фиксации данных геолокации в местах сбора полевого материала. Кроме того, проведены аналогичные консультации на территории Таласского природного очага чумы, Аксайского и Верхненарынского автономных очагов. В июне – июле 2022 г. совместные полевые работы проведены на территории Верхненарынского автономного очага чумы на участке «Бурхан», в процессе которых продолжены консультации по использованию приемов геолокации. В августе 2022 г. совместное эпизоотологическое обследование проведено в Таласском природном очаге чумы в мезоочаге «Сулубакаир» с отработкой приемов лабораторного исследования полевого материала.

Параллельно проведению совместного эпизоотологического обследования специалисты Российского противочумного института «Микроб» изготавливали макеты подробных рабочих карт различных участков природных очагов чумы в километровом масштабе, адаптированных для планирования, проведения и анализа результатов эпизоотологического обследования. К настоящему времени изготовлено 8 карт, суммарно охватывающих более 300 секторов. Планируется дальнейшее изготовление таких карт на остальную энзоотичную территорию республики.

С 8 по 12 августа 2016 г. проведено семинарское занятие при техническом содействии Роспотребнадзора по теме «Актуальные вопросы организации санитарной охраны территории Таможенного союза». В 2016 г. в рамках Распоряжения Правительства РФ, в целях реализации положений ММСР на базе Российского противочумного института «Микроб» в г. Саратове организованы курсы повышения квалификации «ПЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов», на которых прошли обучение специалисты из Кыргызской Республики.

Специалисты Республиканского центра приняли участие в работе XIII Межгосударственной научно-практической конференции государств – участников СНГ, в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСР с докладом «О проводимых противоэпидемических мероприятиях по чуме в Кыргызстане» в Российском противочумном институте «Микроб» в Саратове в 2019 г. В сентябре 2022 г. сотрудники РЦКиООИ приняли участие и выступили с докладами на Международном симпозиуме “Yersinia 14” и XVI Межгосударственной научно-практической конференции по вопросам санитарной охраны территории и снижению риска распространения чумы, которые прошли в г. Санкт-Петербурге (26–28 сентября 2022 г.).

С 19 октября по 26 ноября 2021 г. на базе Российского противочумного института «Микроб» обучены 1 врач-эпидемиолог и 2 врача-бактериолога по программе «Бактериология. Основы безопасной работы с возбудителями особо опасных инфек-

ций». С 25 октября по 17 декабря 2021 г. на базе Ставропольского противочумного института прошли обучение 3 специалиста (зоологи) по программе «Особо опасные зоонозные инфекции». С 25 июля по 8 августа 2022 г. на базе Ставропольского противочумного института прошли курсы повышения квалификации 4 специалиста (зоологи) по программе «Зоологические методы работы в природных очагах инфекционных заболеваний, общих для человека и животных». Проводится онлайн-обучение лабораторных специалистов РЦКиООИ, ответственных за работу специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) при чрезвычайных ситуациях. С 15 по 19 августа 2022 г. проведено обучение на базе Российского института «Микроб» в онлайн-формате.

Ежегодно обследуются выделенные из полевых материалов культуры возбудителей опасных инфекционных болезней с помощью молекулярно-генетических методов и полногеномного секвенирования, проводимого на базе института «Микроб».

Совместные исследования штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы Кыргызской Республики.

На Тянь-Шане возбудитель чумы впервые выделен в 1914 г. В населенных пунктах Центрального Тянь-Шаня вспышки чумы неоднократно возникали в XX в. Первая большая вспышка с высокой летальностью зарегистрирована в Киргизии в 1907 г., затем в 1910 и 1916 гг. Последняя большая вспышка легочной чумы, вызвавшая гибель 54 человек, произошла в 1928 г. в деревне Баш-Кайынды в Ат-Башинском районе Нарынской области. Спорадические случаи чумы у людей происходили в 1914, 1942, 1947, 1952, 1957, 1958, 1962 и 1981 гг. [1, 3]. Основным носителем чумы в Тянь-Шаньском высокогорном очаге – серый сурок *Marmota baibacina*, основные переносчики – блохи *Oropsylla silantiewi*, *Rhadinopsylla li ventricosa*, *Citellophilus lebedewi* [1, 4].

Проведенное ретроспективное изучение 66 штаммов *Y. pestis* из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) на базе Российского противочумного института «Микроб», выделенных в Тянь-Шаньском и Алайском высокогорных очагах Кыргызской Республики с 1928 по 1983 год, показало, что два штамма относились к средневековому биовару основного подвида, остальные принадлежали к античному биовару. Методом фрагментного и полногеномного секвенирования установлено, что штаммы средневекового биовара относятся к филогенетической ветви 2.MED1, а штаммы античного биовара – к линии 0.ANT. Для 17 штаммов 0.ANT проведено полногеномное секвенирование. У остальных штаммов филогенетическая принадлежность определена по наличию маркерных SNP, специфических для ветвей 0.ANT1–0.ANT5 [5, 6]. Установлено, что циркулирующие в Тянь-Шаньском и Алайском высокогорных очагах штаммы 0.ANT делятся на две ветви: 0.ANT3 и 0.ANT5. Штаммы 0.ANT3 распространены в Алайском и встречаются в Аксайском высокогорных

очагах. Штаммы линии 0.ANT5 выявлены впервые. В других очагах мира они отсутствуют. По данным проведенного филогенетического анализа штаммы 0.ANT5 оказались наиболее близкими штаммам 0.ANT4, вызвавшим эпидемию «Юстинианова чума», с которой началась первая пандемия чумы [7–9].

Из 11 штаммов *Y. pestis*, выделенных в Таласском высокогорном очаге в 1980 г., 10 принадлежали к неосновному подвиду и 1 – к средневековому биовару основного подвида филогенетической ветви 2.MED1.

Также проведен комплексный анализ свойств и полногеномное секвенирование 23 штаммов, выделенных в Сарыджазском и Верхненаарынском высокогорных очагах в 2012–2016 и 2019–2020 гг. [10–12]. Культуры из Сарыджазского и Верхненаарынского высокогорных очагов, выделенные сотрудниками РЦКиООИ в 2012–2016 гг. (12 штаммов), депонированы в ГКПБ на базе Российского противочумного института «Микроб». Их фенотипическая и молекулярно-генетическая идентификация проведена в совместных исследованиях сотрудниками обоих учреждений. На основе данных секвенирования выполнен филогеографический анализ штаммов *Y. pestis* античного биовара ветви 0.ANT, выделенных в 2012–2016 гг. в очагах Тянь-Шаня и Памиро-Алая. Установлено, что все штаммы, включая клинический штамм, вызвавший гибель человека в 2013 г., относятся к линии 0.ANT5 античного биовара. Результаты проведенного ретроспективного исследования и полногеномного секвенирования еще одного штамма из фонда ГКПБ, выделенного в Верхненаарынском очаге в октябре 1928 г. от умершего от легочной чумы человека, свидетельствуют в пользу того, что вспышка легочной чумы в урочище Баш-Кайынды в Ат-Башинском районе Нарынской области в октябре 1928 г. (погибли 54 человека) была вызвана штаммами 0.ANT3 античного биовара. Поступившие из РЦКиООИ штаммы *Y. pestis*, выделенные в 2012–2016 гг., экспрессировали признаки, ассоциируемые с вирулентностью: образовывали пигментированные колонии на средах с гемином или красителем Конго красным, LD₅₀ этих штаммов на модели морских свинок составила 11,9–16,9 КОЕ.

Также проведены исследования 11 штаммов *Y. pestis*, полученных при совместном эпизоотологическом мониторинге в Сарыджазском и Верхненаарынском высокогорных очагах Тянь-Шаня в 2019–2020 гг. и депонированных в ГКПБ. По комплексу биохимических характеристик эти штаммы относятся к античному биовару основного подвида. Они ферментируют трехатомный спирт глицерин и моносахарид арабинозу, не разлагают дезоксисахарид рамнозу, способны к реакциям нитрификации и денитрификации [13]. Установлена зависимость роста этих штаммов от наличия в питательной среде аминокислот фенилаланина, метионина, треонина, цистеина и лейцина, что совпадало с питательными потребностями штаммов 2012–2016 гг.

При анализе вирулентности штаммов 2019–2020 гг. методами *in vitro* по наличию признаков зависимости роста от ионов кальция при 37 °С и способности к сорбции красителя Конго красного установлено, что они обладают двумя основными детерминантами факторов патогенности чумного микроба: содержат хромосомную область пигментации с островом высокой патогенности НР1 и плазмиду кальций-зависимости *pCad*, кодирующую систему секреции третьего типа с *Yop*-вирулоном. Определение вирулентности *in vivo* на модели морских свинок показало, что штаммы являются высоковирулентными: их LD_{50} составляет 5–10 КОЕ. При анализе плазмидного состава установлено, что кроме плазмиды *pCad* все штаммы содержат и две видоспецифические плазмиды чумного микроба – *pFra* и *pPst*, экспрессия генов которых важна для трансмиссии возбудителя с помощью артропод и развития инфекционного процесса в млекопитающих. Дополнительные плазмиды в геноме штаммов *Y. pestis* из очагов Тянь-Шаня не выявлены.

Методами молекулярно-генетического анализа и полногеномного секвенирования установлена принадлежность всех штаммов *Y. pestis*, выделенных в Сарыджазском и Верхненаарынском высокогорных очагах в 2019–2020 гг., к филогенетической ветви 0.ANT5 античного биовара основного подвида. По данным полногеномного секвенирования выявлено наличие двух клонов 0.ANT5, один из которых включает часть штаммов 2020 г. из бассейна р. Коойлу в Сарыджазском очаге. Второй мощный клон состоит из штаммов 2012–2020 гг., выделенных в Сарыджазском и Верхненаарынском очагах. Наличие двух клонов штаммов линии 0.ANT5 подтверждено методами мультилокусного VNTR-анализа с использованием локусов *ms01*, *ms04*, *ms06*, *ms46*, *ms62*, *ms70*. Отличия между клонами выявлены по локусам *ms06* и *ms62*.

В целом генетическая однородность современных штаммов ветви 0.ANT5 и их широкое распространение по территории Сарыджазского и Верхненаарынского очагов в комплексе с данными эпизоотологического мониторинга свидетельствуют о расширении ареала этой популяции античного биовара и активизации очагов Тянь-Шаня, вызванных потеплением климата. Впервые секвенированы геномы штаммов *Y. pestis* ветви 0.ANT5, выделенных в XX и XXI вв., включая клинический штамм 2013 г. Получены полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis* ветви 0.ANT3 и штамма этой ветви, вызвавшего вспышку легочной чумы в Верхненаарынском очаге в 1928 г. Установлено, что штаммы ветви 0.ANT3 распространены в Аксайском и Алайском очагах и на граничащей с ними территории провинции Синьцзян в Китае. Они встречаются также в Верхненаарынском очаге. По-видимому, эти территории составляют трансграничную территорию, на которой циркулирует популяция 0.ANT3.

Перспективы микробиологических и палеомикробиологических исследований в природных очагах чумы Кыргызской Республики. Перспективы дальнейших исследований природных очагов чумы Кыргызской Республики связаны с проведением их молекулярно-генетической паспортизации, определением современных ареалов штаммов различных филогенетических линий и ветвей *Y. pestis*, а также с выполнением палеогеномных исследований древних геномов *Y. pestis* с территории республики. Выявление в совместных исследованиях циркуляции штаммов древней филогенетической ветви 0.ANT5, близкой ветви 0.ANT4, вызвавшей эпидемию «Юстинианова чума», послужило основанием для предположения о том, что ближайший предшественник первой пандемии чумы происходит из очагов Тянь-Шаня. Это получило подтверждение в ряде зарубежных работ по реконструкции древних геномов из различных точек Евразии. Так, геном *Y. pestis* из останков кочевника из гор Тянь-Шаня, датируемый 180 г. н.э., филогенетически предшествует реконструированному геному «Юстиниановой чумы» [14].

Проведенные позже исследования археологических образцов из захоронений Кара-Жигач и Бурана в Чуйской долине в окрестностях озера Иссык-Куль в Кыргызской Республике, датируемых 1338–1339 гг., показали, что это эпидемическое событие было вызвано бактерией *Y. pestis* [15]. Два реконструированных исторических генома принадлежали одному штамму, который идентифицирован как MRCA (most recent common ancestor – самый последний общий предок) крупной диверсификации, обычно связываемой с возникновением пандемии. Появление этих штаммов датируется первой половиной XIV в. и служит доказательством того, что источником второй пандемии чумы в начале этого века была Центральная Евразия. Проведенные палеогеномные исследования указывают на то, что очаги Тянь-Шаня являются центром формирования пандемических клонов *Y. pestis*, в котором могут появиться и новые высоковирулентные популяции возбудителя чумы. Реконструкция палеогеномов из различных регионов Кыргызстана важна для установления молекулярных механизмов эволюции возбудителя чумы как высокопатогенной бактерии с трансмиссивным механизмом передачи инфекции.

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

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутыров В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 191 с.
2. Абдикаримов С.Т., Ибрагимов Э.Ш., Эгембергенов Ч.Э. Современное эпизоотическое состояние природных очагов чумы Кыргызской Республики и мероприятия, направленные на обеспечение эпизоотологического благополучия по чуме. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-45-48.

3. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: ООО «Амирит»; 2016. 248 с.
4. Sariyeva G., Bazarkanova G., Maimulov R., Abdikarimov S., Kurmanov B., Abdirasilova A., Shabunin A., Sagiyeve Z., Dzharparova A., Abdel Z., Mussagaliyeva R., Morand S., Motin V., Kosoy M. Marmots and *Yersinia pestis* strains in two plague endemic areas of Tien Shan Mountains. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6:207. DOI: 10.3389/fvets.2019.00207.
5. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One.* 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.
6. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova J.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.
7. Harbeck M., Seifert L., Hänsch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zöller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.C. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6(th) century AD reveals insights into Justinianic plague. *PLoS Pathog.* 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.
8. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Wagglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(4):319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
9. Feldman M., Harbeck M., Keller M., Spyrou M.A., Rot A., Trautmann B., Scholz H.C., Pfüffen B., Peters J., McCormick M., Bos K., Herbig A., Krause J. A high-coverage *Yersinia pestis* genome from a sixth-century Justinianic plague victim. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(11):2911–23. DOI: 10.1093/molbev/msw170.
10. Ерошенко Г.А., Джапарова А.К., Оглодин Е.Г., Альхова Ж.В., Куклева Л.М., Кузнецов А.А., Краснов Я.М., Абдикаримов С.Т., Кутырев В.В. Филогеография штаммов *Yersinia pestis* ветви 0.ANT, выделенных в Тянь-Шане и Памиро-Алае в XX–XXI веках. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 1:76–84. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-76-84.
11. Куклева Л.М., Джапарова А.К., Оглодин Е.Г., Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Кузнецов А.А., Фадеева А.В., Ерошенко Г.А., Бердиев С.К., Кутырев В.В. Комплексная характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Сарыджазском и Верхненарынском высокогорных очагах в 2019–2020 гг. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 2:114–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122.
12. Dzharparova A.K., Eroshenko G.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Berdiev S.K., Kutyrev V.V. Characteristics and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated in the Tien Shan high-mountain plague foci in the XXI century. In: Proceedings of the International Symposium “Yersinia 14” (September 26–28, 2022, Saint-Petersburg, Russian Federation). Saratov: Amirit; 2022. P. 30.
13. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
14. Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., Pedersen M.W., Goldberg A., Usmanova E., Baimukhanov N., Loman V., Hedeager L., Pedersen A.G., Nielsen K., Afanasiev G., Akmatov K., Aldashev A., Alpaslan A., Baimbetov G., Bazaliiskii V.I., Beisenov A., Boldbaatar B., Boldgiv B., Dorzhu C., Ellingvag S., Erdenebaatar D., Dajani R., Dmitriev E., Evdokimov V., Frei K.M., Gromov A., Goryachev A., Hakonarson H., Hegay T., Khachatryan Z., Khaskhanov R., Kitov E., Kolbina A., Kubatbek T., Kukushkin I., Kukushkin I., Lau N., Margaryan A., Merkyte I., Mertz I.V., Mertz V.K., Mijiddorj E., Moiyesev V., Mukhtarova G., Nurmukhanbetov B., Orobekova Z., Panyushkina I., Pieta K., Smrčka V., Shevnina I., Logvin A., Sjögren K.G., Štolcová T., Taravella A.M., Tashbaeva K., Tkachev A., Tulgenov T., Voyakin D., Yepiskoposyan L., Undrakhbold S., Varfolomeev V., Weber A., Wilson Sayres M.A., Kradin N., Allentoft M.E., Orlando L., Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature.* 2018; 557(7705):369–74. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.
15. Spyrou M.A., Musralina L., Gnechhi Ruscone G/A., Kocher A., Borbone P.G., Khartanovic V.I., Buzhilova A., Djansugurova L., Bos K.L., Kühnert D., Haak W., Slavin P., Krause J. The source of the Black Death in fourteenth-century central Eurasia. *Nature.* 2022; 606(7915):718–24. DOI: 10.1038/s41586-022-04800-3.

References

1. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: Medicine; 2004. 191 p.
2. Abdikarimov S.T., Ibragimov E.S., Egembergenov C.E. [Current epizootic condition of natural plague foci in Kyrgyz Republic and measures aimed at provision of epidemiological welfare as regards plague]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (2):45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-45-48.
3. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague on the Territory of the Russian Federation and Former Soviet Union (1876–2016)]. Saratov: “Amirit” LLC; 2016. 248 p.
4. Sariyeva G., Bazarkanova G., Maimulov R., Abdikarimov S., Kurmanov B., Abdirasilova A., Shabunin A., Sagiyeve Z., Dzharparova A., Abdel Z., Mussagaliyeva R., Morand S., Motin V., Kosoy M. Marmots and *Yersinia pestis* strains in two plague endemic areas of Tien Shan Mountains. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6:207. DOI: 10.3389/fvets.2019.00207.
5. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One.* 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.
6. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova J.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.
7. Harbeck M., Seifert L., Hänsch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zöller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.C. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6(th) century AD reveals insights into Justinianic plague. *PLoS Pathog.* 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.
8. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Wagglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(4):319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
9. Feldman M., Harbeck M., Keller M., Spyrou M.A., Rot A., Trautmann B., Scholz H.C., Pfüffen B., Peters J., McCormick M., Bos K., Herbig A., Krause J. A high-coverage *Yersinia pestis* genome from a sixth-century Justinianic plague victim. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(11):2911–23. DOI: 10.1093/molbev/msw170.
10. Eroshenko G.A., Dzharparova A.K., Oglodin E.G., Al'khova Z.V., Kukleva L.M., Kuznetsov A.A., Krasnov Y.M., Abdikarimov S.T., Kutyrev V.V. [Phylogeny of *Yersinia pestis* strains belonging to 0.ANT branch, isolated in Tien-Shan and Pamir-Alay in XX–XXI centuries]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):76–84. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-76-84.
11. Kukleva L.M., Dzharparova A.K., Oglodin E.G., Naryshkina E.A., Krasnov Y.M., Kuznetsov A.A., Fadeeva A.V., Eroshenko G.A., Berdiev S.K., Kutyrev V.V. [Complex characteristics of *Yersinia pestis* strains isolated in the Sarydzhas and Upper-Naryn high-mountain foci in 2019–2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (2):114–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122.
12. Dzharparova A.K., Eroshenko G.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Berdiev S.K., Kutyrev V.V. Characteristics and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated in the Tien Shan high-mountain plague foci in the XXI century. In: Proceedings of the International Symposium “Yersinia 14” (September 26–28, 2022, Saint-Petersburg, Russian Federation). Saratov: Amirit; 2022. P. 30.
13. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: CJSC “Shiko”; 2013. 560 p.
14. Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., Pedersen M.W., Goldberg A., Usmanova E., Baimukhanov N., Loman V., Hedeager L., Pedersen A.G., Nielsen K., Afanasiev G., Akmatov K., Aldashev A., Alpaslan A., Baimbetov G., Bazaliiskii V.I., Beisenov A., Boldbaatar B., Boldgiv B., Dorzhu C., Ellingvag S., Erdenebaatar D., Dajani R., Dmitriev E., Evdokimov V., Frei K.M., Gromov A., Goryachev A., Hakonarson H., Hegay T., Khachatryan Z., Khaskhanov R., Kitov E., Kolbina A., Kubatbek T., Kukushkin I., Kukushkin I., Lau N., Margaryan A., Merkyte I., Mertz I.V., Mertz V.K., Mijiddorj E., Moiyesev V., Mukhtarova G., Nurmukhanbetov B., Orobekova Z., Panyushkina I., Pieta K., Smrčka V., Shevnina I., Logvin A., Sjögren K.G., Štolcová T., Taravella A.M., Tashbaeva K., Tkachev A., Tulgenov T., Voyakin D., Yepiskoposyan L., Undrakhbold S., Varfolomeev V., Weber A., Wilson Sayres M.A., Kradin N., Allentoft M.E., Orlando L., Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature.* 2018; 557(7705):369–74. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.
15. Spyrou M.A., Musralina L., Gnechhi Ruscone G/A., Kocher A., Borbone P.G., Khartanovic V.I., Buzhilova A., Djansugurova L., Bos K.L., Kühnert D., Haak W., Slavin P., Krause J. The source of the Black Death in fourteenth-century central Eurasia. *Nature.* 2022; 606(7915):718–24. DOI: 10.1038/s41586-022-04800-3.

Sjögren K.G., Štolcová T., Taravella A.M., Tashbaeva K., Tkachev A., Tulegenov T., Voyakin D., Yepiskoposyan L., Undrakhbold S., Varfolomeev V., Weber A., Wilson Sayres M.A., Kradin N., Allentoft M.E., Orlando L., Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature*. 2018; 557(7705):369–74. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.

15. Spyrou M.A., Musralina L., Gneccchi Ruscone G/A., Kocher A., Borbone P.G., Khartanovic V.I., Buzhilova A., Djansugurova L., Bos K.L., Kühnert D., Haak W., Slavin P., Krause J. The source of the Black Death in fourteenth-century central Eurasia. *Nature*. 2022; 606(7915):718–24. DOI: 10.1038/s41586-022-04800-3.

Authors:

Berdiev S.K., Dzhaparova A.K. Republican Center of Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 92, Scryabin St., Bishkek, 720005, Kyrgyz Republic. E-mail: rckooi@mail.ru.

Eroshenko G.A., Kuznetsov A.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Бердиев С.К., Джапарова А.К. Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. Кыргызская Республика, 720005, Бишкек, ул. Скрябина, 92. E-mail: rckooi@mail.ru.

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

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22

УДК 616.98:579.842.23

Г.А. Ерошенко, Л.М. Куклева, В.В. Кутырев

Исторические и современные классификации возбудителя чумы

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

В обзоре представлены данные по отечественным и зарубежным фенотипическим классификациям штаммов *Yersinia pestis*, разработанным в XX в.; генетическим классификациям XXI в.; а также по генеалогии древних штаммов чумного микроба, реконструированной с помощью палеогеномных технологий. С момента открытия возбудителя чумы в 1894 г. были созданы многие классификации, которые соответствовали уровню развития микробиологии на тот период времени. В основу внутривидовых классификационных схем XX в. положены три принципа: фенотипические различия между штаммами, особенности видового состава носителей и географическая принадлежность. С развитием молекулярной микробиологии в начале XXI в. разработана генетическая номенклатура ветвей эволюции возбудителя и создан ряд классификаций, построенных на анализе популяционной структуры *Y. pestis*. Через призму генетического разнообразия штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы России, стран ближнего и дальнего зарубежья разработана усовершенствованная классификация с выделением семи подвидов: *pestis*, *tibetica*, *caucasica*, *qinghaica*, *angolica*, *central asiatica*, *ulegeica*, – которая разделила подвиды по филогенетическому принципу и по эпидемической значимости. С развитием палеомикробиологии в генеалогию *Y. pestis* включены доисторические линии эволюции, которые расширили сведения по внутривидовому разнообразию чумного микроба.

Ключевые слова: чума, штаммы, классификация, фенотип, генотип, палеомикробиология.

Корреспондирующий автор: Ерошенко Галина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Исторические и современные классификации возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:14–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22

Поступила 15.12.2022. Принята к публ. 23.12.2022.

G.A. Eroshenko, L.M. Kukleva, V.V. Kutyrev

Historical and Modern Classifications of the Plague Agent

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

Abstract. The review presents the data on domestic and foreign phenotypic classifications of *Yersinia pestis* strains developed in the XX century; genetic classifications of the XXI century; as well as on the genealogy of ancient strains of the plague microbe, reconstructed using paleogenomic technologies. Since the discovery of the plague agent in 1894, many classifications were created that corresponded to the level of development of microbiology at that time. The intraspecific classification schemes of the XX century were based on three principles: phenotypic differences between strains, features of the species composition of carriers, and geographical affiliation. With the development of molecular microbiology early on in the XXI century, a genetic nomenclature of the branches of the pathogen evolution was developed and a number of classifications based on the analysis of the population structure of *Y. pestis* were created. Through the prism of the genetic diversity of *Y. pestis* strains from natural plague foci in Russia, near and far abroad countries, an improved classification with a division into seven subspecies has been developed: *pestis*, *tibetica*, *caucasica*, *qinghaica*, *angolica*, *central asiatica*, *ulegeica*, which allocates the subspecies according to the phylogenetic principle and epidemic significance. With the advancements in paleomicrobiology, prehistoric lineages of evolution have been included in the genealogy of *Y. pestis*, which expand the data on the intraspecific diversity of the plague microbe.

Key words: plague, strains, classification, phenotype, genotype, paleomicrobiology.

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

Corresponding author: Galina A. Eroshenko, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Kutyrev V.V. Historical and Modern Classifications of the Plague Agent. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 4:14–22. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22

Received 15.12.2022. Accepted 23.12.2022.

Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>

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

С момента открытия А. Иерсеном возбудителя чумы в 1894 г. неоднократно предпринимались попытки разработать объективную и удобную в использовании классификацию штаммов этого возбудителя. За основу брались различные критерии, такие как фенотипические различия, особенности видового состава носителей, географическое распространение штаммов *Yersinia pestis*.

Исторические классификации возбудителя чумы. Первые отечественные классификации были основаны на выявлении отличий в биохимических свойствах, таких как ферментация глицерина и денитрифицирующая активность [1, 2]. На основе этих же характеристик, а также с учетом исторических данных R. Devignat (1951) выделил три биовара чумного микроба: Antiqua (античный), Medievalis (сред-

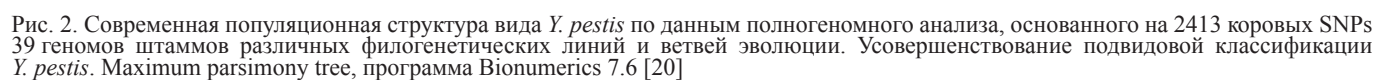
невековый) и *Orientalis* (восточный) [3]. Он предположил, что биовар *Antiqua* вызвал «Юстинианову чуму», *Medievalis* – «Черную смерть», а биовар *Orientalis* стал причиной третьей пандемии чумы. Используя дополнительные критерии классификации, связанные с экологией возбудителя, способностью ферментировать рамнозу и вирулентностью, В.М. Туманский (1957) и М.И. Леви (1962) выделили пять разновидностей возбудителя чумы: крысиная (*ratti*), сусликовая (*citelli*), сурчиная (*marmotae*), песчаночная (*gerbilli*) и полевочья (*microtii*) [4, 5]. В дальнейшем Р.С. Михайлова (1968) предложила использование категории «подвид» для возбудителя чумы и выделила два хорошо дифференцируемых подвида: *Pasterella pestis pestis* и *P. pestis semiplenus* (штаммы возбудителя, выделяемые от обыкновенных полевок на территории Закавказского нагорья) [6]. Географическое происхождение и ландшафтное своеобразие природных очагов чумы положены Л.А. Пейсахис и В.М. Степановым (1975) в основу классификации, выделявшей пять подвидов чумного микроба [7]. В качестве дополнительных тестов для дифференциации подвидов предложены также тесты наличия изоцитратлиазной активности, чувствительности к фагу M1, особенности плазмидного состава [8]. И.Л. Мартиневский (1969) использовал для классификации чумного и близкородственных ему микробов метод нумерической таксономии, с помощью которого выделил три основные таксономические категории: А. *Yersinia pestis* – типичные штаммы из Среднеазиатского горного и пустынных очагов, Китая, МНР, Индии и Африки; Б. *Y. pestoides* – атипичные штаммы из очагов Забайкалья, Горного Алтая и Малого Кавказа; В. *Y. pseudopestis* – штаммы возбудителя псевдотуберкулеза [9]. Понятие подвида у возбудителя чумы нашло дальнейшее развитие в работах Л.А. Тимофеевой (1972, 1981 – с соавт.), предложившей новую классификацию с выделением трех подвидов: *Y. pestis pestis* (две расы – континентальная и океаническая); *Y. pestis altaica* (рамнозоположительные штаммы из Горного Алтая и Монголии); *Y. pestis caucasica* (*semiplenus* Mich, рамнозоположительные штаммы с Кавказа) [10, 11].

Для стандартизации системы классификации штаммов возбудителя чумы в 1985 г. на совещании по таксономии чумного микроба в г. Саратове принята единая систематическая схема подвидовых категорий для возбудителя чумы, основанная на численном анализе 60 фенотипических признаков, вирулентности по отношению к лабораторным животным, ареале распространения. Популяции *Y. pestis*, циркулирующие на территории стран СНГ и Монголии, были разделены на пять подвидов: 1) subsp. *pestis* – основной подвид (Среднеазиатский пустынный очаг, Волго-Уральское междуречье, равнинное Закавказье, Прикаспийский степной очаг, Тянь-Шань, Алай, Забайкалье, Тува); 2) subsp. *altaica* – алтайский подвид (Алтайский горный очаг); 3) subsp. *caucasica* –

кавказский подвид (Приараксинский низкогорный, Закавказский и Восточно-Кавказский высокогорный очаги); 4) subsp. *hissarica* – гиссарский подвид (Гиссарский и Таласский хребты в Таджикистане и Киргизии); 5) subsp. *ulegeica* – улегейский подвид (Монголия) [11]. Некоторые исследователи предлагали выделить штаммы из Таласского высокогорного очага в отдельный, таласский подвид [12]. Штаммы основного подвида не ферментируют рамнозу и мелибиозу, вирулентны для лабораторных животных, обладают высокой вирулентностью для человека и высоким эпидемическим потенциалом. По фенотипическим характеристикам штаммы основного подвида соответствуют трем биоварам: *antiqua*, *medievalis* и *orientalis*. Алтайский, кавказский, гиссарский и улегейский подвиды относят к неосновным подвидам, или «пестоидам». Штаммы неосновных подвидов ферментируют рамнозу и мелибиозу, избирательно вирулентны для лабораторных животных, эпидемически малозначимы, никогда не были связаны со вспышками чумы и эпидемиями. Принятая в 1985 г. классификация подвидов является национальной и не была включена в Международную номенклатуру бактерий.

Современные классификации возбудителя чумы. В дальнейшем с развитием молекулярной микробиологии в качестве основы для классификаций *Y. pestis* стали использовать генетические характеристики, обладающие большим разрешением и надежностью. С помощью метода молекулярной гибридизации ДНК Н. Bercovier *et al.* (1980) показали, что гомология ДНК между возбудителями чумы и псевдотуберкулеза составляет более 90 %, что доказывает их принадлежность к одному виду [13]. Позже при сравнении генов рРНК установлено, что обе бактерии имеют полностью идентичные последовательности гена 16S рРНК и только одно различие оснований в высоковариабельной области гена 23S рРНК, что также доказывает их принадлежность к одному виду [14]. Предложено объединить эти бактерии в один вид с выделением двух подвидов: *Y. pseudotuberculosis* subsp. *pseudotuberculosis* и *Y. pseudotuberculosis* subsp. *pestis* соответственно [13]. Однако из-за возможных ошибок в диагностике этих двух близкородственных, но существенно отличающихся по вирулентности иерсиний, это предложение было критически воспринято медиками и большинством исследователей, занимающихся изучением возбудителя чумы. Оно было отклонено Юридической комиссией Международного комитета систематической бактериологии.

В дальнейшем, проведя сравнительное изучение генов домашнего хозяйства и рестрикционных фрагментов хромосомной ДНК *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, М. Achtman *et al.* (1999) показали, что псевдотуберкулезный микроб является эволюционным предшественником возбудителя чумы. Предположено, что дивергенция *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis* произошла около



новая подвидовая классификация вида *Y. pestis*. Она включает семь подвидов: основной subsp. *pestis* (античный, средневековый, восточный биовары и биовар *intermedium*) и шесть неосновных подвидов – subsp. *tibetica* тибетский 0.PE7 (Китай), subsp. *caucasica* кавказский 0.PE2 (Кавказ), ангольский subsp. *angolica* 0.PE3 (Африка), subsp. *central asiatica* центральноазиатский 0.PE4 с четырьмя биоварами – алтайский 0.PE4a (Россия, Монголия), гиссарский 0.PE4h (Таджикистан), таласский 0.PE4t (Киргизия), microtus 0.PE4m (Китай, Монголия), subsp. *ulegeica* улегейский 0.PE5 (Монголия), subsp. *qinghaica* цинхайский 0.PE10 (Китай) (рис. 2). Новая классификация рассмотрена и утверждена на совещании Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в 2019 г. [21]. Эта усовершенствованная классификация объективна, поскольку построена на молекулярно-генетических данных и учитывает современную глобальную популяционную структуру вида *Y. pestis*. Еще одно преимущество заключается в том, что она делит подвиды по эпидемической значимости, что имеет существенное значение для практики. Высоковирулентными и эпидемически значимыми являются штаммы основного подвида subsp. *pestis*. Штаммы этого подвида могут вызывать вспышки, эпидемии и пандемии чумы. Штаммы большинства неосновных подвидов (кавказский, ангольский, тибетский, цинхайский) имеют низкую эпидемическую значимость, поскольку могут вызы-

вать лишь единичные случаи чумы у людей. И, наконец, не описаны случаи чумы, вызванные алтайским, гиссарским, таласским и *microtus* биоварами центральноазиатского подвида. Вирулентность штаммов *Y. pestis* необходимо учитывать при проведении районирования территорий природных очагов чумы по эпидемической значимости. Целесообразным, на наш взгляд, является включение в названия природных очагов генетического обозначения циркулирующей в нем филогруппы, например: Волго-Уральский песчаный, 2.MED1; Восточно-Кавказский высокогорный, 0.PE2; Забайкальский степной очаг, 2.ANT3; Тянь-Шаньский высокогорный 0.ANT, – поскольку риски заражения чумой человека определяются не видом основного носителя в очаге, а свойствами штаммов *Y. pestis*.

Установлено, что штаммы из очагов России и сопредельных государств принадлежат к филогенетическим ветвям: 0.ANT3, 0.ANT5, 2.ANT3, 4.ANT античного биовара; 2.MED0, 2.MED1, 2.MED4 средневекового биовара; 0.PE2, 0.PE4a, 0.PE4h, 0.PE4t неосновных подвидов. Определены ареалы этих филогенетических популяций в очагах чумы РФ и сопредельных государств (рис. 3). Установлено, что в большинстве природных очагов стран СНГ широко распространена ветвь 2.MED1 средневекового биовара основного подвида. Она циркулирует в 33 из 45 очагов чумы стран СНГ и занимает 93,3 % этих очагов. Это высоковирулентные и эпидемически опасные штаммы. Также эпидеми-

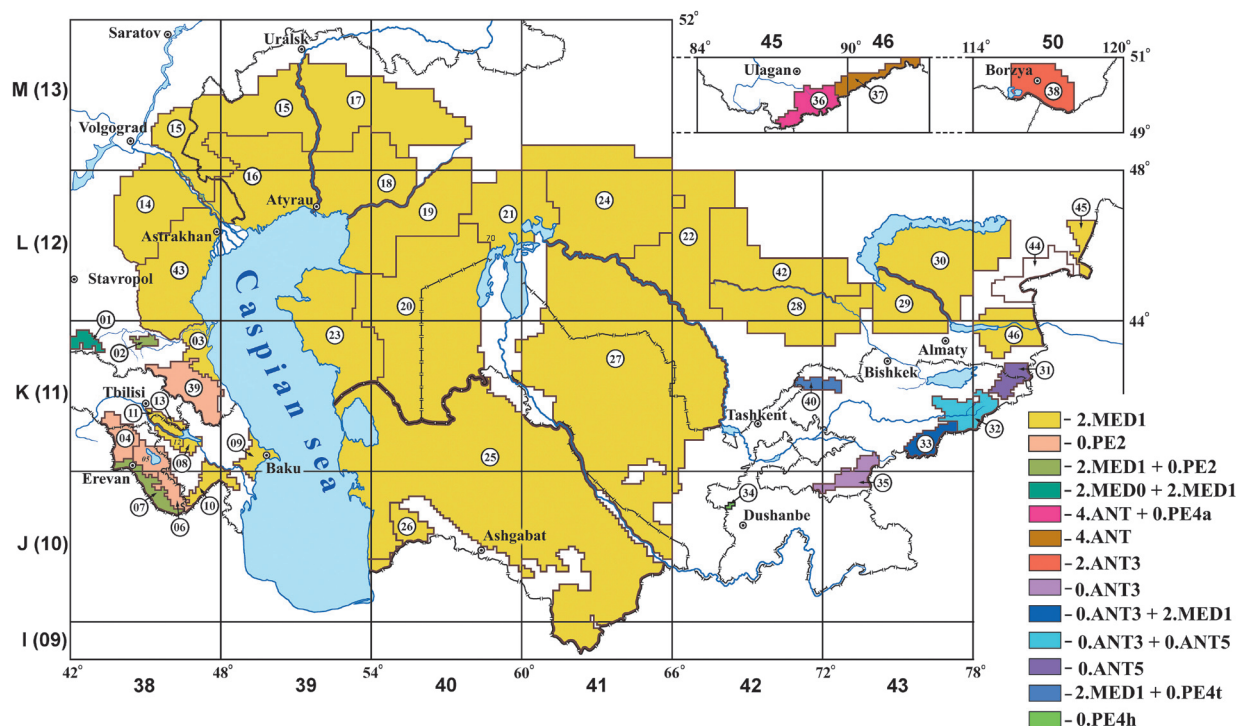


Рис. 3. Филогенетическая принадлежность штаммов *Y. pestis* из очагов чумы России, других стран СНГ и сопредельных государств. Цифры соответствуют классификации очагов, принятой в РФ и странах СНГ

Fig. 3. Phylogenetic appurtenance of *Y. pestis* strains from plague foci in Russia, other CIS countries and neighboring states. The numbers correspond to the classification of foci adopted in the Russian Federation and the CIS countries

ческую значимость имеют штаммы филогенетической линии 4.ANT (Горный Алтай и Тува) и 2.ANT3 (Забайкалье) античного биовара основного подвида. В 2014–2016 гг. штаммы 4.ANT вызвали три случая заболевания чумой человека в Горно-Алтайском высокогорном очаге.

Эпидемическое осложнение по чуме после длительного перерыва произошло в 2013 г. в Сарыджазском высокогорном очаге в составе Тянь-Шаньского высокогорного очага в Киргизской Республике, где от чумы умер подросток, заразившийся от сурка при незаконном охотпромысле. Проведенное нами исследование 65 штаммов, ранее выделенных на этой территории в период с 1945 по 1982 год, а также совместное с сотрудниками Республиканского центра карантинных и особо опасных инфекций Киргизской Республики комплексное изучение свойств 23 штаммов *Y. pestis* 2012–2020 гг. установили, что в Тянь-Шаньском высокогорном очаге распространены штаммы древней филогенетической линии 0.ANT. Это высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы [22–24]. Установлено, что в Сарыджазском и Верхненаарынском очагах преимущественно распространены штаммы ранее неизвестной филогенетической ветви, обозначенной нами как 0.ANT5. В еще одном автономном очаге Тянь-Шаня – Аксайском высокогорном – и на смежной территории Китая выявлена преимущественная циркуляция штаммов филогенетической ветви 0.ANT3. В отрогах Тянь-Шаня в Китае распространены другие древние ветви: 0.ANT1 и 0.ANT2.

Палеогеномные исследования и классификация штаммов доисторической чумы. В настоящее время с совершенствованием молекулярно-генетических и секвенационных технологий все большее развитие получает наука палеомикробиология. Методами палеомикробиологии доказано, что чума заражает людей с доисторических времен и что *Y. pestis* была этиологическим агентом всех трех разрушительных пандемий, поразивших население Европы и других континентов в современную эру [25–28]. Первая пандемия чумы началась с чумы Юстиниана (541–543 гг. н.э.), унесла миллионы человеческих жизней и продолжалась с перерывами до 750 г. Проведенная реконструкция генома *Y. pestis* периода первой пандемии чумы показала, что штамм относится к филогенетической ветви 0.ANT4, наиболее близкой к которой является выявленная нами ветвь 0.ANT5 из Тянь-Шаньского высокогорного очага [23, 29]. Это послужило основанием для предположения, что предшественник первой пандемии чумы происходит из очагов Тянь-Шаня, что получило подтверждение в ряде работ по реконструкции древних геномов из различных точек Евразии. Геном *Y. pestis* из останков кочевника из гор Тянь-Шаня, датируемый 180 г. н.э., филогенетически предшествует реконструированным геномам «Юстиниановой чумы» [30].

Вторая пандемия чумы началась с эпидемии «Черная смерть» (1348–1354 гг.) и унесла от 30 до 50 % населения Европы. Последующие вспышки продолжались до конца XVIII в. Ранее существова-

ло мнение, что вторая пандемия чумы была вызвана средневековым биоваром *Y. pestis*. Однако проведенная реконструкция геномов штаммов разных периодов второй пандемии показала, что она также была вызвана линией античного биовара, которая предшествовала 1.ANT на эволюционном дереве *Y. pestis*. Реконструкция генома штамма из захоронений XIV в. (1338–1339 гг.) в окрестностях озера Иссык-Куль в Киргизской Республике показала, что он является наиболее недавним общим предшественником (MRCA, от англ. most recent common ancestor) штаммов второй пандемии чумы, который затем был занесен по торговым путям в Европу [31].

В дальнейшем из линии 1.ANT античного биовара возникла другая линия основного подвида – 1.ORI восточного биовара, вызвавшая третью пандемию чумы. Пандемия началась в 1855 г. в провинции Юньнань и оттуда через Гонконг чума была разнесена торговыми кораблями по всему миру, вызвав серию эпидемий и вспышек, продолжавшихся вплоть до середины XX в. Динамика распространения восточного биовара 1.ORI во время третьей пандемии характеризовалась единичными случаями интродукции, за которыми следовала быстрая экспансия и расселение в местных резервуарах грызунов. Это объясняет наблюдаемое разнообразие ветвей 1.ORI восточного биовара (1.ORI1, 1.ORI2 и 1.ORI3) в различных регионах мира, каждая из которых представляет отдельную волну распространения *Y. pestis* [18].

Методами палеомикробиологии древняя ДНК чумы обнаружена у людей, живших еще в эпоху позд-

него неолита и бронзового века (5000–3700 гг. до н.э.) в различных регионах Евразии: в Скандинавии, Прибалтике, Западной, Центральной и Восточной Европе, Южной России, на Урале, в Сибири, Якутии. Частое присутствие ДНК *Y. pestis* в человеческих останках эпохи неолита позволяет предположить существование доисторических пандемий чумы [25, 27]. Секвенирование древней ДНК показало, что эти штаммы были базальными по отношению ко всем известным линиям *Y. pestis*. Представители древней LNBA (от англ. Late Neolithic and Bronze Age) ветви были рассеяны по территории всей Евразии, что свидетельствует об интенсивных и регулярных контактах между группами людей в эту доисторическую эпоху [28, 32]. Реконструкция двух древних геномов, полученных из курганных захоронений в Самарской области России и датированных поздним периодом бронзового века (~3800 гг. до н.э.), позволила идентифицировать еще одну линию, обозначенную LBA (от англ. Late Bronze Age) (рис. 4).

Гипотетическая схема эволюции древней и современной чумы, по-видимому, проистекала в следующей последовательности. Палеогеномные исследования показали, что существовали две вымершие ныне линии чумного микроба периода неолита и бронзового века: Gok2 и LNBA, – которые предшествуют линии «0» [25]. После этих двух вымерших линий от ствола эволюции *Y. pestis* отошли ветви 0.PE7 и 0.PE2 неосновных подвидов, сохранившихся до сих пор [25, 26]. После Gok2, LNBA, 0.PE2 и 0.PE7 от ствола эволюции *Y. pestis* отошло ответвление, которое дало начало

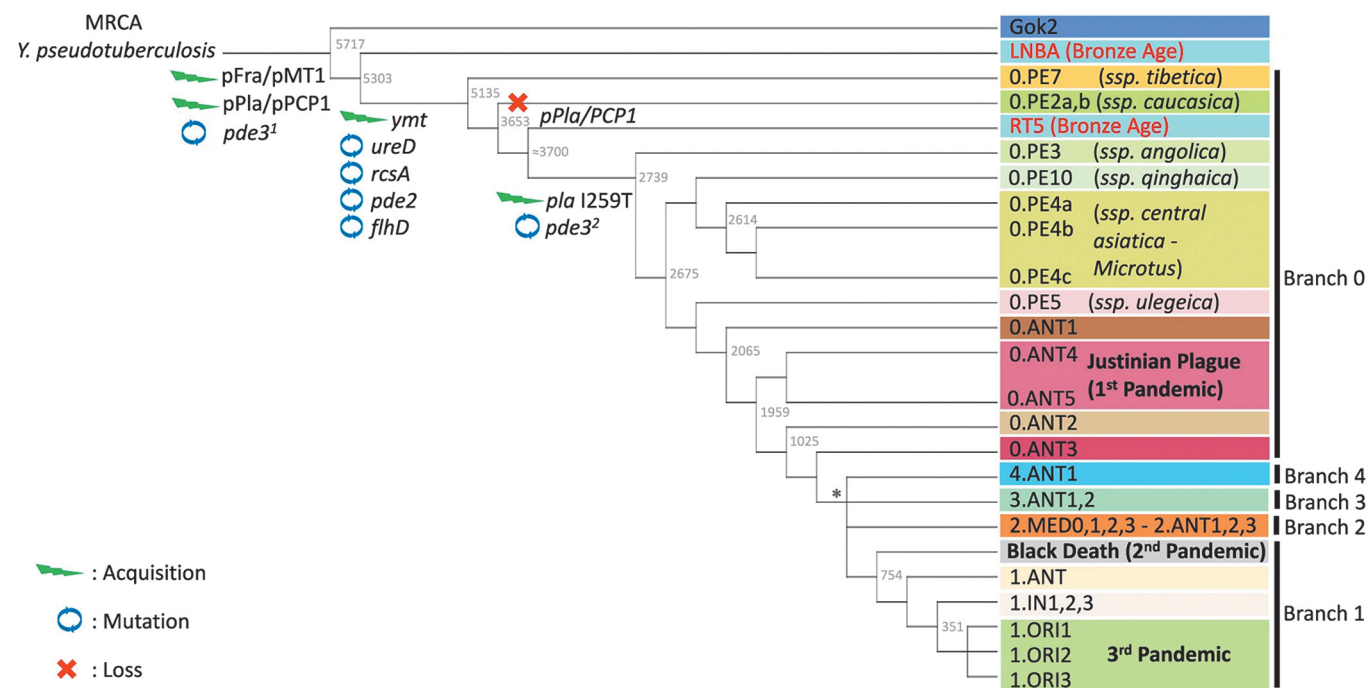


Рис. 4. Схема генеалогии *Y. pestis*. Указаны этапы приобретения (acquisition), инактивации (mutation) и потери (loss) генов в процессе эволюции *Y. pestis* из *Y. pseudotuberculosis* [32]

Fig. 4. Diagram of *Y. pestis* genealogy. The stages of acquisition, inactivation (mutation), and loss of genes during the evolution of *Y. pestis* from *Y. pseudotuberculosis* are presented [32]

вымершей линии позднего бронзового века LBA и линиям, сохранившимся до наших дней: неосновным подвидам 0.PE3, 0.PE10, 0.PE4, 0.PE5, а также различным линиям, вызвавшим все известные пандемии чумы [28]. Ствол «0» перешел в линию 0.ANT основного подвида, от которой отделились ветви 0.ANT1 и 0.ANT2 (Китай), 0.ANT3 (Киргизия, Китай) и 0.ANT5 (Киргизия, Казахстан) [15, 16, 18, 19, 22, 33, 34]. Филогенетическая линия 0.ANT явилась причиной первой пандемии – «Юстиниановой чумы». В точке политомии центрального узла N07 – Big Bang («Большой взрыв») – от филогенетической линии 0.ANT античного биовара отделились эволюционные линии 1.ANT (Центральная Африка), 2.ANT (очаги Китая и Забайкальский степной природный очаг чумы), 3.ANT (Китай, Монголия) и 4.ANT (Горный Алтай и Тува; Россия, Монголия). Эти линии античного биовара и их производные средневекового (2.MED) и восточного (1.ORI) биоваров сохранились в настоящее время и служат причиной вспышек и случаев чумы в очагах на различных континентах.

Процесс эволюции *Y. pestis* из *Y. pseudotuberculosis* сопровождался приобретением двух плазмид вирулентности pFra, pPla и гена *ymt* в составе плазмиды pFra, а также инактивированием генов: *pde3* (мутация в промоторе), *ureD*, *rcaA*, *flhD*, *pde2* [32]. Последствия этих молекулярных изменений привели к развитию трансмиссивного пути передачи *Y. pestis* с помощью блох и к способности вызывать бубонную чуму [33]. Также приобретена мутация I259T в ключевом факторе вирулентности – активаторе плазминогена (Pla), ответственном за фульминантную легочную инфекцию, специфичную для *Y. pestis*.

Совокупность полученных данных доказывает, что эволюция возбудителя чумы была сложной и связана со значительными изменениями генома: приобретением и инактивированием генов, внутригеномными перестройками. Изучение современных и исторических генетических данных необходимо для выяснения путей эволюции *Y. pestis*, а также понимания того, что ожидать от этой бактерии в дальнейшем. Также становится очевидным, что эволюция *Y. pestis* была вызвана не только взаимодействиями хозяина и патогена, но и миграциями и торговыми взаимоотношениями людей, способствовавшими распространению этой высокопатогенной бактерии по территории всей Евразии.

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

Список литературы

- Безсонова А.А. О двух разновидностях *B. pestis*, обнаруживаемых при росте на глицериновых средах. *Вестник микробиологии, эпидемиологии и паразитологии*. 1928; 7(3):325–6.
- Коновалова С.Ф. Нитрозная реакция с культурами *B. pestis* и *B. pseudotuberculosis rodentium* (Pfeiffer). *Вестник микробиологии, эпидемиологии и паразитологии*. 1930; 9(2):513–6.
- Devignat R. Varieties de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothese. *Bull. World. Health Organ.* 1951; 4(2):247–63.
- Туманский В.М. О классификации разновидностей чумного микроба. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1957; 6:3–7.
- Леви М.И. Классификация разновидностей возбудителя чумы. В кн.: Тезисы докладов Научной конференции по природной очаговости и профилактике чумы и туляремии. 30 октября – 2 ноября 1962 г. Ростов н/Д; 1962. С. 72–74.
- Михайлова Р.С. Характеристика свойств и классификация штаммов чумного микроба, выделенных на Кавказе: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ставрополь; 1968. 22 с.
- Пейсахис Л.А., Степанов В.М. Внутривидовая классификация возбудителя чумы по принципу географического районирования. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1975; 2:5–9.
- Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1998; 4:11–22.
- Мартиневский И.Л. Биология и генетические особенности чумного и близкородственных ему микробов. М.: Медицина; 1969. 295 с.
- Тимофеева Л.А. О таксономии чумного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1972; 1:15–20.
- Тимофеева Л.А., Апарин Г.П., Головачева В.Я. Таксономия рода *Yersinia*. В кн.: Современные проблемы зоонозных инфекций: Всесоюз. межвуз. конф. (Симферополь, 28–29 мая 1981 г.): Тез. докл. М.; 1981. С. 90–2.
- Слудский А.А., редактор. Гиссарский природный очаг чумы. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та; 2003. 247 с.
- Bercovier H., Mollaret H.H., Alonso J.V., Brault J., Fanning G.R., Steigerwalt A.G., Brenner D.J. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr. Microbiol.* 1980; 4(4):225–9. DOI: 10.1007/BF02605861.
- Trebesius K., Harmsen D., Rakin A., Schmeltz J., Heesemann J. Development of rRNA-targeted PCR and *in situ* hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(9):2557–64. DOI: 10.1128/JCM.36.9.2557-2564.1998.
- Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guilleaume A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999; 96(24):14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.
- Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francisque V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(51):17837–42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101.
- 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 R. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5147–52. DOI: 10.1128/JB.186.15.5147-5152.2004.
- 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. DOI: 10.1038/ng.705.
- Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., 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 variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
- Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Zh.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.
- Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Поршаков А.М., Ляпин М.Н., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Аязбаев Т.З., Лопатин А.А., Ашибаков У.М., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по чуме в Российской Федерации и прогноз ее развития на 2020–2025 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-43-50.
- Eroshenko G.A., Nosov N.Yu., Krasnov Ya.M., Oglodin Y.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.
- Ерошенко Г.А., Джапарова А.К., Оглодин Е.Г., Альхова Ж.В., Куклева Л.М., Кузнецов А.А., Краснов Я.М.,

Абдикаримов С.Т., Кутырев В.В. Филогеография штаммов *Yersinia pestis* ветви 0.ANT, выделенных в Тянь-Шане и Памиро-Алае в XX–XXI веках. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:76–84. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-76-84.

24. Куклева Л.М., Джапарова А.К., Оглодин Е.Г., Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Кузнецов А.А., Фадеева А.В., Ерошенко Г.А., Бердиев С.К., Кутырев В.В. Комплексная характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Сарыджазском и Верхненарынском высокогорных очагах в 2019–2020 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:114–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122.

25. Rasmussen S., Allentoft M.E., Nielsen K., Orlando L., Sikora M., Sjögren K.G., Pedersen A.G., Schubert M., Van Dam A., Kapel C.M., Nielsen H.B., Brunak S., Avetisyan P., Epimakhov A., Khalyapin M.V., Gnuni A., Kriiska A., Lasak I., Metspalu M., Moiseyev V., Gromov A., Pokutta D., Saag L., Varul L., Yepiskoposyan L., Sicheritz-Pontén T., Foley R.A., Lahr M.M., Nielsen R., Kristiansen K., Willerslev E. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago. *Cell*. 2015; 163(3):571–82. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.009.

26. Andrade Valtuena A., Mitnik A., Key F.M., Haak W., Allmæ R., Belinskij A., Daubaras M., Feldman M., Jankauskas R., Janković I., Massy K., Novak M., Pfrengle S., Reinhold S., Slaus M., Spyrou M.A., Szécsényi-Nagy A., Törv M., Hansen S., Bos K.I., Stockhammer P.W., Herbig A., Krause J. The Stone Age plague and its persistence in Eurasia. *Curr. Biol*. 2017; 27(23):3683–3691.e8. DOI: 10.1016/j.cub.2017.10.025.

27. Rascovan N., Sjögren K.-G., Kristiansen K., Nielsen R., Willerslev E., Desnues C., Rasmussen S. Emergence and spread of basal lineages of *Yersinia pestis* during the Neolithic decline. *Cell*. 2019; 176(1-2):295–305.e10. DOI: 10.1016/j.cell.2018.11.005.

28. Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Wang C.C., Valtuena A.A., Lankapalli A.K., Kondrashin V.V., Tsybin V.A., Khokhlov A., Kühnert D., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Analysis of 3800-year-old *Yersinia pestis* genomes suggests Bronze Age origin for bubonic plague. *Nat. Commun*. 2018; 9(1):2234. DOI: 10.1038/s41467-018-04550-9.

29. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis*. 2014; 14(4):319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.

30. Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., Pedersen M.W., Goldberg A., Usmanova E., Baimukhanov N., Loman V., Hedeager L., Pedersen A.G., Nielsen K., Afanasiev G., Akmatov K., Aldashev A., Alpaslan A., Baimbetov G., Bazaliiskii V.I., Beisenov A., Boldbaatar B., Boldgiv B., Dorzhu C., Ellingvag S., Erdenebaatar D., Dajani R., Dmitriev E., Evdokimov V., Frei K.M., Gromov A., Goryachev A., Hakonarson H., Hegay T., Khachatryan Z., Khaskhanov R., Kitov E., Kolbina A., Kubatbek T., Kukushkin A., Kukushkin I., Lau N., Margaryan A., Merkyte I., Mertz I.V., Mertz V.K., Mijiddorj E., Moiseyev V., Mukhtarova G., Nurmukhanbetov B., Orozbekova Z., Panyushkina I., Pieta K., Smrčka V., Shevnina I., Logvin A., Sjögren K.G., Stolicová T., Taravala A.M., Tashbaeva K., Tkachev A., Tulegenov T., Voyakin D., Yepiskoposyan L., Undrakhbold S., Varfolomeev V., Weber A., Wilson Sayres M.A., Kradin N., Allentoft M.E., Orlando L., Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature*. 2018; 557(7705):369–74. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.

31. Spyrou M.A., Musralina L., Gnecci Ruscone G.A., Kocher A., Borbone P.-G., Khartanovich V.I., Buzhilova A., Djansugurova L., Bos K.I., Kühnert D., Haak W., Slavin P., Krause J. The source of the Black Death in fourteenth-century Central Eurasia. *Nature*. 2022; 606(7915):718–24. DOI: 10.1038/s41586-022-04800-3.

32. Demeure C.E., Dussurget O., Mas Fiol G., Le Guern A.S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Microbes Infect*. 2019; 21(5-6):202–12. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.06.007.

33. Achtman M. How old are bacterial pathogens? *Proc. Biol. Sci*. 2016; 283(1836):20160990. DOI: 10.1098/rspb.2016.0990.

34. Bos K.I., Herbig A., Sahl J., Waglechner N., Fourment M., Forrest S.A., Klunk J., Schuenemann V.J., Poinar D., Kuch M., Golding G.B., Dutour O., Keim P., Wagner D.M., Holmes E.C., Krause J., Poinar H.N. Eighteenth century *Yersinia pestis* genomes reveal the long-term persistence of an historical plague focus. *Elife*. 2016; 5:e12994. DOI: 10.7554/eLife.12994.

References

1. Bezsonova A.A. [On two varieties of *B. pestis* found during culturing on glycerin media]. *Vestnik Mikrobiologii, Epidemiologii i Parazitologii* [Bulletin of Microbiology, Epidemiology and Parasitology]. 1928; 7(3):325–6.

2. Konovalova S.F. [Nitrose reaction with cultures of *B. pestis* and *B. pseudotuberculosis rodentium* (Pfeiffer)]. *Vestnik Mikrobiologii, Epidemiologii i Parazitologii* [Bulletin of Microbiology, Epidemiology and Parasitology]. 1930; 9(2):513–6.

3. Devignat R. Varieties de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse. *Bull. World. Health Organ*. 1951; 4(2):247–63.

4. Tumansky V.M. On the classification of species of the plague microbe. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology]. 1957; (6):3–7.

5. Levi M.I. [Species classification of the causative agent of plague]. In: [Abstracts of the Scientific Conference on Natural Focality and Prevention of Plague and Tularemia. October 30 – November 2, 1962]. Rostov-on-Don; 1962. P. 72–4.

6. Mikhailova R.S. [Characterization of properties and classification of strains of the plague microbe isolated in the Caucasus: author's abstract of thesis for a degree of Candidate of Medical Sciences]. Stavropol; 1968. 22 p.

7. Peisakhis L.A., Stepanov V.M. [Intraspecific classification of the plague agent according to the principle of geographical zoning]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 1975; (2):5–9.

8. Kutyrev V.V., Protchenko O.A. [Classification and molecular genetic studies of *Yersinia pestis*]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 1998; (4):11–22.

9. Martinevsky I.L. [Biology and Genetic Features of the Plague and Closely Related Microbes]. Moscow: Medicine; 1969. 295 p.

10. Timofeeva L.A. [On the taxonomy of the plague microbe]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 1972; (1):15–20.

11. Timofeeva L.A., Aparin G.P., Golovacheva V.Ya. [Taxonomy of the genus *Yersinia*]. In: [Modern Problems of Zoonotic Infections: All-Union Interagency Conference (Simferopol, May 28–29, 1981): Proceedings]. Moscow; 1981. P. 90–2.

12. Sludsky A.A., editor. [Hissar Natural Focus of Plague]. Saratov: Publishing House of the Saratov University; 2003. 247 p.

13. Bercovier H., Mollaret H.H., Alonso J.V., Brault J., Fanning G.R., Steigerwait A.G., Brenner D.J. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr. Microbiol*. 1980; 4(4):225–9. DOI: 10.1007/BF02605861.

14. Trebesius K., Harmsen D., Rakin A., Schmelz J., Heesemann J. Development of rRNA-targeted PCR and *in situ* hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol*. 1998; 36(9):2557–64. DOI: 10.1128/JCM.36.9.2557-2564.1998.

15. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guilleul A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999; 96(24):14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.

16. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francisque V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(51):17837–42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101.

17. 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 R. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. *J. Bacteriol*. 2004; 186(15):5147–52. DOI: 10.1128/JB.186.15.5147-5152.2004.

18. 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. DOI: 10.1038/ng.705.

19. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., 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 variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.

20. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kuleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Zh.V., Oglozin 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.

21. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Porshakov A.M., Lyapin M.N., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Ayazbaev T.Z., Lopatin A.A., Ashibokov U.M., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Epidemiological and epizootic situation on plague in the Russian Federation and forecast for its development

for 2020–2025]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-43-50.

22. Eroshenko G.A., Nosov N.Yu., Krasnov Ya.M., Oglodin Y.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kuttyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.

23. Eroshenko G.A., Dzharparova A.K., Oglodin E.G., Al'khova Z.V., Kukleva L.M., Kuznetsov A.A., Krasnov Y.M., Abdikarimov S.T., Kuttyrev V.V. [Phylogeny of *Yersinia pestis* strains belonging to 0.ANT branch, isolated in Tien-Shan and Pamir-Alay in XX–XXI centuries]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):76–84. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-76-84.

24. Kukleva L.M., Dzharparova A.K., Oglodin E.G., Naryshkina E.A., Krasnov Y.M., Kuznetsov A.A., Fadeeva A.V., Eroshenko G.A., Berdiev S.K., Kuttyrev V.V. [Complex characteristics of *Yersinia pestis* strains isolated in the Sarydzhas and Upper-Naryn high-mountain foci in 2019–2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (2):114–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122.

25. Rasmussen S., Allentoft M.E., Nielsen K., Orlando L., Sikora M., Sjögren K.G., Pedersen A.G., Schubert M., Van Dam A., Kapel C.M., Nielsen H.B., Brunak S., Avetisyan P., Epimakhov A., Khalyapin M.V., Gnuni A., Kriiska A., Lasak I., Metspalu M., Moiseyev V., Gromov A., Pokutta D., Saag L., Varul L., Yepiskoposyan L., Sicheritz-Pontén T., Foley R.A., Lahr M.M., Nielsen R., Kristiansen K., Willerslev E. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago. *Cell*. 2015; 163(3):571–82. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.009.

26. Andrades Valtueña A., Mitnik A., Key F.M., Haak W., Allmæ R., Belinskij A., Daubaras M., Feldman M., Jankauskas R., Janković I., Massy K., Novak M., Pfrengle S., Reinhold S., Šlaus M., Spyrou M.A., Szécsényi-Nagy A., Törv M., Hansen S., Bos K.I., Stockhammer P.W., Herbig A., Krause J. The Stone Age plague and its persistence in Eurasia. *Curr. Biol.* 2017; 27(23):3683–3691.e8. DOI: 10.1016/j.cub.2017.10.025.

27. Rascovan N., Sjögren K.-G., Kristiansen K., Nielsen R., Willerslev E., Desnues C., Rasmussen S. Emergence and spread of basal lineages of *Yersinia pestis* during the Neolithic decline. *Cell*. 2019; 176(1–2):295–305.e10. DOI: 10.1016/j.cell.2018.11.005.

28. Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Wang C.C., Valtueña A.A., Lankapalli A.K., Kondrashin V.V., Tsybin V.A., Khokhlov A., Kühnert D., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Analysis of 3800-year-old *Yersinia pestis* genomes suggests Bronze Age origin for bubonic plague. *Nat. Commun.* 2018; 9(1):2234. DOI: 10.1038/s41467-018-04550-9.

29. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia*

pestis and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(4):319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.

30. Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., Pedersen M.W., Goldberg A., Usmanova E., Baimukhanov N., Loman V., Hedeager L., Pedersen A.G., Nielsen K., Afanasiev G., Akmatov K., Aldashev A., Alpaslan A., Baimbetov G., Bazaliiskii V.I., Beisenov A., Boldbaatar B., Boldgiv B., Dorzhu C., Ellingvag S., Erdenebaatar D., Dajani R., Dmitriev E., Evdokimov V., Frei K.M., Gromov A., Goryachev A., Hakonarson H., Hegay T., Khachatryan Z., Khaskhanov R., Kitov E., Kolbina A., Kubatbek T., Kukushkin A., Kukushkin I., Lau N., Margaryan A., Merkyte I., Mertz I.V., Mertz V.K., Mijiddorj E., Moiseyev V., Mukhtarova G., Nurmukhanbetov B., Orozbekova Z., Panyushkina I., Pieta K., Smrčka V., Shevina I., Logvin A., Sjögren K.G., Štolcová T., Taravella A.M., Tashbaeva K., Tkachev A., Tulenkov T., Voyakin D., Yepiskoposyan L., Undrakhbold S., Varfolomeev V., Weber A., Wilson Sayres M.A., Kradin N., Allentoft M.E., Orlando L., Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature*. 2018; 557(7705):369–74. DOI: 10.1038/s41586-018-0094-2.

31. Spyrou M.A., Musralina L., Gnechchi Ruscone G.A., Kocher A., Borbone P.-G., Khartanovich V.I., Buzhilova A., Djangugurova L., Bos K.I., Kühnert D., Haak W., Slavin P., Krause J. The source of the Black Death in fourteenth-century Central Eurasia. *Nature*. 2022; 606(7915):718–24. DOI: 10.1038/s41586-022-04800-3.

32. Demeure C.E., Dussurget O., Mas Fiol G., Le Guern A.S., Savin C., Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Microbes Infect.* 2019; 21(5–6):202–12. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.06.007.

33. Achtman M. How old are bacterial pathogens? *Proc. Biol. Sci.* 2016; 283(1836):20160990. DOI: 10.1098/rspb.2016.0990.

34. Bos K.I., Herbig A., Sahl J., Waglechner N., Fourment M., Forrest S.A., Klunk J., Schuenemann V.J., Poinar D., Kuch M., Golding G.B., Dutour O., Keim P., Wagner D.M., Holmes E.C., Krause J., Poinar H.N. Eighteenth century *Yersinia pestis* genomes reveal the long-term persistence of an historical plague focus. *Elife*. 2016; 5:e12994. DOI: 10.7554/eLife.12994.

Authors:

Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Kuttyrev 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., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-23-28

УДК 616.98:579.842.23(574)

Т.В. Мека-Меченко, Т.К. Ерубаяев, Э.Ж. Бегимбаева, Г.Г. Ковалева, З.Ж. Абдел, В.В. Сутягин,
У.А. Избанова

Многоуровневая система изучения свойств штаммов чумного микроба в Республике Казахстан

РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева»
Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Алма-Ата, Республика Казахстан

Изучение свежесделанных культур необходимо для составления объективного представления об особенностях свойств природных популяций чумного микроба. Проведен анализ уровней изучения свойств штаммов и представлена характеристика *Yersinia pestis* в Казахстане. Приведены результаты изучения фенотипических и генетических свойств природных штаммов чумного микроба. В результате эпизоотологического обследования природных очагов чумы ежегодно в музеи живых культур противочумных станций поступают штаммы возбудителя чумы, которые передаются в Национальную коллекцию микроорганизмов ННЦООИ. Одним из главных моментов является определение типичности/атипичности штаммов *Y. pestis*. Изучение штаммов начинается в момент выделения в противоэпидемических отрядах. Первичная идентификация штаммов проводится в лабораториях эпидотрядов по морфологии, чувствительности к чумным и псевдотуберкулезному бактериофагам, ферментации глицерина, рамнозы и сахарозы. В лабораториях станций и отделений дополнительно исследуются: ферментация мальтозы и арабинозы, денитрификация, потребности в аминокислотах, вирулентность, чувствительность к антибиотикам. При изучении вирулентности штаммов изучаются: кальцийзависимость, наличие и количество F1, пестициногенность и чувствительность к пестицину 1 и вирулентность для белых мышей. Изучение и сохранение собранного генофонда в Национальной коллекции ННЦООИ включает различные направления работы, одним из главных является углубленное исследование по всем признакам стандартными микробиологическими методами, молекулярными методами для полной идентификации и создания банка данных, содержащего информацию о геноме штаммов при разной интенсивности эпизоотического процесса. В ННЦООИ имеется компьютеризованная база данных по учету и движению штаммов, оборудование для молекулярных исследований. В коллекции проводится оценка свойств, систематизируются сведения и обеспечивается жизнеспособность штаммов возбудителя чумы с целью долгосрочного хранения.

Ключевые слова: чума, штаммы, уровни изучения свойств.

Корреспондирующий автор: Мека-Меченко Татьяна Владимировна, e-mail: LPlague-2@nscedi.kz.

Для цитирования: Мека-Меченко Т.В., Ерубаяев Т.К., Бегимбаева Э.Ж., Ковалева Г.Г., Абдел З.Ж., Сутягин В.В., Избанова У.А. Многоуровневая система изучения свойств штаммов чумного микроба в Республике Казахстан. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:23–28. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-23-28
Поступила 18.11.2022. Принята к публ. 28.11.2022.

T.V. Meka-Mechenko, T.K. Erubaev, E.Zh. Begimbaeva, G.G. Kovaleva, Z.Zh. Abdel, V.V. Sutyagin,
U.A. Izbanova

Multilevel System of Studying Plague Microbe Strains Properties in the Republic of Kazakhstan

Masgut Aikimbaev National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections, Almaty, Republic of Kazakhstan

Abstract. The study of freshly isolated cultures is necessary to form an objective idea of the properties of plague microbe natural populations. The analysis of the levels of investigating the properties of strains has been carried out and the characteristics of *Yersinia pestis* in Kazakhstan are presented. The results of studying the phenotypic and genetic properties of plague microbe natural strains are provided. Following the epizootological survey of natural plague foci, the museums of live cultures at plague control stations annually receive strains of plague pathogen, which are transferred to the National Collection of Microorganisms of the National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections (NSCPDI). One of the main points of *Y. pestis* strains analysis is the determination of their typicality/atypicality. The study of strains begins at the moment of their isolation by anti-epidemic units. The primary identification of strains is carried out in laboratories of anti-epidemic units by morphology, sensitivity to plague and pseudotuberculosis bacteriophages, fermentation of glycerol, rhamnose and sucrose. In the laboratories of plague control stations and departments, fermentation of maltose and arabinose, denitrification, amino acid requirements, virulence, sensitivity to antibiotics are additionally investigated. Analysis of strains virulence includes determination of calcium dependence, the presence and amount of F1, pesticinogenicity and sensitivity to pesticin 1 and virulence for white mice. The assessment and preservation of the collected gene pool in the NSCPDI National Collection includes various activities, one of the main ones is an in-depth study of all features using standard microbiological methods, molecular methods for complete identification and creation of a data bank containing information about the genome of strains at different intensity of the epizootic process. The NSCPDI has a digital database on the registration and movement of strains, equipment for molecular research. The collection evaluates properties, systematizes information, and ensures the viability of plague pathogen strains for long-term storage.

Key words: plague, strains, levels of study of properties.

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

Funding: The work was carried out within the framework of the scientific and technical program “Development and scientific substantiation of public health technologies, biological safety to influence the prevention of dangerous infectious diseases” of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan for 2021–2023 (IRN BR 11065207).

Corresponding author: Tat'yana V. Meka-Mechenko, e-mail: LPlague-2@nscedi.kz.

Citation: Meka-Mechenko T.V., Erubaev T.K., Begimbaeva E.Zh., Kovaleva G.G., Abdel Z.Zh., Sutyagin V.V., Izbanova U.A. Multilevel System of Studying Plague Microbe Strains Properties in the Republic of Kazakhstan. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:23–28. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-23-28

Received 18.11.2022. *Accepted* 28.11.2022.

Meka-Mechenko T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6322-0065>

Erubaev T.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5291-3571>

Begimbaeva E.Zh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3662-5806>

Kovaleva G.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2673-2213>

Abdel Z.Zh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2738-6818>

Sutyagin V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2152-1609>

Izbanova U.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4616-8727>

Природные очаги чумы занимают свыше 40 % территории Республики Казахстан (РК) и их площадь увеличилась за последние 30 лет более чем на 110 тыс. кв. км. При этом площадь природных очагов чумы в Казахстане является наибольшей по сравнению с другими странами СНГ и составляет более 50 % очаговой по чуме территории этих стран вместе взятых. На территории РК расположены 7 природных и 15 автономных очагов чумы [1].

Противочумная служба Республики Казахстан в наши дни представлена Национальным научным центром особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева Министерства здравоохранения РК (ННЦООИ) и 9 противочумными станциями (ПЧС), являющимися его филиалами (Актюбинская, Арало-морская, Атырауская, Жамбылская, Кызылординская, Мангышлакская, Уральская, Талдыкорганская, Шымкентская). В составе ПЧС имеется 22 противочумных отделения, выставяющих 49 противоэпидемических отрядов в сезоны эпизоотологического обследования энзоотичной по чуме территории. Произошла консолидация деятельности казахстанских ученых и практических специалистов ПЧС, работающих в области биобезопасности страны в едином Центре, и обеспечено единство науки и практики.

В результате интенсивного изучения природных очагов чумы накоплен большой фактический материал, позволяющий расширить представления о данной инфекции. Изучение штаммов, изолированных в природных очагах в разные фазы эпизоотического процесса, дает представление об эпизоотологической значимости микроба и облегчает расшифровку целого ряда вопросов эпизоотологии и природной очаговости чумы [2].

Изучены 500 штаммов из Центрально-Азиатского пустынного, Волго-Уральского песчаного и Урало-Уильского степного очагов чумы. На наличие бактериофагов исследовано 1182 штамма, включая штаммы из Таласского и Сарыджазского горных очагов. Штаммы из этих очагов также изучены методом VNTR-анализа. Культурально-морфологические и биохимические свойства изучены стандартными микробиологическими методами. Применялись молекулярные исследования: определение протеинового и плазмидного профилей, полимеразная цепная реакция (ПЦР), VNTR-анализ.

Работа с возбудителем чумы поэтапно проводится во всех лабораториях противочумных учреждений, начиная с противоэпидемических отрядов и заканчивая коллекцией ННЦООИ.

В работе по изучению штаммов мы используем приказы и методические рекомендации РК, стран СНГ и других стран [3–6].

В результате эпизоотологического обследования природных очагов чумы на территории Казахстана ежегодно в музеи живых культур противочумных станций поступают штаммы возбудителя чумы из различных объектов, выделенные на очаговой по чуме территории в лабораториях эпидемиологических отрядов противочумных станций и противочумных отделений, которые затем передаются в Национальную коллекцию микроорганизмов ННЦООИ [7].

Изучение штаммов начинается в момент выделения в противоэпидемических отрядах. Мониторинг свойств штаммов *Yersinia pestis* необходим для составления объективного представления об особенностях свойств природных популяций *Y. pestis*. Одним из главных моментов является определение типичности/атипичности штаммов *Y. pestis*.

Первичная идентификация проводится в лабораториях эпидотрядов по морфологии, чувствительности к чумным и псевдотуберкулезному бактериофагам, ферментации глицерина, рамнозы и сахарозы.

В лабораториях музеев живых культур станций дополнительно исследуются: ферментация мальтозы и арабинозы, денитрификация, потребности в аминокислотах, вирулентность, чувствительность к антибиотикам. При изучении вирулентности штаммов исследуются: кальцийзависимость, наличие и количество F1, пестициногенность и чувствительность к пестицину 1 и вирулентность для белых мышей.

Лаборатория Национальной коллекции ННЦООИ расположена в Центральной референтной лаборатории (ЦРЛ) Центра, имеющей третью степень защиты и все необходимые условия биологической безопасности. С вводом в действие ЦРЛ обеспечена консолидация и длительное безопасное хранение коллекций возбудителей особо опасных инфекций на базе защищенного депозитария. В коллекции, расположенной в ЦРЛ УББ 3, содержатся штаммы патогенов, учет и движение патогенов ведется в системе PACS (система контроля патогенных материалов) [8].

Изучение и сохранение собранного генофонда в Национальной коллекции ННЦООИ включает различные направления работы, одним из главных является углубленное исследование по всем признакам стандартными микробиологическими методами, молекулярными методами для полной идентификации и создания банка данных, содержащего информацию о геноме штаммов при разной интенсивности эпизоотического процесса.

В ННЦООИ имеется компьютеризованная база данных по учету и движению штаммов, оборудование для молекулярных исследований. В коллекции проводится оценка свойств, систематизируются сведения и обеспечивается жизнеспособность штаммов возбудителя чумы с целью долгосрочного хранения.

Таким образом, уровни изучения штаммов *Y. pestis* в РК – это:

1. Лаборатории эпидотрядов: выделение и первичная идентификация культур.

2. Музеи живых культур противочумных станций: дополнительные биохимические признаки, вирулентность, чувствительность к антибиотикам.

3. Национальная коллекция ННЦООИ: комплексное изучение свойств для полной идентификации и создания банка данных.

Штаммы чумного микроба из природных очагов РК в большинстве случаев имеют типичные фенотипические свойства [9]. В 1,2 % случаев зарегистрированы штаммы с измененными биохимическими свойствами по признаку ферментации сахарозы, глицерина, арабинозы, мальтозы, денитрифицирующей активности и пестициногенности [10]. Как правило, выделение этих штаммов имеет нерегулярный характер. Исключение составляют атипичные по отношению к арабинозе (Ara^-) штаммы, длительно циркулирующие в Прибалхашском автономном очаге чумы, при этом увеличивается ареал их распространения.

Из числа Pst^- -штаммов, изолированных в Казахстане, слабую чувствительность к пестицину штамма ЕВ приобрели два штамма: один из Урало-Уильского степного и один из Таукумского автономных очагов.

Изучение потребности в аминокислотах при 28 °С штаммов чумного микроба, циркулирующих в очагах чумы Казахстана, показало стабильную и типичную их приуроченность по признаку зависимости к определенным территориям. Для изолированных в пустынных очагах чумы (Центрально-Азиатский пустынный и Волго-Уральский песчаный) штаммов характерна потребность в метионине, треонине, цистеине и фенилаланине. Часть штаммов дополнительно нуждаются в лейцине и аргинине. Для большинства штаммов из Прикаспийского степного очага чумы требуются три аминокислоты: метионин, треонин и цистеин.

Появление штаммов с измененной зависимостью в аминокислотах носит случайный характер.

Циркуляция аргининзависимых (Arg^-) штаммов не характерна для очагов чумы Казахстана. Однако

начиная с 1999 г. такие штаммы стали выделять в Прибалхашском автономном очаге чумы, при этом их количество стабильно увеличивалось более чем на 20 %. Тенденция продолжает сохраняться, например из 39 штаммов, выделенных в этом очаге в 2017 г., 11 были аргининзависимыми [11, 12].

Наличие F1 изучается различными методами: методом флюоресцирующих антител (МФА), реакцией непрямой гемагглютинации (РНГА), методом Вестерн-блота и плазмидного профиля (наличие плазмиды $pFra$), ПЦР (ген *cafI*). Пять штаммов из Прибалхашского автономного очага, не содержащих в геноме ген *cafI*, не имели плазмиды $pFra$ и не проявляли соответствующих фенотипических свойств, т.е. были $F1^-$ отрицательны при исследовании в РНГА, Western blot и МФА. У двух штаммов из Кызылкумского автономного очага не выявлен F1 в РНГА.

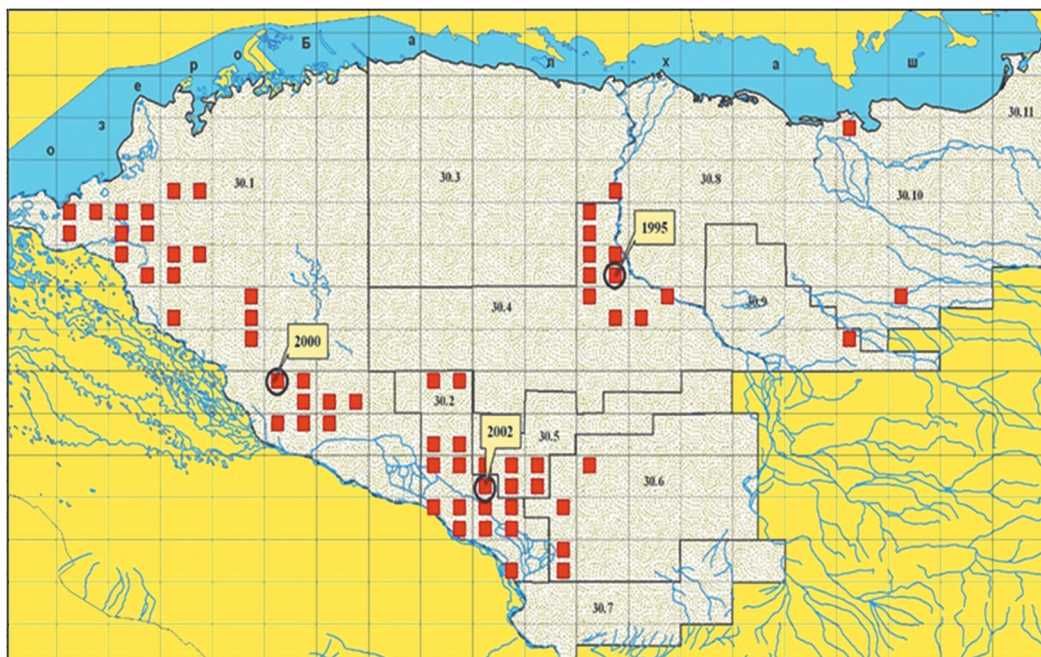
Представляет интерес распространение штаммов чумного микроба с дефектами фракции 1: бесфракционные штаммы и штаммы с ее низким содержанием. На рисунке представлено распространение штаммов *Y. pestis* с измененной капсулой в Прибалхашском автономном очаге чумы с 1995 по 2009 год [13].

Резистентных к антибактериальным препаратам штаммов чумного микроба не обнаружено. Большинство изученных музейных штаммов чумного микроба чувствительны к стрептомицину (92 %), гентамицину (94 %), левомицетину (79 %), тетрациклину (76 %) и ципрофлоксацину (97 %). Спектр изучения чувствительности к антимикробным препаратам сейчас расширен до 15: группа аминогликозидов (стрептомицин, неомидин, канамицин, гентамицин, тобрамицин, амикацин); карбапенемы (имипенем); цефалоспорины (цефазолин, цефуроксим, цефтриаксон, цефепим); фторхинолоны (офлоксацин, пефлоксацин, ципрофлоксацин, ломфлокс) [14].

Изучение штаммов, являющихся продуцентами бактериофагов, а также экологии и свойств бактериофагов, включая степень их генетических и антигенных различий, весьма актуально [15]. Проанализирована частота встречаемости природных чумных бактериофагов и изучены их свойства. Исследованы 1182 природных штамма *Y. pestis*, выделены 34 бактериофага. Наибольшее количество бактериофагов выделено из штаммов в Центрально-Азиатском природном очаге – 31. В Сарыджазском очаге изолирован 1 бактериофаг, в Таласском очаге – 2 штамма продуцента бактериофагов. Бактериофаги чаще выделяли из штаммов, изолированных от грызунов.

Изолированные штаммы бактериофагов отличались друг от друга по морфологическим свойствам, степени литической активности и специфичности.

Результаты исследования штаммов бактериофагов в ПЦР показали, что изученные фаги из различных природных очагов Казахстана гомологичны, за исключением двух штаммов бактериофагов



Распространение штаммов *Y. pestis* с измененной капсулой в Прибалхашском автономном очаге чумы с 1995 по 2009 год

Distribution of *Y. pestis* strains with a modified capsule in the Pre-Balkhash autonomous plague focus between 1995 and 2009

из Прибалхашского и Мойынкумского автономных очагов. Бактериофаги чумного микроба являются важной составной частью сложного биоценоза и дополняют биологическую характеристику чумного микроба. Собранная коллекция бактериофагов в перспективе может быть использована при поиске более чувствительного и специфичного диагностического фага для серийного производства.

В целом штаммы имели типичные фенотипические свойства. Выделение штаммов с отклоняющимися свойствами имеет нерегулярный характер, кроме Ага-, Arg-культур и с отсутствием фракции 1.

Белки наружной мембраны – наиболее высоко экспрессируемые белки на клеточной поверхности чумного микроба [16]. Штаммы чумного микроба, циркулирующие в природных очагах Казахстана, имеют сходный протеиновый профиль, типичный для вида *Y. pestis*. Клеточный экстракт всех изученных чумных микробов содержал набор белков с молекулярной массой в пределах от 17 до 103 кДа. Приблизительно 18 полипептидов выявлено в каждом из проанализированных штаммов. Среди них 7 белков с приблизительно молекулярной массой 90, 80, 64, 46, 38, 29 и 17 кДа преобладали в количественном отношении, являясь основными (мажорными) белками чумной клетки. Кроме того, в клеточной мембране *Y. pestis* присутствовали 11 второстепенных (минорных) белков размером ~103, 100, 61, 43, 39, 35, 33, 28, 27, 25 и 20 кДа.

Степень подобия у казахстанских штаммов находится в диапазоне 94–100 %, что указывает на высокую степень структурной близости клеточных мембран. Получен референс-спектр мембранных белков возбудителя чумы, циркулирующего в природных очагах Казахстана. Штаммы чумного микро-

ба, циркулирующие в природных очагах РК, имеют сходный протеиновый профиль, типичный для вида *Y. pestis*.

Плазмиды имеют решающее значение для патогенности *Y. pestis* [17]. Скрининг штаммов *Y. pestis*, циркулирующих в природных очагах Казахстана, показал преобладание типичного плазмидного профиля (110 т.п.н., 70 т.п.н., 9,5 т.п.н.), характерного для 95,2 % штаммов. Представляют интерес криптическая плазида размером 45–50 т.п.н. штамма, выделенного от больного человека, и плазида с измененной массой 120 т.п.н., что важно для дифференциации природных вариантов от созданных лабораторно путем введения дополнительных факторов вирулентности.

Незначительные колебания молекулярной массы плазмиды rFga не носили характера выраженной закономерности.

Методы молекулярного типирования необходимы для изучения филогенеза чумного микроба и эпидемиологических исследований [18].

В результате применения VNTR-анализа построена дендрограмма генетических взаимоотношений штаммов, выделено 7 кластеров, подобраны отличительные молекулярно-генетические маркеры как между различными кластерами, так и между штаммами внутри одного кластера. Дендрограмма филогенетических связей между штаммами позволяет с довольно высокой долей вероятности определить их происхождение.

Методом мультилокусного VNTR-анализа по 25 ключевым локусам установлено, что исследуемые штаммы чумного микроба филогенетически наиболее близки к представителям биовара *Mediaevalis*. Получено филогенетическое дерево

изученных штаммов. Установлено, что на территории Казахстана циркулируют девять генотипов, выявлено распределение по определенным природным очагам чумы.

Выделяются два крупных кластера: А (штаммы псевдотуберкулеза) и В (две ветви *Y. pestis*). Первая ветвь В1 состоит из двух групп. Группа В1-1: изоляты из Таласского горного очага чумы и *Y. pestis* EV НИИЭГ. Группа В1-2 состоит из штаммов из Сарыджазского, Прибалхашского и Урало-Эмбенского очагов. Вторая ветвь В2 представлена штаммами двух групп: В2-1 и В2-2. Группа В2-1 сформирована штаммами из Мангышлакского, Волго-Уральского песчаного, Волго-Уральского степного очагов чумы и штаммом из Устьюртского очага. Группу В2-2 образуют две подгруппы: В2-2-1 и В2-2-2. Приведенная кластеризация свидетельствует о приуроченности сформированных на дендрограмме групп MLVA-25 к определенным территориям природного очага чумы.

Таким образом, в результате анализа филогенетического дерева сформированы группы MLVA 25 типов разных уровней дискриминации.

Предварительные результаты секвенирования: все штаммы принадлежат к 2.MED1. Есть четыре штамма, принадлежащие к кладе «Регион Каспийского моря»: два из Мангышлакского, один из Приаральско-Каракумского и один из Прибалхашского автономных очагов. В то время как штаммы из Мангышлакского очага вполне логично принадлежат к региону Каспийского моря, два других географически очень далеки. А штамм из Прибалхашья определяет новую ветвь политомии, о которой говорилось в статье Г.А. Ерошенко с соавт. [19].

Поэтапное изучение свойств с расширением исследования различных признаков важно и с точки зрения биологической безопасности, и с точки зрения взаимопроверки свойств. Данная система необходима, оправдана и прошла проверку временем.

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

Работа выполнена в рамках НТП «Разработка и научное обоснование технологий общественно-го здравоохранения, биологической безопасности для воздействия на профилактику опасных инфекционных заболеваний» на 2021–2023 годы Министерства здравоохранения Республики Казахстан (ИРН BR 11065207).

Список литературы

1. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях. Ижевск: ООО «Принт»; 2018. 336 с.
2. Атшабар Б.Б. Естественная изменчивость чумного микроба. Алматы; 2000. 111 с.
3. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории государств – участников Содружества Независимых Государств. Методические рекомендации (утв. 05.11.2019). URL: http://www.microbe.ru/files/2019_MR_Plague_foci_CIS.pdf (дата обращения 27.10.2022).

4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Руководство по изучению штаммов чумного микроба. Алматы; 2001. 39 с.
6. Chu M.C. Laboratory Manual of Plague Diagnostic Tests. CDC Publications. Atlanta; 2000. 129 p.
7. Оптимальные средства и методы работы коллекций возбудителя чумы в противочумных учреждениях Республики Казахстан. Методические рекомендации. Астана; 2008. 30 с.
8. Некрасова Л.Е., Мека-Меченко Т.В., Бегимбаева Э.Ж., Избанова У.А., Ковалева Г.Г., Лухнова Л.Ю., Куница Т.Н., Кузнецов А.Н., Сагиев З.А. Проблемы оценки качества микробной коллекции возбудителей особо опасных инфекций. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2017; 1-2:134–141.
9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
10. Бурделов Л.А., редактор. Атлас распространения особо опасных инфекций в Республике Казахстан. Алматы; 2012. 232 с.
11. Мека-Меченко Т.В., Абдел З.Ж., Бегимбаева Э.Ж., Далибаев Ж.С., Абдирасилова А.А., Мукашев Н.К., Касенова А.К., Есимсейт Д.Т., Абделиев Б.З. Мониторинг свойств штаммов чумного микроба, выделенных в Казахстане в 2017–2018 гг. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2019; 2:43–50.
12. Абдел З.Ж. Анализ свойств штаммов чумного микроба в природных очагах Казахстана с различным уровнем эпизоотической активности и эпидемических проявлений чумы. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2019; 2:57–63.
13. Сутягин В.В., Мека-Меченко Т.В., Ковалева Г.Г., Бердибеков А.Т., Беляев А.И., Ким И.Б. Распространение и характеристика штаммов *Yersinia pestis* с атипичной капсулой в Прибалхашском автономном очаге чумы. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2020; 2:64–9.
14. Мека-Меченко Т.В., Некрасова Л.Е., Бегимбаева Э.Ж., Избанова У.А., Далибаев Ж.С., Лухнова Л.Ю., Куница Т.Н., Ковалева Г.Г., Сутягин В.В., Бердибеков А.Т. Чувствительность к антибиотикам природных штаммов чумного микроба из некоторых очагов Среднеазиатского пустынного природного очага чумы. *Medicine (Almaty)*. 2017; 8:68–72.
15. Skurnik M., Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296(1):5–14. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.09.002.
16. Dutta S.K., Yao Y., Marassi F.M. Structural insights into the *Yersinia pestis* outer membrane protein ail in lipid bilayers. *J. Phys. Chem.* 2017; 121(32):7561–70. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b03941.
17. Ni B., Du Z., Guo Z., Zhang Y., Yang R. Curing of four different plasmids in *Yersinia pestis* using plasmid incompatibility. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; 47(4):235–40. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2008.02426.x.
18. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярное типирование *Yersinia pestis*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 2:3–12.
19. Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'khova Z.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kutyrev V.V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS One*. 2021; 16(2):e0244615. DOI: 10.1371/journal.pone.0244615.

References

1. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Ensuring Epidemiological Well-Being in Natural Plague Foci in the Territory of the CIS Countries and Mongolia in Modern Conditions]. Izhevsk: LLC “Print”; 2018. 336 p.
2. Atshabar B.B. [The Natural Variability of the Plague Microbe]. Almaty; 2000. 111 p.
3. [Organization and conducting of epidemiological surveillance in natural plague foci on the territory of the member states of the Commonwealth of Independent States. Methodological recommendations] (approved on 05 Nov 2019). (Cited 27 Oct 2022). Available from: http://www.microbe.ru/files/2019_MR_Plague_foci_CIS.pdf.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: CJSC “Shiko”; 2013. 560 p.
5. [Guidelines for the Study of Plague Microbe Strains]. Almaty; 2001. 39 p.
6. Chu M.C. Laboratory Manual of Plague Diagnostic Tests. CDC Publications. Atlanta; 2000. 129 p.
7. [Optimal means and methods of work of plague pathogen collections in anti-plague institutions of the Republic of Kazakhstan. Guidelines]. Astana; 2008. 30 p.

8. Nekrasova L.E., Meka-Mechenko T.V., Begimbaeva E.Zh., Izbanova U.A., Kovaleva G.G., Lukhnova L.Yu., Kunitsa T.N., Kuznetsov A.N., Sagiev Z.A. [Problems of assessing the quality of the microbial collection of pathogens of particularly dangerous infections]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. 2017; (1-2):134–141.
9. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: “Medicine”; 2004. 192 p.
10. Burdelov L.A., editor. [Atlas of the Spread of Particularly Dangerous Infections in the Republic of Kazakhstan]. Almaty; 2012. 232 p.
11. Meka-Mechenko T.V., Abdel Z.Zh., Begimbaeva E.Zh., Dalibaev Zh.S., Abdirasilova A.A., Mukashev N.K., Kasenova A.K., Esimseit D.T., Abdeliev B.Z. [Monitoring the properties of plague microbe strains isolated in Kazakhstan in 2017–2018]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. 2019; (2):43–50.
12. Abdel Z.Zh. [Analysis of the properties of plague microbe strains in natural foci of Kazakhstan with different levels of epizootic activity and epidemic manifestations of plague]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. 2019; (2):57–63.
13. Sutyagin V.V., Meka-Mechenko T.V., Kovaleva G.G., Berdibekov A.T., Belyaev A.I., Kim I.B. [Distribution and characteristics of *Yersinia pestis* strains with an atypical capsule in the Balkhash autonomous plague focus]. *Karantinnyye i Zoonoznyye Infektsii v Kazakhstane [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]*. 2020; (2):64–9.
14. Meka-Mechenko T.V., Nekrasova L.E., Begimbaeva E.Zh., Izbanova U.A., Dalibaev Zh.S., Lukhnova L.Yu., Kunitsa T.N., Kovaleva G.G., Sutyagin V.V., Berdibekov A.T. [Sensitivity to antibiotics in natural strains of the plague microbe from certain foci of the Central Asian desert natural plague focus]. *Medicine (Almaty)*. 2017; (8):68–72.
15. Skurnik M., Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296(1):5–14. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.09.002.
16. Dutta S.K., Yao Y., Marassi F.M. Structural insights into the *Yersinia pestis* outer membrane protein ail in lipid bilayers. *J. Phys. Chem.* 2017; 121(32):7561–70. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b03941.
17. Ni B., Du Z., Guo Z., Zhang Y., Yang R. Curing of four different plasmids in *Yersinia pestis* using plasmid incompatibility. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; 47(4):235–40. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2008.02426.x.
18. Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [Molecular typing of *Yersinia pestis*]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2013; (2):3–12.
19. Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'khova Z.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kuttyrev V.V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS One*. 2021; 16(2):e0244615. DOI: 10.1371/journal.pone.0244615.

Authors:

Meka-Mechenko T.V., Erubaev T.K., Begimbaeva E.Zh., Kovaleva G.G., Abdel Z.Zh., Sutyagin V.V., Izbanova U.A. Masgut Aikimbaev National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections. 14, Zhakhanger St., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan. E-mail: nnscedi-1@nscedi.kz.

Об авторах:

Мека-Меченко Т.В., Ерубаяев Т.К., Бегимбаева Э.Ж., Ковалева Г.Г., Абдел З.Ж., Сутягин В.В., Избанова У.А. Национальный научный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева Министерства здравоохранения Республики Казахстан. Республика Казахстан, 050054, Алма-Ата, ул. Жахангер, 14. E-mail: nnscedi-1@nscedi.kz.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-29-40

УДК 616.98:579.842.23

К.А. Никифоров

Современные молекулярно-генетические методы и перспективы их применения для индикации и идентификации штаммов *Yersinia pestis**ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

В обзоре представлен анализ литературных данных, посвященных применению разнообразных современных молекулярно-генетических методов для проведения индикации и идентификации штаммов *Yersinia pestis*, обладающих разными свойствами и степенью вирулентности, что обусловлено разнообразными природными условиями, в которых они циркулируют. Методы рассмотрены с позиции перспективности их применения на трех уровнях (территориальном, региональном и федеральном) системы лабораторной диагностики инфекционных болезней в организациях Роспотребнадзора, для решения задачи поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия населения страны. Рассмотрены основные группы методов: основанные на анализе длин рестрикционных фрагментов (рибо- и IS-типирование, пульс-гельэлектрофорез); основанные на анализе специфических фрагментов (DFR-типирование, VNTR-типирование); основанные на секвенировании (MLST, CRISPR-анализ, SNP-анализ); ПЦР-методы (включая IPCR, SPA); методы изотермической амплификации (LAMP, HDA, RPA, SEA, PCA, SHERLOCK); ДНК-чипы; методы, использующие технологию аптамеров; био- и наносенсоры; ДНК-оригами; методы на основе нейронных сетей. В результате проведенного анализа можно сделать вывод о стремительном развитии молекулярной диагностики и генетики, которое направлено на повышение оперативности, многофакторности и упрощение применения с отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании и высококвалифицированных кадрах для проведения анализа. На всех уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней в организациях Роспотребнадзора возможно использование методов, основанных на ПЦР, изотермической амплификации, SHERLOCK, биосенсорах, малогабаритных приборах для секвенирования. На территориальном уровне в противочумных станциях перспективным является использование иммуно-ПЦР и SPA для проведения индикации *Y. pestis*. На региональном уровне многообещающим выглядит внедрение технологий, основанных на использовании аптамеров и ДНК-чипов. Для федерального уровня перспективно применение методов ДНК-оригами и новых технологий полногеномного секвенирования в рамках выполнения расширенной идентификации, молекулярного типирования и секвенирования геномов штаммов возбудителя чумы.

Ключевые слова: возбудитель чумы, молекулярно-генетические методы.

Корреспондирующий автор: Никифоров Константин Алексеевич, e-mail: gusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Никифоров К.А. Современные молекулярно-генетические методы и перспективы их применения для индикации и идентификации штаммов *Yersinia pestis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:29–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-29-40.

Поступила 05.07.2022. Принята к публ. 01.08.2022.

К.А. Nikiforov**Advanced Molecular-Genetic Methods and Prospects for Their Application for the Indication and Identification of *Yersinia pestis* Strains***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Abstract. The review provides an analysis of the literature data on the use of various modern molecular-genetic methods for the indication and identification of *Yersinia pestis* strains with different properties and degree of virulence, which is caused by the diverse natural conditions in which they circulate. The methods are also considered from the perspective of their promising application at three levels (territorial, regional and federal) of the system for laboratory diagnosis of infectious diseases at the premises of Rosпотребнадзор organizations to solve the problem of maintaining the sanitary and epidemiological well-being of the country's population. The main groups of methods considered are as follows: based on the analysis of the lengths of restriction fragments (ribo- and IS-typing, pulse gel electrophoresis); based on the analysis of specific fragments (DFR typing, VNTR typing); based on sequencing (MLST, CRISPR analysis, SNP analysis); PCR methods (including IPCR, SPA); isothermal amplification methods (LAMP, HDA, RPA, SEA, PCA, SHERLOCK); DNA-microarray; methods using aptamer technology; bio- and nano-sensors; DNA origami; methods based on neural networks. We can conclude that the rapid development of molecular diagnostics and genetics is aimed at increasing efficiency, multi-factorial approaches and simplifying the application of techniques with no need for expensive equipment and highly qualified personnel for analysis. At all levels of the system for laboratory diagnosis of infectious diseases at the Rosпотребнадзор organizations, it is possible to use methods based on PCR, isothermal amplification, SHERLOCK, biosensors, and small-sized sequencing devices. At the territorial level, at plague control stations, the use of immuno-PCR and SPA for the indication of *Y. pestis* is viable. At the regional level, introduction of the technologies based on the use of aptamers and DNA chips looks promising. For the federal level, the use of DNA origami methods and new technologies of whole genome sequencing is a prospect within the framework of advanced identification, molecular typing and sequencing of the genomes of plague agent strains.

Key words: plague agent, molecular-genetic methods.

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

Corresponding author: Konstantin A. Nikiforov, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Citation: Nikiforov K.A. Advanced Molecular-Genetic Methods and Prospects for Their Application for the Indication and Identification of *Yersinia pestis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:29–40. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-29-40
Received 05.07.2022. *Accepted* 01.08.2022.

Nikiforov K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4115-9486>

Важнейшими составляющими обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения страны являются санитарная охрана территории Российской Федерации, государственный санитарно-эпидемиологический надзор и меры по его совершенствованию, предупреждение и ликвидация чрезвычайных ситуаций (ЧС) санитарно-эпидемиологического характера и обеспечение биологической безопасности [1]. В текущих социально-экономических и геополитических реалиях чума является одной из актуальных угроз международному санитарно-эпидемиологическому благополучию населения [2].

В соответствии с усовершенствованной внутривидовой классификацией, основанной на данных полногеномного секвенирования, вид *Yersinia pestis* образован семью подвидами: основным и шестью неосновными (тибетский, кавказский, ангольский, центральноазиатский, цинхайский, улегейский). Центральноазиатский подвида состоит из четырех биоваров: алтайского, гиссарского, таласского и *microtus* [3–5]. Штаммы основного подвида отличаются высокой вирулентностью и эпидемической значимостью и делятся на три биовара: античный, средневековый и восточный, – с возможным выделением четвертого биовара – *intermedium*. Штаммы античного биовара формируют нескольких ветвей эволюции. Древняя ветвь античного биовара 0.ANT дала начало другим античным ветвям: 1.ANT, 2.ANT, 3.ANT, 4.ANT. Линия 1.ANT является предковой по отношению к штаммам группы *intermedium* (1.IN) и восточного биовара (1.ORI), а эволюция линии 2.ANT привела к появлению средневекового биовара (2.MED) [6].

В соответствии с трехуровневой системой лабораторной диагностики инфекционных болезней, регламентированной приказами Роспотребнадзора от 17.03.2008 № 88 и от 01.12.2018 № 116, к территориальному уровню относятся лаборатории центров гигиены и эпидемиологии и их филиалов, противочумных станций и противочумных отделений, к региональному – лаборатории центров индикации и диагностики возбудителей инфекционных болезней, региональных центров по мониторингу за возбудителями I–II и II–IV групп патогенности, к федеральному – лаборатории национальных центров верификации диагностической деятельности, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней, в том числе с функциями в рамках Международных медико-санитарных правил. В лабораториях территориального уровня осуществляют индикацию возбудителя с использованием зарегистрированных диагностических

препаратов; на уровне лабораторий регионального уровня проводится подтверждение и идентификация возбудителей; а на федеральном уровне выполняют расширенную идентификацию, молекулярное типирование и секвенирование генома штаммов возбудителя чумы.

В молекулярно-генетической диагностике *Y. pestis* можно выделить следующие этапы: индикация, идентификация и внутривидовая дифференциация штаммов. Первостепенной задачей при поступлении материала на исследование является индикация, подтверждение наличия возбудителя, относимого к виду *Y. pestis*. Решение этой задачи в настоящее время возможно на уровне эпидотряда, развернутого в природном очаге чумы, или на уровне противочумной станции. Следующей задачей является подтверждение, идентификация найденного штамма. Это можно осуществить в лабораториях регионального уровня. Внутривидовая дифференциация и молекулярное типирование штаммов *Y. pestis* с определением принадлежности к определенной филогенетической линии и выяснением возможного места происхождения проводится в научно-исследовательских противочумных институтах федерального уровня.

Широкое использование методов молекулярно-генетической диагностики в системе эпидемиологического надзора за чумой помимо определения принадлежности штамма к той или иной филогенетической линии позволяет оптимизировать и эпидемиологическую диагностику в части слежения за ходом развития эпидемического процесса на территории, дает возможность получения дополнительных сведений о циркуляции штаммов *Y. pestis* с определением источника инфекции, путей и факторов заражения, оперативной корректировки работы зоо групп и эпидотрядов, проведения комплекса профилактических мероприятий.

В настоящее время разработано большое число молекулярно-генетических методов, которые могут быть использованы для индикации, идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы. **Целью** данной работы стало проведение анализа литературных данных по современным молекулярно-генетическим методам с возможностью их применения на том или ином уровне системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ применительно к решению задачи по поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия населения страны. Условно все молекулярно-генетические методы можно разделить на методы анализа длин рестрикционных фрагментов; методы типирования на основе специфических фрагментов; методы, базирующиеся на секвенировании;

ПЦР-методы; методы изотермической амплификации; ДНК-чипы; методы, использующие технологию аптамеров; био- и наносенсоры; ДНК-оригами.

Методы анализа длин рестрикционных фрагментов (RFLP). К этим методам относятся рибо- и IS-типирование, пульс-гельэлектрофорез. В настоящее время эти методы практически не используются, что связано с их громоздкостью и низкой разрешающей способностью.

Методы типирования на основе специфических фрагментов

Метод DFR-типирования (*different region analysis* – анализ различных регионов). Метод основан на анализе наличия или отсутствия DFR (в геноме *Y. pestis* их 23). Используя DFR, можно дифференцировать некоторые подвиды и популяции штаммов [7]. Однако анализ DFR не обладает высокой дифференцирующей способностью, а также отличается громоздкостью, что делает DFR-типирование ограниченно применимым к решению вопросов филогеографии и молекулярной эпидемиологии *Y. pestis*.

Метод анализа переменного числа tandem-повторов (VNTR – *variable number tandem repeats*). Метод обладает высокой дискриминирующей способностью в отношении возбудителя чумы. VNTR-типирование основано на анализе разницы в размере и копийности VNTR-локусов. Примером VNTR-типирования штаммов возбудителя чумы может служить использование 25 локусов (MLVA 25) с применением метода капиллярного или гельэлектрофореза [8] и 43 локусов с применением капиллярного электрофореза. Также разработана третья система MLVA, включающая 14+12 VNTR, которая по способности дифференцировать штаммы чумы показывает результаты, согласующиеся с результатами SNPs-анализа [9].

Метод VNTR-типирования может использоваться для анализа штаммов *Y. pestis*, выделенных во время одной вспышки чумы, однако имеет ограниченную эффективность для филогенетического анализа из-за высокой скорости мутирования VNTR-локусов.

Методы, основанные на секвенировании

MLST (*multilocus sequence typing* – мультилокусное секвенс-типирование). Этот метод основан на анализе фрагментов нескольких генов «домашнего хозяйства», расположенных так, чтобы они не были сцеплены друг с другом [10]. С помощью этого метода возможно проведение дифференциации *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и ряда подвидов *Y. pestis*.

Благодаря значительному снижению стоимости проведения полногеномного секвенирования предложен новый подход для проведения MLST в рамках молекулярно-эпидемиологических исследований – полногеномный MLST (wgMLST), использующий различные типы нуклеотидных различий (SNP, VNTR и INDEL) в открытых рамках считывания (ORF) организма, что значительно расширяет диф-

ференцирующие возможности [11]. Преимуществом wgMLST является низкая вычислительная мощность компьютера, необходимого для проведения анализа. Недостатками метода wgMLST являются недостаточно высокая точность получаемых результатов, а также необходимость проведения анализа высококвалифицированным специалистом.

CRISPR-анализ (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами). В CRISPR-анализе используют последовательности повторяющихся элементов CRISPR (кластерные регулярно разделенные короткие палиндромные повторы, состоящие из прямых повторов длиной 21–37 п.н., разделенных спейсерами) [12]. В геноме *Y. pestis* присутствуют три CRISPR-области: YPa, YPb и YPc. CRISPR-анализ как инструмент для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* не обладает высокой разрешающей способностью и при этом характеризуется дороговизной и достаточно продолжительным временем, необходимым для получения результата.

Таким образом, методы VNTR-, MLST- и CRISPR-анализа могут быть использованы в рамках научно-исследовательской деятельности противочумных институтов РФ при проведении молекулярно-генетических исследований штаммов возбудителя чумы и для молекулярной экспертизы случаев чумы.

Полногеномное секвенирование и SNP-анализ. Полногеномное секвенирование считается одним из самых эффективных методов молекулярного типирования и применяется как для анализа современных штаммов, так и для реконструкции древних геномов *Y. pestis* [13]. Суть метода заключается в исследовании эволюционного порядка дивергенции геномов путем сравнения их нуклеотидных последовательностей и оценки генетической дистанции между парами последовательностей, выражаемых в виде филогенетического дерева. Полногеномный SNP-анализ характеризуется высокой воспроизводимостью результатов и является эффективным инструментом для внутривидовой дифференциации штаммов чумы. Однако проведение такого анализа трудоемко, отличается высокой себестоимостью и нуждается в высокотехнологичном оборудовании и высококвалифицированных кадрах. Но в настоящее время технологии полногеномного секвенирования стремительно развиваются и существуют разработки малогабаритных приборов для секвенирования. В частности, компания Oxford Nanopore Technologies разработала прибор MinION, который можно использовать в полевых условиях и перемещать даже во время работы. Однако для проведения анализа полученного сиквенса все еще необходим высококвалифицированный специалист и мощный компьютер со специальным программным обеспечением. Кроме того, частота ошибки у прибора MinION выше, чем у стационарных секвенаторов. Но не вызывает сомнения, что эти минусы в дальнейшем будут устранены

и возможность использования полногеномного секвенирования в полевых условиях будет повсеместной.

Таким образом, в системе лабораторной диагностики инфекционных болезней Российской Федерации для решения задачи по установлению филогенетического родства штаммов возбудителя чумы и определению их принадлежности к определенным линиям эволюции, а также выяснению источника заноса при проведении эпидемиологического расследования могут быть использованы методы полногеномного секвенирования на уровне научно-исследовательских противочумных институтов.

Методы ПЦР. Одними из наиболее простых, быстрых и доступных методов молекулярно-генетического анализа с низкой себестоимостью являются методы ПЦР-типирования. В их основе лежит многократное копирование специфических локусов ДНК *in vitro* как результат циклического повторения температурных режимов. В литературе имеется информация о значительном числе модификаций ПЦР для повышения ее специфичности и чувствительности: Touchdown ПЦР (ПЦР с этапом постепенного снижения температуры отжига праймеров); ПЦР с перекрывающимися праймерами, или продлением перекрывания (overlap extension PCR) – дает возможность получать длинные фрагменты ДНК, состоящие из двух разных фрагментов без рестрикции и лигирования [14]; метилспецифичная ПЦР (methylation-specific PCR) – применяется, чтобы понять, метилирован ли определенный участок ДНК по цитозину, что позволяет определить, принадлежит ли ДНК живой клетке [15]; «холодная» ПЦР (COLD-PCR – CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR) – эффективна, когда необходимо обнаружить, однонуклеотидную мутацию гена, но при этом проба содержит ДНК-матрицу как с мутантным геном, так и с геном дикого типа (в основе «холодной» ПЦР лежит тот факт, что замена даже одного нуклеотида в одной из цепей ДНК-фрагмента приводит к изменению его температуры плавления, в результате подбора критической температуры денатурации эффективность ПЦР резко падает из-за малого числа денатурированных матриц) [16]; цифровая ПЦР (digital PCR) – точный и воспроизводимый метод количественного определения ДНК. При проведении цифровой ПЦР пробу делят на большое количество маленьких субъединиц (компарментов) и проводят ПЦР в каждой из них отдельно. Этот метод обладает большей точностью, чем ПЦР-РВ, при этом он дороже и более трудоемок, но, возможно, в будущем получит большее распространение. В настоящее время работы в этом направлении активно ведутся, в частности компанией Bio-Rad разработана система QX200 для одновременного проведения высокоточной цифровой ПЦР у 96 образцов.

Однако на современном этапе своего развития большинство из этих методов ПЦР-типирования характеризуются громоздкостью, относительно низкой межлабораторной воспроизводимостью и низкой

разрешающей способностью для проведения внутривидовой дифференциации *Y. pestis*.

Одним из самых эффективных, быстрых и точных вариантов ПЦР с возможностью одновременной детекции нескольких ДНК-локусов является ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Высокой специфичностью и низким уровнем фонового свечения красителей характеризуется способ применения олигонуклеотидных зондов с ковалентно связанными с ними флуоресцентными красителями на 5'-конце и гасителями флуоресценции на 3'-конце (TaqMan-зонды) [17]. К настоящему времени разработано множество вариантов зондов для детекции ампликонов в ПЦР-РВ. Одним из таких способов является использование праймер-зондов «Скорпион», имеющих две метки по типу «шпилька – петля» из-за комплементарной последовательности на 5'- и 3'-конце. Использование праймер-зондов «Скорпион» повышает точность детекции, гарантируя практически полное отсутствие фонового свечения [18]. Еще одним вариантом детекции ампликонов в ПЦР-РВ является FRET (Fluorescence resonance energy transfer), принцип которого заключен в использовании двух зондов, разделенных друг от друга 1–3 нуклеотидами [19]. Также разработан вариант ПЦР-РВ с использованием зондов с комплементарными концевыми последовательностями (molecular beacons) [20].

ПЦР-РВ применяется для индикации, идентификации и дифференциации штаммов возбудителя чумы с использованием хромосомных и плазмидных мишеней. В Российской Федерации зарегистрированы следующие наборы реагентов: «Набор реагентов для ускоренной идентификации штаммов *Y. pestis* методом мультилокусной ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Y. pestis* идентификация – РГФ)», «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» производства РосНИПЧИ «Микроб» [21]; «АмплиСенс *Y. pestis* – FL» производства ЦНИИ эпидемиологии; «ОМ-Скрин-Чума-РВ» производства ЗАО «Синтол».

М.С. Thomas *et al.* разработали способ детекции патогенных для человека микроорганизмов из рода *Yersinia* в образцах пищевых продуктов, сочетающий в себе мультиплексную ПЦР-РВ и пиросеквенирование для обнаружения и дифференциации патогенных иерсиний с высокой степенью достоверности [22].

Особое внимание привлекают работы, направленные на упрощение SNP-анализа путем использования для выявления полиморфных нуклеотидов амплификационных технологий. Аллель-специфическая ПЦР (АС-ПЦР) основана на использовании двух аллель-специфичных праймеров, у которых 3'-концевой нуклеотид комплементарен SNP, и третьего общего праймера [23]. Метод основан на разной эффективности элонгации спаренного и неспаренного 3'-нуклеотида Taq-полимеразой, что должно приводить к отсутствию продукта амплификации при неполной комплементарности

3'-концевого нуклеотида праймера и SNP. Но в реальности полное ингибирование реакции отмечается не всегда. Повышение точности АС-ПЦР возможно путем использования дополнительных неспаренных нуклеотидных оснований на 3'-конце праймера. Для АС-ПЦР предложен ряд вариаций, повышающих производительность, скорость анализа, а также дающих возможность количественного определения ДНК-мишени [24]. А. J. Vogler *et al.* разработали АС-ПЦР с зондами TaqMan-MGB для детекции SNPs, характерных для штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Северной Америки [25]. АС-ПЦР-PB занимает меньше времени, является более экономически выгодной и чувствительной по сравнению с прямым секвенированием ДНК по Сенгеру.

Основываясь на приведенных выше фактах, становится очевидно, что ПЦР-PB – высокоточный, быстрый и надежный метод индикации, идентификации и дифференциации штаммов чумы в исследуемом материале. В настоящее время ПЦР-PB используется на всех уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ (начиная с мобильных лабораторий СПЭБ и эпидотрядов и заканчивая противочумными институтами), что позволяет проводить быструю индикацию, идентификацию и дифференциацию штаммов *Y. pestis*.

Иммуно-ПЦР (иПЦР, IPCR). Метод разработан сотрудниками Калифорнийского университета в Беркли в 1992 г. [26]. Суть метода заключается в следующем: пробы, где проводят детекцию определенной молекулы (гормон, токсин и др.), вносят в специальные пробирки, материал которых характеризуется высокой антигенсвязывающей способностью и термостойкостью. Затем добавляют специфические антитела со связанными с ними ДНК-фрагментами длиной 150–300 п.н. После связывания антител с искомыми антигенами, иммобилизованными на стенках пробирок, осуществляют промывку. Затем в пробирки вносят смесь для ПЦР-PB и проводят реакцию, в результате которой амплифицируются ДНК-фрагменты на антителах, связавшихся с антигенами. Как итог получают сведения о наличии антигенов и их количестве в пробе [27]. По разрешающей способности иммуно-ПЦР превосходит ИФА на 2–5 порядков и позволяет детектировать антиген при невозможности концентрирования пробы. Также иммуно-ПЦР дает возможность одновременного обнаружения множества различных антигенов, так как с ними связаны разные ДНК-фрагменты. В работе N. Malou *et al.* показано, что иммуно-ПЦР является эффективным методом для обнаружения антигенов *Y. pestis* в пробах, полученных из массовых древних захоронений людей, погибших от чумы [28]. Иммуно-ПЦР является довольно интересным и перспективным методом, который может быть использован для детекции антигенов чумы на уровне противочумных станций и институтов.

Твердофазная амплификация (SPA – solid phase amplification). Это еще один вариант ампли-

фикации ДНК, который был представлен С. Adessi *et al.* [29]. Основная идея этого метода заключается в прикреплении праймеров (через их 5'-конец) к твердой поверхности (кремнезему, гранулам полистирола). Это ограничивает амплификацию двумерными поверхностями и, следовательно, позволяет легко проводить амплификацию многих ДНК-мишеней в единой системе.

Методы изотермической амплификации – альтернативы ПЦР. В литературе имеются данные о множестве методов изотермической амплификации ДНК или РНК: системы амплификации на основе транскрипции (TAS), самоподдерживающаяся реакция репликации последовательности (3SR), амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты (NASBA), амплификация со смещением цепи (SDA), репликация по вращающемуся кругу (RCR), изотермическая амплификация, опосредованная петлей (LAMP), хеликазозависимая амплификация (HDA), изотермическая амплификация с одним праймером (SPIA) и кросс-прайминг-амплификация (CPA). TAS, 3SR, NASBA, SDA, HDA и SPIA требуют нескольких ферментов (трех или более) и тщательной оптимизации. RCR, LAMP и CPA могут эффективно протекать при постоянной температуре с помощью одного фермента.

Изотермическая амплификация, опосредованная образованием петель (LAMP – loop-mediated isothermal amplification). Метод впервые описан в 2000 г. [30]. В этом методе используется *Bst*-полимераза, полученная из *Geobacillus stearothermophilus*, совмещающая полимеразную и хеликазную активности, что позволяет исключить фазу денатурации и проводить реакцию при 60–65 °C. LAMP также отличается от обычной ПЦР тем, что при ее проведении используется не одна, а две или три пары праймеров, что повышает специфичность реакции, но в то же время повышает вероятность артефактов. В исследовании R. Singh *et al.* разработали пару LAMP для быстрого обнаружения *Y. pestis*, использующих 6 праймеров, рассчитанных на гены *cafI* и участок 3a [31]. Работа J. Jin *et al.* посвящена разработке метода LAMP с микрожидкостным чипом (LAMP на чипе) для одновременного обнаружения 10 патогенных бактерий, передающихся через воду: *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus* и *Yersinia enterocolitica* [32]. Вариантом LAMP является предложенная W. Liu *et al.* [33] полимеразная спиральная реакция (PSR), требующая одну пару праймеров и один фермент. Последовательности прямого и обратного праймеров обратны друг другу на их 5'-конце, тогда как их 3'-концевые последовательности комплементарны специфическим последовательностям ДНК-мишеней. Использование LAMP дает возможность эффективной детекции *Y. pestis* с высокой чувствительностью и специфичностью в биологических

образцах человека. Метод обладает потенциалом для использования в полевых условиях во время вспышек в условиях ограниченных ресурсов.

Хеликазозависимая амплификация (HDA – helicase-dependent amplification). В 2004 г. сотрудники компании New England Biolabs (NEB) предложили еще одну альтернативу полимеразной цепной реакции – хеликазозависимую амплификацию. Авторы использовали хеликазу UvrD *Escherichia coli*, SSB-белки gp32 фага T4 и фрагмент Клёнова *exo-*. Хеликаза разделяет цепи ДНК, SSB-белки связывают и стабилизируют цепи в этом положении, а фрагмент Клёнова осуществляет синтез новой цепи ДНК. Реакция протекает при 37 °С. Предварительная денатурация ДНК при 95 °С перед ее постановкой повышает эффективность в 1,5–2 раза. В настоящее время выпускаются коммерческие наборы, содержащие вместо фрагмента Клёнова *Bst*-полимеразу, а вместо UvrD *E. coli* – термостабильную хеликазу UvrD *Thermoanaerobacter tengcongensis* (*Tte*-UvrD), что дает возможность проведения реакции при 65 °С. Недостатками этого метода являются необходимость проведения предварительной денатурации образца для получения результатов, сравнимых с результатами стандартной ПЦР, и тот факт, что максимальный размер амплифицируемого фрагмента не превышает 120 п.н. Согласно данным литературы, HDA обладает большей диагностической чувствительностью, чем LAMP. Использование же хелимеразы (особым образом сшитые *Tte*-UvrD и *Bst*-полимераза), разработанной компанией BioHelix, позволяет повысить размер амплифицируемого фрагмента до 1500 п.н.

Рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА). Метод разработан в 2006 г. учеными из биотехнологической компании TwistDX LTD. Основным отличием РПА от обычной ПЦР является возможность протекания реакции при комнатной температуре (25 °С), однако оптимальной температурой является диапазон 37–40 °С. В РПА используются большой фрагмент *Bsu*-полимеразы, SSB-белки gp32 фага T4 и его же рекомбиназа *UvsX*. Часть молекул рекомбиназы соединяют с одним праймером, часть – с другим. Процесс протекания РПА является АТФ-зависимым, поскольку энергия требуется для освобождения 3'-конца праймера от молекул рекомбиназы. Размер амплифицируемого фрагмента ограничен тысячей пар нуклеотидов, а минимальная длина праймера должна составлять 30 нуклеотидов. Время, требуемое для проведения РПА, намного меньше, чем для стандартной ПЦР (может длиться 15–30 минут). Этот метод амплификации не обладает значительными недостатками (основным недостатком является необходимость строгого соблюдения условий реакции) и может использоваться как РПА с обратной транскрипцией и РПА в реальном времени. О. Mayboroda *et al.* использовали твердофазную РПА для оптического обнаружения *Y. pestis* [34]. Система продемонстрировала высокую специфичность.

Амплификация с обменом цепей (SEA – strand exchange amplification). SEA – это простая реакция изотермической амплификации, опосредованная «пузырьками» денатурации (небольшие по протяженности локальные участки расхождения цепей ДНК), требующая только одной пары праймеров и одной ДНК-полимеразы [35]. Метод отличается простотой и быстротой, но на современном этапе пригоден лишь для обнаружения коротких фрагментов ДНК, хотя и отличается высокой чувствительностью, то есть может быть использован лишь для первичной детекции патогена. Этот метод применялся вместе с анализом «бокового потока» (LFA) (стрип-биосенсор с сухим реагентом, методологически напоминающий ИХА-тест) для визуальной детекции нуклеиновых кислот. А метод LFA как самостоятельный метод использовался для анализа при оказании скорой медицинской помощи из-за своих преимуществ: отсутствия необходимости предварительной обработки образцов, удобства, небольшого времени на проведение анализа, относительной дешевизны и отсутствия необходимости квалифицированных специалистов и дорогостоящего оборудования. Метод LFA эффективно применялся для обнаружения белков, токсинов, нуклеиновых кислот и однонуклеотидных полиморфизмов геномной ДНК. А.А. Zasada *et al.* применили три метода изотермической амплификации ДНК: LAMP, HDA и RPA – в сочетании с методом LFA для быстрой индикации ДНК *B. anthracis*, *Y. pestis* и *F. tularensis* [36]. Недостатком разработанного метода является относительно высокий риск получения ложноположительных результатов. Также в литературе есть информация о разработке быстрых и достаточно точных способов детекции *Y. pestis* методом LFA [37].

Импульсная амплификация (PCA – pulse-controlled amplification). PCA – это технология амплификации нуклеиновых кислот, использующая быстрые импульсы энергии для нагрева (с помощью металлических нагревательных элементов, встроенных непосредственно в реакцию амплификации). Нагревание и охлаждение длятся несколько микросекунд, что обеспечивает сверхбыстрое циклирование, в течение которого происходит амплификация целевой последовательности. Это снижает общее время амплификации до 10 раз, что обеспечивает получение результата за 15 минут при работе на небольшом портативном прототипе устройства. Примером перспективности использования этой технологии является разработка PCA для обнаружения ДНК *Y. pestis* [38].

SHERLOCK (specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking). Метод сочетает преамплификацию нуклеиновых кислот с энзимологией CRISPR-Cas для распознавания специфических последовательностей ДНК или РНК. Метод основан на проведении нескольких реакций, первой из которых является рекомбиназная полимеразная амплификация, о которой написано выше. После этого смесь

олигонуклеотидов подвергается транскрипции с использованием Т7 РНК-полимеразы, промотор которой находится в праймерах, использованных в РПА. В результате получается смесь нуклеиновых кислот, обогащенная молекулами РНК искомой нуклеотидной последовательности. После этого этапа используется система CRISPR-Cas: в качестве зонда используется сгРНК, часть последовательности которой комплементарна искомой нуклеотидной последовательности полинуклеотида-мишени. Образующийся РНК-дуплекс приводит к активации фермента нуклеазы – неспецифичной Cas13a. При связывании с дуплексом Cas13a неспецифично ферментирует свободные нуклеиновые кислоты и в результате достигает флуоресцентно-меченых РНК-сенсоров, в избытке находящихся в этой системе. Расщепление РНК-сенсоров детектируется флуориметром и говорит об успешности протекания реакции. Метод выглядит перспективно и многообещающе, обладает высокой специфичностью. Проведение анализа методом SHERLOCK возможно при 37 °С и для детекции не требуется наличие амплификатора для ПЦР-РВ, что говорит о перспективности его использования в полевых условиях. В литературе имеются данные о разработке SHERLOCK для детекции всех видов *Plasmodium*, вызывающих малярию у человека [39], для обнаружения вируса SARS-CoV-2 [40].

Методы изотермической амплификации представляют собой очень перспективное направление развития молекулярной диагностики, которое в будущем, возможно, полностью вытеснит стандартную ПЦР-РВ в силу своих преимуществ в виде удобства, небольшого времени на проведение анализа, относительной дешевизны и отсутствия необходимости квалифицированных специалистов и дорогостоящего оборудования, поскольку реакции идут при одной температуре. Эти методы могут быть использованы на всех уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ для проведения индикации, идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов чумы.

ДНК-чипы. Это биологические макромолекулы, расположенные на специальном носителе, способные избирательно связывать вещества, содержащиеся в анализируемом растворе. ДНК-чипы были разработаны для минисеквенирования *de novo*. С течением времени ДНК-чипы стали использовать для решения более широкого круга задач: сравнения нуклеотидных последовательностей, исследования процесса гибридизации, поиска SNPs, секвенирования, оценки стабильности вторичной структуры ДНК. Метод ДНК-чипов базируется на гибридизации ампликонов, полученных в ПЦР и несущих флуоресцентный краситель с расположенными на стекле уникальными ДНК-зондами. В литературе имеется информация о разработке биочипов отечественными и зарубежными исследователями. Например, в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Москва) разработан биочип для детекции возбу-

лей натуральной оспы, сибирской язвы, гепатитов В и С, ВИЧ-1, вируса гриппа А [41]. В литературе есть сведения о разработке ДНК-чипов для выявления вируса гриппа; детекции генов антибиотикоустойчивости; для детекции и идентификации энтерогеморрагической *E. coli* O157:H7 и *V. cholerae* O139; идентификации возбудителей неонатальных заболеваний и кариотипических изменений; индикации ДНК вируса птичьего гриппа (AIV) [42]. В работе V. Srinivasan *et al.* говорится о разработке ДНК-чипа для одновременной детекции 14 бактериальных патогенов, выделяемых из воды и пищевых продуктов: *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Cryptosporidium parvum*, *Mycoplasma genitalium*, *Streptococcus agalactiae* и *Proteus mirabilis* [43]. Показана эффективность использования ДНК-чипов как дополнительного инструмента (для связывания определенных ДНК-локусов перед последующим секвенированием) при проведении палеогенетических исследований.

Для детекции возбудителей особо опасных инфекций сконструировано 4 ДНК-чипа: для детекции *B. anthracis* (Affymetrix, США), *Brucella melitensis* (University of Namur, США), *V. cholerae* O1 (Nimblegen, США) и *E. coli* O157 (Agilent Technologies, США). Сконструирован ДНК-чип для индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию основных генов вирулентности [44].

Дальнейшее развитие и усовершенствование технологии ДНК-чипов для индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций предоставит возможность расширения круга эпидемиологических задач, проведения экспресс-диагностики многих признаков в одном анализе. Кроме того, биочипы могут быть использованы для дифференциации и типирования штаммов возбудителей опасных инфекций и определения их эпидемического потенциала, что позволит повысить эффективность анализа при эпидемиологических расследованиях и определении путей распространения и заноса штаммов возбудителей. Технология ДНК-чипов может быть использована в противочумных станциях и институтах.

Аптамеры. Аптамеры – однопептидные молекулы ДНК или РНК, способные формировать сложную трехмерную пространственную структуру, комплементарную другим поверхностям и, следовательно, обладающую возможностью «узнавать» другие молекулы или проявлять каталитическую активность [45]. Для получения аптамеров разработан метод, получивший название SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения) [46]. Принцип метода заключен

в отборе и воспроизведении из смеси случайных фрагментов нуклеиновых кислот, способных соединяться со специфичными молекулами-мишенями. Отбор состоит из трех стадий: случайная библиотека, содержащая значительное число коротких нуклеотидных последовательностей, способных к формированию разнообразных трехмерных структур, инкубируется с молекулой-мишенью; затем осуществляется разделение связанных и несвязанных олигонуклеотидов; после чего олигонуклеотиды, связавшиеся с мишенью, отделяются и амплифицируются. В результате формируется обогащенная библиотека, которую затем клонируют, и идентифицируют последовательности аптамеров, прошедших этот отбор. В большинстве экспериментов по подбору аптамеров используются библиотеки, содержащие олигонуклеотиды длиной 20–60 нуклеотидов.

Области применения аптамеров очень широки: изучение механизмов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами: получение высокоэффективных и специфичных ингибиторов белков-мишеней, в том числе облегчая распознавание патогена иммунной системой макроорганизма; направленная доставка лекарственных препаратов; использование в ИФА, иммуно-ПЦР, биосенсорах [47], ДНК-чипах [48] и других методах молекулярно-генетической диагностики. В литературе есть данные по разработке диагностических подходов на основе аптамеров по детекции возбудителя Крымской-Конго геморрагической лихорадки [49], *Cronobacter sakazakii*, *Shigella flexneri*. Аптамеры являются функциональными аналогами моноклональных антител, но они обладают преимуществами перед антителами: получить аптамеры намного проще, дешевле и быстрее, они обладают значительно меньшим размером и, следовательно, легче проникают в ткани и клетки, могут обладать более высокой аффинностью и специфичностью. В настоящее время ведется активная работа по совершенствованию отбора аптамеров, в частности по разработке автоматизированных систем отбора аптамеров. Технология аптамеров, безусловно, является одним из перспективных направлений развития современной молекулярной диагностики и генетики и может быть использована на базе противочумных институтов РФ.

Биосенсоры. Биосенсоры – аналитические устройства, детектирующие определенные молекулы в биологических материалах и выводящие информацию об их наличии и количестве в виде электрического сигнала. Автором первого биосенсора и биосенсорной концепции как таковой является Леланд Кларк (L.C. Clark Jr.) [50] с работой о применении изобретенного им кислородного электрода, получившего затем название электрода Кларка. Наносенсоры – биологические, химические или другие сенсорные точки, передающие информацию о наночастицах на макроскопический уровень. В своей основе наносенсоры имеют квантовые точки – фрагменты проводника или полупроводника, носители

заряда которого ограничены в пространстве по всем трем измерениям [51]. Основными функциональными элементами биосенсоров являются рецептор, физический преобразователь (транзьюсер) и рабочая среда. Принцип действия базируется на взаимодействии рецептора с исследуемым материалом и последующей регистрации взаимодействия транзьюсером и преобразовании в электрический сигнал. В своей основе современные биосенсоры имеют чувствительные полимеры – материалы, способные испытывать обратимые или необратимые изменения физических свойств и/или химической структуры, взаимодействуя с внешними факторами. В зависимости от транзьюсера можно выделить пять основных типов биосенсоров: электрохимические, основанные на измерении электрического тока как результата окисления или восстановления электрохимически активных веществ (среди них выделяют амперометрические, потенциометрические, кондуктометрические и импедансометрические); пьезоэлектрические, основанные на измерении массы, плотности; калориметрические, основанные на измерении количества теплоты, выделяемой при взаимодействии анализируемого соединения с рецептором; оптические, основанные на измерении интенсивности поглощения или отражения света, люминесценции и др.; биосенсоры, основанные на поверхностном плазмонном резонансе, в своей основе имеют определение изменения показателя преломления среды. По виду детектируемых молекул биосенсоры можно разделить на геносенсоры, белковые сенсоры, иммуносенсоры и биосенсоры, детектирующие другие химические вещества. В зависимости от механизма распознавания геносенсоры можно разделить: на гибридизационные – базируются на способности одноцепочечной ДНК распознавать и специфически связываться с комплементарными ей нуклеотидными последовательностями; интеркаляционные – основаны на интеркаляции химических веществ в структуру ДНК; аптамерные – используют специфичные ДНК-аптамеры. Также в настоящее время в биосенсоры активно внедряются методы изотермической амплификации и CRISPR/Cas-системы.

В литературе описаны биосенсоры для индикации иридовирусов, норовирусов, герпесвирусов, вируса Чикунгунья, вируса Зика, вируса гриппа, некоторых онкогенов, *Listeria monocytogenes*, некоторых грибов, простейших, бактерий рода *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Clostridium tetani*, *Mycobacterium tuberculosis*, для обнаружения F1 антигена *Y. pestis* [52], бактерий рода *Yersinia* [53]. К сильным сторонам биосенсоров можно отнести высокую чувствительность и специфичность, возможность детекции органических и неорганических молекул, быстрое действие и многократное использование. Удачное сочетание скорости получения результата, стоимости, мобильности и небольшого размера делают их отличными кандидатами для работы в полевых условиях, что указывает на возможность их использования на всех уровнях

системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ.

ДНК-оригами (DNA-Origami). Это технология направленного синтеза молекул ДНК, обладающих способностью к самоорганизации в заранее смоделированные объекты. Впервые о создании и использовании 3D-структур из ДНК сообщили в 1982 г. [54]. Результаты этого исследования N.C. Seeman стали основой для последующей работы P.W. Rothemund [55], в которой описан метод получения ДНК-структур с определенной формой. ДНК-оригами могут иметь несколько функциональных групп на поверхности, специфически связывающих определенную молекулу, и в результате могут быть использованы для детекции. Использование в ДНК-оригами аптамеров и иных лигандов дает возможность конструирования сенсорных биочипов и биосенсоров для выявления нуклеиновых кислот, вплоть до отдельных SNP, белков и других соединений, в том числе наноразмеров. Специфичность детекции повышается путем размещения ДНК-оригами на твердой подложке, в результате ДНК-структуры располагаются в определенном порядке в необходимой ориентации. M. Raveendran *et al.* сообщили о разработке биосенсора на основе ДНК-оригами с центральной полостью со специфичным для мишени ДНК-аптамером, который может быть использован для детекции отдельных молекул биомаркеров в клинических образцах [56]. В литературе есть данные о разработке прототипа системы для генотипирования вируса гепатита В с использованием ДНК-оригами и для детекции РНК вируса Зика [57]. Также ДНК-оригами могут быть использованы для конструирования систем доставки лекарств и для формирования наноразмерных литографических масок, а в перспективе – разработки электронных устройств на основе ДНК. Технология ДНК-оригами в настоящее время активно развивается, и ее перспективность не вызывает сомнений, в рамках системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ этот метод может быть использован на уровне противочумных институтов.

Методы с использованием нейронных сетей. Нейронная сеть представляет собой математическую модель, ее программную и аппаратную реализацию, сконструированную подобно биологическим сетям нервных клеток. В настоящее время нейросети стремительно развиваются и каждый год находят применение в новых сферах деятельности: прогноз финансовых изменений, психодиагностика, хемоинформатика, нейроуправление, экономика. В работе B. Yang *et al.* предпринимается попытка использования сверточной нейронной сети (сеть морфологии молекулы – MMNet), в основе которой лежит анализ морфологических и молекулярных характеристик для разделения на отдельные виды насекомых и рыб [58]. Использование нейросетей, безусловно, обладает большим потенциалом во всех сферах человеческой деятельности, но в на-

стоящее время для решения задач биоинформационного анализа требуется дальнейшее усложнение и развитие этого метода.

В результате проведенного анализа литературных данных можно сделать вывод о стремительном развитии новых методов молекулярной диагностики и генетики. Основными направлениями этого развития являются повышение оперативности, многофакторности и упрощение использования с отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании и высококвалифицированных специалистах для проведения анализа. Все многообразие современных молекулярно-генетических методов можно условно и обобщенно разделить: на методы, основанные на анализе длин рестрикционных фрагментов; методы типирования на основе специфических фрагментов; методы, основанные на секвенировании; ПЦР-методы; методы изотермической амплификации; ДНК-чипы; методы, использующие технологию аптамеров; био- и наносенсоры; ДНК-оригами. В Российской Федерации для решения задач по поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия населения и развитию эпидемиологического надзора путем совершенствования способов индикации, идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы перспективным является внедрение новых технологий. На всех уровнях системы лабораторной диагностики возможно использование методов, основанных на ПЦР, изотермической амплификации, SHERLOCK, биосенсорах, малогабаритных приборах для секвенирования. На территориальном уровне на противочумных станциях перспективным выглядит использование иммуно-ПЦР и SPA для проведения индикации *Y. pestis*. На региональном уровне выглядит многообещающим внедрение технологий, основанных на использовании аптамеров, ДНК-чипов для подтверждения и идентификации *Y. pestis*. А для федерального уровня перспективно внедрение методов ДНК-оригами и стремительно развивающихся новых технологий полногеномного секвенирования в рамках выполнения расширенной идентификации, молекулярного типирования и секвенирования геномов штаммов возбудителя чумы.

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

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Концептуальные основы биологической безопасности. Часть 1. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013; 10:4–13.
2. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2006; 2:5–9.
3. Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Кутырев В.В. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64.

4. 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.
5. Никифоров К.А., Морозов О.А., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Популяционная структура, таксономия и генетические особенности штаммов *Yersinia pestis* центральноазиатского подвида. *Генетика*. 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.
6. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., 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., Song J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Wang Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
7. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярное типирование *Yersinia pestis*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 2:3–12.
8. Zhang Y., Luo T., Yang C., Yue X., Guo R., Wang X., Buren M., Song Y., Yang R., Cao H., Cui Y., Dai X. Phenotypic and molecular genetic characteristics of *Yersinia pestis* at an emerging natural plague focus, Junggar Basin, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 98(1):231–7. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0195.
9. Wang P., Shi L., Zhang F., Guo Y., Zhang Z., Tan H., Cui Z., Ding Y., Liang Y., Liang Y., Yu D., Xu J., Li W., Song Z. Ten years of surveillance of the Yulong plague focus in China and the molecular typing and source tracing of the isolates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(3):e0006352. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006352.
10. Nour El-Din H.T., Yassin A.S., Ragab Y.M., Hashem A.M. Phenotype-genotype characterization and antibiotic-resistance correlations among colonizing and infectious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from intensive care units. *Infect. Drug Resist.* 2021; 14:1557–71. DOI: 10.2147/IDR.S296000.
11. Jolley K.A., Maiden M.C. Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future Microbiol.* 2014; 9(5):623–30. DOI: 10.2217/fmb.14.24.
12. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) for the genotyping of bacterial pathogens. *Methods Mol. Biol.* 2009; 551:105–16. DOI: 10.1007/978-1-60327-999-4_9.
13. Spyrou M.A., Keller M., Tukhbatova R.I., Scheib C.L., Nelson E.A., Andrades Valtueña A., Neumann G.U., Walker D., Alterauge A., Carty N., Cessford C., Fetz H., Gourvenec M., Hartle R., Henderson M., von Heyking K., Inskip S.A., Kacki S., Key F.M., Knox E.L., Later C., Maheshwari-Aplin P., Peters J., Robb J.E., Schreiber J., Kivisild T., Castex D., Lösch S., Harbeck M., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes. *Nat. Commun.* 2019; 10(1):4470. DOI: 10.1038/s41467-019-12154-0.
14. Chen F., Ye J., Liu W., Chio C., Wang W., Qin W. Knockout of a highly GC-rich gene in *Burkholderia pyrrocinia* by recombineering with freeze-thawing transformation. *Mol. Plant Pathol.* 2021; 22(7):843–57. DOI: 10.1111/mpp.13058.
15. Yang S., Yuan Z.J., Zhu Y.H., Chen X., Wang W. lncRNA PVT1 promotes cetuximab resistance of head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting miR-124-3p. *Head Neck*. 2021; 43(9):2712–23. DOI: 10.1002/hed.26742.
16. Mortazavipour M.M., Shahbazi S., Mahdian R. Detection of paternal IVS-II-1 (G>A) (*HBB*: c.315+1G>A) mutation in cell-free fetal DNA using COLD-PCR assay. *Hemoglobin*. 2020; 44(3):168–73. DOI: 10.1080/03630269.2020.1768864.
17. Kane S.R., Shah S.R., Alfaro T.M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis*. *J. Microbiol. Methods*. 2019; 162:21–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.05.005.
18. Siggillino A., Ulivi P., Pasini L., Reda M.S., Chiadini E., Tofanetti F.R., Baglivo S., Metro G., Crinó L., Delmonte A., Minotti V., Roila F., Ludovini V. Detection of *EGFR* mutations in plasma cell-free tumor DNA of TKI-treated advanced-NSCLC patients by three methodologies: Scorpion-ARMS, PNAclamp, and Digital PCR. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10(12):1062. DOI: 10.3390/diagnostics10121062.
19. Schneider R., Lamien-Meda A., Auer H., Wiedermann-Schmidt U., Chiodini P.L., Walochnik J. Validation of a novel FRET real-time PCR assay for simultaneous quantitative detection and discrimination of human *Plasmodium* parasites. *PLoS One*. 2021; 16(6):e0252887. DOI: 10.1371/journal.pone.0252887.
20. Sherrill-Mix S., Hwang Y., Roche A.M., Glascock A., Weiss S.R., Li Y., Haddad L., Deraska P., Monahan C., Kromer A., Graham-Wooten J., Taylor L.J., Abella B.S., Ganguly A., Collman R.G., Van Duyn G.D., Bushman F.D. Detection of SARS-CoV-2 RNA using RT-LAMP and molecular beacons. *Genome Biol.* 2021; 22(1):169. DOI: 10.1186/s13059-021-02387-y.
21. Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ситмбетов Д.А., Осина Н.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-PTФ». *Проблемы осо-*
- бо опасных инфекций*. 2021; 4:90–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95.
22. Thomas M.C., Janzen T.W., Husczyzsky G., Mathews A., Amoako K.K. Development of a novel multiplexed qPCR and Pyrosequencing method for the detection of human pathogenic *Yersinia*. *Int. J. Food. Microbiol.* 2017; 257:247–53. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.019.
23. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(7):2503–16. DOI: 10.1093/nar/17.7.2503.
24. Cai L., Kong F., Jelfs P., Gilbert G.L., Sintchenko V. Rolling circle amplification and multiplex allele-specific PCR for rapid detection of *katG* and *inhA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2009; 299(8):574–81. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.05.006.
25. Vogler A.J., Driebe E.M., Lee J., Auerbach R.K., Allender C.J., Stanley M., Kubota K., Andersen G.L., Radnedge L., Worsham P.L., Keim P., Wagner D.M. Assays for the rapid and specific identification of North American *Yersinia pestis* and the common laboratory strain CO92. *Biotechniques*. 2008; 44(2):201, 203–204, 207. DOI: 10.2144/000112815.
26. Sano T., Smith C.L., Cantor C.R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*. 1992; 258(5079):120–2. DOI: 10.1126/science.1439758.
27. Jayathilake C., Nemoto N. cDNA Display-mediated immuno-PCR (cD-IPCR): An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. *Methods Mol Biol.* 2021; 2261:307–21. DOI: 10.1007/978-1-0716-1186-9_19.
28. Malou N., Tran T.N., Nappez C., Signoli M., Le Forestier C., Castex D., Drancourt M., Raoult D. Immuno-PCR – a new tool for paleomicrobiology: the plague paradigm. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31744. DOI: 10.1371/journal.pone.0031744.
29. Adessi C., Matton G., Ayala G., Turcatti G., Mermoud J.J., Mayer P., Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(20):E87. DOI: 10.1093/nar/28.20.E87.
30. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.E63.
31. Singh R., Pal V., Tripathi N.K., Goel A.K. Development of a pair of real-time loop mediated isothermal amplification assays for detection of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Mol. Cell Probes*. 2020; 54:101670. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101670.
32. Jin J., Duan L., Fu J., Chai F., Zhou Q., Wang Y., Shao X., Wang L., Yan M., Su X., Zhang Y., Pan J., Chen J. A real-time LAMP-based dual-sample microfluidic chip for rapid and simultaneous detection of multiple waterborne pathogenic bacteria from coastal waters. *Anal. Methods*. 2021; 13(24):2710–21. DOI: 10.1039/d1ay00492a.
33. Liu W., Dong D., Yang Z., Zou D., Chen Z., Yuan J., Huang L. Polymerase spiral reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method. *Sci. Rep.* 2015; 5:12723. DOI: 10.1038/srep12723.
34. Mayborda O., Gonzalez Benito A., Sabaté del Rio J., Svobodova M., Julich S., Tomaso H., O'Sullivan C.K., Katakis I. Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(3):671–6. DOI: 10.1007/s00216-015-9177-1.
35. Shi L., Yang G., Zhang Z., Xia L., Liang Y., Tan H., He J., Xu J., Song Z., Li W., Wang P. Reemergence of human plague in Yunnan, China in 2016. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0198067. DOI: 10.1371/journal.pone.0198067.
36. Zasada A.A., Zacharczuk K., Formińska K., Wiatrzyk A., Ziolkowski R., Malinowska E. Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. *Anal. Biochem.* 2018; 560:60–6. DOI: 10.1016/j.ab.2018.09.008.
37. Kortli S., Jauset-Rubio M., Tomaso H., Abbas M.N., Bashammakh A.S., El-Shahawi M.S., Alyoubi A.O., Ben-Ali M., O'Sullivan C.K. *Yersinia pestis* detection using biotinylated dNTPs for signal enhancement in lateral flow assays. *Anal. Chim. Acta*. 2020; 1112:54–61. DOI: 10.1016/j.aca.2020.03.059.
38. Müller K., Daßen S., Holowachuk S., Zwirgmaier K., Stehr J., Buersgens F., Ullerich L., Stoecker K. Pulse-Controlled Amplification – A new powerful tool for on-site diagnostics under resource limited conditions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(1):e0009114. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009114.
39. Cunningham C.H., Hennelly C.M., Lin J.T., Ubalee R., Boyce R.M., Mulogo E.M., Hathaway N., Thwai K.L., Phanuz F., Kalonji A., Mwandagaliwa K., Tshefu A., Juliano J.J., Parr J.B. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of *Plasmodium* detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping. *EBioMedicine*. 2021; 68:103415. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103415.
40. Schermer B., Fabretti F., Damagnez M., Di Cristanziano V., Heger E., Arjune S., Tanner N.A., Imhof T., Koch M., Ladha A., Joung J., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Burst V., Zhang F.,

- Klein F., Benzing T., Müller R.U. Rapid SARS-CoV-2 testing in primary material based on a novel multiplex RT-LAMP assay. *PLoS One*. 2020; 15(11):e0238612. DOI: 10.1371/journal.pone.0238612.
41. Савватеева Е.Н., Дементьева Е.И., Цыбульская М.В., Осипова Т.В., Рябых Т.П., Турыгин А.Ю., Юрасов Р.А., Заседателев А.С., Рубина А.Ю. Биологический микрочип для одновременного количественного иммунологического анализа маркеров онкологических заболеваний в сыворотке крови человека. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 6:679–83.
42. Jiang D., Tian Y., Zhang Y., Lu X., Xiao D., Zhou C. One-step fast and label-free imaging array for multiplexed detection of trace avian influenza viruses. *Anal. Chim. Acta*. 2021; 1171:338645. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338645.
43. Srinivasan V., Stedtfeld R.D., Tourlousse D.M., Baushke S.W., Xin Y., Miller S.M., Pham T., Rouillard J.M., Gulari E., Tiedje J.M., Hashsham S.A. Diagnostic microarray for 14 water and foodborne pathogens using a flatbed scanner. *J. Microbiol. Methods*. 2017; 139:15–21. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.04.009.
44. Никифоров К.А., Уткин Д.В., Макашова М.А., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование системы мультиплексных ПЦР с гибридно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы. *Биотехнология*. 2020; 36(3):46–56. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-46-56.
45. Famulok M. Allosteric aptamers and aptazymes as probes for screening approaches. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2005; 7(2):137–43.
46. Ellington A.D., Szostak J.W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990; 346(6287):818–22. DOI: 10.1038/346818a0.
47. Jeddi I., Saiz L. Computational design of single-stranded DNA hairpin aptamers immobilized on a biosensor substrate. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):10984. DOI: 10.1038/s41598-021-88796-2.
48. Duangthaiaporn S., Reaver N.G.F., Cameron B.D., Kim D.S. Adsorption kinetics of glycated hemoglobin on aptamer microarrays with antifouling surface modification. *Langmuir*. 2021; 37(15):4647–57. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c00446.
49. Jalali T., Salehi-Vaziri M., Pouriayevali M.H., Gargari S.L.M. Aptamer based diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever from clinical specimens. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):12639. DOI: 10.1038/s41598-021-91826-8.
50. Qlark L.C. Jr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *ASAIO J.* 1956; 2(1):41–8.
51. Hong C.A., Park J.C., Na H., Jeon H., Nam Y.S. Short DNA-catalyzed formation of quantum dot-DNA hydrogel for enzyme-free femtomolar specific DNA assay. *Biosens Bioelectron.* 2021; 182:113110. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113110.
52. Born F., Braun P., Scholz H.C., Grass G. Specific detection of *Yersinia pestis* based on receptor binding proteins of phages. *Pathogens*. 2020; 9(8):611. DOI: 10.3390/pathogens9080611.
53. Liu X., Wang L., Zhao J., Zhu Y., Yang J., Yang F. Enhanced binding efficiency of microcantilever biosensor for the detection of *Yersinia*. *Sensors (Basel)*. 2019; 19(15):3326. DOI: 10.3390/s19153326.
54. Seeman N.C. Nucleic acid junctions and lattices. *J. Theor. Biol.* 1982; 99(2):237–47. DOI: 10.1016/0022-5193(82)90002-9.
55. Rothmund P.W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*. 2006; 440(7082):297–302. DOI: 10.1038/nature04586.
56. Raveendran M., Lee A.J., Sharma R., Wälti C., Actis P. Rational design of DNA nanostructures for single molecule biosensing. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):4384. DOI: 10.1038/s41467-020-18132-1.
57. Ochmann S.E., Vietz C., Trofymchuk K., Acuna G.P., Lalkens B., Tinnefeld P. Optical nanoantenna for single molecule-based detection of Zika virus nucleic acids without molecular multiplication. *Anal. Chem.* 2017; 89(23):13000–7. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04082.
58. Yang B., Zhang Z., Yang C., Wang Y., Orr M.C., Hongbin W., Zhang A.B. Identification of species by combining molecular and morphological data using convolutional neural networks. *Syst. Biol.* 2022; 71(3):690–705. DOI: 10.1093/sysbio/syab076.
- whole-genome sequencing of the strains from the Russian Federation and the neighboring states]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (4):58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64.
4. 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., Ogolodin 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.
5. Nikiforov K.A., Morozov O.A., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Population structure, taxonomy and genetic features of *Yersinia pestis* strains of the Central Asian subspecies]. *Genetika [Genetics]*. 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.
6. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., 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 variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
7. Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [Molecular typing of *Yersinia pestis*]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology, and Virology]*. 2013; (2):3–12.
8. Zhang Y., Luo T., Yang C., Yue X., Guo R., Wang X., Buren M., Song Y., Yang R., Cao H., Cui Y., Dai X. Phenotypic and molecular genetic characteristics of *Yersinia pestis* at an emerging natural plague focus, Junggar Basin, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 98(1):231–7. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0195.
9. Wang P., Shi L., Zhang F., Guo Y., Zhang Z., Tan H., Cui Z., Ding Y., Liang Y., Liang Y., Yu D., Xu J., Li W., Song Z. Ten years of surveillance of the Yulong plague focus in China and the molecular typing and source tracing of the isolates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(3):e0006352. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006352.
10. Nour El-Din H.T., Yassin A.S., Ragab Y.M., Hashem A.M. Phenotype-genotype characterization and antibiotic-resistance correlations among colonizing and infectious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from intensive care units. *Infect. Drug Resist.* 2021; 14:1557–71. DOI: 10.2147/IDR.S296000.
11. Jolley K.A., Maiden M.C. Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future Microbiol.* 2014; 9(5):623–30. DOI: 10.2217/fmb.14.24.
12. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) for the genotyping of bacterial pathogens. *Methods Mol. Biol.* 2009; 551:105–16. DOI: 10.1007/978-1-60327-999-4_9.
13. Spyrou M.A., Keller M., Tukhbatova R.I., Scheib C.L., Nelson E.A., Andrades Valtueña A., Neumann G.U., Walker D., Alterauge A., Carty N., Cessford C., Fetz H., Gourvenec M., Hartle R., Henderson M., von Heyking K., Inskip S.A., Kacki S., Key F.M., Knox E.L., Later C., Maheshwari-Aplin P., Peters J., Robb J.E., Schreiber J., Kivisild T., Castex D., Lösch S., Harbeck M., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes. *Nat. Commun.* 2019; 10(1):4470. DOI: 10.1038/s41467-019-12154-0.
14. Chen F., Ye J., Liu W., Chio C., Wang W., Qin W. Knockout of a highly GC-rich gene in *Burkholderia pyrrocinia* by recombineering with freeze-thawing transformation. *Mol. Plant Pathol.* 2021; 22(7):843–57. DOI: 10.1111/mpp.13058.
15. Yang S., Yuan Z.J., Zhu Y.H., Chen X., Wang W. lncRNA PVT1 promotes cetuximab resistance of head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting miR-124-3p. *Head Neck*. 2021; 43(9):2712–23. DOI: 10.1002/hed.26742.
16. Mortazavipour M.M., Shahbazi S., Mahdian R. Detection of paternal IVS-II-1 (G>A) (*HBB*: c.315+1G>A) mutation in cell-free fetal DNA using COLD-PCR assay. *Hemoglobin*. 2020; 44(3):168–73. DOI: 10.1080/03630269.2020.1768864.
17. Kane S.R., Shah S.R., Alfaro T.M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis*. *J. Microbiol. Methods*. 2019; 162:21–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.05.005.
18. Siggillino A., Ulivi P., Pasini L., Reda M.S., Chiadini E., Tofanetti F.R., Baglivo S., Metro G., Crinó L., Delmonte A., Minotti V., Roila F., Ludovini V. Detection of *EGFR* mutations in plasma cell-free tumor DNA of TKI-treated advanced-NSCLC patients by three methodologies: Scorpion-ARMS, PNAclamp, and Digital PCR. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10(12):1062. DOI: 10.3390/diagnostics10121062.
19. Schneider R., Lamien-Meda A., Auer H., Wiedermann-Schmidt U., Chiodini P.L., Walochnik J. Validation of a novel FRET real-time PCR assay for simultaneous quantitative detection and discrimination of human *Plasmodium* parasites. *PLoS One*. 2021; 16(6):e0252887. DOI: 10.1371/journal.pone.0252887.
20. Sherrill-Mix S., Hwang Y., Roche A.M., Glascock A., Weiss S.R., Li Y., Haddad L., Deraska P., Monahan C., Kromer A., Graham-Wooten J., Taylor L.J., Abella B.S., Ganguly A., Collman R.G., Van Duyn G.D., Bushman F.D. Detection of SARS-CoV-2 RNA using

References

- Onishchenko G.G., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Lyapin M.N., Kutyrev V.V. [Conceptual bases of biological safety. Part 1]. *Vestnik Rossiyskoi Akademii Meditsinskikh Nauk [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2013; (10):4–13.
- Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Krivulya S.D., Fedorov Yu.M., Toporkov V.P. [Strategy for combating infectious diseases and sanitary protection of territories under modern conditions]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2006; (2):5–9.
- Eroshenko G.A., Krasnov Y.M., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Ogolodin E.G., Kutyrev V.V. [Updating of intra-specific *Yersinia pestis* classification, based on the results of

- RT-LAMP and molecular beacons. *Genome Biol.* 2021; 22(1):169. DOI: 10.1186/s13059-021-02387-y.
21. Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sitmbetov D.A., Osina N.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Construction of the reagent panel "GenPest-subspecies/Altai-RGF"]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (4):90–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95.
22. Thomas M.C., Janzen T.W., Husczyński G., Mathews A., Amoako K.K. Development of a novel multiplexed qPCR and Pyrosequencing method for the detection of human pathogenic *Yersinia*. *Int. J. Food. Microbiol.* 2017; 257:247–53. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.019.
23. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(7):2503–16. DOI: 10.1093/nar/17.7.2503.
24. Cai L., Kong F., Jelfs P., Gilbert G.L., Sintchenko V. Rolling circle amplification and multiplex allele-specific PCR for rapid detection of *katG* and *inhA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2009; 299(8):574–81. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.05.006.
25. Vogler A.J., Driebe E.M., Lee J., Auerbach R.K., Allender C.J., Stanley M., Kubota K., Andersen G.L., Radnedge L., Worsham P.L., Keim P., Wagner D.M. Assays for the rapid and specific identification of North American *Yersinia pestis* and the common laboratory strain CO92. *Biotechniques*. 2008; 44(2):201, 203–204, 207. DOI: 10.2144/000112815.
26. Sano T., Smith C.L., Cantor C.R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*. 1992; 258(5079):120–2. DOI: 10.1126/science.1439758.
27. Jayatilake C., Nemoto N. cDNA Display-mediated immuno-PCR (cD-IPCR): An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. *Methods Mol Biol.* 2021; 2261:307–21. DOI: 10.1007/978-1-0716-1186-9_19.
28. Malou N., Tran T.N., Nappez C., Signoli M., Le Forestier C., Castex D., Drancourt M., Raoult D. Immuno-PCR – a new tool for paleomicrobiology: the plague paradigm. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31744. DOI: 10.1371/journal.pone.0031744.
29. Adessi C., Matton G., Ayala G., Turcatti G., Mermoud J.J., Mayer P., Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterization of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(20):E87. DOI: 10.1093/nar/28.20.e87.
30. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
31. Singh R., Pal V., Tripathi N.K., Goel A.K. Development of a pair of real-time loop mediated isothermal amplification assays for detection of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Mol. Cell Probes*. 2020; 54:101670. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101670.
32. Jin J., Duan L., Fu J., Chai F., Zhou Q., Wang Y., Shao X., Wang L., Yan M., Su X., Zhang Y., Pan J., Chen J. A real-time LAMP-based dual-sample microfluidic chip for rapid and simultaneous detection of multiple waterborne pathogenic bacteria from coastal waters. *Anal. Methods*. 2021; 13(24):2710–21. DOI: 10.1039/d1ay00492a.
33. Liu W., Dong D., Yang Z., Zou D., Chen Z., Yuan J., Huang L. Polymerase spiral reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method. *Sci. Rep.* 2015; 5:12723. DOI: 10.1038/srep12723.
34. Mayboroda O., Gonzalez Benito A., Sabaté del Rio J., Svobodova M., Julich S., Tomaso H., O'Sullivan C.K., Kataris I. Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(3):671–6. DOI: 10.1007/s00216-015-9177-1.
35. Shi L., Yang G., Zhang Z., Xia L., Liang Y., Tan H., He J., Xu J., Song Z., Li W., Wang P. Reemergence of human plague in Yunnan, China in 2016. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0198067. DOI: 10.1371/journal.pone.0198067.
36. Zasada A.A., Zacharczuk K., Formińska K., Wiatrzyk A., Ziółkowski R., Malinowska E. Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. *Anal. Biochem.* 2018; 560:60–6. DOI: 10.1016/j.ab.2018.09.008.
37. Kortli S., Jauset-Rubio M., Tomaso H., Abbas M.N., Bashammakh A.S., El-Shahawi M.S., Alyoubi A.O., Ben-Ali M., O'Sullivan C.K. *Yersinia pestis* detection using biotinylated dNTPs for signal enhancement in lateral flow assays. *Anal. Chim. Acta*. 2020; 1112:54–61. DOI: 10.1016/j.aca.2020.03.059.
38. Müller K., Daßen S., Holowachuk S., Zwirgmaier K., Stehr J., Buersgens F., Ullrich L., Stoeker K. Pulse-Controlled Amplification – A new powerful tool for on-site diagnostics under resource limited conditions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(1):e0009114. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009114.
39. Cunningham C.H., Hennelly C.M., Lin J.T., Ubalee R., Boyce R.M., Mulogo E.M., Hathaway N., Thwai K.L., Phanzy F., Kalonji A., Mwandangirwa K., Tshetu A., Juliano J.J., Parr J.B. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of *Plasmodium* detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping. *EBioMedicine*. 2021; 68:103415. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103415.
40. Schermer B., Fabretti F., Damagnez M., Di Cristanziano V., Heger E., Arjune S., Tanner N.A., Imhof T., Koch M., Ladha A., Joong J., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Burst V., Zhang F., Klein F., Benzing T., Müller R.U. Rapid SARS-CoV-2 testing in primary material based on a novel multiplex RT-LAMP assay. *PLoS One*. 2020; 15(11):e0238612. DOI: 10.1371/journal.pone.0238612.
41. Savvateeva E.N., Dement'eva E.I., Tsybul'skaya M.V., Osipova T.V., Ryabykh T.P., Turygin A.Yu., Yurasov R.A., Zasedatelev A.S., Rubina A.Yu. [Biological microchip for simultaneous quantitative immunological analysis of cancer markers in human blood serum]. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2009; 6:679–83.
42. Jiang D., Tian Y., Zhang Y., Lu X., Xiao D., Zhou C. One-step fast and label-free imaging array for multiplexed detection of trace avian influenza viruses. *Anal. Chim. Acta*. 2021; 1171:338645. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338645.
43. Srinivasan V., Stedtfeld R.D., Turloussé D.M., Baushke S.W., Xin Y., Miller S.M., Pham T., Rouillard J.M., Gulari E., Tiedje J.M., Hashsham S.A. Diagnostic microarray for 14 water and food-borne pathogens using a flatbed scanner. *J. Microbiol. Methods*. 2017; 139:15–21. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.04.009.
44. Nikiforov K.A., Utkin D.V., Makashova M.A., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Construction of a multiplex PCR system with hybridization-fluorescence registration of results on a solid substrate for the indication and identification of plague agent strains]. *Biokhimiya [Biotechnology]*. 2020; 36(3):46–56. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-46-56.
45. Famulok M. Allosteric aptamers and aptazymes as probes for screening approaches. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2005; 7(2):137–43.
46. Ellington A.D., Szostak J.W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990; 346(6287):818–22. DOI: 10.1038/346818a0.
47. Jeddi I., Saiz L. Computational design of single-stranded DNA hairpin aptamers immobilized on a biosensor substrate. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):10984. DOI: 10.1038/s41598-021-88796-2.
48. Duangthaiaporn S., Reaver N.G.F., Cameron B.D., Kim D.S. Adsorption kinetics of glycated hemoglobin on aptamer microarrays with antifouling surface modification. *Langmuir*. 2021; 37(15):4647–57. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c00446.
49. Jalali T., Salehi-Vaziri M., Pouriayevali M.H., Gargari S.L.M. Aptamer based diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever from clinical specimens. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):12639. DOI: 10.1038/s41598-021-91826-8.
50. Clark L.C. Jr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *ASAIO J.* 1956; 2(1):41–8.
51. Hong C.A., Park J.C., Na H., Jeon H., Nam Y.S. Short DNA-catalyzed formation of quantum dot-DNA hydrogel for enzyme-free femtomolar specific DNA assay. *Biosens. Bioelectron.* 2021; 182:113110. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113110.
52. Born F., Braun P., Scholz H.C., Grass G. Specific detection of *Yersinia pestis* based on receptor binding proteins of phages. *Pathogens*. 2020; 9(8):611. DOI: 10.3390/pathogens9080611.
53. Liu X., Wang L., Zhao J., Zhu Y., Yang J., Yang F. Enhanced binding efficiency of microcantilever biosensor for the detection of *Yersinia*. *Sensors (Basel)*. 2019; 19(15):3326. DOI: 10.3390/s19153326.
54. Seeman N.C. Nucleic acid junctions and lattices. *J. Theor. Biol.* 1982; 99(2):237–47. DOI: 10.1016/0022-5193(82)90002-9.
55. Rothmund P.W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*. 2006; 440(7082):297–302. DOI: 10.1038/nature04586.
56. Rayeendran M., Lee A.J., Sharma R., Wälti C., Actis P. Rational design of DNA nanostructures for single molecule biosensing. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):4384. DOI: 10.1038/s41467-020-18132-1.
57. Ochmann S.E., Vietz C., Trofymchuk K., Acuna G.P., Lalkens B., Tinnefeld P. Optical nanoantenna for single molecule-based detection of Zika virus nucleic acids without molecular multiplication. *Anal. Chem.* 2017; 89(23):13000–7. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04082.
58. Yang B., Zhang Z., Yang C., Wang Y., Orr M.C., Hongbin W., Zhang A.B. Identification of species by combining molecular and morphological data using convolutional neural networks. *Syst. Biol.* 2022; 71(3):690–705. DOI: 10.1093/sysbio/syab076.

Authors:

Nikiforov K.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Никифоров К.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-41-49

УДК 616.98:579.842.23

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

SNP-профили штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из очагов чумы Прикаспия

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

Метод SNP-типирования, основанный на выявлении в геноме стабильных генетических маркеров – однонуклеотидных полиморфизмов, успешно применяется для генотипирования патогенных микроорганизмов и может быть использован для SNP-профилирования штаммов *Yersinia pestis* и проведения молекулярно-генетической паспортизации очаговых территорий. **Цель работы** – определение SNP-профилей штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, выделенных в очагах чумы Прикаспия в 1912–2015 гг., и разработка способа идентификации уникальных SNPs методом секвенирования по Сэнгеру для проведения молекулярно-генетической паспортизации этих территорий. **Материалы и методы.** Проведено комплексное исследование фенотипических и генотипических свойств 190 штаммов *Y. pestis* из очагов чумы Прикаспийского региона. Филогенетическая реконструкция методом максимального правдоподобия (*Maximum Likelihood*, модель GTR) в программе SeaView 5.0.4 выполнена на основе 1621 SNPs, идентифицированных среди 50 штаммов *Y. pestis* по данным WG-SNP-анализа в программе snippy 4.6. Расчет праймеров для ПЦР-амплификации отобранных в кандидаты-мишени SNP-локусов проводили в программе Vector NTI. Секвенирование локусов SNPs по Сэнгеру осуществлялось на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, США). **Результаты и обсуждение.** Все исследованные штаммы из очагов Прикаспия по фенотипическим характеристикам относились к высоковирулентному и эпидемически значимому средневековому биовару основного подвида *Y. pestis*. По результатам WG-SNP-анализа определено 9 SNP-генотипов, основанных на полиморфизме единичных нуклеотидов 24 генов, характерных для ключевых филопопуляций, в которые входят штаммы, выделенные в различные периоды эпидемической и эпизоотической активности в очагах Прикаспия. Установление SNP-генотипов штаммов средневекового биовара *Y. pestis*, полученных более чем за столетний период в очагах Прикаспийского региона, создает предпосылки для определения их канонического SNP-профиля (canSNP) и для разработки алгоритма молекулярно-эпидемиологического мониторинга очагов, в которых циркулирует этот высоковирулентный биовар.

Ключевые слова: чума, SNPs, генотипирование, природные очаги.

Корреспондирующий автор: Балыкова Алина Николаевна, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Для цитирования: Балыкова А.Н., Куклева Л.М., Горюнова П.А., Шевченко К.С., Коврижников А.В., Краснов Я.М., Червякова Н.С., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. SNP-профили штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из очагов чумы Прикаспия. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:41–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-41-49

Поступила 30.11.2022. Принята к публ. 01.12.2022.

A.N. Balykova, L.M. Kukleva, P.A. Goryunova, K.S. Shevchenko, A.V. Kovrizhnikov, Ya.M. Krasnov,
N.S. Chervyakova, G.A. Eroshenko, V.V. Kutyrev

SNP-Profiles of *Yersinia pestis* Strains of the Medieval Biovar from the Caspian Sea Region Plague Foci

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

Abstract. The SNP-typing method based on the detection of stable genetic markers in the genome, i.e., single nucleotide polymorphisms, is successfully used for genotyping of pathogenic microorganisms and can be applied for SNP-profiling of *Yersinia pestis* strains and molecular-genetic certification of focal areas. **The aim** of the study was to determine the SNP profiles of *Y. pestis* strains of the medieval biovar isolated in the Caspian Sea region plague foci in 1912–2015 and to develop a method for identifying unique SNPs using the Sanger sequencing for molecular-genetic certification of these territories. **Materials and methods.** A comprehensive study of the phenotypic and genotypic properties of 190 *Y. pestis* strains from plague foci in the Caspian Sea region was carried out. Phylogenetic reconstruction by the *Maximum Likelihood* method (GTR model) in the SeaView 5.0.4 software was performed on the basis of 1621 SNPs identified among 50 *Y. pestis* strains according to WG-SNP analysis in the snippy 4.6 program. Primers for PCR amplification of the SNP loci selected as target were calculated using the Vector NTI program. Sanger sequencing of SNPs loci was conducted on an ABI PRISM 3500XL genetic analyzer (Applied Biosystems, USA). **Results and discussion.** According to phenotypic characteristics, all studied strains from the Caspian foci belonged to a highly virulent and epidemically significant medieval biovar of the main subspecies of *Y. pestis*. According to the results of the WG-SNP analysis, 9 SNP genotypes were identified based on the polymorphism of single nucleotides of 24 genes characteristic of the main phylopopulations, which include strains isolated during various periods of epidemic and epizootic activity in the Caspian plague foci. Determining of SNP genotypes of *Y. pestis* strains of the medieval biovar, obtained over a hundred

years in the Caspian foci, creates the prerequisites for defining the canonical SNP profile (canSNP) and for developing an algorithm for molecular epidemiological monitoring of the foci in which this highly virulent biovar circulates.

Key words: plague, SNPs, genotyping, natural foci.

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

Corresponding author: Alina N. Balykova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Balykova A.N., Kukleva L.M., Goryunova P.A., Shevchenko K.S., Kovrizhnikov A.V., Krasnov Ya.M., Chervyakova N.S., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. SNP-Profiles of *Yersinia pestis* Strains of the Medieval Biovar from the Caspian Sea Region Plague Foci. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:41–49. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-41-49

Received 30.11.2022. Accepted 01.12.2022.

Balykova A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3766-7979>
Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>
Goryunova P.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6522-2606>
Shevchenko K.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3170-9827>
Kovrizhnikov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>

Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>
Chervyakova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Kuttyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Чума – особо опасная инфекционная болезнь, которая по-прежнему сохраняет свой пандемический потенциал и представляет угрозу для населения многих стран. Важность получения геномного портрета и изучения направлений эволюции возбудителя этой зоонозной природно-очаговой инфекции, оставившей беспрецедентный след в истории, не вызывает сомнений. Из четырех известных биоваров основного подвида возбудителя чумы именно высоковирулентный и эпидемически значимый средневековый биовар *Yersinia pestis* (2.MED) занимает 93,3 % энзоотичной по чуме территории очагов стран СНГ, что составляет 1959965 км² [1, 2]. Согласно данным эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга, в конце XIX – начале XX в. в Прикаспии происходили массовые вспышки чумы, внутривидовое положение этиологических агентов которых не было установлено. Наибольшее число заболевших зарегистрировано в Прикаспийском Северо-Западном степном, Волго-Уральском степном и Волго-Уральском песчаном очагах чумы [3]. Ранее нами установлено, что в начале XX в. этиологическими агентами вспышек чумы в северной части Прикаспия были штаммы филогенетической ветви *Y. pestis* средневекового биовара – 2.MED1 [4]. Заболеваемость среди населения здесь продолжалась до конца 1930-х – начала 1940-х гг. Затем произошло значительное снижение эпизоотической активности этой группы очагов чумы Прикаспия с наступлением длительного межэпизоотического периода в середине XX в. Последние эпизоотические проявления в степных, полупустынных и пустынных (северная подзона) ландшафтах России и Казахстана зарегистрированы в первой половине прошлого века (1940–1950 гг.). Прекращение эпизоотий связывали с проведенными на территориях этих очагов беспрецедентными для мировой практики работами по дератизации и дезинсекции. В период 1963–1979 гг. эпизоотии чумы вновь произошли на территории Прикаспийской низменности и в Предкавказье. Затем кратковременные проявления активности в очагах Северного и Северо-Западного Прикаспия происходили вплоть до 2015 г. и чередовались с затуханием эпизоотического процесса от 2 до 5 лет [3]. С начала XX в. и по настоящий период при проведении эпидемиологического и эпизоотологического монито-

ринга в природных очагах чумы Прикаспия специалистами противочумных учреждений Российской Федерации собрана уникальная коллекция штаммов *Y. pestis*, которая хронологически отражает историю этих очагов. Анализ этой коллекции комбинацией методов *in vitro* и *in silico* – полногеномного и фрагментного секвенирования и SNP-генотипирования – позволяет установить SNP-профили средневекового биовара в очагах Прикаспийского региона. Метод SNP-генотипирования выявляет однонуклеотидные полиморфизмы, характеризующиеся эволюционной стабильностью, что делает их надежными маркерами для молекулярного типирования средневекового биовара. Установление SNP-генотипов штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, выделенных более чем за столетний период в очагах Прикаспия, создает предпосылки для создания канонического SNP-профиля (canSNP) для молекулярно-генетической паспортизации очагов, в которых циркулирует этот биовар [5, 6]. Выявленные SNP-генотипы могут быть использованы при эпидемиологическом и эпизоотологическом расследовании случаев чумы, а также возможных актов биотерроризма. **Целью** данной работы явилось определение SNP-профилей штаммов средневекового биовара *Y. pestis*, выделенных в очагах чумы Прикаспия с 1912 по 2015 год, и разработка способа идентификации уникальных для них SNPs методом секвенирования по Сэнгеру для совершенствования алгоритма молекулярно-эпидемиологического мониторинга паспортизации этих территорий.

Материалы и методы

Анализ культурально-морфологических, биохимических свойств исследуемых штаммов *Y. pestis*. В работе исследовано 190 штаммов *Y. pestis* из очагов чумы Прикаспия, выделенных в 1912–2015 гг. Использованные штаммы *Y. pestis* получены из Государственной коллекции патогенных бактерий на базе ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Штаммы *Y. pestis* культивировали при 28 °C 24–48 часов на агаре или в бульоне LB (pH 7,2). Дифференциально-биохимический анализ проводили путем определения ферментативной активности штаммов *Y. pestis* по раз-

личным сахаридам, глицерину, способности к редукции нитратов [7].

Идентификация SNPs-локусов, подбор праймеров, проведение ПЦР, фрагментное секвенирование. Для ПЦР-амплификации и фрагментного секвенирования ДНК 190 штаммов *Y. pestis* выделяли с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США) по инструкции производителя. Идентификацию SNPs проводили путем выравнивания нуклеотидных последовательностей штаммов на геном CO92, при помощи программы snippy 4.6 (<https://github.com/tseemann/snippy>), с последующим удалением 13 SNPs из области гомоплазий [8]. Полученный набор SNPs содержал только коровую область генома (1621 SNPs). Филогенетическую реконструкцию методом максимального правдоподобия Maximum Likelihood осуществляли с использованием программы SeaView 5.0 [9] с последующей визуализацией в FigTree 1.4.3. Подбор модели нуклеотидных замен проводили в программе jModelTest 2.1.7 [10], в результате выбрана модель GTR (Bootstrap-500). В качестве внешней группы в филогенетическом анализе использованы геномы 8 штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI Genbank: Pestoides A(0.PE4a, NZ_ACNT000000000), Pestoides F(0.PE2, NC_009381), 620024(0.PE7, ADPM000000000), CO92 (1.ORI1, AL590842.1), 351001 (2.ANT2, ADPF000000000), 91 (2.MED2, ADPU000000000), CMCC125002 (2.MED3, ADQN000000000), KIM10 (2.MED1, AE009952.1).

Расчет праймеров для ПЦР на маркерные SNPs проводили с помощью программы Vector NTI 10 (<http://www.thermofisher.com>). Амплификацию локусов SNPs выполняли в отдельных реакциях с помощью рассчитанных праймеров при следующем температурном режиме: 1 цикл – 95 °C в течение 5 мин; затем 35 циклов – 95 °C, 20 с; 58–60 °C, 35 с; 72 °C, 25 с и завершающий этап элонгации – 1 мин при 72 °C. Секвенирование по Сэнгеру осуществляли на платформе ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, США). Анализ полученных последовательностей проводили при помощи программы 3500 Series Data Collection Software, оценку гомологии выполняли в Mega X, exonerate (<https://github.com/nathanweeks/exonerate>) и при помощи алгоритма BLAST. Полногеномные последовательности *Y. pestis*, использованные в данной работе для WG-SNP-анализа и филогенетической реконструкции, депонированы в базе данных NCBI GenBank нами ранее [1, 4, 11]. Для определения SNP-генотипа WG-сборок штаммов *Y. pestis* использовался авторский скрипт на языке программирования python v3.10 (модули библиотек pandas, Biopython).

Результаты и обсуждение

Проведено комплексное исследование 190 штаммов *Y. pestis*, выделенных из природных очагов чумы Прикаспийского региона и сопредельных террито-

рий в 1912–2015 гг. Все изученные штаммы относились к средневековому биовару основного подвида чумного микроба и имели типичный фенотип: ферментировали глицерин и арабинозу, не ферментировали рамнозу и мелибиозу, не обладали денитрифицирующей активностью.

Полногеномные последовательности 42 штаммов *Y. pestis*, использованных в этой работе для WG-SNP-анализа и филогенетической реконструкции, депонированы нами ранее в базе данных NCBI GenBank [1, 4, 10]. По результатам анализа данных полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis* методами WG-SNP-анализа и филогенетической реконструкции нами определены 9 SNP-генотипов (рисунков), характерных для ключевых филопопуляций штаммов возбудителя чумы, которые выделялись в различные периоды эпизоотической активности природных очагов Прикаспия. На рисунке (B) обозначены эволюционные узлы филопопуляций, по которым составлены генотипы Pricasp. Штаммы *Y. pestis*, взятые в качестве внешней группы, не приведены на дендрограмме для улучшения разрешения рисунка.

Для разработки способа определения SNP-профиля штаммов возбудителя чумы, выделенных в очагах Прикаспия, с помощью программы Vector NTI 10 на выбранные маркерные локусы рассчитаны праймеры для ПЦР-амплификации (табл. 1).

Секвенирование по Сэнгеру осуществляли на платформе ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, США). Принадлежность исследуемого штамма чумного микроба из Прикаспийского региона и сопредельных очагов чумы к конкретному геноварианту устанавливали по результатам данных фрагментного секвенирования по наличию маркерного SNP в указанной позиции гена (табл. 2). Для определения SNP-генотипа WGS-сборок штаммов *Y. pestis* использовался авторский скрипт на языке программирования python v3.10 (модули библиотек pandas, Biopython). Поиск SNPs осуществлялся в двух режимах: поиска координаты SNP в гене согласно табл. 2 и ПЦР *in silico* с праймерами на SNPs-локусы из табл. 1. В результате работы скрипта SNP_finder.py формировался файл multi-FASTA по каждому исследуемому гену, а также результирующая таблица в формате .xlsx, содержащая установленные SNP-генотипы для анализируемой выборки штаммов.

Подобранные для проведения SNP-генотипирования 24 локуса тестировались на 190 штаммах *Y. pestis*, выделенных в 1912–2015 гг. от носителей, переносчиков и человека на территории 17 природных очагов чумы Прикаспия, Кавказа и Центральной Азии. В первой половине XX в. (1912–1955 гг.) на территории Прикаспийского региона выявлено 3 SNP-генотипа (9 генов): Pricasp-1, Pricasp-2 и Pricasp-6. Штаммы ветви 2.MED4 относились к генотипу Pricasp-1, маркерные SNPs которого находились в трех генах-мишенях (*priA*, *apaH*, *phnL*), с помощью которых найдено 18 штаммов периода 1917–1950 гг. из 4 очагов чумы Прикаспия,



4 – SNP-профили штаммов *Y. pestis* средневекового бювара из природных очагов чумы Прикаспия и сопредельных территорий; *B* – филогенетическое дерево максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) 50 штаммов *Y. pestis* средневекового бювара (линия 2.MED) из природных очагов Прикаспия и сопредельных территорий. Значение логарифма функции правдоподобия $\text{PhyML } \ln(L) = -10312.4$; 1621 SNPs, модель GTR

4–4 SNP profiles established for the medieval biovar of *Y. pestis* strains from the natural plague foci in the Caspian Sea region and adjacent territories; B – Maximum Likelihood phylogenetic tree of 50 *Y. pestis* strains of the medieval biovar (2.MED line) from natural foci of the Caspian Sea region and adjacent territories. The value of the logarithm of the likelihood function $\text{PhyML}(\ln L) = -10312.4$; 1621 SNPs, GTR model

Таблица 1 / Table 1

Праймеры для идентификации SNP-генотипов у штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из очагов чумы Прикаспия

Primers for identification of SNP genotypes in *Y. pestis* strains of the medieval biovar from the Caspian Sea region plague foci

SNP-генотип SNP-genotype	Последовательности праймеров 5'→3' The primer sequences 5'→3'
Pricasp-1	<i>apaH</i> -S: GGGACCACGGGCAACTAAA <i>apaH</i> -AS: TGGCTGCCTCGATGAAT
	<i>phnL</i> -S: ACGCTGCTACGCTCCCTCTA <i>phnL</i> -AS: TGA CTGACCCAACCGACA
	<i>priA</i> -S: TCAGCCGTTGCAGCAGTT <i>priA</i> -AS: GGCGTTATGGATTATGGG
	<i>radC</i> -S: TCGTGTATTTCGCCATGAAG <i>radC</i> -AS: TCACCTGCGTCGTTATCAAA
Pricasp-2	<i>upo0842</i> -S: CGGGGGCAAAGCATTACA <i>upo0842</i> -AS: CGTATTGGTGCCGTCATCAT
	<i>narP</i> -S: ATCGTTGACGACCATCCG <i>narP</i> -AS: TTTTAACGTATCCAGCCCG
	<i>asnA</i> -S: AGATGCTAAAGGCCGTGAAC <i>asnA</i> -AS: ATGTCGCCGTTTAAATCCAG
	<i>ssrA</i> -S: GGATGGACACGCTACTGACA <i>ssrA</i> -AS: CAAACGACGAAAACCTACGCAC
Pricasp-3	<i>flgK</i> -S: CCGGTTACTCAGCCAGC <i>flgK</i> -AS: TCGCGGCACTGAGAGAGGAA
	<i>upo1240</i> -S: TGTCAGGCGTCGCTCATT <i>upo1240</i> -AS: TGGCGGGATAGGTGGTTA
	<i>upo1564</i> -S: CCGCTCCGCTGCCCTATATCA <i>upo1564</i> -AS: ATCACGTAACGGACGCGGGA
	<i>bglY</i> -S: TTGCTTGTCTCTCAATGGC <i>bglY</i> -AS: TGCTGCACGTCCTGCTAAAT
Pricasp-4.1	<i>tssG</i> -S: TCTGGTGCTGTTGCGGGTCT <i>tssG</i> -AS: CCGCAGCCACTGAGCAACAA
Pricasp-4.2	<i>selS</i> -S: GCTATTGCTATTTGGGGTGG <i>selS</i> -AS: GGGTTACAGGGGCATCAAT
Pricasp-5	<i>upo4015</i> -S: GAATGCCAGCCGAGCGACTT <i>upo4015</i> -AS: GCTGTGCGGTGTGGTATTTGA
	<i>upo0379</i> -S: TGGTGTCTCTCGCAATCA <i>upo0379</i> -AS: AGACGGCAAGCAGGTGTT
Pricasp-6	<i>cysJ</i> -S: CCCATCAACTTCACGCTGT <i>cysJ</i> -AS: TGGGTGTGGTGCGCTATGA
	<i>aspB</i> -S: GCCGAAACAGACAACGATCT <i>aspB</i> -AS: CGTTGCTGTAACCAAACCTGC
	<i>upo3544</i> -S: TAACGGTGTGTATAAAGCGGG <i>upo3544</i> -AS: GCGTAGTCCATAACCGTAAATC
Pricasp-7	<i>upo4104</i> -S: TACGCGGCTTTATCTGTGTG <i>upo4104</i> -AS: CAAATGCTGCTGTGTATCCG
	<i>upo0033</i> -S: TACCGCATTCACCAACCA <i>upo0033</i> -AS: CGAACGATTGGAACAGCT
Pricasp-8	<i>ptsP</i> -S: GTGGGAGATGGCAAGAGCGT <i>ptsP</i> -AS: TGCAAGTGGGCTAACGAGGC
	<i>selenide</i> -S: CTATTGCTATTTGGGGTGGC <i>selenide</i> -AS: AAGATGCCAATGCCCAAT
	<i>gltP</i> -S: ACGGCTAGCTGTACCACCGTC <i>gltP</i> -AS: TGAGGCGAATACCAGCGGCA

8 из которых получены от людей и 10 – от носителей и переносчиков (табл. 2). Также к генотипу Pricasp-1 отнесен штамм из Индии, выделенный от человека в 1928 г. на о. Шри-Ланка. Штаммы 2.MED4 выделены от разных носителей и перенос-

чиков в первой половине XX в. и в дальнейшем уже не выделялись.

Следующие 8 найденных SNP-генотипов относились к филогенетической ветви 2.MED1. По мишеням генотипа Pricasp-2 найдено 20 штаммов периода 1930–1954 гг. Этот генотип представлен несколькими вариантами комбинации мишеней: вариант 1 (*narP* + *radC*), вариант 2 (*narP* + *YPO0842*), общая SNP (*narP*). Генотип Pricasp-2 в основном состоит из штаммов, изолированных из природных резервуаров, и пяти штаммов, выделенных от людей. Один штамм этого генотипа выделен в 1949 г. на территории Туркменистана. Вероятно, распространение геноварианта Pricasp-2 на территорию Каракумского пустынного очага произошло с судами через Каспийское море. Изучение других штаммов из этого очага позволит провести более детальный анализ участков распространения этого генотипа. В генотип Pricasp-6 из очагов Прикаспийского региона вошли 14 штаммов, выделенных в период 1912–1938 гг. и содержащих три маркерные нуклеотидные замены в генах *upo0379*, *cysJ*, *aspB*. Большинство штаммов получены от человека (8 шт.) в период вспышек с высоким процентом летальности в первой половине XX в. на территории очагов Прикаспия. Также установлено, что к этому генотипу относится штамм, выделенный в Индии, о. Шри-Ланка (1928 г., от крысы), что косвенно указывает на возможность заноса в период вспышек первой половины XX в. не только штаммов ветви 2.MED4, но и штаммов ветви 2.MED1 средневекового биовара с территории Прикаспия в Индию.

Среди штаммов *Y. pestis* второй половины XX в. (1956–2015 гг.) из Прикаспийского региона выявлено 6 SNP-генотипов (15 генов): Pricasp-3, Pricasp-4, Pricasp-5, Pricasp-7, Pricasp-8 и Pricasp-9. Генотип Pricasp-3 (SNPs в генах *asnA*, *ssrA*) составили 6 штаммов периода 1990–2002 гг., изолированные от песчанок в Северном Прикаспии (рисунок, табл. 2). С 1990 г. случаи чумы среди людей на этой территории не выявлены. По мишеням, маркерным для генотипа Pricasp-4 (*flg8*, *upo1240*, *upo1564*), найден 41 штамм, выделенный от носителей и переносчиков в 1979–2015 гг. в Северо-Западном Прикаспии и Предкавказье. Начиная с 1979 г. на территориях, на которых был распространен этот генотип, штаммов от людей не получено. Внутри этого генотипа выделено еще два геноварианта: Pricasp-4_1 (*bglY*) и Pricasp-4_2 (*tssG*), – которые характеризуют локальные популяции Северо-Западного Прикаспия (рисунок, табл. 2). Для выявленного генотипа Pricasp-5 характерно наличие трех замен SNPs, в качестве маркеров выбраны белок-кодирующие гены *selD* и *upo4015*, с помощью которых установлена принадлежность к этому генотипу еще 48 штаммов, выделенных от носителей и переносчиков. Штаммы этого генотипа получены в период возобновления эпизоотической активности в очагах Северного Прикаспия после длительного межэпизоотического периода в 1963 г. (Астраханская область, Волго-Уральский пес-

Таблица 2 / Table 2

SNP-генотипы штаммов *Y. pestis* средневекового биовара основного подвида из очагов Прикаспия
SNP-genotypes of *Y. pestis* strains of the medieval biovar of the main subspecies from the Caspian Sea region plague foci

SNP-генотип / филогенетическая ветвь / год SNP-genotype / phylogenetic branch / year	Ген / замена нуклеотида / аминокислоты Gene / nucleotide / amino acid substitution	Природный очаг (число штаммов) Natural focus (number of strains)
1	2	3
Pricasp-1 2.MED4 1917–1950	<i>apaH</i> 802C>A, His268Asn	№ 14 Прикаспийский Северо-Западный (9) № 15 Волго-Уральский степной (5) № 16 Волго-Уральский песчаный (2) № 6 Зангезуро-Карабахский горный (1) Шри-Ланка (1)
	<i>phnL</i> 247G>A, Ala83Thr	
	<i>priA</i> 164A>G, sSNP	№ 14 Caspian North-Western steppe (9) № 15 Volga-Ural steppe (5) № 16 Volga-Ural sandy (2) № 6 Zangezur-Karabakh mountain (1) Sri Lanka (1)
Pricasp-2 2.MED1 1930–1954	<i>Общая (Common) narP</i> 101C>A, Ala34Asp	№ 9 Кобыстанский равнинно-предгорный (2) № 14 Прикаспийский Северо-Западный степной (1) № 15 Волго-Уральский степной (4) № 16 Волго-Уральский песчаный (7) № 18 Урало-Эмбенский пустынный (1) № 25 Каракумский пустынный (1) № 43 Прикаспийский песчаный (4) № 9 Kobystan plain-piedmont (2) № 14 Caspian North-Western steppe (1) № 15 Volga-Ural steppe (4) № 16 Volga-Ural sandy (7) № 18 Ural-Emben desert (1) № 25 Karakum desert (1) № 43 Caspian sandy (4)
	<i>Вариант 1 (Variant 1)</i> <i>narP</i> <i>radC</i> 456G>T, sSNP	№ 16, № 18, № 25, № 43
	<i>Вариант 2 (Variant 2)</i> <i>narP</i> <i>upo0842</i> 1358C>T, Thr453Ile	№ 9, № 14, № 15, № 16, № 43
Pricasp-3 2.MED1 1990–2002	<i>asnA</i> 618A>T, sSNP	№ 16 Волго-Уральский песчаный (5) № 19 Предустуртский пустынный (1)
	<i>ssrA</i> 197C>T, Pro66Leu	№ 16 Volga-Ural sandy (5) № 19 Pre-Usturt desert (1)
Pricasp-4 2.MED1 1979–2015	<i>flgK</i> 244C>T, Gln82*	№ 3 Дагестанский равнинно-предгорный (4) № 11 Джейранчельский равнинно-предгорный (1) № 14 Прикаспийский Северо-Западный (3) № 16 Волго-Уральский песчаный (1) № 43 Прикаспийский песчаный (32)
	<i>upo1240</i> 127A>G, Thr43Ala	
	<i>upo1564</i> 265C>T, Gln89*	№ 3 Dagestan plain-piedmont (4) № 11 Jeyranchel plain- piedmont (1) № 14 Caspian North-Western (3) № 16 Volga-Ural sandy (1) № 43 Caspian sandy (32)
Pricasp-4.1 2.MED1 1983–2006	<i>bglY</i> 96C>T, sSNP	№ 3, № 14, № 43 – (6)
Pricasp-4.2 2.MED1 1980–2015	<i>tssG</i> 1023T>G, sSNP	№ 3, № 43 – (10)

Окончание табл. 2 / Ending of table 2

1	2	3
Pricasp-5 2.MED1 1959–1992	<i>sel</i> 404C>T, Ser135Phe	№ 15 Волго-Уральский степной (9) № 16 Волго-Уральский песчаный (23) № 17 Урало-Уильский степной (13) № 18 Урало-Эмбенский пустынный (3)
	<i>уро4015</i> 290A>C, His97Pro	№ 15 Volga-Ural steppe (9) № 16 Volga-Ural sandy (23) № 17 Ural-Uil steppe (13) № 18 Ural-Emben desert (3)
Pricasp-6 2.MED1 1912–1938	<i>уро0379</i> 238G>A, Val80Met	№ 14 Прикаспийский Северо-Западный степной (4) № 16 Волго-Уральский песчаный (7)
	<i>cysJ</i> 403C>T, Arg135Trp	№ 43 Прикаспийский песчаный (2) Шри-Ланка (1)
	<i>aspB</i> 1431G>T, Lis477Asn	№ 14 Caspian North-Western steppe (4) № 16 Volga-Ural sandy (7) № 43 Caspian sandy (2) Sri Lanka (1)
Pricasp-7 2.MED1 1968–2001	<i>уро3544</i> 544G>T, Ala182Ser	№ 1 Центральнo-Кавказский высокогорный (3) № 2 Терско-Сунженский низкогорный (5) № 7 Приараксинский низкогорный (2) № 14 Прикаспийский Северо-Западный степной (2)
	<i>уро4104</i> 95C>T, Thr32Ile	№ 1 Central-Caucasian high-mountain (3) № 2 Terek-Sunzha low-mountain (5) № 7 Araks low-mountain (2) № 14 Caspian North-Western steppe (2)
Pricasp-8 2.MED1 1986–1992	<i>уро0033</i> 496C>T, Arg166Trp	№ 15 Волго-Уральский степной (9) № 15 Volga-Ural steppe (9)
	<i>ptsP</i> 275A>C, Asp92Ala	
	<i>selenide</i> 449G>T, Gly150Val	
Pricasp-9 2.MED1 1964–1978	<i>gltP</i> 1387A>T, Ile463Phe	№ 9 Кобыстанский равнинно-предгорный (3) № 43 Прикаспийский песчаный (1) № 18 Урало-Эмбенский пустынный (1) № 20 Устьюртский пустынный (1) № 23 Мангышлакский пустынный (2) № 9 Kobystan plain-piedmont (3) № 43 Caspian sandy (1) № 18 Ural-Emben desert (1) № 20 Ustyurt desert (1) № 23 Mangyshlak desert (2)

чанный очаг) и в 1959 г. (Атырауская область, Волго-Уральский степной очаг).

Генотип Pricasp-8 составили 9 штаммов, выделенных в 1986–1992 гг. в Волго-Уральском степном очаге от носителей и переносчиков. Для него характерны три несинонимичных SNPs в генах: *уро0033*, *ptsP*, *selenide*. Отсутствие в этом генотипе штаммов из других очагов позволяет предположить, что популяция Pricasp-8 была распространена в период 1986–1992 гг. только на территории Волго-Уральского степного очага чумы. По результатам SNP-генотипирования и филогенетического анализа штаммы возбудителя чумы, относящиеся к вышеперечисленным генотипам второй половины XX в. (Pricasp-3, Pricasp-4, Pricasp-5, Pricasp-8 и Pricasp-9),

являются потомками штаммов 1945 г. из Северного Приаралья, ветвь которых отошла от политомии первой половины XX в. (рисунок).

Двенадцать штаммов, выделенных в 1968–2001 гг. в низкогорных очагах Кавказа и в Прикаспийском Северо-Западном степном очаге чумы, по результатам фрагментного секвенирования вошли в генотип Pricasp-7. Для этого генотипа характерно наличие двух несинонимичных SNPs в генах *уро3544* и *уро4104*. У штаммов 1972–1973 гг., выделенных на Ергенинской возвышенности, установлен SNP-профиль, сходный со штаммами из низкогорных очагов Предкавказья. Кратковременная активизация Прикаспийского Северо-Западного очага в 1972–1973 гг. на Ергенинской возвышенности произошла

из-за распространения на этих территориях штаммов из Предкавказья. Штаммы 1986 г., полученные в восточной части этого очага – в Юстинском и Ики-Бурульском районах Республики Калмыкия (генотип Pricasp-4), напротив, являлись потомками штаммов 1945 г. из Северного Приаралья, занимающих анцестральное положение по отношению к политомии второй половины XX в. Это косвенно доказывает распространение популяции 2.MED1 из Северного Приаралья через очаги Северного Прикаспия. Для восьми штаммов генотипа Pricasp-9, выделенных в очагах Северного, Северо-Западного и Восточного Прикаспия в 1964–1978 гг., характерно наличие SNP в гене *gltP* (табл. 2). Большая территория выделения штаммов свидетельствуют о том, что распространение этого геноварианта могло происходить через порты Каспийского моря с торговыми судами.

Таким образом, по результатам проведенного молекулярного генотипирования определены основные SNP-генотипы, характерные для *Y. pestis* средневекового биовара из очагов Прикаспия, которые могут быть использованы для детализации паспортизации и молекулярного мониторинга этих очаговых по чуме территорий. С помощью WG-SNP-анализа и филогенетической реконструкции определены 24 гена, составляющие 9 SNP-генотипов средневекового биовара *Y. pestis*, штаммы которого выделены с 1912 по 2015 год в Прикаспии и сопредельных очагах чумы. Разработан способ и подобраны праймеры для SNP-генотипирования методом ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. По результатам генотипирования 190 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара основного подвиды из 17 природных очагов Прикаспия, Кавказа и Центральной Азии установлена принадлежность 176 штаммов к выявленным генотипам: Pricasp-1 – 18 шт., Pricasp-2 – 20 шт., Pricasp-3 – 6 шт., Pricasp-4 (включая 4 1+4 2) – 41 шт., Pricasp-5 – 48 шт., Pricasp-6 – 14 шт., Pricasp-7 – 12 шт., Pricasp-8 – 9 шт., Pricasp-9 – 8 шт. Применение этого метода обеспечивает дифференциацию геновариантов штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, распространенных в природных очагах Прикаспия, по маркерным полиморфным нуклеотидам SNPs, периоду выделения и географической принадлежности. Установленные SNP-профили штаммов средневекового биовара *Y. pestis*, полученных более чем за столетний период в очагах Прикаспийского региона, создают предпосылки для создания канонического SNP-профиля (canSNP) для молекулярно-генетической детализации паспортизации очагов, в которых циркулирует этот высоковирулентный биовар. Это также может повысить эффективность эпидемиологического отслеживания происхождения геновариантов *Y. pestis* при проведении молекулярно-эпидемиологического мониторинга.

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

Список литературы

1. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova 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.
2. Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Оглодин Е.Г., Никифоров К.А., Корзун В.М., Вержущий Д.Б., Чипанин Е.В., Аязбаев Т.З., Джапарова А.К., Бердиев С.К., Лопатин А.А., Дубянский В.М., Щербак С.А., Балахонov С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпидемиологическая ситуация по чуме в 2020 г. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации и других стран СНГ на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 1:52–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-52-62.
3. Кутырев В.В., Попова А.Ю., редакторы. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: Амирит; 2016. 248 с.
4. Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'hova Z.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kutyrev V.V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS One.* 2021; 16(2):e0244615. DOI: 10.1371/journal.pone.0244615.
5. 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.
6. Lärkeryd A., Myrtenäs K., Karlsson E., Dwibedi C.H., Forsman M., Larsson P., Johansson A., Sjödin A. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics.* 2014; 30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Шико; 2013. 560 с.
8. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., 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 variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
9. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(2):221–4. DOI: 10.1093/molbev/msp259.
10. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 2012; 9(8):772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.
11. Balykova A.N., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Five draft genome sequences of historical *Yersinia pestis* strains of phylogroups 2.MED4 and 2.MED1 of the medieval biovar. *Microbiol. Resour. Announc.* 2022; 11(5):e0004422. DOI: 10.1128/mra.00044-22.

References

1. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova 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.
2. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Oglodin E.G., Nikiforov K.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Chipanin E.V., Ayazbaev T.Z., Dzhabarova A.K., Berdiev S.K., Lopatin A.A., Dubyansky V.M., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Epidemiological situation on plague in 2020. Forecast of epizootic activity of natural plague foci in the Russian Federation and other CIS countries for 2021]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):52–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-52-62.
3. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague in the Territory of the Russian Federation and Former Soviet Union Countries (1876–2016)]. Saratov: LLC “Amirrit”; 2016. 248 p.
4. Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'hova Z.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kutyrev V.V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS One.* 2021; 16(2):e0244615. DOI: 10.1371/journal.pone.0244615.

5. 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.
6. Lärkeryd A., Myrtenäs K., Karlsson E., Dwibedi C.H., Forsman M., Larsson P., Johansson A., Sjödin A. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics.* 2014; 30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113.
7. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: CJSC “Shiko”; 2013. 560 p.
8. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., 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 variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
9. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(2):221–4. DOI: 10.1093/molbev/msp259.
10. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModel-Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 2012; 9(8):772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.
11. Balykova A.N., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. Five draft genome sequences of historical *Yersinia pestis* strains of phylogroups 2.MED4 and 2.MED1 of the medieval biovar. *Microbiol. Resour. Announc.* 2022; 11(5):e0004422. DOI: 10.1128/mra.00044-22.

Authors:

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

Об авторах:

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

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-50-56

УДК 616.98:579.842.23

Т.В. Гапельченкова, Р.З. Шайхутдинова, А.С. Трунякова, Т.Э. Светоч, Т.И. Комбарова,
М.Е. Платонов, А.И. Борзилов, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская

Динамика антительного ответа морских свинок к белкам *Yersinia pestis* при чуме

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», р.п. Оболенск, Российская Федерация

Конструирование новых средств специфической профилактики чумы, тем более субъединичных вакцин, невозможно без исследования роли отдельных антигенов в проявлении патогенных и иммуногенных свойств *Yersinia pestis*. **Цель** настоящего исследования состояла в определении методом иммуноферментного анализа (ИФА) уровня антител к антигенам чумного микроба в сыворотках морских свинок, выживших после заражения сублетальными дозами вирулентных штаммов чумного микроба. **Материалы и методы.** Морских свинок заражали подкожно штаммом дикого типа *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 или бескапсульным (Caf1⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 в дозе 30 КОЕ. Кровь от больных или переболевших чумой морских свинок отбирали на 15, 30, 60 и 90-е сутки после заражения. Антительный ответ определяли к 18 рекомбинантным белкам *Y. pestis* методом ИФА. **Результаты и обсуждение.** У морских свинок наблюдали неоднородный антительный ответ к большинству антигенов с вариацией титров IgG от животного к животному. После введения штаммов *Y. pestis* 231 и *Y. pestis* 358/12 иммунодоминантный характер имели 6 (AilC, Caf1, Pla, YopM, YopL, TalB) и 6 (AilC, pN6, SurA, YopM, MetQ, HtpG) из 18 использованных белков соответственно. Для большинства исследуемых антигенов наблюдали подъем титров антител в сыворотках морских свинок, зараженных штаммом дикого типа *Y. pestis* 231, к 90-м суткам наблюдения, в то время как при заражении бескапсульным (Caf1⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 обнаружили тенденцию снижения титров специфических антител к 90-м суткам. Сохранение в организме морских свинок в течение длительного времени после перенесенного заболевания антител к белкам *Y. pestis* разной локализации, функциональной активности, степени представленности на поверхности бактериальной клетки свидетельствует о множественном характере формирования иммунного ответа при чуме. Полученные результаты важны для дизайна эффективных вакцин против чумы, а также для поиска новых мишеней для диагностики данной инфекции.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, бубонная чума, рекомбинантные антигены, антитела, иммунный ответ.

Корреспондирующий автор: Гапельченкова Татьяна Владимировна, e-mail: gapelchenkova@obolensk.org.

Для цитирования: Гапельченкова Т.В., Шайхутдинова Р.З., Трунякова А.С., Светоч Т.Э., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Борзилов А.И., Копылов П.Х., Дентовская С.В. Динамика антительного ответа морских свинок к белкам *Yersinia pestis* при чуме. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:50–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-50-56

Поступила 15.04.2022. Отправлена на доработку 05.05.2022. Принята к публ. 29.07.2022.

T.V. Gapel'chenkova, R.Z. Shaikhutdinova, A.S. Trunyakova, T.E. Svetoch, T.I. Kombarova,
M.E. Platonov, A.I. Borzilov, P.Kh. Kopylov, S.V. Dentovskaya

Dynamics of Antibody Response to *Yersinia pestis* Proteins in Plague Affected Guinea Pigs

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. Designing of new means for the specific prevention of plague, especially protein subunit vaccines, is impossible without studying the role of individual antigens in the manifestation of the pathogenic and immunogenic properties of *Yersinia pestis*. **The aim** of the present study was to determine the antibody levels to *Y. pestis* antigens in guinea pigs that survived infection with sub-lethal doses of virulent plague agent strains using enzyme immunoassay (ELISA). **Materials and methods.** Guinea pigs were inoculated subcutaneously with 30 CFU of the wild type *Y. pestis* subsp. *pestis* strain 231 or non-capsular *Y. pestis* subsp. *pestis* Caf1-negative strain 358/12. Blood samples from sick or recovered guinea pigs were collected on day 15, 30, 60, and 90 after infection. The antibody response was assessed by 18 recombinant *Y. pestis* proteins in ELISA. **Results and discussion.** Heterogeneity of the antibody responses to the majority of the antigens with variation of IgG titers from animal to animal has been revealed. We observed increase in antibody titers by day 90 for the most analyzed antigens in the sera of the guinea pigs injected with wild type *Y. pestis* 231. On the contrary we found reduction in antibody titers by day 90 in case of inoculation with *Y. pestis* 358/12. The preservation of antibodies to *Y. pestis* proteins of different localization in the organism of the guinea pigs, as well functional activity, and the degree of representation on the surface of bacterial cell for a prolonged period of time indicates the multiplex nature of the plague immunity formation. Our findings are significant for the future design and development of effective vaccines against plague and the search for new targets for diagnostics of this disease.

Key words: *Yersinia pestis*, bubonic plague, recombinant antigens, antibodies, immune response.

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

Funding: The work was carried out within the frames of the sectoral research program of the Rospotrebnadzor for 2021–2025 “Problem-Oriented Scientific Research in the Field of Epidemiological Surveillance of Infectious and Parasitic Diseases”.

Corresponding author: Tat'yana V. Gapel'chenkova, e-mail: gapelchenkova@obolensk.org.

Citation: Gape'chenkova T.V., Shaikhutdinova R.Z., Trunyakova A.S., Svetoch T.E., Kombarova T.I., Platonov M.E., Borzilov A.I., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. Dynamics of Antibody Response to *Yersinia pestis* Proteins in Plague Affected Guinea Pigs. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 4:50–56. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-50-56

Received 15.04.2022. Revised 05.05.2022. Accepted 29.07.2022.

Gape'chenkova T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2958-0144>
Shaikhutdinova R.Z., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6985-6822>
Trunyakova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9223-2105>
Svetoch T.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3540-1176>
Kombarova T.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-1739>

Platonov M.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3946-1755>
Borzilov A.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6309-7645>
Kopylov P.Kh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0250-3237>
Dentovskaya S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

Возбудитель чумы – *Yersinia pestis* – является одним из самых смертоносных инфекционных агентов, циркулирующих в природных биоценозах среди позвоночных хозяев и членистоногих переносчиков и представляющих серьезную угрозу здоровью населения РФ и всего мира. Так, эпидемические проявления чумы в 2011–2020 гг. зарегистрированы на территории 11 государств, общее число случаев заражения чумой в мире за это время составило 6347, из них летальных – 892 [1]. Быстрое развитие инфекционного процесса, несмотря на доступность лечения антибиотиками, может вызвать высокий уровень смертности [2], поэтому превентивная защита населения, проживающего в эндемичных районах, остается актуальной.

В настоящее время не существует ни одной чумной вакцины, получившей одобрение ВОЗ. Применявшиеся для людей, входящих в группы повышенного риска, вакцины представляют собой либо цельноклеточные варианты бактерий *Y. pestis*, инактивированные формальдегидом, либо варианты живого аттенуированного штамма *Y. pestis* EV76. Ограничение их применения, вызванное недостаточной эффективностью первого препарата и сохраняющейся остаточной вирулентностью второго, стимулирует исследования по разработке нетоксичных, высокоэффективных чумных вакцин. Одним из направлений совершенствования вакцинопрофилактики чумы является создание субъединичных вакцин, содержащих факторы патогенности чумного микроба, основными из которых являются иммунодоминантные белки: Caf1⁺ (F1) – капсульный антиген, подавляющий фагоцитоз [3], и LcrV (V) – ключевой регулятор системы секреции бактерий III типа, который отвечает за доставку цитотоксических белков в цитозоль клеток млекопитающих [4]. Было показано, что эти комбинированные вакцины обеспечивают эффективную защиту от бубонной и легочной формы чумы на животных моделях [5–7]. Однако существование бескапсульных, но сохранивших вирулентность штаммов *Y. pestis*, а также обнаружение мутаций в гене, кодирующем белок LcrV, обосновывают необходимость разработки многокомпонентных субъединичных вакцин, в состав которых включены другие белки, обладающие защитными свойствами.

Конструирование новых средств специфической профилактики чумы, тем более субъединичных вакцин, невозможно без исследования роли отдельных антигенов в проявлении патогенных и иммуногенных свойств *Y. pestis*. Условия существования чумного микроба: внешняя среда, организм перенос-

чика (блохи, организм млекопитающего) – оказывают влияние на функционирование генетического аппарата, обеспечивающего биосинтез структурных компонентов бактериальной клетки, позволяющих приспосабливаться и существовать в различных экологических нишах.

Для формирования протективного противочумного иммунитета необходима специфическая активация клеточного и гуморального звеньев иммунной системы, начинающаяся с распознавания наивными лимфоцитами антигенов, представленных на поверхности профессиональных «антигенпрезентирующих клеток» (АПК) в сочетании с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Антительный ответ зависит от степени представленности антигенов и поэтому является чувствительным индикатором роли белков, важных для бактерии во время инфекционного процесса.

В настоящем исследовании методом иммуноферментного анализа (ИФА) определили уровни антител к рекомбинантным белкам чумного микроба в сыворотках морских свинок, выживших после заражения сублетальными дозами вирулентных штаммов *Y. pestis*, для выбора наиболее перспективных антигенов, способных вызывать защитный иммунный ответ.

Материалы и методы

Штаммы, плазмиды, среды. Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе, приведены в табл. 1. Микроорганизмы (*Escherichia coli*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) выращивали на жидких и плотных питательных средах: LB (Luria Bertani broth medium: триптон – 1 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, натрий хлористый – 1 %), Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и ВНИ (Brain Heart Infusion, HiMedia, Индия). В случае необходимости в питательные среды добавляли антибиотики: 100 мкг/мл ампициллина или 40 мкг/мл канамицина.

Праймеры. Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в табл. 2.

Клонирование и очистка рекомбинантных белков. Плазмидные конструкции, содержащие амплифицированные в ПЦР гены *ymt*, *pla*, *pst*, *ompA*, *surA*, *ailC*, *nlpD*, *yapF*, *yapM*, *yapL*, *metQ*, *glnA*, *hlyG*, *talB*, *fbaA* *Y. pestis*, включающие сайты для эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI, создали с использованием вектора pET32b(+). Клонирование осуществляли согласно руководству Т. Maniatis *et al.* [11].

Таблица 1 / Table 1

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в исследовании
Bacterial strains and plasmids used in this study

Штамм или плаزمид Strain or plasmid	Генотип или соответствующая характеристика Genotype or relevant characteristics	Источник/ссылка Source/Reference
<i>Y. pestis</i> 231	Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ , вирулентный (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>antiqua</i>) Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ , virulent (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>antiqua</i>)	ГКПМ-Оболensk SCPM-Obolensk
<i>Y. pestis</i> И-358/12	Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ , вирулентный (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>medievalis</i>) Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ , virulent (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>medievalis</i>)	ГКПМ-Оболensk SCPM-Obolensk
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ ompT hsd S _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Novagene, Madison, WI, USA
<i>E. coli</i> DH5α	lacZ DM15 D(lacZYA-argF) recA1 endA1 hsdR17(rk 2mk+) phoA supE44 thi gyrA96 relA1	ГКПМ-Оболensk SCPM-Obolensk
<i>Y. pseudotuberculosis</i> EV11MpFSK3/9	O:3 серотип, несет плазмиду pFSK3/9; Km ^R O:3 serotype, carries the plasmid pFSK3/9; Km ^R	[8]
pET32b(+)	Экспрессионный вектор с T7-промотером для прокариот; Ap ^R Prokaryotic expression vector with T7 promoter; Ap ^R	Novagen, Madison, WI, USA
pFSK3/9	cafI ^R +, cafI ^M +, cafI ^A +, cafI ⁺ , pla ⁺ , pst ⁺ , imm; Km ^R	[8]
pIG824	Производное космиды pHC79, содержащее полный оперон <i>psaEFABC</i> ; Ap ^R Tc ^R A derivative of pHC79 cosmid containing the complete operon <i>psaEFABC</i> ; Ap ^R Tc ^R	[9]
pETV-I-3455	Производное pET32b(+), кодирующее синтез полипептида LcrV _(G113) <i>Y. pestis</i> A derivative of pET32b(+) encoding the synthesis of the polypeptide LcrV _(G113) <i>Y. pestis</i>	[10]

Примечание: ГКПМ-Оболensk – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур.

Note: SCPM-Obolensk – The State Collection of Pathogenic Microbes and Cell Cultures.

Выделение белков проводили методом Ni²⁺-хелатной аффинной хроматографии с использованием носителя производства фирмы Tosoh, Япония, AF-Chelate TOYOPEARL 650M, упакованного в колонку объемом 25 мл; нагрузку и очистку колонки ионами никеля проводили самостоятельно по инструкции производителя. Контроль экспрессии после индукции и последующего выделения белков осуществляли электрофоретически в системе ПААГ с 0,1 % ДСН по методу U.K. Laemmli [12] и О. Остерману [13] и методом иммуноблота [14] с использованием меченых пероксидазой моноклональных антител против встроенного гексапептида (His)₆ (#A7058, Sigma, США).

F1-антиген выделяли из супернатанта культуры *Y. pseudotuberculosis* 11M/pFSK3/9 методом высаливания раствором (NH₄)₂SO₄ (30 %) и последовательной гель-фильтрацией согласно МР 4.2.0219-20 «Выделение и очистка F1-антигена чумного микроба». рН6-антиген (Psa) получали из супернатанта культуры *E. coli* DH5α/pIG824 методом осаждения в изoeлектрической точке, рН 4,01 [9]. LcrV-антиген выделяли и очищали с последовательным использованием гель-фильтрации, анионообменной хроматографии (DEAE TSK 650M) и гидрофобной хроматографии [10].

Животные. В экспериментах *in vivo* использовано 27 нелинейных морских свинок, самцы/самки (225±25) г. Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (№ P05-28). Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Для содержания животных в условиях

BSL-3 использовали микроизоляторы, снабженные HEPA-фильтрами (Lab Products Inc., США). Температура, влажность, вентиляция и освещение соответствовали стандартным нормам для содержания животных. Животные имели свободный доступ к воде и корму.

Моделирование чумной инфекции. Для моделирования заражения чумой в диких условиях одну группу морских свинок (N=15) заражали подкожно штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 дикого типа, другую (N=12) – бескапсульным (CafI⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 в дозе 30 КОЕ. Кровь от больных или переболевших чумой морских свинок (n=3) получали на 15, 30, 60 и 90-е сутки после заражения. Для получения сывороток цельную кровь выдерживали в течение 18 ч при температуре +4 °С. Образовавшиеся сыворотки аккуратно отбирали и разводили 1:10 физиологическим раствором (PBS), содержащим мертиолят натрия (1:5000). После прогревания в течение 30 минут при температуре 56 °С их расфасовывали и замораживали. Сыворотки от неинфицированных животных (n=3), инактивированные аналогичным способом, служили отрицательным контролем.

Иммуноферментный анализ. ИФА проводили, как описано ранее [15]. Для сенсибилизации планшета использовали растворы рекомбинантных белков *Y. pestis* (6 мкг/мл) в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9,6). Титром антител считали величину наибольшего разведения иммунной сыворотки, которой соответствовала оптическая плотность (ОП), превосходящая контрольное значение на 0,1 единицы, при условии достижения значения ОП не меньше 0,2. Для статистического анализа использовали

Таблица 2 / Table 2

Последовательности праймеров, использованных в работе
Sequences of primers used in this study

Праймеры Primers	Последовательность (5'-3') Primer sequence (5'-3')
Ymt587F	GCGCCATATGCTTCAAATAGATAATGTC
YmtR	ATACTCGAGATTGGGCTTAATTTGGAAATG
Pla-NdeI	GGCATATGAAGAAAAGTTCTATTGTGG
Pla-HindIII	TTAAGCTTGAAGCGATATTGCAGA
PstF	CAATCATATGTCAGATACAATGGTAGTG
PstR	CTCCTCGAGTTTAAACAATCCACTATC
OmpANdeI	GGCATATGAAAAAGACAGCTATCGC
OmpAXhoI	GGCTCGAGAGCCTGTGGCTGAGTCACAAC
SurANdeI	TTGATGCATATGAAGAACTGGAGAACGCT
SurAXhoI	TTCTCGAGTTGTGGTTGTGCATTACTAC
AilC-NcoI	GGTCCATGGTGTATGCCGAAGGCGAAAGC
AilC-XhoI	AAACTCGAGGAACCGGTAACCCGCGCCAA
NlpD-NdeI	CCTCGCATATGAGCACAGGAAGCCCAATG
NlpD-XhoI	CCCTCGAGTCGCTGCGGAAGGTAACGCAG
YapFNdeI	GGCATATGGATCAGACCCTCCACTTCGC
YapFPasXhoI	GGCTCGAGCACTGGATCACGACGGTACTC
yapM-NdeI	CCTGTCTATGGTAGTATGCCACCAGAAGC
yapM-XhoI	CCCTCGAGAGTTGCTGCTGACTGATTAC
yapL-Nde	CCTGTCTATGGAATTCATGATTGATTACTG
yapL-Xho	GGCTCGAGACCTTTATATTATTAAATCC
MetQNdeI	CGCCCGCATATGCTTTAAATTCAAATC
MetQXhoI	AAACTCGAGCCAGCCTTTTACTGCGCCAC
CF-glnA	ACCAACATATGACAAATCCGGGAGATATAAG
glnAXhoI	AAACTCGAGAACGCTGTAATACAGTTCGAAC
htpG-NdeI	GGTGGCATATGAATATGAAAGGTCAAGAAACC
htpG-XhoI	ATACTCGAGAGCCGTGAGTAAGTATTCATTC
TalBNdeI	AACCGCATATGACCGATAAACTTACTTC
TalBXhoI	TTCTCGAGCAACAAGTCGGAGATCAT
fbaANdeI	GGCATATGTCTAAATTTTGTATTCG
fbaAXhoI	GGCTCGAGCAGTACGTCGATGGCGTTACG

Примечание: сайты связывания эндонуклеаз рестрикции подчеркнуты.

Note: restriction endonuclease binding sites are underlined.

GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, США), выполняя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Конструирование плазмид и выделение антигенов *Y. pestis*. Кодирующие последовательности генов *ymt*, *pla*, *pst*, *ompA*, *surA*, *ailC*, *nlpD*, *metQ*, *glnA*, *htpG*, *talB*, *fbaA*, а также passenger-домен генов *yapF*, *yapM* и *yapL* клонировали в экспрессирующем векторе pET32b(+) по сайтам эндонуклеаз NdeI и XhoI. Белки Ymt (595 а.о.), Pst (365 а.о.), SurA (442 а.о.),

MetQ (279 а.о.), GlnA (485 а.о.), HtpG (632 а.о.), TalB (325 а.о.) и Fba (367 а.о.) содержали полигистидиновую последовательность (His₆), выделены методом аффинной Ni⁺⁺-хелатной хроматографии в нативных условиях. Белки Pla (345 а.о.), OmpA (361 а.о.), AilC (168 а.о.), NlpD (341 а.о.), YapF (486 а.о.), YapL (473 а.о.) и YapM (428 а.о.) выделены тем же методом, но в присутствии 6 М мочевины в денатурирующих условиях в связи с нерастворимой природой (рис. 1). Рекомбинантные белки F1, pH6, LcrV выделяли, как описано ранее [9, 10] (рис. 1).

Антителный ответ к антигенам *Y. pestis* у морских свинок, переживших подкожное заражение вирулентными штаммами. Морские свинки традиционно используются в качестве лабораторных животных для моделирования бубонной чумы, так как обладают высокой чувствительностью к *Y. pestis*, диссеминация возбудителя при подкожном заражении происходит в большинство органов с возможным возникновением вторичной легочной инфекции [16]. В настоящем исследовании морских свинок заражали малой дозой штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 дикого типа (ЛД₅₀=24 КОЕ) или бескапсульным (CafI⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 (ЛД₅₀=316 КОЕ), для снижения вирулентности не подвергавшихся предварительной анимализации. Развитие заболевания при использованной заражающей дозе было медленным, с потерей животными

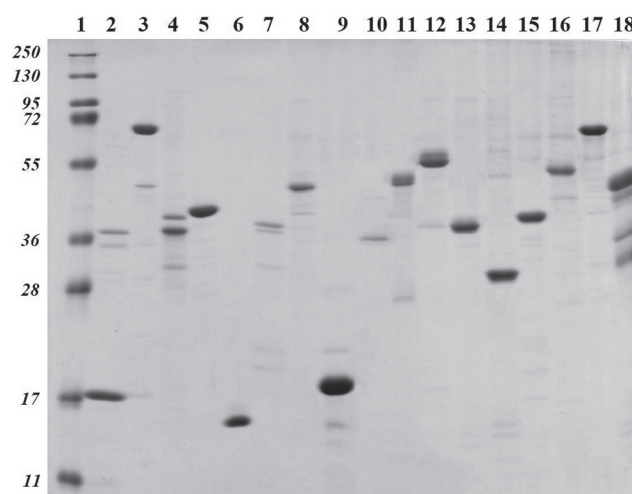


Рис. 1. Электрофорез препаратов очищенных антигенов *Y. pestis*, использованных для определения титров антител:

1 – маркеры молекулярных масс белков, Fermentas, # Sm1811 (сверху вниз: кДа – 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 11); 2 – смесь LcrV (37 кДа) и F1 (17 кДа); 3 – Ymt (68,6 кДа); 4 – Pla (38,3 кДа); 5 – Pst (41,1 кДа); 6 – pH6-антиген (15 кДа); 7 – OmpA (39 кДа); 8 – SurA (48,8 кДа); 9 – AilC (19,0 кДа); 10 – NlpD (35,9 кДа); 11 – YapF (49,7 кДа); 12 – смесь YapM (45,3 кДа), Fba (40,2 кДа) и MetQ (30,4 кДа); 13 – YapL (51,1 кДа); 14 – GlnA (52,5 кДа); 15 – HtpG (72,1 кДа); 16 – TalB (36,1 кДа)

Fig. 1. Electrophoresis of purified *Y. pestis* antigen preparations utilized to determine the antibody titers:

1 – markers of protein molecular weights, “Fermentas”, # Sm1811 (from top to bottom: кDa – 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 11); 2 – mix of LcrV (37 kDa), and F1 antigen (17 kDa); 3 – Ymt (62 kDa); 4 – Pla (38 kDa); 5 – Pst (41 kDa); 6 – pH6 antigen (15 kDa); 7 – OmpA (40.6 kDa); 8 – SurA (49.9 kDa); 9 – AilC (19.0 kDa); 10 – NlpD (35 kDa); 11 – YapF (49.7 kDa); 12 – mix YapM (45.3 kDa), Fba (40.2 kDa), and MetQ (30.4 kDa); 13 – YapL (51.1 kDa); 14 – GlnA (52.5 kDa); 15 – HtpG (72.1 kDa); 16 – TalB (36.1 kDa)

около 15 % веса к 7–16-м сут, что согласуется с опубликованными ранее данными [17]. В группе животных, инфицированных подкожно штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 231, пало 3 из 15 взятых в эксперимент особей, в группе *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 гибели не наблюдали.

Антительный ответ определяли к 18 рекомбинантным белкам *Y. pestis*, кодируемым генами плазмидной и хромосомной локализации, а именно капсульному антигену (Caf1, F1), мышиному токсину (Ymt), V-антигену (LcrV), активатору плазминогена (Pla), пестицину (Pst), рН6-антигену (Psa), белку внешней мембраны (OmpA), липопротейну D (NlpD), шаперону (SurA), белку локуса адгезии/инвазии (AilC); автотранспортерам Va-типа секреции: YapM, YapF, YapL, субстрат-связывающему белку ABC-транспортера метионина (MetQ), глутаминсинтетазе (GlnA), белку теплового шока (HtpG), трансальдолазе B (TalB), фруктозо-бисфосфатальдолозе (Fba).

У больных или переболевших бубонной чумой морских свинок наблюдали неоднородный антительный ответ к большинству использованных антигенов с вариацией титров IgG от животного к животному (рис. 2). Максимальные титры антител обнаружили к белку AilC при заражении штаммами *Y. pestis* 231 и 358/12; белкам, ассоциированным с патогенностью (Caf1 и Pla для животных, зараженных штаммом *Y. pestis* 231; рН6 и SurA – после введения штамма *Y. pestis* 358/12); белкам-автотранспортерам YapM, YapL и трансальдолазе B при заражении штаммом

Y. pestis 231 или белку-автотранспортеру YapM, субстрат-связывающему белку ABC-транспортера метионина MetQ и белку теплового шока HtpG при подкожном введении штамма *Y. pestis* 358/12.

Динамика роста титров антител в сыворотках морских свинок, зараженных штаммом дикого типа *Y. pestis* 231, не носила прямолинейного характера, однако для большинства исследуемых белков, за исключением F1, LcrV и Pst, наблюдали подъем к 90-м сут наблюдения (рис. 2, А). Причем значения специфических титров к 90-м сут превышали значения титров в первой точке забора крови примерно в 3–30 раз. Достоверные отличия в динамике титров антител установили для белков NlpD и HtpG ($p < 0,05$), V-антигена ($p < 0,001$), белков F1, AilC, SurA и GlnA ($p < 0,005$), а также белка YapM ($p < 0,0001$).

В сыворотках морских свинок, зараженных бескапсульным (Caf1⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12, обнаружили рост титров специфических антител для белков Pla, Pst, AilC, YapF, YapL и Fba к 15-м сут, для YapM и TalB – к 30-м сут и для LcrV, NlpD, рН6, OmpA, SurA и MetQ – к 60-м сут с общей тенденцией снижения к 90-м сут наблюдения (рис. 2, В). Причем для подавляющего большинства исследованных белков, за исключением пяти (V₃₄₅₅, рН6, YapM, Fba и MetQ), различия в титрах антител между точками забора крови носили достоверный характер ($p < 0,05$).

Попытки оценить длительность иммунитета, сформированного после перенесенного заболевания,

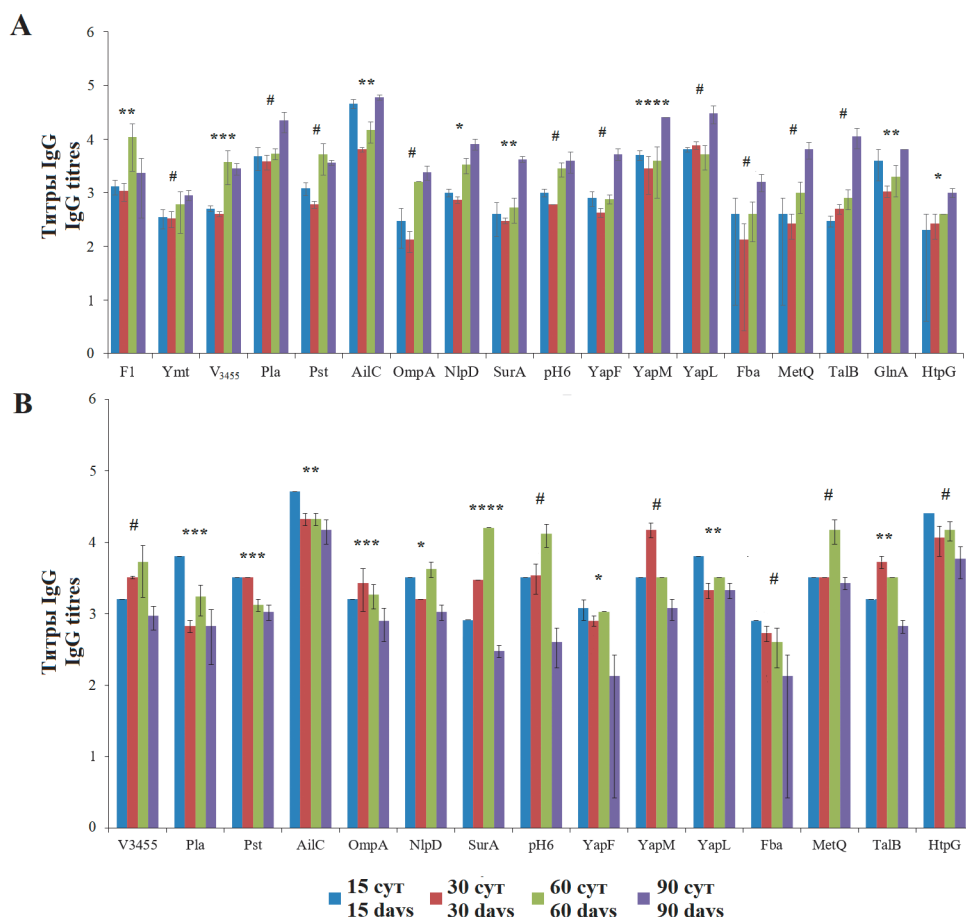


Рис. 2. Динамика титров специфических антител против белков чумного микроба в сыворотках морских свинок на различные сроки после заражения вирулентными штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 дикого типа (А) или бескапсульным (Caf1⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 (В):

$p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Fig. 2. Dynamics of specific antibody titers against *Y. pestis* proteins in guinea pig sera at different periods after infection with virulent strains of *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 of the wild type (A) or non-capsular Caf1-negative strain of *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 (B):

$p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

ния или вакцинации, предпринимаются многими исследователями. В основном в качестве маркирующих антигенов используют один из иммунодоминантных – капсульный антиген F1 и LcrV *Y. pestis*. G. Benner *et al.* [18] методом ИФА обнаружили через 30 сут в крови у мышей, выживших после заражения *Y. pestis*, антитела к F1, LcrV, Pla, YopM, YopH. V. Andrianaivoarimanana *et al.* [19] показали методом ИФА, что в крови переболевших чумой крыс можно обнаружить анти-F1 IgG в течение многих месяцев. Т.Е. Ерова *et al.* [20] в крови переболевших крыс на 64-е сут идентифицировали антитела к белкам F1, Pla, Ail и OmpA чумного микроба. В. Li *et al.* [21] с использованием панели белковых микрочипов (149 белков *Y. pestis*) выявили 50 белков, инициирующих антительный ответ у кроликов на 50-й день после иммунизации вакцинным штаммом EV76. Авторы обнаружили иммунодоминантный характер 13 белков, в том числе F1, LcrV, рН6, OmpA. В следующей работе В. Li *et al.* [22] показали методом ИФА наличие антител к F1 в сыворотке крови у 69,5 % пациентов, переболевших чумой более 10 лет назад. При этом на панели белковых микрочипов (218 белков *Y. pestis* различной локализации) авторы обнаружили антитела к 20 белкам, в том числе F1, LcrV, OmpA, рН6, в сыворотках пациентов, со времени заболевания которых прошло от 5 до 20 лет. В настоящем исследовании мы впервые проанализировали иммунный ответ у морских свинок, переживших подкожное заражение штаммами чумного микроба, для получения информации об экспрессии *in vivo* и иммуногенности использованных белков *Y. pestis* в процессе инфекции.

Несмотря на несомненное преобладание иммунного ответа на иммунодоминантные антигены, сохранение в организме в течение длительного времени после перенесенного заболевания антител к белкам *Y. pestis* разной локализации, функциональной активности, степени представленности на поверхности бактериальной клетки свидетельствует о множественном характере формирования иммунитета при чуме. Полученные результаты важны для дизайна эффективных вакцин против чумы, а также для поиска новых мишеней для диагностики данной инфекции.

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

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Список литературы

1. Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Поршаков А.М., Ляпин М.Н., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Аязбаев Т.З., Лопатин А.А., Ашибокоев У.М., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В.

Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по чуме в Российской Федерации и прогноз ее развития на 2020–2025 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-5.

2. Dillard R.L., Juergens A.L. Plague. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

3. Du Y., Rosqvist R., Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* 2002; 70(3):1453–60. DOI: 10.1128/IAI.70.3.1453-1460.2002.

4. Mueller C.A., Broz P., Müller S.A., Ringler P., Erne-Brand F., Sorg I., Kuhn M., Engel A., Cornelis G.R. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*. 2005; 310(5748):674–6. DOI: 10.1126/science.1118476.

5. Anderson G.W. Jr., Leary S.E., Williamson E.D., Titball R.W., Welkos S.L., Worsham P.L., Friedlander A.M. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1996; 64(11):4580–5. DOI: 10.1128/iai.64.11.4580-4585.1996.

6. Titball R.W., Williamson E.D. Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine*. 2001; 19(20):4175–84. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00163-3.

7. Williamson E.D. Plague vaccine research and development. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91(4):606–8. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01497.x.

8. Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Anisimov A.P. A recombinant prototrophic *Yersinia pestis* strain over-produces F1 antigen with enhanced serological activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 529:419–21. DOI: 10.1007/0-306-48416-1_83.

9. Anisimov A.P., Bakhteeva I.V., Panfersev E.A., Svetoch T.E., Kravchenko T.B., Platonov M.E., Titareva G.M., Kombarova T.I., Ivanov S.A., Rakin A.V., Amoako K.K., Dentovskaya S.V. The subcutaneous inoculation of pH 6 antigen mutants of *Yersinia pestis* does not affect virulence and immune response in mice. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 1):26–36. DOI: 10.1099/jmm.0.005678-0.

10. Копылов П.Х., Бахтеева И.В., Анисимов А.П., Дентовская С.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Левчук В.П., Панферцев Е.А., Платонов М.Е., Светоч Т.Э., Титарева Г.М. Нуклеотидная последовательность, кодирующая иммуногенный полипептид LcrV_(G113), вызывающий защитный иммунный ответ против *Yersinia pestis*; рекомбинантная плазмидная ДНК pETV-I-3455, кодирующая иммуногенный полипептид LcrV_(G113); рекомбинантный штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pETV-I-3455 – продуцент иммуногенного полипептида LcrV_(G113); полипептид LcrV_(G113) и способ его получения. Патент на изобретение РФ № 2439155, опубли. 10.01.2012. Бюл. № 1.

11. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p.

12. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

13. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука; 1981. 288 с.

14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1979; 76(9):4350–4. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

15. Williamson E.D., Vesey P.M., Gillhespy K.J., Eley S.M., Green M., Titball R.W. An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 116(1):107–14. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1999.00859.x.

16. Jones S.M., Griffin K.F., Hodgson I., Williamson E.D. Protective efficacy of a fully recombinant plague vaccine in the guinea pig. *Vaccine*. 2003; 21(25-26):3912–8. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00379-7.

17. Quenee L.E., Ciletti N., Berube B., Krausz T., Elli D., Hermanas T., Schneewind O. Plague in Guinea pigs and its prevention by subunit vaccines. *Am. J. Pathol.* 2011; 178(4):1689–700. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.028.

18. Benner G.E., Andrews G.P., Byrne W.R., Strachan S.D., Sample A.K., Heath D.G., Friedlander A.M. Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice. *Infect. Immun.* 1999; 67(4):1922–8. DOI: 10.1128/IAI.67.4.1922-1928.1999.

19. Andrianaivoarimanana V., Telfer S., Rajerison M., Ranjalaly M.A., Andriamirimanana F., Rahangosoaamamitiana C., Rahalison L., Jambou R. Immune responses to plague infection in wild *Rattus rattus*, in Madagascar: a role in foci persistence. *PLoS One*. 2012; 7(6):e38630. DOI: 10.1371/journal.pone.0038630.

20. Erova T.E., Rosenzweig J.A., Sha J., Suarez G., Sierra J.C., Kirtley M.L., van Lier C.J., Telepnev M.V., Motin V.L., Chopra A.K. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(2):227–38. DOI: 10.1128/CI.00597-12.

21. Li B., Jiang L., Song Q., Yang J., Chen Z., Guo Z., Zhou D., Du Z., Song Y., Wang J., Wang H., Yu S., Wang J., Yang R. Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine. *Infect. Immun.* 2005; 73(6):3734–9. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3734-3739.2005.

22. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(2):228–34. DOI: 10.1128/CAI.05559-11.

References

1. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Porshakov A.M., Lyapin M.N., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Ayazbaev T.Z., Lopatin A.A., Ashibokov U.M., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutryev V.V. [Epidemiological and epizootic situation on plague in the Russian Federation and forecast for its development for 2020–2025]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-5.

2. Dillard R.L., Juergens A.L. Plague. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

3. Du Y., Rosqvist R., Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* 2002; 70(3):1453–60. DOI: 10.1128/IAI.70.3.1453-1460.2002.

4. Mueller C.A., Broz P., Müller S.A., Ringler P., Erne-Brand F., Sorg I., Kuhn M., Engel A., Cornelis G.R. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*. 2005; 310(5748):674–6. DOI: 10.1126/science.1118476.

5. Anderson G.W. Jr., Leary S.E., Williamson E.D., Titball R.W., Welkos S.L., Worsham P.L., Friedlander A.M. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1996; 64(11):4580–5. DOI: 10.1128/iai.64.11.4580-4585.1996.

6. Titball R.W., Williamson E.D. Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine*. 2001; 19(20):4175–84. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00163-3.

7. Williamson E.D. Plague vaccine research and development. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91(4):606–8. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01497.x.

8. Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Anisimov A.P. A recombinant prototrophic *Yersinia pestis* strain over-produces F1 antigen with enhanced serological activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 529:419–21. DOI: 10.1007/0-306-48416-1_83.

9. Anisimov A.P., Bakhteeva I.V., Panfertsev E.A., Svetoch T.E., Kravchenko T.B., Platonov M.E., Titareva G.M., Kombarova T.I., Ivanov S.A., Rakin A.V., Amoako K.K., Dentovskaya S.V. The subcutaneous inoculation of pH 6 antigen mutants of *Yersinia pestis* does not affect virulence and immune response in mice. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 1):26–36. DOI: 10.1099/jmm.0.005678-0.

10. Kopylov P.Kh., Bakhteeva I.V., Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Ivanov S.A., Kiseleva N.V., Levchuk V.P., Panfertsev E.A., Platonov M.E., Svetoch T.E., Titareva G.M. [A nucleotide sequence encoding an immunogenic lcrV(G113) polypeptide that elicits a protective immune response against *Yersinia pestis*; recombinant plasmid DNA pETV-I-3455 encoding the immunogenic LcrV_(G113) polypeptide; recombinant *Escherichia coli* strain BL21(DE3)/pETV-I-3455, producer of the immunogenic polypeptide LcrV_(G113); polypeptide LcrV_(G113) and method for its production]. Patent for the invention in the Russian Federation No. 2439155, publ. 01/10/2012. Bull. No. 1.

11. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p.

12. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

13. Osterman L.A. [Methods for the Study of Proteins and Nucleic Acids. Electrophoresis and Ultracentrifugation]. Moscow: “Nauka”; 1981. 288 p.

14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1979; 76(9):4350–4. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

15. Williamson E.D., Vesey P.M., Gillhespy K.J., Eley S.M., Green M., Titball R.W. An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 116(1):107–14. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1999.00859.x.

16. Jones S.M., Griffin K.F., Hodgson I., Williamson E.D. Protective efficacy of a fully recombinant plague vaccine in the guinea pig. *Vaccine*. 2003; 21(25-26):3912–8. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00379-7.

17. Quenee L.E., Ciletti N., Berube B., Krausz T., Elli D., Hermanas T., Schneewind O. Plague in Guinea pigs and its prevention by subunit vaccines. *Am. J. Pathol.* 2011; 178(4):1689–700. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.028.

18. Benner G.E., Andrews G.P., Byrne W.R., Strachan S.D., Sample A.K., Heath D.G., Friedlander A.M. Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice. *Infect. Immun.* 1999; 67(4):1922–8. DOI: 10.1128/IAI.67.4.1922-1928.1999.

19. Andrianavoaarimanana V., Telfer S., Rajerison M., Ranjalaly M.A., Andriamiarimanana F., Rahaingosoamamitiana C., Rahalison L., Jambou R. Immune responses to plague infection in wild *Rattus rattus*, in Madagascar: a role in foci persistence. *PLoS One*. 2012; 7(6):e38630. DOI: 10.1371/journal.pone.0038630.

20. Erova T.E., Rosenzweig J.A., Sha J., Suarez G., Sierra J.C., Kirtley M.L., van Lier C.J., Telepnev M.V., Motin V.L., Chopra A.K. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(2):227–38. DOI: 10.1128/CAI.00597-12.

21. Li B., Jiang L., Song Q., Yang J., Chen Z., Guo Z., Zhou D., Du Z., Song Y., Wang J., Wang H., Yu S., Wang J., Yang R. Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine. *Infect. Immun.* 2005; 73(6):3734–9. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3734-3739.2005.

22. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(2):228–34. DOI: 10.1128/CAI.05559-11.

Authors:

Gapel'chenkova T.V., Shaikhutdinova R.Z., Trunyakova A.S., Svetoch T.E., Kombarova T.I., Platonov M.E., Borzilov A.I., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Гавельченко Т.В., Шайхутдинова Р.З., Трунякова А.С., Светоч Т.Э., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Борзилов А.И., Копылов П.Х., Дентовская С.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская область, р.п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-57-62

УДК 616.98:579.842.23

П.А. Горюнова, Г.А. Ерошенко, Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, З.Л. Девдариани,
Н.С. Червякова, В.В. Кутырев

Вариабельность генов *pgm*-области штаммов *Yersinia pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы

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

Цель работы – сравнение нуклеотидных последовательностей генов *pgm*-области штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в 1925–2015 гг. на территории Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы. **Материалы и методы.** В работе использованы 65 штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы. Выделение ДНК проводили с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit. Полногеномное секвенирование выполняли в Ion S5 XL System (Thermo Fischer Scientific). Обработку данных осуществляли с помощью Ion Torrent Suite software package 3.4.2 и NewblerGS Assembler 2.6. Для сравнения полученных последовательностей с генетическим банком данных GenBank NCBI использовали алгоритм Blast. Филогенетический анализ выполнен по данным полногеномного SNP-анализа на основе 1183 выявленных SNPs. Поиск маркерных SNPs выполняли с помощью программы Snippy 4.6. Построение филогенетического дерева осуществляли с использованием алгоритма Maximum Likelihood, модель нуклеотидных замен GTR. **Результаты и обсуждение.** Проанализированы нуклеотидные последовательности генов *pgm*-области 65 штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы. Выявлены единичные нуклеотидные замены у штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и Кобыстанского равнинно-предгорного очагов в генах *hmsR*, *astB*, *ybtS*, *upo1944*, *upo1943*, *upo1936*, а также делеция в 5 п.н. в гене *upo1945*, которая характерна для штаммов одной из филогенетических линий *Y. pestis* из очагов Кавказа и Закавказья, выделенных в 1968–2001 гг. Полученные данные могут быть использованы для дифференциации штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага, а также в установлении направлений микроэволюции возбудителя чумы в этом регионе Прикаспия и сопредельных очагах.

Ключевые слова: чума, *pgm*-область, *hms*-оперон, природные очаги.

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

Для цитирования: Горюнова П.А., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Девдариани З.Л., Червякова Н.С., Кутырев В.В. Вариабельность генов *pgm*-области штаммов *Yersinia pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:57–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-57-62

Поступила 21.12.2022. Принята к публ. 22.12.2022.

P.A. Goryunova, G.A. Eroshenko, L.M. Kukleva, E.A. Naryshkina, Z.L. Devdariani,
N.S. Chervyakova, V.V. Kutyrev

Variability of *pgm*-Region Genes in *Yersinia pestis* Strains from the Caspian Sandy and Adjacent Plague Foci

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

Abstract. The aim of the study was to compare the nucleotide sequences of *pgm*-region genes in *Yersinia pestis* strains isolated on the territory of the Caspian sandy and adjacent plague foci in 1925–2015. **Materials and methods.** 65 *Y. pestis* strains from the Caspian sandy and adjacent plague foci were used in the work. DNA isolation was performed using the PureLink Genomic DNA Mini Kit. Whole genome sequencing was conducted in Ion S5 XL System (Thermo Fischer Scientific). Data processing was carried out using Ion Torrent Suite software package 3.4.2 and NewblerGS Assembler 2.6. To compare the obtained sequences with the NCBI GenBank database, the Blast algorithm was used. The phylogenetic analysis was performed according to the data of whole genome SNP analysis based on 1183 identified SNPs. The search for marker SNPs was performed using the Snippy 4.6 program. The phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood algorithm, the GTR nucleotide substitution model. **Results and discussion.** The nucleotide sequences of *pgm*-region genes of 65 *Y. pestis* strains from the Caspian sandy and adjacent plague foci have been assessed. Single nucleotide substitutions have been identified in *Y. pestis* strains from the Caspian sandy and Kobystan plain-foothill foci in the *hmsR*, *astB*, *ybtS*, *upo1944*, *upo1943*, *upo1936* genes, as well as a deletion of 5 bp in the *upo1945* gene, which is characteristic of strains of one of the phylogenetic lines of *Y. pestis* from the foci of Caucasus and Transcaucasia, isolated in 1968–2001. The data obtained can be used to differentiate *Y. pestis* strains from the Caspian sandy focus, as well as to establish the directions of microevolution of the plague pathogen in this region and adjacent foci.

Key words: plague, *pgm*-region, *hms*-operon, natural foci.

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

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

Citation: Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Devdariani Z.L., Chervyakova N.S., Kutyrev V.V. Variability of *pgm*-Region Genes in *Yersinia pestis* Strains from the Caspian Sandy and Adjacent Plague Foci. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:57–62. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-57-62

Received 21.12.2022. Accepted 22.12.2022.

Goryunova P.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6522-2606>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
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>

Хромосомная *pgm*-область *Yersinia pestis* (рис. 1) имеет размер 102 т.п.н. и фланкирована двумя копиями IS100 элементов, гомологичная рекомбинация по которым может явиться причиной спонтанной потери (с частотой 10^{-5}) всей этой области [1]. Хромосомная область пигментации включает *hms*-оперон и остров высокой патогенности (HPI). В составе области пигментации С. Buchrieser *et al.* также идентифицировали ряд генов, принимающих участие в регуляторных и транспортных процессах, пилин-подобный локус и локус, вероятно, кодирующий двухкомпонентную регуляторную систему, аналогичную регуляторной системе *BvgAS* у *Bordetella pertussis* [2]. Оперон *hms* представлен генами *hmsH*, *hmsF*, *hmsR*, *hmsS* (от англ. hemin storage). Белки, детерминированные генами *hms*-оперона, являются компонентами наружной (*hmsH* и *hmsF*) и внутренней (*hmsR* и *hmsS*) мембран клетки *Y. pestis* [3]. Гены *hms*-оперона отвечают за образование экзополисахарида, биосинтез которого необходим для проявления штаммами *Y. pestis* следующих признаков: способность образовывать биопленку, формирование «чумного» блока в преджелудке блохи, образование пигментированных колоний при выращивании на среде с добавлением гемина или красителя Конго красного [4, 5]. Продукция этого экзополисахарида регулируется генами дигуанилатциклазы *hmsT* и фосфодиэстеразы *hmsP*, расположенными на значительном расстоянии от оперона и действующими как положительный и отрицательный регуляторы соответственно [6]. Другой важный участок хромосомной *pgm*-области – остров высокой патогенности HPI – содержит *ybt*-регион с генами сидерофор-зависимой системы потребления железа, продукты которой необходимы для выживания возбудителя в кровяном русле хозяина в условиях дефицита ионов железа [7]. Мутации в генах *ybt*-и *hms*-оперонов приводят к утрате вирулентности и снижению жизнеспособности вне организма хозяина соответственно. Характеристика структурно-функционального состояния *pgm*-области важна для оценки вирулентного и эпидемического потенциала штаммов *Y. pestis*, выделенных от носителей/переносчиков или во время эпидемической вспышки. Целью данной работы является сравнение нуклеотидных последовательностей генов *pgm*-области

штаммов *Y. pestis*, выделенных в 1925–2015 гг. на территории Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы.

Материалы и методы

В работе использованы 65 штаммов *Y. pestis*, выделенные в 1925–2015 гг. на территории Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы. Штаммы *Y. pestis* получены из Государственной коллекции патогенных бактерий на базе ФКУН Роспотребнадзора, где их хранили в лиофильно высушенном состоянии. Культуры чумного микроба выращивали на LB-агаре и LB-бульоне (pH 7,2) при температуре 28 °C на протяжении 1–2 суток. Выделение ДНК проводили с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Полногеномное секвенирование проводили в Ion S5 XL System (Thermo Fischer Scientific). Обработку данных осуществляли с помощью Ion Torrent Suite software package 3.4.2 и NewblerGS Assembler 2.6. Для сравнения полученных последовательностей с генетическим банком данных GenBank NCBI использовали алгоритм Blast (<http://blast.ncbi>). SNPs выявляли путем выравнивания контигов штаммов на геноме CO92 (NCBI GenBank ID AL590842.1) при помощи программы Snippy 4.6, с последующим удалением 28 гомоплазий SNPs [8]. Полученный набор SNPs содержал только коровую область генома. Дендрограмму Maximum Likelihood строили с использованием программы PHYLML-3.1. Подбор модели нуклеотидных замещений проводили в программе jModelTest 2.1.7 [9], в результате определена модель GTR (Bootstrap-500).

Результаты и обсуждение

Проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов *pgm*-области 65 штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы (таблица). При сравнении нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского очага выявлен высокий консерватизм *hms*-оперона исследуемых штаммов. В гене *hmsR* у штамма 258

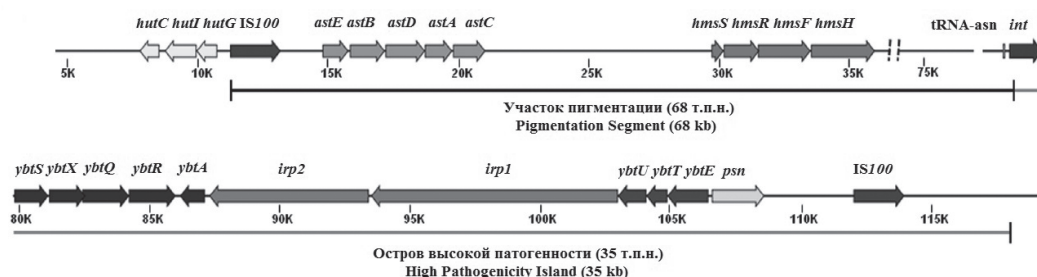


Рис. 1. Генетическая организация хромосомной *pgm*-области *Y. pestis*. Схематическое изображение, показывающее основные гены, расположенные в хромосомной *pgm*-области размером 102 т.п.н. [12]

Fig. 1. Genetic organization of the chromosomal *pgm*-region in *Y. pestis*. Schematic representation displaying major genes located within the 102-kb chromosomal *pgm*-region [12]

Выявленные мутации в генах хромосомной *pgm*-области штаммов *Y. pestis*, выделенных в 1925–2015 гг. на территории Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумыIdentified mutations in the genes of the chromosomal *pgm*-region in *Y. pestis* strains isolated in the Caspian sandy and adjacent plague foci in 1925–2015

Ген Gene	Мутация Mutation	Замена аминокислоты Amino acid substitution	Позиция в гене* Position in the gene*	Кодируемый продукт Encoded product	Штаммы <i>Y. pestis</i> , у которых присутствует мутация <i>Y. pestis</i> strains possessing this mutation
<i>hmsR</i>	G → A	Глицин → Аспарагиновая кислота Glycine → Aspartic acid	425 п.н. 425 bp	Белок HmsR HmsR protein	Прикаспийский песчаный: 258, человек, 1930 Caspian sandy: 258, human, 1930
<i>astB</i>	C → T	Пролин (синонимичная) Proline (synonymous)	972 п.н. 972 bp	Аргинин N-сукцинилтрансфераза Arginine N-succinyltransferase	Прикаспийский песчаный: М-595, <i>C. sugveolus</i> , 1980 Caspian sandy: М-595, <i>C. sugveolus</i> , 1980
<i>ybtS</i>	A → G	Аспарагин → Аспарагиновая кислота Asparagine → Aspartic acid	481 п.н. 481 bp	Салицилатсинтетаза Salicylate synthetase	Кобыстанский равнинно-предгорный: 808, <i>X. conformis</i> , 1953 Kobystan plain-foothill: 808, <i>X. conformis</i> , 1953
<i>уро1945</i>	Делеция 5 п.н. Deletion 5 bp	—	238 п.н. 238 bp	Предполагаемый мембранный белок Putative membrane protein	Терско-Сунженский низкогорный: 14-Д, <i>C. tesquorum</i> , 1970, 15-Д, <i>N. setosa</i> , 1970, 16-Д, <i>C. orientalis</i> , 1970, 25-Д, <i>C. tesquorum</i> , 1970, 1116-Д, <i>S. pygmaeus</i> , 1970 Terek-Sunzhian low-mountain: 14-Д, <i>C. tesquorum</i> , 1970, 15-Д, <i>N. setosa</i> , 1970, 16-Д, <i>C. orientalis</i> , 1970, 25-Д, <i>C. tesquorum</i> , 1970, 1116-Д, <i>S. pygmaeus</i> , 1970
<i>уро1944</i>	C → T	Пролин → Лейцин Proline → Leucine	314 п.н. 314 bp	Предполагаемый мембранный белок Putative membrane protein	Прикаспийский песчаный: 258, человек, 1930 М-595, <i>C. sugveolus</i> , 1980 Caspian sandy: 258, human, 1930 М-595, <i>C. sugveolus</i> , 1980
<i>уро1943</i>	C → T	Треонин (синонимичная) Threonine (synonymous)	381 п.н. 381 bp	Предполагаемый мембранный белок Putative membrane protein	Прикаспийский песчаный: 664, <i>S. pygmaeus</i> , 1946 Caspian sandy: 664, <i>S. pygmaeus</i> , 1946
<i>уро1936</i>	C → T	Гистидин → Тирозин Histidine → Tyrosine	829 п.н. 829 bp	Предполагаемая аминотрансфераза Putative aminotransferase	Прикаспийский песчаный: 282, <i>S. pygmaeus</i> , 1935 Caspian sandy: 282, <i>S. pygmaeus</i> , 1935

Примечание: * позиция от начала гена по геному референсного штамма *Y. pestis* CO92 (NCBI GenBank ID AL590842.1).

Note: * the position from the beginning of the gene according to the genome of the reference *Y. pestis* CO92 strain (NCBI GenBank ID AL590842.1).

(человек, 1930) из Прикаспийского песчаного очага выявлена замена G → A в позиции 425 от начала гена (в соответствии с геномом штамма CO92), которая привела к замене аминокислоты глицин на аспарагиновую кислоту (Gly → Asp). Ранее Е.Г. Булгакова с соавт. [10] описали замену единичного нуклеотида T → C в позиции 661 от начала гена у штаммов CO92 биовара *orientalis* и *Antiqua* биовара *antiqua*, которая привела к замене аминокислоты валин на глицин (Val → Gly) в белке HmsR. По данным S. Forman *et al.* [11], способность сорбировать кислые красители и образовывать биопленку у штаммов *Y. pestis* утрачивается при изменении в доменах Hms-белков аминокислотных остатков на Ala: Asp 114, Trp 115, His 184 – в белке HmsF; Asp 176,

Asp 269, Gln 305, Arg 308 – в белке HmsR; Trp 80, Tyr 83 – в белке HmsS. Снижение способности сорбировать кислые красители и образовывать биопленку происходит при замене аминокислотных остатков: Glu 281 в белке HmsH; Trp 143 в белке HmsF. Выявленная нами замена не расположена в пределах кодонов указанных аминокислотных остатков. Можно предположить, что найденная нуклеотидная замена не влияет на изменение стабильности и выраженности признака пигментации у штамма 258.

Оперон *ast* включает в себя гены *astE*, *astB*, *astD*, *astA*, *astC*, отвечающие за утилизацию аргинина [2]. Проведенный нами сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *ast*-генов показал, что в гене *astB*, отвечающем за синтез N-сукцилларгинин

дигидролазы, у штамма М-595 (*Cricetulus sugveolus*, 1980) из Прикаспийского песчаного очага в позиции 972 от начала гена (в соответствии с геномом штамма CO92) присутствует замена С → Т, которая не привела к смене аминокислоты пролин Pro. Вариабельность в нуклеотидных последовательностях генов *astE*, *astD*, *astC* отсутствует.

Остров высокой патогенности HPI включает *ybt*-регион с генами сидерофор-зависимой системы потребления железа и геном *psn*, кодирующим рецептор комплекса *Ybt-Fe*, а также чувствительность к видоспецифическому бактериоцину – пестицину. Наличие острова патогенности HPI, наряду с плазмидой кальцийзависимости *pCad*, кодирующей систему секреции III типа, является обязательным для проявления вирулентности возбудителем чумы. При сравнении нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского очага выявлен высокий консерватизм *ybt*-региона исследуемых штаммов. В гене *ybtS* (салицилатсинтетаза) обнаружена единичная нуклеотидная замена А → G в позиции 481 от начала гена (в соответствии с геномом штамма CO92) в штамме 808 (*Xenopsylla conformis*, 1953) из Кобыстанского равнинно-предгорного очага, которая привела к замене аминокислоты аспарагин на аспарагиновую кислоту (Asn → Asp). Вариабельность в генах *ybtX*, *ybtQ*, *ybtP*, *ybtA*, *irp1*, *irp2*, *ybtU*, *ybtT*, *ybtE*, *psn* у исследованных нами штаммов отсутствует. Ранее К.А. Никифоров с соавт. [13] описали также замену единичного нуклеотида С → Т в позиции 661 от начала гена у штаммов центральноазиатского подвида, которая привела к замене аминокислоты пролин на серин (Pro → Ser) в белке YbtS. Пока неясно, как влияет эта замена аминокислоты в белке YbtS на его функциональность, однако М.С. Miller *et al.* показали, что мутанты по гену *ybtS* не образуют молекулу иерсиниабактина [14].

Для штаммов 14-Д (*Ceratophilus tesquorum*, 1970), 15-Д (*Neopsilla setosa*, 1970), 16-Д (*Ctenophthalmus orientalis*, 1970), 25-Д (*C. tesquorum*, 1970), 1116-Д (*Spermophilus pygmaeus*, 1970) из Терско-Сунженского низкогогорного очага в гене *upo1945* (предполагаемый мембранный белок) выявлена делеция в 5 п.н. в позиции 238–242 от начала гена (в соответствии с геномом штамма CO92), вызвавшая сдвиг рамки считывания и нарушение кодируемого белка. При сравнении полученной последовательности с последовательностями базы данных GenBank NCBI установлено, что данная делеция характерна также для штаммов KM-918 (*Ctenophyllus orientalis*, 1986), C-781 (*Spermophilus musicus*, 2001) из Центрально-Кавказского высокогорного, штамма 818 (*Ceratophyllus caspius*, 1968) из Приараксинского низкогогорного, а также штамма 1408 (блохи, 1972) из Прикаспийского Северо-Западного степного очагов.

В гене *upo1944* (предполагаемый мембранный белок) обнаружена единичная нуклеотидная замена С → Т в позиции 314 от начала гена (в соответствии

с геномом штамма CO92) в штаммах 258 (человек, 1930), М-595 (*C. sugveolus*, 1980) из Прикаспийского песчаного очага, которая привела к смене аминокислоты пролин → лейцин (Pro → Leu). В гене *upo1943* (предполагаемый мембранный белок) у штамма 664 (*S. pygmaeus*, 1946) из Прикаспийского песчаного очага присутствует синонимичная нуклеотидная замена С → Т в позиции 381 от начала гена (в соответствии с геномом штамма CO92), которая не привела к смене аминокислоты треонин (Thr). В гене *upo1936* (предполагаемая аминотрансфераза) у штамма 282 (*S. pygmaeus*, 1935) из Прикаспийского песчаного очага выявлена замена С → Т в позиции 829 от начала гена (в соответствии с геномом штамма CO92), которая привела к замене аминокислоты гистидин → тирозин (His → Tyr).

Для установления степени родства штаммов *Y. pestis*, содержащих выявленную делецию 5 п.н. в гене *upo1945*, нами проведен филогенетический анализ исследуемых штаммов. В филогенетическом анализе использованы нуклеотидные последовательности 10 штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного очага, а также последовательности 20 штаммов из сопредельных очагов Северного Прикаспия, Кавказа, Закавказья и Северного Приаралья, включая 5 штаммов из Терско-Сунженского низкогогорного, 3 – Центрально-Кавказского высокогорного, 3 – Кобыстанского равнинно-предгорного, 1 – Мильско-Карабахского равнинно-предгорного, 1 – Приараксинского низкогогорного, 1 – Прикаспийского Северо-Западного степного, 1 – Северо-Приаральского пустынного, 1 – Урало-Эмбенского пустынного, 1 – Приаральско-Каракумского пустынного, 1 – Каракумского пустынного, 1 – Дагестанского равнинно-предгорного, 1 – Джейранчельского равнинно-предгорного природных очагов чумы. В филогенетический анализ включены также штаммы других филогенетических линий из разных очагов мира, последовательности которых представлены в базе данных NCBI GenBank. К ним относятся следующие геномы: 620024 (NCBI GenBank ID NZ_ADPM000000000.1), Pestoides F (NCBI GenBank ID NC_009381.1), Pestoides A (NCBI GenBank ID NZ_ACNT000000000.1), CO92 (NCBI GenBank ID AL590842.1), 351001 (NCBI GenBank ID NZ_ADPF000000000.1), CMCC125002 (NCBI GenBank ID ADQN000000000.1), KIM10 (NCBI GenBank ID AE009952.1). Дендрограмма построена на основе полногеномного SNP-анализа 37 штаммов *Y. pestis* (рис. 2).

Сравнительный филогенетический анализ на основе выявленных 1183 коровых SNPs показал, что штаммы *Y. pestis* из Терско-Сунженского низкогогорного очага, содержащие делецию в 5 п.н. в гене *upo1945*, составили отдельный кластер в кавказской ветви эволюции (рис. 2). В этот кластер II (1968–2001) также вошли штаммы: 818 (*C. caspius*, 1968) из Приараксинского низкогогорного очага, 1408 (блохи, 1972) из Прикаспийского Северо-Западного

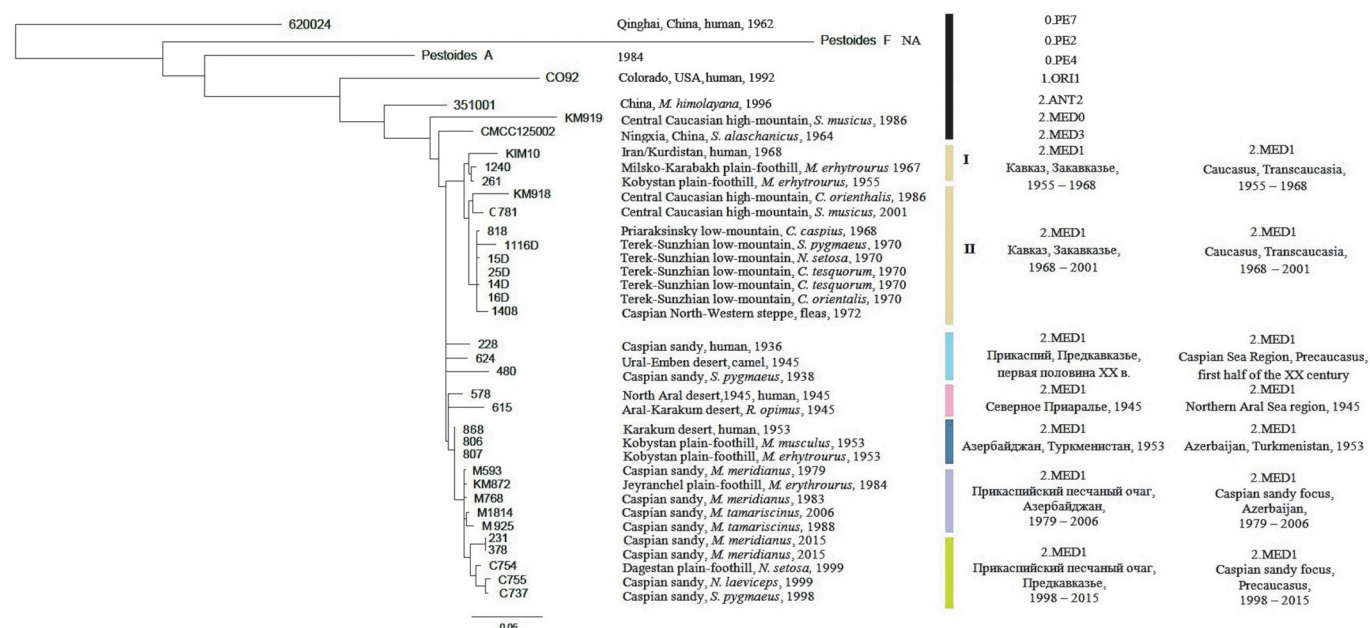


Рис. 2. Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы по данным полногеномного SNP-анализа. Дендрограмма Maximum likelihood на основе 1183 SNPs построена с помощью PHYL 3.1, модели GTR, 500 бутстрэп-реплик

Fig. 2. Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains from the Caspian sandy and adjacent plague foci according to the results of whole genome SNP-analysis. Maximum likelihood dendrogram is constructed based on 1183 SNPs using PHYL 3.1, GTR model, 500 bootstrap replicas

степного очага, KM918 (*C. orienthalis*, 1986) и C781 (*S. musicus*, 2001) из Центрально-Кавказского высокогорного очага. Анализ этих штаммов показал, что в их геноме также присутствует мутация в 5 п.н. в той же локализации, что и у штаммов из Терско-Сунженского низкогорного очага. Это означает, что выявленная мутация в гене *upo1945* является маркерной для этой филогенетически родственной группы штаммов. Она может быть использована для реконструкции микроэволюции и распространения одной из линий *Y. pestis* на Кавказе. В другом кластере I (1955–1968) кавказской ветви, так же как и в других исследованных штаммах, эта маркерная делеция отсутствовала. В кластер I вошли штаммы из Кобыстанского равнинно-предгорного очага – 261 (*Meriones erythourus*, 1955), Мильско-Карабахского равнинно-предгорного очага – 1240 (*M. erythourus*, 1967) и штамм KIM10 (человек, 1968).

Таким образом, анализ нуклеотидных последовательностей генов *pgm*-области 65 штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и сопредельных очагов чумы выявил их высокий консерватизм. Обнаружены единичные нуклеотидные замены у штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского песчаного и Кобыстанского равнинно-предгорного очагов в генах *hmsR*, *astB*, *ybtS*, *upo1944*, *upo1943*, *upo1936*, а также делеция в 5 п.н. в гене *upo1945*, которая характерна для штаммов одной из филогенетических линий *Y. pestis* из очагов Кавказа и Закавказья, выделенных в 1968–2001 гг. Остальные гены у всех изученных нами штаммов были идентичными. Дальнейшее исследование генотипических особенностей штаммов *Y. pestis* необходимо для оценки их вирулентного и

эпидемического потенциала. Полученные данные могут быть использованы в лабораторной диагностике, а также в установлении направлений микроэволюции возбудителя чумы в этом регионе Прикаспия и сопредельных очагов.

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

Список литературы

1. Fetherston J.D., Schuetz P., Perry R.D. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol. Microbiol.* 1992; 6(18):2693–704. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01446.x.
2. Buchrieser C., Rusniok C., Frangeul L., Couve E., Billault A., Kunst F., Carniel E., Glaser P. The 102-kilobase *pgm* locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Infect. Immun.* 1999; 67(9):4851–61. DOI: 10.1128/IAI.67.9.4851-4861.1999.
3. Perry R.D., Bobrov A.G., Kirillina O., Jones H.A., Pedersen L., Abney J., Fetherston J.D. Temperature regulation of the hemin storage (*Hms*+) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. *J. Bacteriol.* 2004; 186(6):1638–47. DOI: 10.1128/JB.186.6.1638-1647.2004.
4. Hinnebusch B.J., Perry R.D., Schwan T.G. Role of *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in transmission of plague by fleas. *Science.* 1996; 273(5273):367–70. DOI: 10.1126/science.273.5273.367.
5. Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Куклева Л.М., Кошель Е.И., Одинок Г.Н., Шавина Н.Ю., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Краснов Я.М., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Ерохин П.С., Бойко А.В., Кутырев В.В. Изучение образования биопленки у беспиgmentных и беспилазмидных мутантов штамма *Yersinia pestis* на биотических поверхностях в условиях *in vitro* и *in vivo*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2012; 3:45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-3-45-49.
6. Bobrov A.G., Kirillina O., Forman S., Mack D., Perry R.D. Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of *Hms* inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(6):1419–32. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01554.x.

7. Perry R.D., Balbo P.B., Jones H.A., Fetherston J.D., DeMoll E. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology (Reading)*. 1999; 145(Pt. 5):1181–90. DOI: 10.1099/13500872-145-5-118.
8. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., 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 variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
9. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 9(8):772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.
10. Булгакова Е.Г., Краснов Я.М., Гаева А.В., Сухоносов И.Ю., Анисимова Л.В., Гусева Н.П., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Особенности проявления признака пигментации и структурные различия генов *hms*-оперона у штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* разного происхождения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; 2:30–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-2(108)-30-35.
11. Forman S., Bobrov A.G., Kirillina O., Craig S.K., Abney J., Fetherston J.D., Perry R.D. Identification of critical amino acid residues in the plague biofilm *Hms* proteins. *Microbiology (Reading)*. 2006; 152(Pt. 11):3399–410. DOI: 10.1099/mic.0.29224-0.
12. Gaddy C.E., Cuevas P.F., Hartman L.J., Howe G.B., Worsham P.L., Minogue T.D. Development of real-time PCR assays for specific detection of *hmsH*, *hmsF*, *hmsR*, and *irp2* located within the 102-kb *pgm* locus of *Yersinia pestis*. *Mol. Cell. Probes*. 2014; 28(5-6):288–95. DOI: 10.1016/j.mcp.2014.08.004.
13. Никифоров К.А., Морозов О.А., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Популяционная структура, таксономия и генетические особенности штаммов *Yersinia pestis* центральноазиатского подвида. *Генетика*. 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.
14. Miller M.C., Fetherston J.D., Pickett C.L., Bobrov A.G., Weaver R.H., DeMoll E., Perry R.D. Reduced synthesis of the *Ybt* siderophore or production of aberrant *Ybt*-like molecules activates transcription of yersiniabactin genes in *Yersinia pestis*. *Microbiology (Reading)*. 2010; 156(Pt. 7):2226–38. DOI: 10.1099/mic.0.037945-0.
1. Fetherston J.D., Schuetz P., Perry R.D. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol. Microbiol.* 1992; 6(18):2693–704. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01446.x.
2. Buchrieser C., Rusniok C., Frangeul L., Couve E., Billault A., Kunst F., Carniel E., Glaser P. The 102-kilobase *pgm* locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Infect. Immun.* 1999; 67(9):4851–61. DOI: 10.1128/IAI.67.9.4851-4861.1999.
3. Perry R.D., Bobrov A.G., Kirillina O., Jones H.A., Pedersen L., Abney J., Fetherston J.D. Temperature regulation of the hemin storage (*Hms*+) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. *J. Bacteriol.* 2004; 186(6):1638–47. DOI: 10.1128/JB.186.6.1638-1647.2004.
4. Hinnebusch B.J., Perry R.D., Schwan T.G. Role of *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in transmission of plague by fleas. *Science*. 1996; 273(5273):367–70. DOI: 10.1126/science.273.5273.367.
5. Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kukleva L.M., Koshel' E.I., Odinokov G.N., Shavina N.Yu., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Krasnov Y.M., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Erokhin P.S., Boiko A.V., Kutyrev V.V. [Studies of biofilm formation in non-pigmented and plasmid-deprived mutants of *Yersinia pestis* on biotic surfaces, *in vivo* and *in vitro*]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2012; (3):45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-3-45-49.
6. Bobrov A.G., Kirillina O., Forman S., Mack D., Perry R.D. Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of *Hms* inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(6):1419–32. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01554.x.
7. Perry R.D., Balbo P.B., Jones H.A., Fetherston J.D., DeMoll E. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology (Reading)*. 1999; 145(Pt. 5):1181–90. DOI: 10.1099/13500872-145-5-118.
8. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., 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 variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
9. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 9(8):772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.
10. Boolgakov E.G., Krasnov Y.M., Gaeva A.V., Sukhonosov I.Yu., Anisimova L.V., Guseva N.P., Novichkova L.A., Kutyrev V.V. [Peculiarities of Pigmentation Expression and Structural Differences of *hms* Operon Genes in *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* Strains of Diverse Origin]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; (2):30–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-2(108)-30-35.
11. Forman S., Bobrov A.G., Kirillina O., Craig S.K., Abney J., Fetherston J.D., Perry R.D. Identification of critical amino acid residues in the plague biofilm *Hms* proteins. *Microbiology (Reading)*. 2006; 152(Pt. 11):3399–410. DOI: 10.1099/mic.0.29224-0.
12. Gaddy C.E., Cuevas P.F., Hartman L.J., Howe G.B., Worsham P.L., Minogue T.D. Development of real-time PCR assays for specific detection of *hmsH*, *hmsF*, *hmsR*, and *irp2* located within the 102-kb *pgm* locus of *Yersinia pestis*. *Mol. Cell. Probes*. 2014; 28(5-6):288–95. DOI: 10.1016/j.mcp.2014.08.004.
13. Nikiforov K.A., Morozov O.A., Nosov N.Y., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Population structure, taxonomy, and genetic features of *Yersinia pestis* strains of the Central Asian subspecies]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.
14. Miller M.C., Fetherston J.D., Pickett C.L., Bobrov A.G., Weaver R.H., DeMoll E., Perry R.D. Reduced synthesis of the *Ybt* siderophore or production of aberrant *Ybt*-like molecules activates transcription of yersiniabactin genes in *Yersinia pestis*. *Microbiology (Reading)*. 2010; 156(Pt. 7):2226–38. DOI: 10.1099/mic.0.037945-0.

Authors:

Goryunova P.A., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Devdariani Z.L., Chervyakova N.S., Kutyrev 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., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Девдариани З.Л., Червякова Н.С., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-63-68

УДК 616.98(574)

Т.К. Ерубаев¹, Г.Г. Ковалева¹, Т.В. Мека-Меченко¹, З.Ж. Абдел¹, В.В. Сутягин², Ю.В. Кислицын²,
А.И. Беляев², И.Б. Ким²

Международное сотрудничество Казахстана в профилактике особо опасных инфекций

¹РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева»
Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Алматы, Республика Казахстан;

²Филиал «Талдыкорганская противочумная станция» ННЦООИ, Талдыкорган, Республика Казахстан

Особенностью эпидемического процесса последних лет является зависимость заболеваемости различными нозологиями от эпидемической ситуации в соседних странах. В связи с этим особую важность приобретает проведение совместных противоэпидемических и профилактических мероприятий в приграничных районах с целью предупреждения завоза опасных инфекций на территории сопредельных государств. **Цель** работы – анализ результатов международного сотрудничества в профилактике особо опасных инфекций. Представлены направления сотрудничества и результаты совместных исследований. Описаны мероприятия по сотрудничеству между профильными учреждениями Министерства здравоохранения Республики Казахстан и Роспотребнадзора в области оперативного обмена информацией при возникновении чрезвычайных ситуаций, проведения совместных исследовательских работ по мониторингу особо опасных и других природно-очаговых инфекционных болезней на приграничных территориях, совместных семинаров, научно-практических конференций по внедрению в практику современных методов лабораторной диагностики, стажировок по обмену опытом по методам эпизоотологического обследования в очагах особо опасных инфекций. Описаны примеры российско-казахстанского сотрудничества. Представлены результаты совместного с Российской Федерацией эпизоотологического обследования территории казахстанской части горного Алтая. В глобальном масштабе случаи заболевания чумой и другими особо опасными инфекциями в любом географическом регионе могут представлять собой международные чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения, и этот тип угрозы требует международного сотрудничества.

Ключевые слова: международное сотрудничество, чума, особо опасные инфекции.

Корреспондирующий автор: Ковалева Галина Геннадьевна, e-mail: GDeputy-1@nscedi.kz.

Для цитирования: Ерубаев Т.К., Ковалева Г.Г., Мека-Меченко Т.В., Абдел З.Ж., Сутягин В.В., Кислицын Ю.В., Беляев А.И., Ким И.Б. Международное сотрудничество Казахстана в профилактике особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:63–68. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-63-68
Поступила 19.12.2022. Принята к публ. 22.12.2022.

T.K. Erubaev¹, G.G. Kovaleva¹, T.V. Meka-Mechenko¹, Z.Zh. Abdel¹, V.V. Sutyagin², Yu.V. Kislitsyn²,
A.I. Belyaev², I.B. Kim²

International Cooperation of Kazakhstan in the Prevention of Particularly Dangerous Infections

¹Masgut Aikimbaev National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Republic of Kazakhstan;

²Affiliated Branch of the NSCPDI "Taldykorgan Plague Control Station", Taldykorgan, Republic of Kazakhstan

Abstract. The dependence of the incidence of various nosologies on the epidemic situation in neighboring countries has been a feature of the epidemic process in recent years. In this regard, it is of particular importance to carry out joint anti-epidemic and preventive measures in border areas in order to prevent the importation of dangerous infections into the territory of neighboring states. **The aim** of the work was to analyze the results of international cooperation in the prevention of particularly dangerous infections. Presented are the areas of cooperation and outcomes of joint research activities. Measures for cooperation between the relevant institutions of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan and the Rospotrebnadzor on the operational exchange of information in case of emergencies, joint research work on the monitoring of particularly dangerous and other natural-focal infectious diseases in the border areas, joint seminars, scientific and practical conferences on the introduction of modern methods of laboratory diagnostics into practice, internships on the exchange of experience in epizootiological survey in foci of particularly dangerous infections are described in the paper. Examples of Russian-Kazakh cooperation are provided. The results of a joint epizootiological survey of the territory of the Kazakh part of the Altai Mountains are presented. On a global scale, cases of plague and other particularly dangerous infections in any geographic region can constitute international public health emergencies and this type of threat requires international cooperation.

Key words: international cooperation, plague, particularly dangerous infections.

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

Corresponding author: Galina G. Kovaleva, e-mail: GDeputy-1@nscedi.kz.

Citation: Erubaev T.K., Kovaleva G.G., Meka-Mechenko T.V., Abdel Z.Zh., Sutyagin V.V., Kislitsyn Yu.V., Belyaev A.I., Kim I.B. International Cooperation of Kazakhstan in the Prevention of Particularly Dangerous Infections. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:63–68. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-63-68

Received 19.12.2022. Accepted 22.12.2022.

Erubaev T.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5291-3571>
Kovaleva G.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2673-2213>
Meka-Mechenko T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6322-0065>
Abdel Z.Zh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2738-6818>

Sutyagin V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2152-1609>
Kislitsyn Yu.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3129-4972>
Belyaev A.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2618-3362>
Kim I.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4940-5482>

Противочумная служба Республики Казахстан в наши дни представлена Национальным научным центром особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева Министерства здравоохранения Республики Казахстан (ННЦООИ МЗ РК), объединенным с 9 противочумными станциями (ПЧС), являющимися его филиалами (Актюбинская, Араломорская, Атырауская, Жамбылская, Кызылординская, Мангышлакская, Уральская, Талдыкорганская, Шымкентская). В составе филиалов ПЧС имеется 22 противочумных отделения, выставяющих 49 противоэпидемических отрядов в сезоны эпизоотологического обследования энзоотичной по чуме территории. Произошла консолидация деятельности казахстанских ученых и практических специалистов противочумных станций, работающих в области биобезопасности страны, в едином Центре и обеспечено триединство науки, образования и практики [1].

В последние годы угрозы завоза и распространения карантинных и особо опасных инфекций в республику существенно возросли. Особенностью эпидемического процесса последних лет является зависимость заболеваемости различными нозологиями от эпидемической ситуации в соседних странах [2]. В связи с этим особую важность приобретает проведение совместных противоэпидемических и профилактических мероприятий в приграничных районах с целью предупреждения завоза опасных инфекций на территории сопредельных государств [3].

Организациями МЗ РК во взаимодействии с другими заинтересованными органами принимались необходимые меры по недопущению завоза и распространения лихорадки Эбола на территории Республики Казахстан. Большую помощь оказала Российская Федерация в оказании технической поддержки странам Евразийского экономического сообщества (ЕАЭС) в противодействии инфекционным болезням. В частности, Казахстаном были закуплены препараты для диагностики лихорадки Эбола, препараты для диагностики оспы обезьян.

Сотрудничество осуществляется в следующих направлениях:

1. Совершенствование организационных и методических аспектов санитарной охраны территории ЕАЭС. Укрепление двустороннего и многостороннего сотрудничества с компетентными ведомствами зарубежных государств по вопросам обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и защиты прав потребителей.

2. Создание и нормативно-методическое обеспечение функционирования системы совместного реагирования Республики Казахстан и Российской Федерации на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера.

3. Совершенствование эпидемиологического надзора за чумой в ее природных очагах на сопредельных территориях на основе внедрения современных информационных технологий.

4. Научное обеспечение и совершенствование эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга в сочетанных природных очагах особо опасных зоонозных инфекций.

5. Совершенствование информационного обмена и взаимодействия при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения и биологической безопасности в отношении современных угроз и вызовов международного характера в формате Содружества Независимых Государств (СНГ), ЕАЭС, Шанхайской организации сотрудничества (ШОС), двухстороннего сотрудничества Республики Казахстан и Российской Федерации.

В рамках международного сотрудничества осуществляются следующие мероприятия:

– заключение соглашений между профильными учреждениями МЗ РК и Роспотребнадзора об оперативном обмене информацией при возникновении чрезвычайных ситуаций, представляющих угрозу санитарно-эпидемиологической безопасности населению Республики Казахстан и Российской Федерации в приграничных районах;

– проведение совместных исследовательских работ по мониторингу опасных и других природно-очаговых инфекционных болезней на приграничных территориях для оценки эпизоотологической обстановки и прогнозирования эпидемиологической ситуации;

– организация и проведение совместных семинаров, научно-практических конференций и рабочих совещаний по внедрению в практику современных методов лабораторной диагностики опасных и природно-очаговых инфекционных болезней и совершенствованию эпидемиологического надзора за ними;

– организация и проведение двусторонних стажировок специалистов научно-исследовательских организаций ННЦООИ и Роспотребнадзора с целью обмена опытом по методам эпизоотологического обследования в очагах чумы и других природно-очаговых инфекций.

Развитие международного сотрудничества с Российской Федерацией. 9 декабря 2020 г. в г. Санкт-Петербурге в период работы Международной научно-практической конференции по вопросам противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям состоялась торжественная передача ключей от новой мобильной автолаборатории Российской Федерации в дар Республике Казахстан. Все мобильные лаборатории, полученные в рамках технической помощи от Российской Федерации, успешно и эффективно работают в наших региональных противочумных филиалах.

В мае 2021 г. состоялся визит российской делегации во главе с заместителем директора Департамента по вопросам нераспространения и контроля над вооружениями Министерства иностранных дел РФ г-на К.В. Воронцова в Центральную референтную лабораторию ННЦООИ для проведения двусторонних российско-казахстанских межведомственных консультаций в области биобезопасности. На встрече состоялось обсуждение общей ситуации в области биобезопасности на постсоветском пространстве, казахстанско-российское взаимодействие в области биобезопасности, а также согласование проекта межправительственного меморандума по биологической безопасности.

В 2021 г. проведено эпизоотологическое обследование территории Волго-Уральского песчаного очага чумы совместно со специалистами Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Астраханской противочумной станции, Атырауского филиала ННЦООИ. Также в 2021 г. проведено эпизоотологическое обследование территории трансграничного Горно-Алтайского очага чумы специалистами Талдыкорганского филиала ННЦООИ и института «Микроб».

В 2022 г. ННЦООИ принял участие в создании коллективных монографий:

- «Международное сотрудничество по формированию единой системы мониторинга и оперативного реагирования на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера на пространстве СНГ»;

- «Подвиг во имя жизни. 125 лет противочумным учреждениям России и стран СНГ»;

- «Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств».

3–5 августа 2022 г. проведены совместные тренировочные учения по готовности к оперативному реагированию с использованием ресурсов мобильных лабораторий.

Развитие российско-казахстанского сотрудничества будет продолжаться и развиваться. Эффективный эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекциями и комплексное взаимодействие необходимы для обеспечения биологической безопасности Республики Казахстан и Российской Федерации.

Вопросам профилактики чумы был посвящен Международный симпозиум “*Yersinia 14*”, состоявшийся в сентябре 2022 г. в Санкт-Петербурге [4]. Участникам симпозиума представлены доклады ведущих ученых из учреждений разных стран, в том числе из ННЦООИ, о современных результатах исследований чумы и других иерсиний. Программа симпозиума включала пленарные и секционные заседания по ключевым фундаментальным и прикладным направлениям исследования иерсиний. Симпозиум позволил организовать неформальный профессиональный диалог, что способствовало общему успеху в противодействии чуме – инфекции, которая продолжает оставаться актуальной и в наши дни.

Вопросам профилактики чумы был посвящен и Международный семинар с участием России, Монголии, Казахстана и Китая, состоявшийся 2 декабря 2022 г., организованный Китайским центром по контролю и профилактике заболеваний (China CDC). В семинаре приняли участие ученые из Китая, России, Казахстана и Монголии. Обсуждена ситуация по чуме, и ННЦООИ представлены результаты обследования потенциально-очаговой по чуме территории Республики Казахстан.

Эпизоотологическое обследование территории казахстанской части горного Алтая проводится в рамках соглашения от 16.10.2017 и решения Международного рабочего совещания (Алматы, 18.11.2020).

Эпизоотологическое обследование проводилось в летние сезоны 2021, 2022 гг. специалистами филиала «Талдыкорганская противочумная станция» ННЦООИ совместно со специалистами института «Микроб» на территории двух административных районов (Катон-Карагайский, Курчумский) Восточно-Казахстанской области (ВКО) Республики Казахстан, граничащих с очаговыми по чуме территориями соседних государств.

Обследование данной территории проведено в связи с увеличением эпизоотической активности Сайлюгемского высокогорного природного очага чумы, располагающегося в сходных ландшафтах в границах Российской Федерации и Монголии [5]. В последние годы в очаге выявляется вирулентный центральноазиатский штамм чумного микроба основного подвида в поселениях серого сурка [6], что приводило к эпидемическим осложнениям – единичным заболеваниям населения бубонной формой чумы [7]. На территории Монголии регистрировались случаи с летальными исходами. Ранее в Горно-Алтайском очаге (Россия) выделяли только штаммы алтайского подвида *Yersinia pestis*, которые не вызывали заболеваний людей [8].

Обследуемая территория – это горная местность с системой хребтов и речных горных долин. В Катон-Карагайском районе она представлена южным макросклоном хребта Листвяга, южными и восточными склонами горного узла г. Белуха Катуньского хребта, нагорьем между реками Белая Берель и Бухтарма, хребтами Южного Алтая (Сарымсакты, Тарбагатай и Южный Алтай), западной частью плато Укок в границах Казахстана.

В Курчумском районе работа проводилась по Кара-Кабинской и Орловской долинам, южным склонам Южно-Алтайского хребта, Маркакольской котловине, отрогам хребта Азутау. Высоты колеблются от 850 м над уровнем моря (долина среднего течения Бухтармы), 2500 м (плато Укок) и до 3487 м на хребте Южный Алтай (рис. 1).

Общая площадь административных районов равна 36,4 тыс. км² и включает в свой состав 25 сельских округов, 106 населенных пунктов. Население районов полностью сельское и составляет свыше 45 тыс. человек. Основным занятием местных жителей является

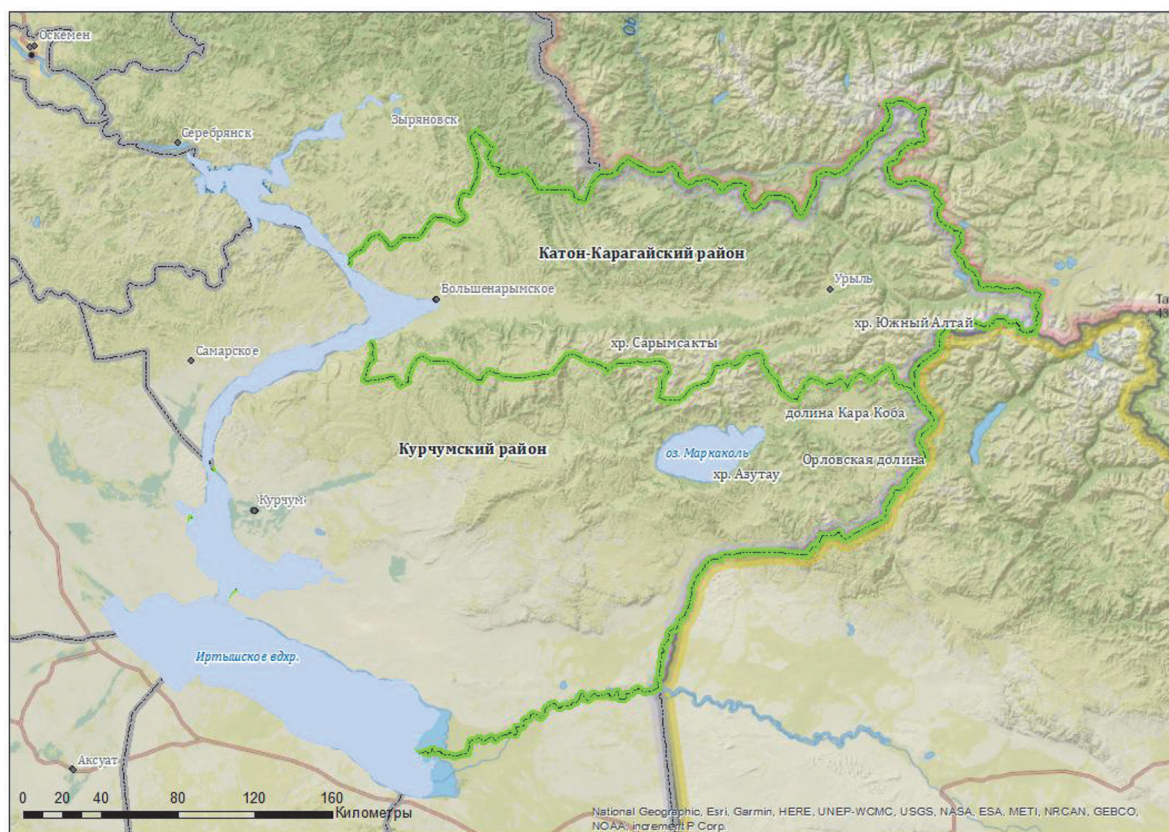


Рис. 1. Обследуемая потенциально-очаговая по чуме территория Республики Казахстан

Fig. 1. Surveyed potentially focal for plague territory of the Republic of Kazakhstan

сельское хозяйство (животноводство, растениеводство, пчеловодство, мараловодство и т.д.). В последние годы в этих районах бурно развивается экологический туризм. Основная часть населения имеет тесный контакт с дикой природой и соответственно входит в группу риска заражения природно-очаговыми инфекциями. Отдельную группу риска составляют сотрудники Катон-Карагайского национального парка, Маркакольского государственного природного заповедника и лесных хозяйств, пограничники.

Указанная территория Катон-Карагайского и Курчумского районов противочумной службой обследовалась впервые (рис. 2).

На территории Катон-Карагайского и Курчумского районов зарегистрированы природные очаги туляремии, сибирской язвы, лептоспироза и бруцеллеза. Установлено, что случай заболевания лептоспирозом в Катон-Карагайском районе был в 2012 г., в Курчумском районе – в 2015 и 2017 гг. Больных бруцеллезом регистрировали в Курчумском районе в 2014 г. (24 случая), в Катон-Карагайском районе в 2018 г. (3 случая). Единичные случаи заболеваний сибирской язвой, туляремией зарегистрированы в Катон-Карагайском районе, а листериоз – в Курчумском районе.

Основной целью работы противоэпидемического отряда являлась оценка эпидемиологического статуса территории Казахстанского Алтая в отношении природной очаговости чумы, а также других особо опасных инфекционных болезней.

Противоэпидемический отряд проводил работу со второй половины июля по середину августа в 2021–2022 гг. Общая площадь обследования составила 4100 км² (41 сектор), где взято 103 пробы полевого материала. Добытый полевой материал исследован бактериологическим, иммунологическим и молекулярно-генетическим (ПЦР) методами в соответствии с Методическими рекомендациями (2019) «Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории государств – участников Содружества Независимых Государств» и [9].

Всего исследовано 878 теплокровных животных (27 видов) и 1679 эктопаразитов (26 видов), а также погадки хищных птиц, костные останки грызунов и др.

Серый сурок на обследованной территории распространен в мозаичных поселениях локально, численность его низкая. Сурки расселены отдельными разобщенными семьями или небольшими группами, удаленными друг от друга на расстояния до 5 км. Норы расположены на южных и юго-восточных склонах альпийского и остепненной части субальпийского поясов, также встречались поселения на высокотравных горных лугах, что не свойственно данному виду. Занимаемая площадь отдельных поселений варьирует от 1 до 70 га. Средняя плотность вида по всей территории не превышает 0,1 жилых бутан на 1 км², хотя в изолированных обитаемых поселениях достигает до 1,2 бут/га.

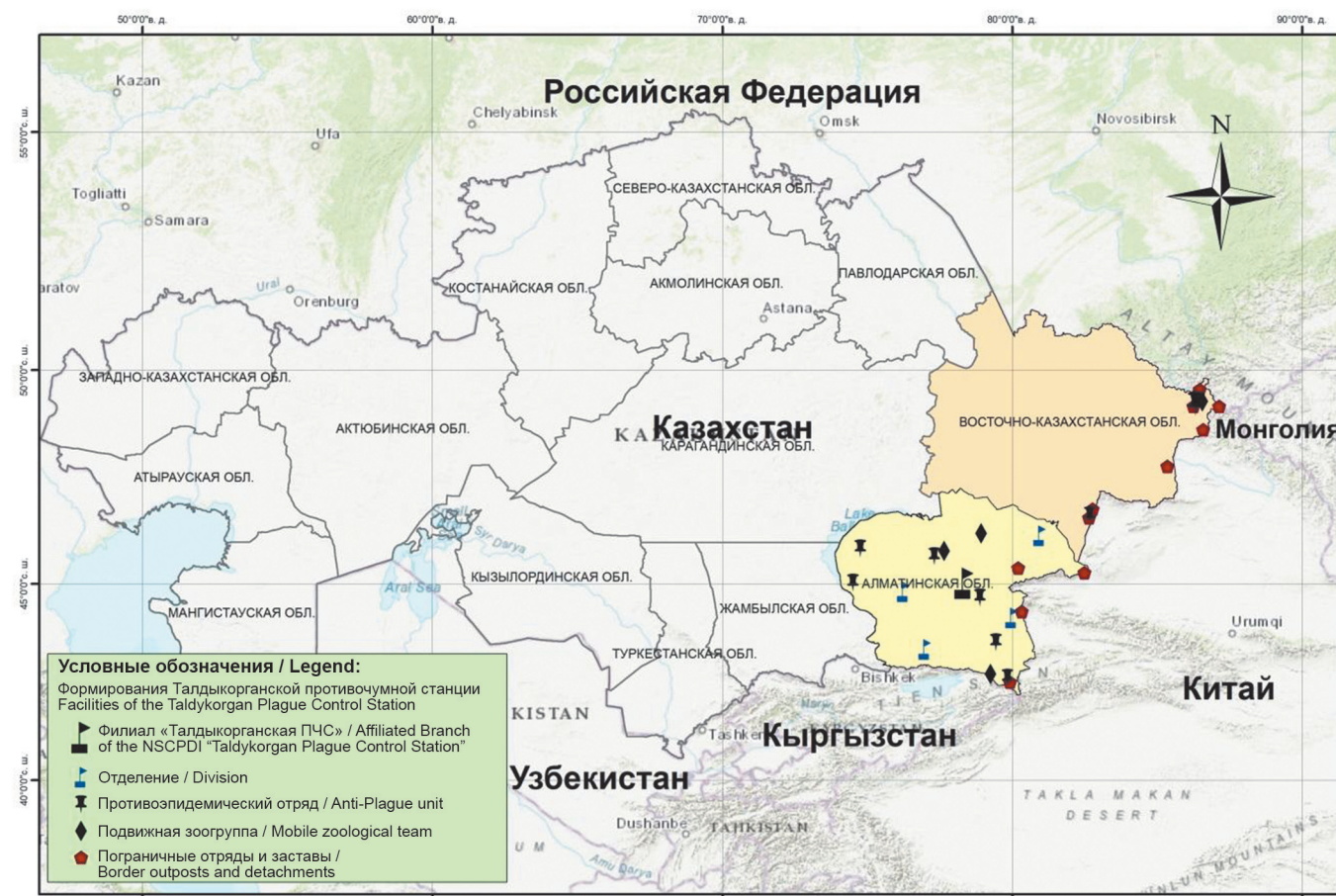


Рис. 2. Территория обследования противоэпидемическим отрядом

Fig. 2. The territory surveyed by the anti-epidemic unit

Несколько шире, но также мозаично, в островных и ленточных поселениях распространен длиннохвостый суслик. В Курчумском районе отмечаются совместные его группировки с серым сурком. Численность суслика в пределах поселений в среднем по полученным данным составила 7 особей/га.

По результатам зоологических исследований констатируется высокая мозаика поселений мелких млекопитающих 20 видов – потенциальных носителей и резервуаров природно-очаговых инфекций. Численность мышевидных грызунов составила в среднем 7,2 % попадания в давилки, доминировали в уловах полевка-экономка (ИД=51,8 %), обыкновенная (15,0 %) и красная (14,2 %) полевки. В населенных пунктах численность – 5,8 % попадания, преобладала мышь домовая (ИД=82,6 %).

За период работы в ВКО с млекопитающих и входов нор (длиннохвостый суслик) собрано 1398 блох 22 видов и 281 клещ. Блох в жилье человека при учетах не обнаружено.

Среди отловленных млекопитающих блохи обнаружены на 16 видах, из которых наиболее пораженным оказался длиннохвостый суслик, индекс обилия на нем доходил до 23. Из мышевидных – наибольшее количество видов блох зарегистрировано на полевке-экономке, красной и красно-серой полевках. Наиболее часто встречаемым видом среди блох оказалась *Hystrihopsylla talpae* – отмечена на 7 видах грызунов. На серых сур-

ках отмечено два вида блох: *Oropsylla silantiewi* и *Pulex irritans*. Индекс обилия составил 0,12.

На длиннохвостых сусликах паразитировали в основном специфические блохи: *Citellophilus tesquorum altaicus* и *Frontopsylla elatoides*. Общий индекс обилия – 3,6.

По результатам эпизоотологического обследования за два сезона циркуляции чумного микроба не обнаружено.

Вместе с тем при исследовании материала от носителей и переносчиков на прочие природно-очаговые инфекции получены следующие результаты: методом ПЦР выявлены генетические маркеры возбудителей лептоспироза *Leptospira* spp. (5 шт.), ГЛПС Puumala (1), иксодовых клещевых боррелиозов (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) (4), а также серологическим методом выявлены антитела к возбудителям псевдотуберкулеза (1), кишечного иерсиниоза (1), листериоза (4).

Несмотря на отрицательный результат обследования территории на чуму, сохраняется вероятность ее заноса из очагов чумы северо-западной части Монголии и плато Укок Горно-Алтайского очага России. Это обусловлено отсутствием экологических препятствий для связи поселений потенциальных носителей на приграничной территории Республики Казахстан с очагами чумы сопредельных государств и небольшим расстоянием до границ

выявленных эпизоотий. Также в ходе наблюдений определено, что за последние три года произошло резкое снижение количества выпадающих осадков в период активной вегетации растений, приведшее к деградации растительности и началу преобразования типов ландшафта. Эти факторы оказывают влияние на повышение миграционной активности среди носителей ввиду снижения обеспеченности их кормом. Можно предположить, что при тенденции сохранения климатических факторов в комплексе с увеличением эпизоотической активности в очагах чумы Монголии и Российской Федерации возникает необходимость проведения дальнейшего эпизоотологического мониторинга Казахстанского Алтая на чуму и другие особо опасные инфекции.

В глобальном масштабе случаи заболевания чумой и другими особо опасными инфекциями в любом географическом регионе могут представлять собой международные чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения, и этот тип угрозы требует международного сотрудничества.

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

Список литературы

1. Кутырев В.В., Шербакова С.А., Карнаухов И.Г., Касьян Ж.А., Шиянова А.Е., Горбунов В.А., Красько А.Г., Лешкевич А.Л., Федорович Е.В., Семизон П.А., Рустамова Л.М., Петкевич А.С., Ерубав Т.К., Аязбаев Т.З., Турегелдиева Д.А., Ковалева Г.Г., Бердиев С.К., Усенбаев Н.Т., Казыбаева Ж.С. Система мониторинга и реагирования на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера в странах СНГ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:95–106. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-95-106.
2. Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Оглодин Е.Г., Никифоров К.А., Корзун В.М., Вержущий Д.Б., Чипанин Е.В., Аязбаев Т.З., Джaparova A.K., Бердиев С.К., Лопатин А.А., Дубянский В.М., Шербакова С.А., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпидемиологическая ситуация по чуме в 2020 г. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации и других стран СНГ на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:52–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-52-62.
3. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях. Ижевск: ООО «Принт»; 2018. 336 с.
4. О Международном симпозиуме “Yersinia 14” и XVI Межгосударственной научно-практической конференции по вопросам санитарной охраны территории и снижения риска распространения чумы. [Электронный ресурс]. URL: https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1742/1337?locale=ru_RU (дата обращения 09.12.2022).
5. Корзун В.М., Денисов А.В., Базарова Г.Х., Санаров П.П., Шефер В.В., Холин А.В., Чипанин Е.В., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Балахонов С.В. Новая эпизоотическая территория в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы на плоскогорье Укок. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:103–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-103-109.
6. Корзун В.М., Балахонов С.В., Денисов А.В., Чипанин Е.В., Косилко С.А., Рождественский Е.Н., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Базарова Г.Х., Ярыгина М.Б. Интродукция возбудителя чумы основного подвиды в поселения серого сурка в Юго-Восточном Алтае. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2017; 4:20–9.
7. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 4:9–16. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-9-16.

8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Казахстана, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.

9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

References

1. Kutyrev V.V., Shcherbakova S.A., Karnaukhov I.G., Kas'yan Z.A., Shiyanova A.E., Gorbunov V.A., Kras'ko A.G., Leshkevich A.L., Fedorovich E.V., Semizhon P.A., Rustamova L.M., Petkevich A.S., Erubaev T.K., Ayazbaev T.Z., Turegeldieva D.A., Kovaleva G.G., Berdiev S.K., Usenbaev N.T., Kazybaeva Z.S. [System of monitoring and response to public health emergencies of sanitary-epidemiological character in the CIS countries]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (3):95–106. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-95-106.
2. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Oglozin E.G., Nikiforov K.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Chipanin E.V., Ayazbaev T.Z., Dzharparova A.K., Berdiev S.K., Lopatin A.A., Dubiansky V.M., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Epidemiological situation on plague in 2020. Forecast of episootic activity of natural plague foci in the Russian Federation and other CIS countries for 2021]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):52–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-52-62.
3. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Ensuring Epidemiological Well-Being in Natural Plague Foci in the Territory of the CIS Countries and Mongolia under Current Conditions]. Izhevsk: LLC “Print”; 2018. 336 p.
4. On International Symposium “Yersinia 14” and XVI Interstate Scientific and Practical Conference on the Issues of Sanitary Protection of the Territory and Reducing the Risk of Spread of Plague. (Cited 09 Dec 2022). [Internet]. Available from: https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1742/1337?locale=ru_RU.
5. Korzun V.M., Denisov A.V., Bazarova G.K., Sanarov P.P., Shefer V.V., Kholin A.V., Chipanin E.V., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Balakhonov S.V. [New epizootic territory in Gorno-Altai high-mountain natural plague focus on the Ukok plateau]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):103–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-103-109.
6. Korzun V.M., Balakhonov S.V., Denisov A.V., Chipanin E.V., Kosilko S.A., Rozhdestvensky E.N., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Bazarova G.K., Yarygina M.B. [Introduction of the plague pathogen of the main subspecies into the settlements of the gray marmot in the South-Eastern Altai]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2017; (4):20–8.
7. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Paksina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.K., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootiological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; (4):9–16. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-9-16.
8. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, the Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: “Medicine”; 2004. 192 p.
9. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: CJSC “Shiko”; 2013. 560 p.

Authors:

Erubaev T.K., Kovaleva G.G., Meka-Mechenko T.V., Abdel Z.Zh. Masgut Aikimbaev National Scientific Center of Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan. 14, Zhakhanger St., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan. E-mail: nnscedi-1@nnscedi.kz.
Sutyagin V.V., Kisilitsyn Yu.V., Belyaev A.I., Kim I.B. Affiliated Branch of the NSCPDI “Taldykorgan Plague Control Station”. Taldykorgan, Republic of Kazakhstan.

Об авторах:

Ерубав Т.К., Ковалева Г.Г., Мека-Меченко Т.В., Абдел З.Ж. Масгут Айкимбаев Национальный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева Министерства здравоохранения Республики Казахстан. Республика Казахстан, 050054, Алматы, ул. Жахангер, 14. E-mail: nnscedi-1@nnscedi.kz.

Сутягин В.В., Кислицын Ю.В., Беляев А.И., Ким И.Б. Филиал «Талдыкорганская противочумная станция» ННЦООИ, Республика Казахстан, Талдыкорган.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-69-74

УДК 616.98:579.842.23+616.98:579.88

П.Х. Копылов, С.В. Дентовская

Прямое количественное определение белковых антигенов в препаратах субъединичных чумных и риккетсиозных вакцин

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», р.п. Оболенск, Российская Федерация

Цель работы – предложить методические приемы прямого количественного определения специфических белковых антигенов *Yersinia pestis* и *Rickettsia raoultii* в препаратах и различных прототипах субъединичных вакцин. **Материалы и методы.** В качестве модельных использовали антигены *Y. pestis* LcrV и CafI, заключенные в субстанцию вакцины чумной молекулярной микроинкапсулированной (ВЧММ) и отдельно, в микрокристаллы аминокислот, соосажденных с белками чумного микроба. Антигены *R. raoultii* Adr2, OmpB24, YbgF адсорбировали прототипом субстанции риккетсиозной вакцины. Освобождение чумных антигенов из микрокапсул ВЧММ проводили последовательной обработкой последних органическими растворителями метиленхлоридом и метанолом соответственно, микрокристаллы-носители растворяли 0,1 М натрий-цитратным буфером, pH 6,0. Антигены в прототипе субстанции риккетсиозной вакцины определяли измерением количества белков, не связывающихся с алюмогелем. Количественные параметры, характеризующие содержание антигенов в субстанциях и прототипах вакцинных препаратов, вычисляли в результате обработки цифровых изображений полиакриламидных гелей, полученных электрофорезом фракций белковых антигенов, экстрагированных из носителей. **Результаты и обсуждение.** Изучены не вызывающие деградацию белка способы прямой экстракции и последующего количественного анализа антигенов *Y. pestis* LcrV и CafI из препаратов субъединичных вакцин на основе микрокристаллов аминокислот и полилактидных микрокапсул. Установлен различный характер связывания LcrV и CafI в субстанциях микрокристаллов, при этом количественно определена доля антигенов, освобождающихся из микрокристаллов только в результате их полного растворения. Выявлено, что при низких концентрациях белков LcrV и CafI, экстрагированных из микрокристаллов, для их уверенной визуализации необходимо концентрирование экстрактов с последующим удалением солей. Подтверждено, что 10 мкг чумных антигенов и белков *R. raoultii* в объеме дозы введения 200 мкл суспензии достаточно для количественного анализа электрофоретическим методом. Обсуждаются перспективы альтернативных прямой экстракции антигенов иных физико-химических методов оценки состава и качества вакцинных препаратов.

Ключевые слова: вакцины, адъюванты, *Yersinia pestis*, LcrV, CafI, микрокристаллы, экстракция, *Rickettsia raoultii*, Adr2, OmpB24, YbgF.

Корреспондирующий автор: Копылов Павел Христофорович, e-mail: info@obolensk.org.

Для цитирования: Копылов П.Х., Дентовская С.В. Прямое количественное определение белковых антигенов в препаратах субъединичных чумных и риккетсиозных вакцин. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-69-74

Поступила 16.12.2022. Принята к публ. 23.12.2022.

P.Kh. Kopylov, S.V. Dentovskaya

Direct Quantification of Protein Antigens in Subunit Plague and Rickettsial Vaccine Preparations

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to put forward the methods for direct quantitative determination of the content of *Yersinia pestis* and *Rickettsia raoultii* protein antigens in preparations and various prototypes of subunit vaccines. **Materials and methods.** *Y. pestis* LcrV and CafI antigens enclosed in the substance of the molecular microencapsulated plague vaccine (MMPV) and separately, in microcrystals of amino acids co-precipitated with plague proteins were used as model antigens. *R. raoultii* Adr2, OmpB24, and YbgF antigens were adsorbed on the prototype substance of the rickettsial vaccine. The release of plague antigens from MMPV microcapsules was carried out through successive treatment of the latter with organic solvents, methylene chloride and methanol, respectively; the carrier microcrystals were dissolved in 0.1 M sodium citrate buffer at pH 6.0. The antigen content in the prototype substance of the rickettsial vaccine was determined by measuring the amount of proteins not bound to the alumogel. Quantitative parameters characterizing the content of antigens in the substances and prototypes of vaccine preparations were calculated by processing digital images of polyacrylamide gels obtained by electrophoresis of protein antigen fractions extracted from carriers. **Results and discussion.** Methods for direct extraction and subsequent quantitative analysis of *Y. pestis* LcrV and CafI antigens from subunit vaccine preparations based on amino acid microcrystals and polylactide microcapsules that do not cause protein degradation have been studied. A different nature of the binding of LcrV and CafI in the substances of microcrystals has been established, while the proportion of antigens released from microcrystals has been quantified only in case of their complete dissolution. It was found that at low concentrations of LcrV and CafI proteins extracted from microcrystals, it is necessary to concentrate the extracts with subsequent removal of salts for their reliable visualization. It has been confirmed that 10 µg of plague antigens and proteins of *R. raoultii* in a dose volume of 200 µl of suspension is sufficient for quantitative analysis using electrophoretic method. The prospects of other physicochemical methods alternative to direct extraction of antigens for evaluating the composition and quality of vaccine preparations are discussed.

Key words: vaccines, adjuvants, *Yersinia pestis*, LcrV, CafI, microcrystals, extraction, *Rickettsia raoultii*, Adr2, OmpB24, YbgF.

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

Funding: The work was carried out within the framework of the Rospotrebnadzor research program for 2021–2025 “Scientific support of epidemiological surveillance and sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Creation of new technologies, means and methods of control and prevention of infectious and parasitic diseases”.

Corresponding author: Pavel Kh. Kopylov, e-mail: info@obolensk.org.

Citation: Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. Direct Quantification of Protein Antigens in Subunit Plague and Rickettsial Vaccine Preparations. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:69–74. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-69-74

Received 16.12.2022. **Accepted** 23.12.2022.

Kopylov P.Kh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1345-2033>

Dentovskaya S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

Вакцинация препаратами на основе инактивированных или аттенуированных микроорганизмов остается одним из наиболее эффективных методов профилактики инфекционных заболеваний. Введение в организм человека всей совокупности антигенов, присутствующих в такого рода препаратах, обуславливает проблему их безопасного применения и использования в качестве универсальных платформ для разработки. Субъединичные вакцины, несущие только основные иммунодоминантные компоненты, позволяют в значительной степени снимать вопросы безопасности. Снижение общего числа антигенов в вакцине уменьшает общую нагрузку на иммунную систему человека, но в то же время утрата целого ряда антигенов с меньшей протективностью сказывается на иммунологической эффективности таких вакцин. Снижение протективности субъединичных вакцин в значительной мере компенсируется введением в препарат иммуностимулирующих агентов (адъювантов). Современные адъюванты могут значительно повышать эффективность иммунного ответа за счет оптимизации размера и формы частиц вакцинного препарата, сохранения нативной структуры антигенов и за счет препятствования термоинактивации [1, 2]. Вместе с тем упрощенный по своей природе антигенный состав субъединичных вакцин подчеркивает важность количественной оценки иммунодоминантных антигенов в вакцинной субстанции, что позволяет контролировать дозирование препарата и проводить мониторинг технологического процесса его получения. Разработка вакцин – это длительный многоэтапный процесс с экспериментальными исследованиями, контролем качества производства, включая нормативно-правовые вопросы, маркетинг и продажи. Краеугольным камнем в разработке вакцин является наличие панели высококачественных тестов и методов, которые позволяют снижать риски получения некачественного продукта как на этапах разработки, клинических испытаний, лицензирования, так и выпуска коммерческого препарата. В итоге все вакцинные препараты должны соответствовать требованиям нормативной документации, касающимся доказательного состава препаратов, в том числе и количественного определения в них присутствующих белковых антигенов [3]. Недавно, например, опубликован всесторонний обзор комплекса методов и подходов *in vivo* и *in vitro*, исполь-

зуемых для контроля различных стадий производства и самого конечного продукта – оральной холерной бивалентной химической вакцины [4]. **Цель** нашей работы – предложить методические приемы прямого количественного определения специфических белковых антигенов *Yersinia pestis* и *Rickettsia raoultii* в препаратах и различных прототипах субъединичных вакцин с учетом проблем и перспектив контроля качества на этапах разработки средств специфической профилактики инфекционных заболеваний.

Материалы и методы

Реагенты. Для приготовления гелей, буферных растворов в процессе растворения микрокристаллов и микрокапсул применяли отечественные реактивы категории «осч», «хч» и импортные, соответствующие им по чистоте.

Источники антигенов. Антигены *Y. pestis* LcrV и CafI выделяли и характеризовали, как описано соответственно в работах [5, 6]. Белки Adr2, OmpB24 и YbgF выделяли никель-хелатной хроматографией на колонках HisTrap HP, 5 ml (Cytiva) с учетом рекомендаций производителя из лизатов рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, несущих гены *adr2*, *ompB24* и *ybgF* из штамма *R. raoultii* «Караганда 7/98» в плазмиде pET32b(+), любезно предоставленных М.Е. Платоновым.

Адсорбция антигенов суспензией гидрооксида алюминия (алюмогеля). Антигены, предварительно диализованные против забуференного изотонического раствора (ЗФР), содержащего 10 мМ двузамещенного фосфата натрия, 1,76 мМ однозамещенного фосфата калия, 2,7 мМ хлористого калия, 137 мМ хлористого натрия, pH 7,2, стерилизовали, пропуская через стерильные мембранные PES-фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Whatman), и смешивали со стерильной суспензией геля гидрооксида алюминия (A8222, Sigma) в физрастворе. Оба компонента суспензии предварительно стерилизовали автоклавированием при 0,5 атм в течение 30 мин. Суспензии антигенов с гидроокисью алюминия тщательно перемешивали и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Контрольные пробы получали из эквивалентных объемов растворов, не содержащих алюмогель. Пробы для электрофореза готовили из надосадочных фракций отобранных аликвот после центрифугирования.

Экстракция антигенов из полилактидных микрокапсул. Экстракцию антигенов и количественный анализ LcrV и CafI таких микрокапсул, составляющих основу субъединичной чумной вакцины, проводили так, как предложено нами в нормативной документации на вакцину чумную молекулярную микроинкапсулированную (ВЧММ) (регистрационное удостоверение № ЛП-004808 от 19.04.2018).

Освобождение (экстракция) антигенов из микрокристаллов, образованных быстрым осаждением белков с аминокислотами. Препараты микрокристаллов, нагруженных отдельно антигенами LcrV и CafI, получали по методу, изложенному в статье S. Jones *et al.* [7]. Высушенные в течение ночи при комнатной температуре субстанции хранили при 4 °С. Для экстракции белков из нагруженных микрокристаллов использовали методику, описанную в той же статье, измененную с учетом массы сухой субстанции. Готовили навески микрокристаллов, нагруженных антигенами LcrV или CafI, массой около 10 мг в микропробирках и суспендировали их в 1 мл 3ФР в течение 1 мин при комнатной температуре, после чего суспензии центрифугировали 3 мин при 12000g. Отбирали пробы надосадочных фракций в объеме 800 мкл, осторожно удаляли из микропробирок оставшийся 3ФР и вносили по 1 мл 0,1 М раствора цитрата натрия, pH 6,0. Растворение навесок проводили в течение 1 ч при 37 °С с периодическим встряхиванием на вортексе V-32 (BioSan) со скоростью вращения 2500 об/мин, после чего повторяли центрифугирование в тех же условиях и проводили отбор проб. К оставшимся осадкам вновь прибавляли по 1 мл 0,1 М раствора цитрата натрия (pH 6,0) и продолжали их растворение и отбор проб, как описано выше; во второй порции цитрата осадки растворялись полностью. До начала анализа пробы хранили замороженными при минус 20 °С.

Количественное определение антигенов. Количество антигенов в предварительно концентрированных пробах определяли по результатам их электрофореза в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) в восстанавливающих условиях [8]. Для увеличения концентраций белков в анализируемых образцах и их последующей визуализации в гелях пробы обрабатывали следующим образом. К 800 мкл проб добавляли по 200 мкл 80 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и оставляли микропробирки в холодильнике на ночь с целью образования осадка, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 20000g и 4 °С и помещали на лед. Надосадочную часть осторожно удаляли и добавляли к пробам по 1 мл 90 % водного раствора ацетона, охлажденного до минус 20 °С, инкубировали в течение 1 ч в морозильной камере, после чего центрифугировали при тех же условиях. Растворитель декантировали и повторяли процедуру промывки ацетоном еще раз для удаления остатков ТХУ, микропробирки подсушивали на лабораторном столе 3–4 мин. Для растворения осажденных ТХУ и ацетоном белков применяли буфер Laemmli в объеме

60 мкл, содержащий 120 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 20 % глицерина, 10 % 2-меркаптоэтанола, 4 % додецилсульфата натрия и 0,004 % бромфенолового синего. Пробы прогревали в течение 5 мин при 95 °С, встряхивали на вортексе и после образования конденсата при комнатной температуре кратко, в течение 0,5 мин, центрифугировали. Концентрированные таким образом белки в буфере Laemmli использовали для электрофореза. Гели окрашивали кумасси G-250 и получали цифровые изображения на сканере ImageQuant 800 (Amersham), денситометрический анализ окрашенных полос проводили программой GenAnalyser 2010, в качестве калибровки использовали образцы альбумина с различными концентрациями и маркеры молекулярных масс LMW (Cytiva) с заявленными массовыми долями компонентов.

Результаты и обсуждение

Задача экстрагирования белков, прочно адсорбированных частицами гидроокиси алюминия, ограничивала применение жестких агентов, вызывающих необратимую деградацию полипептидной цепи антигенов. Экспериментально найденные более мягкие экстрагенты, такие как буферные растворы с различными детергентами, с высокими/низкими значениями pH, хаотропными агентами, часто освобождали белки в недостаточной степени, при этом значительно усложняя последующие процедуры необходимостью своего удаления из аналитов. Поэтому задачу определения антигенов в составе вакцины часто решают от противного – измерением количества антигенов, не связывающихся с алюмогелем. Необходимо отметить, что такой метод может быть использован только при адсорбции антигенов, то есть в процессе приготовления вакцинных препаратов, и не применим для готовых субстанций на основе гидроокиси алюминия. Итоги сорбции использованных нами различных антигенов частицами гидроокиси алюминия иллюстрирует рис. 1. Сравнение линий 1 и 2 этого рисунка показало неполную адсорбцию антигенов LcrV и CafI в приготовленном препарате, связывание составляло соответственно 43 и 30 %. В то же время очищенные рекомбинантные белки риккетсий Adr2 и YbgF полностью адсорбировались; в значительной степени (90 %) также адсорбирован белок OmpB24 таким же количеством гидроокиси алюминия, как и в случае белков чумного микроба (рис. 1, линии 4, 8 и 6). Видно, что использование одинаковых массовых соотношений различных антигенов и алюмогеля выдает вариативность их адсорбционных способностей в отношении сорбента, обусловленных в конечном итоге топографией заряженных и гидрофобных участков, то есть аминокислотными последовательностями антигенов. Из рис. 1 следует, что задача контроля поведения антигенов на этапе их адсорбции гидроокисью алюминия может быть успешно решена для диапазона концентраций используемых в экспериментальных прототипах вакцинных пре-

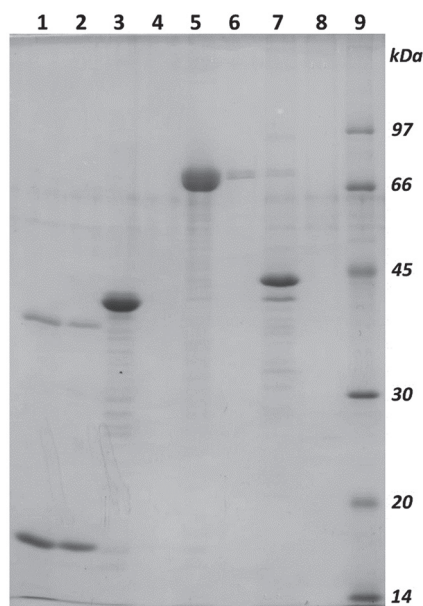


Рис. 1. Электрофорез очищенных белков LcrV, CafI, Adr2, OmpB24 и YbgF после адсорбции в суспензии гидрооксида алюминия:

линии 1, 2 – LcrV и CafI; 3, 4 – Adr2; 5, 6 – OmpB24; 7, 8 – YbgF; 1, 3, 5, 7 – неадсорбированные белки в контрольных препаратах; 2, 4, 6, 8 – надосадочные фракции суспензий гидрооксида алюминия; 9 – маркеры молекулярных масс белков, Cytiva, # 17044601 (сверху вниз, кДа – 97, 66, 45, 30, 20, 14)

Fig. 1. Electrophoresis of purified proteins LcrV, CafI, Adr2, OmpB24, and YbgF after adsorption in a suspension of aluminum hydroxide:

lanes 1, 2 – LcrV and CafI; 3, 4 – Adr2; 5, 6 – OmpB24; 7, 8 – YbgF; 1, 3, 5, 7 – non-adsorbed proteins in control preparations; 2, 4, 6, 8 – supernatant fractions of suspensions of aluminum hydroxide; 9 – protein molecular weight markers, “Cytiva”, # 17044601 (from top to bottom, kDa – 97, 66, 45, 30, 20, 14)

паратов (одна доза суспензии для введения мышам составляла 200 мкл, содержала 10 мкг антигена и визуализировалась на электрофореграмме).

В экспериментах с микрокристаллами, полученными по методу S. Jones *et al.* [7], нагруженными отдельно антигенами LcrV и CafI, использован мягкий метод их растворения в цитратном буфере, который сохранял антигены, заключенные в микрокристаллы, и давал возможность проведения дальнейшего анализа освобожденных белков. В оригинальной методике количественное определение проводили иммуноферментным анализом с использованием соответствующих специфических антител и антивидовых конъюгатов [7]. Мы использовали электрофорез и денситометрию гелей, что исключало получение и использование специфических антител, однако из-за меньшей чувствительности метода ДСН-ПААГ применяли концентрирование образцов с необходимым исчерпывающим удалением ТХУ и цитрата, которые могли сильно исказить электрофореграммы.

Приведена электрофореграмма параллельной экстракции LcrV и CafI из четырех одинаковых навесок нагруженных микрокристаллов (рис. 2). Анализ показал, что часть LcrV (16,1 %) и CafI (25,2 %) переходила в растворимое состояние в 3ФР в течение 1 мин, последующая часовая экстракция 0,1 М цитратом освобождала из микрокристаллов

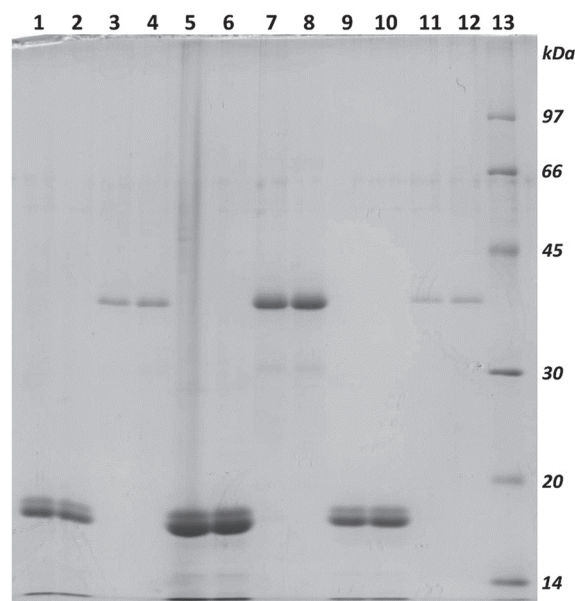


Рис. 2. Электрофорез экстрактов микрокристаллов, нагруженных антигенами LcrV и CafI отдельно:

линии 1, 2, 5, 6, 8, 9 – экстракты микрокристаллов с CafI; 3, 4, 7, 8, 11, 12 – экстракты микрокристаллов с LcrV; 1, 2, 3, 4 – экстракция физраствором; 5, 6, 7, 8 – первая экстракция 0,1 М цитратом, pH 6,0; 9, 10, 11, 12 – вторая экстракция 0,1 М цитратом, pH 6,0; 13 – маркеры молекулярных масс белков, Cytiva, # 17044601 (сверху вниз, кДа – 97, 66, 45, 30, 20, 14)

Fig. 2. Electrophoresis of microcrystal extracts loaded with LcrV and CafI antigens separately:

lanes 1, 2, 5, 6, 8, 9 – extracts of microcrystals with CafI; 3, 4, 7, 8, 11, 12 – extracts of microcrystals with LcrV; 1, 2, 3, 4 – saline extraction; 5, 6, 7, 8 – first extraction with 0.1 M citrate, pH 6.0; 9, 10, 11, 12 – second extraction with 0.1 M citrate, pH 6.0; 13 – protein molecular weight markers, “Cytiva”, # 17044601 (from top to bottom, kDa – 97, 66, 45, 30, 20, 14)

соответственно 75,2 и 49,2 % этих антигенов, вторая экстракция тем же буфером завершала растворение носителя и освобождала оставшиеся антигены – 8,7 и 25,6 % соответственно (рис. 2). Представленный анализ позволял сравнить эффективность различных вариантов адсорбции LcrV и CafI микрокристаллами, определить содержание антигенов в 1 мг сухой субстанции, долю легкорастворимых белков в препаратах и рассчитать массы смешиваемых микрокристаллов с эквивалентным содержанием антигенов, а также число доз прототипа препарата для иммунизации животных.

Анализ прямого определения антигенов LcrV и CafI в полилактидных микрокапсулах препарата ВЧММ детально изложен в соответствующей нормативной документации и аналогичен представленному выше с теми отличиями, что полимерный носитель последовательно обрабатывали не цитратом, а органическими растворителями, удаляли их и растворяли содержимое вакцинных флаконов в электрофоретическом буфере Laemmli. Экспериментально установили, что органические контаминанты полилактидной матрицы образцов не влияли на качество гелей. Результаты использовали для нормативного количественного контроля антигенов в препаратах ВЧММ.

Разработка вакцины – сложная задача. Часто для разработки вакцины недостаточно научных знаний о

молекулярных механизмах ее защитного действия, что затрудняет увязку определенного компонента с конкретными характеристиками продукта и существенно затрудняет разработку соответствующих анализов для контроля качества вакцины. Кроме того, большое разнообразие патогенов также порождает значительные различия в технологии производства вакцин [9]. В результате каждая вакцина нуждается в индивидуальном наборе тестов для определения ее качества. Текущие нормативные требования к биофармацевтическим продуктам хорошо обобщены в руководствах Международной конференции по гармонизации [10].

Рассматривая прототипы вакцинных препаратов на основе носителей-адъювантов различной химической природы, можно заключить, что возможность прямого анализа их антигенного содержимого традиционными методами, включающими экстракцию и последующий анализ, определяется прочностью связей между белковыми антигенами и матрицей. В случае практически необратимого связывания количественный контроль антигена возможен главным образом на этапе изготовления. В противоположном случае возможно специфическое разрушение носителей в мягких условиях с сохранением антигенов либо радикальное ослабление межмолекулярных сил, удерживающих антиген, с его последующей диффузией в растворимую фазу и идентификация количественными иммунохимическими (ИФА, иммунохроматография), физико-химическими (ДСН-ПААГ, спектрофотометрия) методами, причем для каждого типа адъюванта-носителя, исходя из его химической природы, существуют специфические методы и условия его растворения (разрушения). В нашем исследовании показано использование двух методов: одного – для растворения цитратным буфером микрокристаллов, нагруженных антигенами LcrV и CafI; второго – для деградации полилактидных микрокапсул, несущих LcrV и CafI, метиленхлоридом и метанолом. Оба приема позволяли получить воспроизводимые результаты и определить содержание чумных антигенов в вакцинном препарате и его прототипе. Риккетсиозные антигены, прочно связывающиеся с гидроокисью алюминия, определяли по их остаточному количеству, анализируя содержимое фракций, свободных от микрочастиц гидроокиси алюминия.

Методы прямого количественного определения антигенов в составе препаратов, исключающих экстракцию, чрезвычайно привлекательны. В простом случае для количественного определения дозы антигена в вакцинном препарате на основе микрокапсул использовали специфическую метку, флуоресцеин-изотиоцианат (ФИТЦ), который вводили в CafI с образованием ковалентной связи [11]. Концентрацию связанного ФИТЦ определяли спектрофотометрически по характерному пику поглощения хромофорной флуоресцеиновой химической группы при 496 нм. Похожий подход применили

также О.Ю. Кочеткова с соавт. [12] для оценки эффективности включения ФИТЦ-меченного альбумина методом адсорбции в синтетические микрокапсулы в зависимости от числа полиэлектролитных слоев. Однако для характеристики содержания немеченых, нативных антигенов в партиях профилактических препаратов необходимо разработать полностью адекватную модель переноса и интерпретации модельных результатов поведения ФИТЦ-меченных антигенов с учетом того, сколько молекул метки вводится в антиген, меняя его заряд, гидрофобность и молекулярную массу. Дополнительные проблемы для прямого определения антигенов возникают, когда один из иммуногенных компонентов прототипа вакцинного препарата представляет собой не индивидуальный антиген, а, например, сложный антигенный комплекс, в основном белков и липополисахаридов [11]. Значения измеренных интегральных параметров антигенного комплекса должны полностью отражать его протективные иммунологические свойства, и очевидно, что получение доказательств адекватности и информативности характеристических параметров является отдельным трудоемким исследованием.

Прямые методы изучения белков в составе препаратов должны не только определять их количество, но и нести информацию для оценки качества профилактических препаратов, как самих антигенов, так и микроносителей (адъювантов). Дальнейшее накопление информации о свойствах субстанции субъединичных вакцин и их понимание можно применить к более сложным и перспективным прототипам, например к внеклеточным везикулам, нестабильная природа, сложная структура и состав которых создают трудности при их создании и изучении. Необходимо отметить, что уже в настоящее время рациональный дизайн создания вакцинных препаратов начинает строиться на основе полного понимания характеристик иммуногенных биочастиц [13–15]. Применение прямых аналитических методов при разработке вакцинных препаратов, таких как высокоэффективная хроматография, рассеяние лазерного света под разными углами, дифференциальная сканирующая калориметрия, флуоресценция, спектроскопия комбинационного рассеяния, необходимо для поиска решений по сохранению биологических функций вакцин, их количественного анализа, для описания их поведения при нарушении условий хранения с целью предотвращения от дезактивации или денатурации. Сочетание различных физико-химических методов и корреляция с анализами биологической и протективной активности *in vitro* или *in vivo* является будущей тенденцией развития, гарантирующей высокие темпы разработок, безупречное качество, безопасность и эффективность многих классов вакцинных препаратов.

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

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней».

Список литературы

1. Benne N., van Duijn J., Kuiper J., Jiskoot W., Slütter B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *J. Control Release*. 2016; 234:124–34. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.033.
2. Baranov M.V., Kumar M., Sacanna S., Thutupalli S., van den Bogaart G. Modulation of immune responses by particle size and shape. *Front. Immunol.* 2021; 11:607945. DOI: 10.3389/fimmu.2020.607945.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.: 2018. С. 5326–36.
4. Воробьева С.А., Дуракова О.С., Громова О.В., Волох О.А., Клокова О.Д., Никифоров А.К. Антигенные компоненты холерной бивалентной химической вакцины, методы их выделения и контроля. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 2:12–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-12-19.
5. Копылов П.Х., Светоч Т.Э., Иванов С.А., Комбарова Т.И., Перовская О.Н., Титарева Г.М., Анисимов А.П. Особенности хроматографической очистки и протективности изоформ LcrV *Yersinia pestis*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019; 55(5):471–80. DOI: 10.1134/S0555109919040081.
6. Дятлов И.А., Сомов А.Н., Дунайцев И.А., Копылов П.Х., Иванов С.А., Борзилов А.И., Анисимов А.П., Храмов М.В. Рекомбинантный вакцинный препарат пролонгированного действия для профилактики чумы у млекопитающих и человека и способ его получения. Патент РФ № 2671525 C2, опубл. 01.11.2018. Бюл. № 31.
7. Jones S., Asokanathan C., Kmiec D., Irvine J., Fleck R., Xing D., Moore B., Parton R., Coote J. Protein coated microcrystals formulated with model antigens and modified with calcium phosphate exhibit enhanced phagocytosis and immunogenicity. *Vaccine*. 2014; 32(33):4234–42. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.09.061.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
9. Sheridan C. The business of making vaccines. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23(11):1359–66. DOI: 10.1038/nbt1105-1359.
10. ICH – International Conference on Harmonisation Regulations. Q7 – GMP Guide for Active Pharmaceutical Ingredients; Q8(R2) – Pharmaceutical Development; Q9 – Quality Risk Management; Q10 – Pharmaceutical Quality System; Q11 – Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities). [Электронный ресурс]. URL: <https://www.gmppublications.com/product185.html> (дата обращения 14.12.2022).
11. Сомов А.Н., Дубровский А.В., Дунайцев И.А., Иванов С.А., Комбарова Т.И., Кочеткова О.Ю., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Тихоненко С.А., Пинчук А.С., Фирстова В.В., Дентовская С.В. Иммуногенные свойства полиэлектролитных микрокапсул, нагруженных антигенами *Francisella tularensis* или *Yersinia pestis*. *Иммунология*. 2019; 40(5):52–61. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15006.
12. Кочеткова О.Ю., Казакова Л.И., Мошков Д.А., Винокуров М.Г., Шабарчина Л.И. Включение белков в полиэлектролитные микрокапсулы методами копреципитации и адсорбции. *Биоорганическая химия*. 2013; 39(5):565–71. DOI: 10.7868/S0132342313050084.
13. Herrington W.F. Jr., Singh G.P., Wu D., Barone P.W., Hancock W., Ram R.J. Optical detection of degraded therapeutic proteins. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):5089. DOI: 10.1038/s41598-018-23409-z.
14. Yang Y., Su Z., Ma G., Zhang S. Characterization and stabilization in process development and product formulation for super large proteinaceous particles. *Eng. Life Sci.* 2020; 20(11):451–65. DOI: 10.1002/elsc.202000033.
15. Буданова А.А., Шуковская Т.Н. Исследования *in silico* на этапах конструирования современных средств иммунопрофилактики чумы (на примере субъединичных вакцин). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-6-13.

References

1. Benne N., van Duijn J., Kuiper J., Jiskoot W., Slütter B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *J. Control Release*. 2016; 234:124–34. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.033.
2. Baranov M.V., Kumar M., Sacanna S., Thutupalli S., van den Bogaart G. Modulation of immune responses by particle size and shape. *Front. Immunol.* 2021; 11:607945. DOI: 10.3389/fimmu.2020.607945.
3. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV edition. Vol. 4. Moscow; 2018. P. 5326–36.
4. Vorob'eva S.A., Durakova O.S., Gromova O.V., Volokh O.A., Klokova O.D., Nikiforov A.K. [Antigenic components of chemical bivalent cholera vaccine, methods of their isolation and control]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (2):1–19. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-12-19.
5. Kopylov P.Kh., Svetoch T.E., Ivanov S.A., Kombarova T.I., Perovskaya O.N., Titareva G.M., Anisimov A.P. [Features of chromatographic purification and protectivity of LcrV *Yersinia pestis* isoforms]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology]*. 2019; 55(5):471–80. DOI: 10.1134/S0555109919040081.
6. Dyatlov I.A., Somov A.N., Dunaytsev I.A., Kopylov P.Kh., Ivanov S.A., Borzilov A.I., Anisimov A.P., Khramov M.V. [Recombinant vaccine preparation of prolonged action for the prevention of plague in mammals and humans and a method for its production]. RF Patent No. 2671525 C2, published November 01, 2018. Bulletin No. 31.
7. Jones S., Asokanathan C., Kmiec D., Irvine J., Fleck R., Xing D., Moore B., Parton R., Coote J. Protein coated microcrystals formulated with model antigens and modified with calcium phosphate exhibit enhanced phagocytosis and immunogenicity. *Vaccine*. 2014; 32(33):4234–42. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.09.061.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
9. Sheridan C. The business of making vaccines. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23(11):1359–66. DOI: 10.1038/nbt1105-1359.
10. ICH – International Conference on Harmonisation Regulations. Q7 – GMP Guide for Active Pharmaceutical Ingredients; Q8(R2) – Pharmaceutical Development; Q9 – Quality Risk Management; Q10 – Pharmaceutical Quality System; Q11 – Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities). (Cited 14 Dec 2022). [Internet]. Available from: <https://www.gmppublications.com/product185.html>.
11. Somov A.N., Dubrovsky A.V., Dunaytsev I.A., Ivanov S.A., Kombarova T.I., Kochetkova O.Yu., Kravchenko T.B., Titareva G.M., Tikhonenko S.A., Pinchuk A.S., Firstova V.V., Dentsovskaya S.V. [Immunogenic properties of polyelectrolyte microcapsules loaded with *Francisella tularensis* or *Yersinia pestis* antigens]. *Immunologiya [Immunology]*. 2019; 40(5):52–61. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15006.
12. Kochetkova O.Yu., Kazakova L.I., Moshkov D.A., Vinokurov M.G., Shabarchina L.I. [Incorporation of proteins into polyelectrolyte microcapsules by co-precipitation and adsorption methods]. *Bioorganicheskaya Khimiya [Bioorganic Chemistry]*. 2013; 39(5):565–71. DOI: 10.7868/S0132342313050084.
13. Herrington W.F. Jr., Singh G.P., Wu D., Barone P.W., Hancock W., Ram R.J. Optical detection of degraded therapeutic proteins. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):5089. DOI: 10.1038/s41598-018-23409-z.
14. Yang Y., Su Z., Ma G., Zhang S. Characterization and stabilization in process development and product formulation for super large proteinaceous particles. *Eng. Life Sci.* 2020; 20(11):451–65. DOI: 10.1002/elsc.202000033.
15. Budanova A.A., Shchukovskaya T.N. [In silico research at the stages of designing modern means for prevention of plague (by the example of subunit vaccines)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (3):6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-6-13.

Authors:

Kopylov P.Kh., Dentsovskaya S.V. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Копылов П.Х., Дентовская С.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, р.п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-75-81

УДК 616.98:579.842.23

Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова

Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии *Yersinia pestis*

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Патогенные бактерии используют низкомолекулярные хелаторы железа – сидерофоры – для ассимиляции железа в организме хозяина. Будучи признанными факторами вирулентности, эти молекулы, различающиеся по структурным и функциональным свойствам, являются предметом наиболее интенсивного изучения в медицинской микробиологии. Настоящее исследование посвящено изучению сидерофора иерсиниахелина (Ych), обнаруженного у возбудителя чумы *Yersinia pestis*. **Цель** работы – выяснение роли Ych в физиологии *Y. pestis* путем сравнения свойств трех штаммов чумного микроба, различающихся по продукции Ych. **Материалы и методы.** В экспериментах использованы три варианта штамма *Y. pestis* EV76: родительский штамм *Y. pestis* EV76, его мутант, не продуцирующий Ych из-за делеции трех генов биосинтеза сидерофора (аналоги *ypa1530–1532* в штамме *Y. pestis* CO92), и комплементированный мутант, который трансформирован рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV, содержащей клонированные гены биосинтеза Ych в составе высококопийного плазмидного вектора pSC-A-amp/kan. Сравнительный анализ трех штаммов проведен по морфологии колоний, сидерофорной активности, скорости роста и чувствительности к перекиси водорода. **Результаты и обсуждение.** В результате сравнения штаммов установлено, что секреция бактериями Ych при 26 °C обеспечивает ассимиляцию бактериями железа. При 37 °C Ych не секретируется в среду и обеспечивает защиту бактерий от бактерицидного действия реактивных соединений кислорода. Таким образом, в ходе исследования показано, что иерсиниахелин способен стимулировать ассимиляцию бактериями железа в железодефицитных условиях и обладает антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: иерсиниахелин, сидерофор, *Yersinia pestis*.

Корреспондирующий автор: Кузнецова Дарья Александровна, e-mail: dariakuz3112@bk.ru.

Для цитирования: Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии *Yersinia pestis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:75–81. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-75-81

Поступила 27.06.2022. Принята к публ. 06.09.2022.

D.A. Kuznetsova, V.A. Rykova, O.N. Podladchikova

The Role of the Yersiniachelin Siderophore in the Physiology of *Yersinia pestis*

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Pathogenic bacteria use low-molecular-weight iron chelators – siderophores – to assimilate iron in the host body. Being recognized as virulence factors, these molecules, differing in structural and functional properties, are the subject of the most intensive research in medical microbiology. The present study is devoted to the investigation of yersiniachelin siderophore (Ych) found in the causative agent of plague, *Yersinia pestis*. **The aim** of the work was to clarify the role of Ych in the physiology of *Y. pestis* by comparing the properties of three strains of the plague microbe, differing in Ych production. **Materials and methods.** Three variants of *Y. pestis* EV76 strain were used in the experiments: parent strain *Y. pestis* EV76, its mutant that does not produce Ych due to deletion of three siderophore biosynthesis genes (analogues of *ypa1530–1532* in *Y. pestis* CO92 strain) and a complemented mutant that was transformed by a recombinant pSC-A-5EV plasmid containing Ych biosynthesis genes cloned into the high-copy plasmid vector pSC-A-amp/kan. Comparative analysis of the three strains was carried out in terms of colony morphology, siderophore activity, growth rate, and sensitivity to hydrogen peroxide. **Results and discussion.** The comparison of these strains has revealed that the secretion of Ych by bacteria at 26 °C ensures the assimilation of iron. At 37 °C, Ych is not secreted into the medium and protects bacteria from the bactericidal action of reactive oxygen compounds. Thus, the study shows that yersiniachelin is able to stimulate the assimilation of iron by bacteria under iron-deficit conditions and has antioxidant properties.

Key words: yersiniachelin, siderophore, *Yersinia pestis*.

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

Corresponding author: Dar'ya A. Kuznetsova, e-mail: dariakuz3112@bk.ru.

Citation: Kuznetsova D.A., Rykova V.A., Podladchikova O.N. The Role of the Yersiniachelin Siderophore in the Physiology of *Yersinia pestis*. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 4:75–81. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-75-81

Received 27.06.2022. Accepted 06.09.2022.

Kuznetsova D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4198-0629>
Rykova V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3484-5100>

Podladchikova O.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7178-2255>

В настоящее время выявлены и охарактеризованы многие факторы вирулентности *Yersinia pestis*, способствующие проникновению, приживлению и размножению возбудителя чумы в организме млекопитающих. Однако факторы, определяющие на-

чальную стадию инфекции, наименее изучены. В то же время способность выживать, размножаться и противостоять защитным механизмам врожденного иммунитета хозяина на первом этапе инфекции определяет дальнейшую судьбу инфекционного

процесса. Известно, что в начале инфекции способность бактерий противостоять защитным механизмам хозяина зависит от способности ассимилировать железо [1]. Важным механизмом ассимиляции бактериями железа в организме хозяина является продукция низкомолекулярных хелаторов – сидерофоров [2]. Сидерофоры являются признанными факторами вирулентности бактерий, поэтому изучение этих молекул, различающихся по структурным и функциональным свойствам, является в настоящее время наиболее динамично развивающейся областью исследований в медицинской микробиологии. Анализ разных бактериальных сидерофоров показал, что, помимо обеспечения бактерий железом, сидерофоры выполняют множество других функций [3]. Многие бактерии продуцируют несколько сидерофоров, активных в разных условиях и на разных этапах инфекции. Накапливаются данные, что способность патогенных бактерий продуцировать множественные сидерофоры коррелирует с тяжестью вызываемого патогенами заболевания. Прежде всего, это связано с многообразием функций сидерофоров во время инфекции, а также с их разным родством к белку иммунной системы сидерокалину-2, который продуцируется эпителиальными клетками и нейтрофилами и инактивирует некоторые (например, катехолатные) сидерофоры [4]. При этом другие сидерофоры (например, сидерофоры гидроксаматного типа) не взаимодействуют с сидерокалином. По современным представлениям, именно комбинация продуцируемых патогеном сидерофоров определяет его «репликативные ниши» и модулирует реакцию хозяина на инфекцию [5].

Важная роль сидерофоров для вирулентности бактерий показана в ходе многочисленных исследований сидерофора иерсиниабактина (Ybt) *Y. pestis*, который кодируется островом высокой патогенности (HPI-1) в составе нестабильного хромосомного *pgm*-локуса [6]. Хотя Ybt хорошо изучен как на модели *Y. pestis*, так и других синтезирующих его патогенных энтеробактерий, механизм его участия в реализации патогенных свойств возбудителя чумы остается предметом исследования. На протяжении многих лет Ybt считался единственным сидерофором *Y. pestis* [7], но в секвенированных геномах *Y. pestis* выявлены гены биосинтеза и других сидерофоров. Экспрессия этих генов *in vitro* и *in vivo* подтверждается результатами транскриптомных исследований [8].

Наши исследования свидетельствуют о том, что, помимо Ybt, *Y. pestis* действительно синтезирует еще один сидерофор – иерсиниахелин (Ych), который кодируется хромосомным *usu*-локусом [9]. В нашей предыдущей работе [10] для доказательства функциональности генов *usu*-локуса в клетках чумного микроба и изучения возможных функций Ych гены его биосинтеза из штамма *Y. pestis* EV76 клонированы в составе высококопийного вектора pSCA-amp/kan в клетках *Escherichia coli* H1884, не проду-

цирующих собственный сидерофор энтеробактин. С помощью сравнения свойств этого рекомбинантного штамма с родительским штаммом, трансформированным векторной плазмидой, установлено, что Ych может экспрессироваться в клетках кишечной палочки и способствует защите бактерий от реактивных соединений кислорода. Поскольку в рекомбинантной плазмиде имеются гены биосинтеза Ych и отсутствуют гены, ответственные за его транспорт, для анализа участия сидерофора в ассимиляции железа и реализации его других возможных функций необходимо использовать штамм *Y. pestis*, содержащий гены его транспорта. В настоящей работе использован вакцинный штамм *Y. pestis* EV76, не продуцирующий Ybt из-за делеции хромосомного *pgm*-локуса, в состав которого входят гены биосинтеза и транспорта этого сидерофора. При этом штамм содержит гены *usu*-локуса и продуцирует Ych. Для изучения роли Ych в клетках чумного микроба из штамма *Y. pestis* EV76 получен мутант, не продуцирующий Ych, а также комплементированный мутант, содержащий плазмиду pSCA-5EV с клонированными генами биосинтеза Ych из штамма EV76. **Цель работы** – выяснение роли Ych в физиологии *Y. pestis* путем сравнения свойств трех штаммов чумного микроба, различающихся по продукции Ych.

Материалы и методы

В работе использовали три штамма: родительский штамм *Y. pestis* EV76, его мутант, не продуцирующий Ych, трансформированные векторной плазмидой pSC-A-amp/kan, а также мутант, который трансформирован рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV. Штаммы, полученные из Коллекции патогенных микроорганизмов Ростовского-на-Дону противочумного института, представлены в таблице. Мутант получен методом конъюгативного переноса из клеток *E. coli* рекомбинантной плазмиды, содержащей делецию трех генов биосинтеза Ych (аналоги *upo1530–1532* в штамме *Y. pestis* CO92). В то же время у мутанта сохранены транспортные гены, необходимые для секреции Ych и поглощения бактериями нагруженного железом этого сидерофора. Для комплементации отсутствующих генов биосинтеза Ych мутант трансформирован рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV, содержащей эти гены [11].

Штаммы выращивали в жидких и на плотных питательных средах: LB (DIFCO, США), NB (DIFCO, США), TA (DIFCO, США) и минимальной среде M9, в которую добавляли растворы четырех L-аминокислот (метионин, треонин, цистеин, фенилаланин) до концентрации 20 мкг/мл. При выращивании штаммов, содержащих векторную и рекомбинантную плазмиды, в среды добавляли антибиотики: ампициллин и канамицин (50 мкг/мл). Для анализа влияния железа на скорость роста бактерий в среды добавляли растворы FeCl₃ (100 мкМ) и хелатора железа 2-2'-дипиридила (50–100 мкМ). Бактериальные

Штаммы, использованные в работе
Strains used in the study

Название Name	Характеристика Description	Ссылка References
<i>Y. pestis</i> EV76	Родительский штамм Parent strain	[12]
<i>Y. pestis</i> EV76 Ych ⁻	Мутант родительского штамма, не продуцирующий Ych Mutant of the parent strain not producing Ych	[13]
<i>Y. pestis</i> EV76 /pSCA-amp/kan	Родительский штамм, трансформированный векторной плазмидой pSCA-amp/kan Parent strain transformed with vector plasmid pSCA-amp/kan	Настоящая работа Current study
<i>Y. pestis</i> EV76 Ych ⁻ /pSCA-amp/kan	Ych ⁻ мутант, трансформированный векторной плазмидой pSCA-amp/kan Ych ⁻ mutant transformed with a vector plasmid pSCA-amp/kan	Настоящая работа Current study
<i>Y. pestis</i> EV76 Ych ⁻ /pSCA-5EV	Ych ⁻ мутант, комплементированный рекомбинантной плазмидой pSCA-5EV, содержащей гены биосинтеза Ych, встроенные в вектор pSCA-amp/kan Ych ⁻ mutant complemented with pSCA-5EV recombinant plasmid containing Ych biosynthesis genes inserted into the pSCA-amp/kan vector	[11]

взвеси для экспериментов готовили на забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР), количество содержащихся в них бактерий определяли, используя оптический отраслевой стандарт мутности Тарасевича, измерение оптической плотности и высев культур на плотную питательную среду LB для подсчета выросших колоний.

Анализ сидерофорной активности штаммов проводили на среде, разработанной для выявления сидерофоров у разных видов бактерий [14]. Эта среда содержит хромогенный хелатор железа хромозуол S (CAS), имеющий при 30%-м насыщении железом сине-зеленую окраску, которая изменяется на желтую после удаления из CAS-реагента железа сидерофорами, выделяемыми бактериями в среде. Для индукции сидерофорной активности перед посевом на индикаторную среду штаммы *Y. pestis* выращивали при 26 °C на железodefицитной среде NB, содержащей 50–100 мкМ 2-2'-дипиридила. На CAS-агар пятном наносили по 10 мкл суспензии (5·10⁹ м.кл./мл дистиллированной воды) каждого штамма и посевы инкубировали 2–5 суток при 26 или 37 °C.

Скорость роста бактерий определяли в жидких питательных средах (LB, M9 и M9 с дипиридилом). Бактерии предварительно выращивали при 26 °C на плотной среде LB с ампициллином в течение 48 ч, отмывали 2 раза холодным стерильным ЗФР от остатков среды и суспендировали в ЗФР (до 10⁹ м.кл./мл по стандарту мутности). Взвеси бактерий выравнивали до одинаковых показателей оптической плотности (соответствующей 0,1 при длине волны 550 нм) и по 10⁷ м.кл./мл засевали в 150 мл питательной среды. Бактерии выращивали при 26 °C в условиях аэрации на шуттеле (150 об/мин). Через определенные промежутки времени из колб отбирали по 2 мл взвеси, измеряли оптическую плотность и параллельно высевали на плотную среду LB для контроля чистоты культуры и подсчета колоний. Полученные данные оптической плотности использовали для построения кривых роста штаммов в различных средах с помощью программы Microsoft Excel.

Чувствительность трех исследуемых штаммов к перекиси водорода определяли на плотной питательной среде диско-диффузионным методом и в растворе (ЗФР) путем подсчета бактерий, выживших после действия перекиси. На плотную среду ТА высевали суспензии (10⁹ м.кл./мл дистиллированной воды) штаммов, предварительно выращенных на этой среде при 37 °C в течение 48 ч. Через 6 ч инкубации при 37 °C в центр посевов помещали бумажный диск, пропитанный 3%-м раствором перекиси водорода. После 48 ч выращивания штаммов при 37 °C на агаре вокруг дисков отмечались зоны отсутствия роста бактерий, различающиеся по диаметру у разных штаммов.

Анализ чувствительности трех штаммов к перекиси в ЗФР проводили, используя суспензии в ЗФР бактерий, выращенных за 48 ч при 37 °C на агаре LB. Суспензии разбавляли до концентрации 10⁵ м.к./мл и добавляли перекись водорода (до конечной концентрации 0,01 %). В контрольные пробы вместо перекиси добавляли стерильную дистиллированную воду. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °C, после чего разбавляли в 100 раз и высевали по 0,1 мл (т.е. 100 м.кл./чашка Петри) на среду LB (по 3 чашки на каждую пробу). Через 48–72 ч выращивания при 26 °C подсчитывали количество выросших колоний и рассчитывали процент выживших клеток по отношению к контролям.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ вариантов штамма *Y. pestis* EV76, различающихся по продукции Ych. Выяснение роли Ych в физиологии чумного микроба проведено путем сравнения свойств родительского штамма *Y. pestis* EV76 с его мутантом, не продуцирующим этот сидерофор, а также с мутантом, комплементированным рекомбинантной плазмидой pSCA-5EV, содержащей гены биосинтеза Ych. Для корректного сравнения штаммов в одинаковых условиях в присутствии ампициллина, необходимого для сохранения в бактериях рекомбинантной плазмиды

pSC-A-5EV, родительский штамм и его мутант по продукции Ych трансформированы векторной плазмидой pSC-A-amp/kan. Анализ трех штаммов, выросших на среде LB при 26 и 37 °C, показал, что штаммы не различались по морфологии колоний при 26 °C, однако при 37 °C рекомбинантный штамм – суперпродукент Ych образовывал коричневые включения внутри колоний (рис. 1, А). По-видимому, при 37 °C Ych не выделяется рекомбинантным штаммом в среду, а накапливается в бактериях в комплексе с железом. Отсутствие подобного эффекта при 26 °C позволяло предположить, что при этой температуре сидерофор выделяется из клеток. Подтверждение этого предположения получено при анализе сидерофорной активности штаммов на индикаторной среде для выявления продукции сидерофоров (CAS-агар).

Сравнение сидерофорной активности трех вышеописанных вариантов штамма *Y. pestis* EV76 (рис. 1, В) проведено при 26 °C, поскольку при 37 °C штамм *Y. pestis* EV76 не растет на железodefицитных средах, в том числе и на CAS-агаре. Известно, что для роста в этих условиях чумному микробу необходим сидерофор Ybt [6], экспрессия которого активируется при 37 °C. Как видно на рис. 1, В, ни родительский штамм, ни его мутант не обладают сидерофорной активностью при 26 °C. По-видимому, это связано с известными результатами разных авторов, что *pgm*[−] штаммы не обладают сидерофорной активностью на CAS-агаре, поскольку не продуцируют Ybt. Это наблюдение привело авторов к заключению, что *Y. pestis* не синтезирует других сидерофоров, кроме Ybt [7]. Тем не менее сидерофор Ych обнаружен в составе фактора аутоагглютинации чумного микроба, который представляет собой поверхностный Нср-подобный компонент системы секреции VI типа. Наше предыдущее исследование позволило установить, что отсутствие у *pgm*[−] штаммов активности на CAS-агаре, не связано с отсутствием способности синтезировать другие сидерофоры. Как выяснилось, *pgm*[−], в отличие от *pgm*⁺ штаммов, продуцируют низкомолекулярный ингибитор, который препятствует выделению сидерофоров в среду. Однако суперпродукция Ych рекомбинантным штаммом, содержащим гены биосинтеза Ych на высококопийной плазмиде, способствует преодолению действия ингибитора, выделению сидерофора в среду и образованию большой зоны просветления CAS-реагента вокруг посева.

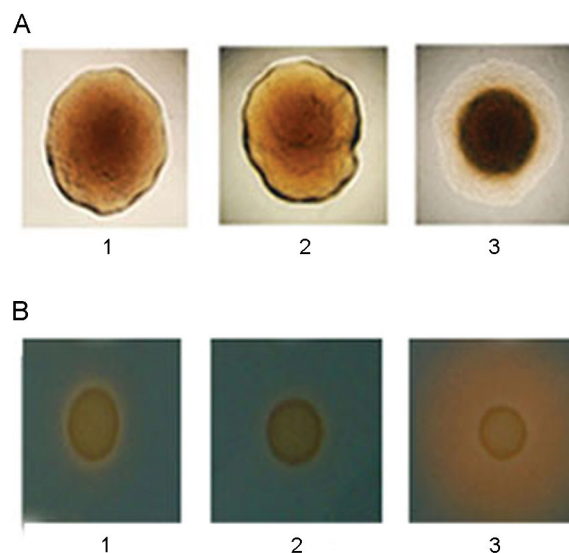


Рис. 1. Сравнительный анализ родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего Ych (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV (3):

А – морфология колоний, образованных тремя штаммами после 48 ч выращивания при 37 °C на среде LB; В – сидерофорная активность штаммов, выращенных в течение 48 ч на CAS-агаре при 26 °C

Fig. 1. Comparative analysis of the parent strain *Y. pestis* EV76 (1), its mutant that does not produce Ych (2), and the mutant complemented with the recombinant plasmid pSC-A-5EV (3):

A – morphology of colonies formed by three strains at 37 °C and cultivation time of 48 h on LB medium; B – siderophore activity of the strains cultured for 48 h on CAS-agar at 26 °C

Анализ участия Ych в ассимиляции бактериями железа. Исследование возможной роли Ych в ассимиляции чумным микробом железа проведено при сравнении трех штаммов по способности расти при 26 °C в средах, различающихся по концентрации железа. На первом этапе работы сравнение родительского и мутантного штаммов позволило установить, что оба штамма практически не отличались по скорости роста в богатой железом среде LB (рис. 2, А), однако мутант несколько отставал от родительского штамма при росте в минимальной среде M9 (рис. 2, В), особенно в железodefицитной среде M9, содержащей 50 мкМ хелатора железа 2-2'-дипиридила (рис. 2, С). Надо отметить, что при добавлении в среду M9 солей трехвалентного железа (100 мкМ) различия в скорости роста между штаммами отсутствовали, что подтверждало участие Ych в ассимиляции бактериями железа в условиях его дефицита.

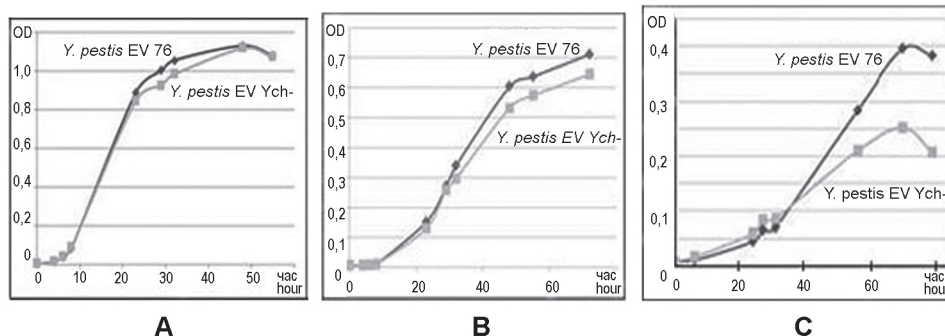


Рис. 2. Кривые роста родительского (*Y. pestis* EV76) и мутантного (*Y. pestis* EV76 Ych[−]) штаммов при выращивании с аэрацией (150 об/мин) при 26 °C в жидких питательных средах:

LB (А), M9 (В) и M9 с 50 мкМ 2-2'-дипиридила (С)

Fig. 2. Growth curves of parent (*Y. pestis* EV76) and mutant (*Y. pestis* EV76 Ych[−]) strains when cultured with aeration (150 rpm) at 26 °C in liquid nutrient media:

LB (A), M9 (B), and M9 with 50 μM of 2-2'-dipyridyl (C)

Полученные данные подтвердились и при включении в анализ мутанта, комплементированного плазмидой pSC-A-5EV. Сравнение скорости роста трех штаммов в среде M9 в присутствии ампициллина (50 мкг/мл) и 50 мкМ хелатора 2-2'-дипиридила (рис. 3) выявило различия между штаммами. Комплементированный мутант значительно обгонял в росте родительский штамм, а мутант, не продуцирующий сидерофор, отставал по росту от обоих штаммов.

Различия в скорости роста между тремя штаммами были более выраженными при их выращивании в условиях интенсивной аэрации и практически отсутствовали при выращивании бактерий в стационарных условиях. Эти данные свидетельствовали о том, что Ych, помимо участия в ассимиляции бактериями *Y. pestis* железа в железодефицитных условиях, способствует защите бактерий от действия реактивных соединений кислорода.

Анализ антиоксидантной активности Ych.

С целью подтвердить предположение, что экспрессия Ych защищает бактерии от реактивных соединений кислорода, мы проанализировали чувствительность штаммов к бактерицидному действию перекиси водорода. Сравнение показало (рис. 4), что мутант, не продуцирующий Ych, более чувствителен к действию перекиси, чем родительский штамм.

При анализе штаммов диско-диффузионным методом (рис. 4, А) мутант образовывал большую зону ингибции роста, чем родительский штамм и комплементированный мутант. Анализ чувствительности трех штаммов к перекиси водорода в ЗФР (рис. 4, В) также показал, что мутант, комплементированный рекомбинантной плазмидой, восстанавливал способность сопротивляться действию перекиси. В разных экспериментах разница между родительским

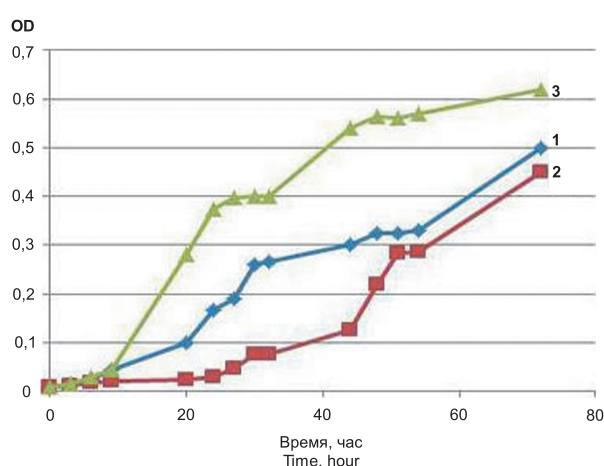


Рис. 3. Кривые роста родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего Ych (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV (3) в среде M9, содержащей ампициллин (50 мкг/мл) и 50 мкМ 2-2'-дипиридила

Fig. 3. Growth curves of the parent strain *Y. pestis* EV76 (1), its mutant that does not produce Ych (2), and the mutant complemented with the recombinant plasmid pSC-A-5EV (3) in M9 medium containing ampicillin (50 µg/ml) and 50 µM of 2-2'-dipyridyl

и мутантным штаммом была количественно более стабильной, в то время как штамм-суперпродуцент Ych демонстрировал разный процент бактерий, выживших после воздействия перекиси. При этом во всех экспериментах сохранялась одна и та же тенденция – комплементированный мутант обладал большей устойчивостью к перекиси, чем мутант, не продуцирующий Ych. Вышеописанные различия между тремя штаммами подтверждают возможную роль Ych в качестве антиоксиданта, способствующего снижению чувствительности бактерий к бактерицидному действию перекиси водорода.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало экспрессию генов *usu*-кластера не только в клетках кишечной палочки [10], но и в бактериях *Y. pestis*. Вопрос о возможности экспрессии генов этого кластера клетками возбудителя чумы многие годы дискутировался в литературе, и функционирование генов этого кластера ставилось рядом авторов под сомнение [7]. Сомнения в возможности синтеза сидерофора, кодируемого *usu*-кластером, высказывались из-за наличия в нем гена биосинтеза сидерофора (аналог гена *upo1538* в штамме *Y. pestis* CO92), содержащего мутацию со сдвигом рамки счи-

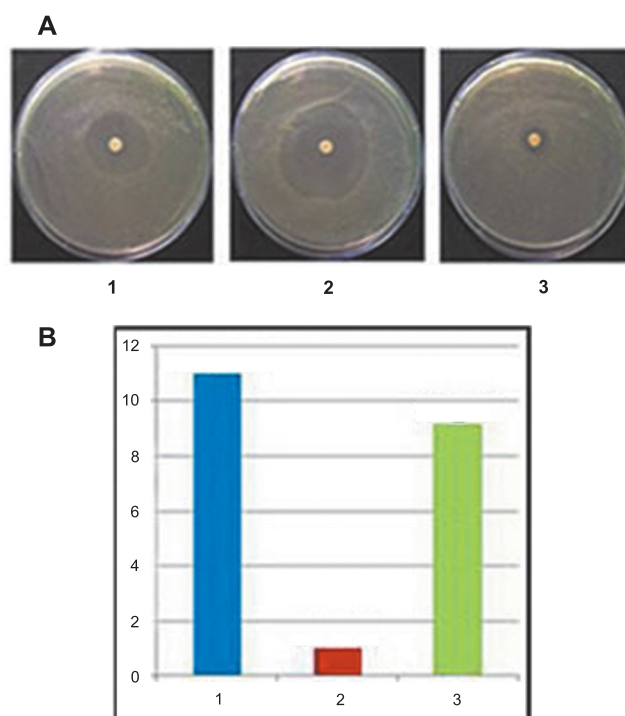


Рис. 4. Сравнительный анализ чувствительности к бактерицидному действию перекиси водорода родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего Ych (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV (3):

А – диско-диффузионный метод; В – чувствительность (процент выживших бактерий) трех штаммов после воздействия 0,01%-й перекиси водорода в ЗФР в течение 30 мин

Fig. 4. Comparative analysis of sensitivity to the bactericidal effect of hydrogen peroxide in the parent strain *Y. pestis* EV76 (1), its mutant that does not produce Ych (2), and the mutant complemented with the recombinant plasmid pSC-A-5EV (3):

А – disk diffusion method; В – sensitivity (percentage of survived bacteria) of the three strains after the 30 min exposition to 0.01 % hydrogen peroxide in PBS (phosphate buffered saline solution)

тивания. Однако проведенный нами анализ структуры этого гена показывает, что он является копией гена *uro1532*, не содержащего видимых повреждений. Поэтому в геноме разных штаммов чумного микроба содержится полный набор генов, необходимых для синтеза Ych.

С помощью транскрипционного анализа с использованием тотальных геномных микрочипов показано, что входящие в *usu*-кластер гены транскрибируются чумным микробом [15] и обладают повышенной экспрессией в плазме крови человека по сравнению со средой LB [16]. Более того, установлено, что один из биосинтетических генов этого кластера, *usuI*, снижает свою экспрессию при 37 °C. Это позволяло предположить, что Ych должен обладать повышенной экспрессией при 26 °C и может участвовать в ассимиляции чумным микробом железа при этой температуре. Тем не менее многие годы попытки обнаружить у чумного микроба другие сидерофоры кроме Ybt на среде для выявления сидерофоров были отрицательными. Секрецию Ych клетками чумного микроба на индикаторной среде для выявления сидерофоров удалось обнаружить только в настоящем исследовании – у рекомбинантного штамма *Y. pestis* – суперпродуцента этого сидерофора.

Наше исследование на модели трех вариантов штамма *Y. pestis* EV76, различающихся по продукции Ych, позволило обнаружить свидетельства экспрессии этого сидерофора не только штаммом-суперпродуцентом, но и родительским штаммом. Так, в отличие от мутанта, не синтезирующего Ych, родительский штамм более активно размножался в условиях дефицита железа при 26 °C, что свидетельствовало об участии Ych в ассимиляции железа при этой температуре. Предположение о существовании у чумного микроба криптической системы ассимиляции железа при 26 °C высказывалось еще в 1996 г. [17]. Подтверждение такому предположению получено в данной работе – продукция Ych родительским и рекомбинантным штаммом продуцентом иерсиниахелина способствует размножению бактерий в железodefицитной среде при 26 °C. Отсутствие роста исследуемых штаммов, не продуцирующих Ybt, в железodefицитных средах при 37 °C свидетельствует в пользу заключения о необходимости Ybt для роста *Y. pestis* в этих условиях [6]. Исследование функциональных свойств Ych на модели вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 позволило заключить, что этот сидерофор, при наличии у бактерий его рецептора на поверхности клеток и транспортных белков в мембранах бактерий, способен стимулировать ассимиляцию бактериями железа в железodefицитных условиях при 26 °C.

Свидетельства продукции Ych чумным микробом не только при 26 °C, но и при 37 °C, получены в настоящем исследовании. Накопление Ych штаммом-суперпродуцентом внутри бактерий при 37 °C предполагает снижение эффективности секреции сидерофора в этих условиях. При этом Ych способствует

защите бактерий от бактерицидного действия перекиси водорода – и родительский штамм, и суперпродуцент сидерофора более защищены от действия перекиси, чем мутант, не продуцирующий Ych. Повышение антиоксидантных свойств сидерофоров, локализованных внутри клеток было выявлено как у бактерий, так и у грибов [18, 19]. Результаты настоящего исследования на модели чумного микроба подтвердили данные, полученные на модели рекомбинантного штамма кишечной палочки, о том, что Ych обладает антиоксидантными свойствами [10], более выраженными при внутриклеточной локализации сидерофора.

Таким образом, проведенное исследование показало, что Ych экспрессируется клетками чумного микроба как при 26 °C, так и 37 °C. При 26 °C в железodefицитных условиях он секретируется в среду и способствует ассимиляции железа, а при 37 °C остается внутри бактерий и защищает их от бактерицидного действия реактивных соединений кислорода. Выявленные свойства иерсиниахелина позволяют предположить, что этот сидерофор может играть определенную роль и в инфекционном процессе. Анализ влияния Ych на организм лабораторных животных является предметом изучения в настоящее время.

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

Список литературы

1. Kontoghiorghes G.J., Kontoghiorghes C.N. Iron and chelation in biochemistry and medicine: new approaches to controlling iron metabolism and treating related diseases. *Cells*. 2020; 19(6):1456. DOI: 10.3390/cells9061456.
2. Khasheii B., Mahmoodi P., Mohammadzadeh A. Siderophores: importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol. Res.* 2021; 250:126790. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126790.
3. Johnstone T.C., Nolan E.M. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans.* 2015; 44(14):6320–39. DOI: 10.1039/c4dt03559c.
4. Sia A.K., Allred B.E., Raymond K.N. Siderocalins: siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 2013; 17(2):150–7. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.11.014.
5. Holden V., Bachman M.A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*. 2015; 7(6):986–95. DOI: 10.1039/c4mt00333k.
6. Perry R.D., Fetherston J.D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2011; 13(10):808–17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008.
7. Forman S., Paulley J.T., Fetherston J.D., Cheng Y.Q., Perry R.D. *Yersinia* ironomics: comparison of iron transporters among *Yersinia pestis* biotypes and its nearest neighbor, *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biometals*. 2010; 23(2):275–94. DOI: 10.1007/s10534-009-9286-4.
8. Rakin A., Schneider L., Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front. Cell. Inf. Microbiol.* 2012; 2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151.
9. Podladchikova O., Rykova V., Antonenka U., Rakin A. *Yersinia pestis* autoagglutination is mediated by Hcp-like protein and siderophore Yersiniachelin (Ych). *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:289–92. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_36.
10. Кузнецова Д.А., Подладчикова О.Н. Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli*. *Бактериология*. 2018; 3(1):36–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44.
11. Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Кузнецова Д.А. Рекомбинантная плазмида, экспрессирующая клонированные гены биосинтеза сидерофора иерсиниахелина возбудителя

чумы, способ ее получения и штамм *Y. pestis* – суперпродуцент иерсиниахелина. Патент на изобретение РФ № 2670949, опубл. 25.10.2018. Бюл. № 30.

12. Girard G. L'immunité dans l'infection pesteuse. Acquisitions apportées par 30 années de travaux sur la souche de *Pasteurella pestis* (Girard et Robic). *Biol. Med. (Paris)*. 1963; 52(6):631–731.

13. Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Морозова И.В. Способ выделения ингибитора секреции сидерофоров, синтезируемого *pgm*-штаммами *Y. pestis*, и выделенный ингибитор. Патент на изобретение РФ № 2549712, опубл. 27.04.2015. Бюл. № 12.

14. Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 1987; 160(1):47–56. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.

15. Motin V.L., Georgescu A.M., Fitch J.P., Gu P.P., Nelson D.O., Mabery S.L., Garnham J.B., Sokhansanj B.A., Ott L.L., Coleman M.A., Elliott J.M., Kegelmeyer L.M., Wyrobek A.J., Slezak T.R., Brubaker R.R., Garcia E. Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2004; 186(18):6298–305. DOI: 10.1128/JB.186.18.6298-6305.2004.

16. Chauvaux S., Rosso M.L., Frangeul L., Lacroix C., Labarre L., Schiavo A., Marceau M., Dillies M.A., Foulon J., Coppée J.Y., Médigue C., Simonet M., Carniel E. Transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in human plasma: an approach for discovering bacterial genes involved in septicemic plague. *Microbiology (Reading)*. 2007; 153(Pt. 9):3112–23. DOI: 10.1099/mic.0.2007/006213-0.

17. Lucier T.S., Fetherston J.D., Brubaker R.R., Perry R.D. Iron uptake and iron-repressible polypeptides in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1996; 64(8):3023–31. DOI: 10.1128/iai.64.8.3023-3031.1996.

18. Eisendle M., Schrettl M., Kragl C., Müller D., Illmer P., Haas H. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* 2006; 5(10):1596–603. DOI: 10.1128/EC.00057-06.

19. Peralta D.R., Adler C., Corbalán N.S., Paz García E.C., Pomares M.F., Vincent P.A. Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PLoS One*. 2016; 11(6):e0157799. DOI: 10.1371/journal.pone.0157799.

References

1. Kontoghiorghe G.J., Kontoghiorghe C.N. Iron and chelation in biochemistry and medicine: new approaches to controlling iron metabolism and treating related diseases. *Cells*. 2020; 19(6):1456. DOI: 10.3390/cells9061456.

2. Khasheii B., Mahmoodi P., Mohammadzadeh A. Siderophores: importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol. Res.* 2021; 250:126790. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126790.

3. Johnstone T.C., Nolan E.M. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans.* 2015; 44(14):6320–39. DOI: 10.1039/c4dt03559c.

4. Sia A.K., Allred B.E., Raymond K.N. Siderocalins: siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 2013; 17(2):150–7. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.11.014.

5. Holden V., Bachman M.A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*. 2015; 7(6):986–95. DOI: 10.1039/c4mt00333k.

6. Perry R.D., Fetherston J.D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2011; 13(10):808–17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008.

7. Forman S., Paulley J.T., Fetherston J.D., Cheng Y.Q., Perry R.D. *Yersinia* ironomics: comparison of iron transporters among *Yersinia pestis* biotypes and its nearest neighbor, *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biomol.* 2010; 23(2):275–94. DOI: 10.1007/s10534-009-9286-4.

8. Rakin A., Schneider L., Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front. Cell. Inf. Microbiol.* 2012; 2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151.

9. Podladchikova O., Rykova V., Antonenka U., Rakin A. *Yersinia pestis* autoagglutination is mediated by Hcp-like protein and siderophore Yersiniachelin (Ych). *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:289–92. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_36.

10. Kuznetsova D.A., Podladchikova O.N. [Cloning and expression of *Yersinia pestis* yersiniachelin siderophore biosynthesis genes in *Escherichia coli* cells]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2018; 3(1):36–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44.

11. Podladchikova O.N., Rykova V.A., Kuznetsova D.A. [Recombinant plasmid expressing cloned genes for biosynthesis of yersiniachelin siderophore of the plague pathogen, method for its production, and *Y. pestis* strain-superproducer of yersiniachelin]. RF Patent for an invention. 2018. No. 2670949, publ. October 25, 2018. Bull. No. 30.

12. Girard G. L'immunité dans l'infection pesteuse. Acquisitions apportées par 30 années de travaux sur la souche de *Pasteurella pestis* (Girard et Robic). *Biol. Med. (Paris)*. 1963; 52(6):631–731.

13. Podladchikova O.N., Rykova V.A., Morozova I.V. [A method for isolating an inhibitor of siderophore secretion synthesized by *pgm*-strains of *Y. pestis* and an isolated inhibitor]. RF Patent for an invention. No. 2549712, publ. April 27, 2015. Bull. No. 12.

14. Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 1987; 160(1):47–56. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.

15. Motin V.L., Georgescu A.M., Fitch J.P., Gu P.P., Nelson D.O., Mabery S.L., Garnham J.B., Sokhansanj B.A., Ott L.L., Coleman M.A., Elliott J.M., Kegelmeyer L.M., Wyrobek A.J., Slezak T.R., Brubaker R.R., Garcia E. Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2004; 186(18):6298–305. DOI: 10.1128/JB.186.18.6298-6305.2004.

16. Chauvaux S., Rosso M.L., Frangeul L., Lacroix C., Labarre L., Schiavo A., Marceau M., Dillies M.A., Foulon J., Coppée J.Y., Médigue C., Simonet M., Carniel E. Transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in human plasma: an approach for discovering bacterial genes involved in septicemic plague. *Microbiology (Reading)*. 2007; 153(Pt. 9):3112–23. DOI: 10.1099/mic.0.2007/006213-0.

17. Lucier T.S., Fetherston J.D., Brubaker R.R., Perry R.D. Iron uptake and iron-repressible polypeptides in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1996; 64(8):3023–31. DOI: 10.1128/iai.64.8.3023-3031.1996.

18. Eisendle M., Schrettl M., Kragl C., Müller D., Illmer P., Haas H. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* 2006; 5(10):1596–603. DOI: 10.1128/EC.00057-06.

19. Peralta D.R., Adler C., Corbalán N.S., Paz García E.C., Pomares M.F., Vincent P.A. Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PLoS One*. 2016; 11(6):e0157799. DOI: 10.1371/journal.pone.0157799.

Authors:

Kuznetsova D.A., Rykova V.A., Podladchikova O.N. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-82-89

УДК 616.98:579.842.23

М.А. Макашова, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Н.А. Шарапова, Е.А. Нарышкина, В.Г. Германчук,
Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев

Длительное сохранение *Yersinia pestis* в ассоциации с *Acanthamoeba castellanii* в эксперименте

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

Цель исследования – выявление возможности длительного выживания и сохранения свойств *Yersinia pestis* в ассоциации с почвенными амебами *Acanthamoeba castellanii*. **Материалы и методы.** Использовали штаммы возбудителя чумы и акантамеб, выделенные на одном участке Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Систематическую принадлежность простейших определяли путем анализа данных секвенирования фрагмента гена 18S рРНК с последующим выравниванием на последовательности амёб из базы данных NCBI GenBank. Получение флуоресцентного штамма *Y. pestis* осуществляли методом электропорации с использованием плазмиды pTurboGFP-B. Совместное культивирование проводили в солевом буфере в отсутствие питательных веществ для клеток возбудителя чумы. Определение влияния сокультивирования с простейшими на свойства штамма *Y. pestis* выполняли с помощью микробиологических, биологических и молекулярно-генетических методов. **Результаты и обсуждение.** Установлено сохранение жизнеспособности клеток штамма *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT в совместной культуре с клетками амёб в отсутствие дополнительных питательных веществ на протяжении 22 месяцев эксперимента. Сокультивирование с амёбами не привело к изменению культурально-морфологических, генетических и вирулентных свойств штамма возбудителя чумы. Полученные данные подтверждают возможность использования *Acanthamoeba castellanii* чумным микробом для персистенции в почвенных биоценозах и открывают перспективу изучения механизмов сохранения возбудителя чумы в течение длительных межэпизоотических периодов.

Ключевые слова: межэпизоотические периоды, чума, механизм сохранения, свободноживущие амёбы, *Yersinia pestis*, *Acanthamoeba*.

Корреспондирующий автор: Макашова Марина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Макашова М.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Шарапова Н.А., Нарышкина Е.А., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Длительное сохранение *Yersinia pestis* в ассоциации с *Acanthamoeba castellanii* в эксперименте. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:82–89. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-82-89

Поступила 15.12.2022. Принята к публ. 22.12.2022.

M.A. Makashova, E.G. Oglodin, L.M. Kukleva, N.A. Sharapova, E.A. Naryshkina,
V.G. Germanchuk, G.A. Eroshenko, V.V. Kuttyrev

Long-Term Persistence of *Yersinia pestis* in Association with *Acanthamoeba castellanii* in Experiment

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

Abstract. The aim of the study was to test the feasibility of long-term survival and preservation of the properties of *Yersinia pestis* in association with soil amoeba *Acanthamoeba castellanii*. **Materials and methods.** *Y. pestis* strains and acanthamoeba isolated in the common area of the Gorno-Altai high-mountain plague focus were used for the study. The systematic affiliation of protozoa was determined through analyzing the 18S rRNA gene fragment sequencing data, followed by alignment with amoeba sequences from the NCBI GenBank database. A fluorescent *Y. pestis* strain was obtained by electroporation using the pTurboGFP-B plasmid. Co-cultivation was carried out in saline buffer in the absence of nutrients for the cells of plague pathogen. The influence of co-culturing with protozoa on *Y. pestis* properties was determined using microbiological, biological, and molecular-genetic methods. **Results and discussion.** The cell viability preservation for 22 months of the experiment in *Y. pestis* strain belonging to the main subspecies of the antique biovar, the 4.ANT phylogenetic line in co-culture with amoeba cells in the absence of additional nutrients has been established. Co-cultivation with amoebae did not lead to a change in the cultural, morphological, genetic and virulent properties of the plague pathogen strain. The data obtained confirm the possibility of using *Acanthamoeba castellanii* by the plague microbe to persist in soil biocenoses and open up the prospect of studying the mechanisms of plague pathogen surviving during extended inter-epizootic periods.

Key words: inter-epizootic periods, plague, mechanism of persistence, free-living amoeba, *Yersinia pestis*, *Acanthamoeba*.

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

Corresponding author: Marina A. Makashova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Makashova M.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Naryshkina E.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. Long-Term Persistence of *Yersinia pestis* in Association with *Acanthamoeba castellanii* in Experiment. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 4:82–89. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-82-89

Received 15.12.2022. Accepted 22.12.2022.

Makashova M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7713-7959>
Oglodin E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>
Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>
Sharapova N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>

Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>
Germanchuk V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8986-3640>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Одним из наиболее актуальных вопросов в экологии *Yersinia pestis* является выяснение возможных механизмов сохранения возбудителя в почвенных биоценозах природных очагов чумы. Известно, что ряд патогенных бактерий (*Legionella pneumophila* [1, 2], *Mycobacterium marinum* [3], *Vibrio cholerae* [4], *Francisella tularensis* [5]) используют образование вне- и внутриклеточных ассоциаций с водными и почвенными простейшими в качестве стратегии выживания в окружающей среде. Подобные ассоциации являются экологической нишей, в которой многие бактериальные и грибковые патогены не только избегают стрессорного воздействия окружающей среды, но и размножаются с последующим выходом во внешнюю среду [6]. Согласно литературным данным, возбудитель чумы способен сохраняться в клетках *Hartmannella rhysodes* [7], инфузорий *Tetrahymena pyriformis* [8, 9], *Dictyostelium discoideum* [10], *Acanthamoeba castellanii* [11–13] от 2 дней до 14 месяцев.

Выживание *Y. pestis* напрямую зависит от условий сокультивирования (температура, влажность, среда культивирования, соотношение концентраций амёб и бактериальных клеток). Эксперименты по изучению взаимодействия амёб и штаммов возбудителя чумы проводились в почве [9], жидкой среде, содержащей органические вещества [8, 13], в отсутствие влаги для имитации засушливых условий [11]. Однако для того, чтобы выяснить закономерности взаимодействия и установить возможность длительного сохранения *Y. pestis* в клетках амёб, необходимо создать условия, при которых единственной стратегией выживания будет использование ресурсов простейших. Так, сокультивирование в солевом растворе без питательных веществ, с одной стороны, будет интенсифицировать процесс фагоцитоза бактериальных клеток амёбами, а с другой стороны – инициировать использование *Y. pestis* питательных ресурсов амёб.

В большинстве проведенных исследований были использованы музейные штаммы *Y. pestis*. Однако для более точного моделирования необходимо использование организмов, являющихся членами одного биоценоза. Существование организмов на протяжении длительного времени на одной территории приводит к формированию устойчивого сообщества [14]. Удобной моделью для рассмотрения этих взаимоотношений являются штаммы *Y. pestis* и амёб, выделенные на территории активного в настоящее время Горно-Алтайского высокогорного очага и адаптированные к одному природному биоценозу.

При изучении численности простейших из почв природных очагов чумы Прикаспия и Горного Алтая установлено, что в 1 г почвы может находиться до 300 тыс. клеток простейших [13, 15]. Одним из доминирующих представителей простейших являются цистообразующие амёбы рода *Acanthamoeba*.

Высокая численность акантамёб в почвах в совокупности с широким распространением в разных очагах чумы свидетельствует о том, что они могут рассматриваться в качестве природных резервуаров *Y. pestis*. В эксперименте по совместному культивированию возбудителя чумы основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT и *A. castellanii*, выделенных на одной территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, в жидкой питательной среде LB в течение 14 дней описана динамика изменения концентраций клеток *Y. pestis* и амёб в исследуемой среде, свидетельствующая о наличии взаимодействий между этими организмами [13]. В то же время значительный интерес представляет исследование длительного взаимодействия *Y. pestis* и амёб *A. castellanii* для установления механизмов персистенции возбудителя во время длительных межэпизоотических периодов в очагах.

Немаловажным также является изучение влияния акантамёб на свойства клеток *Y. pestis* при их длительном сосуществовании. Имеются данные о повышении вирулентности иерсиний при пассировании через инфузории, аналогичном пассированию на перитонеальных макрофагах морских свинок и белых мышей [16]. Поэтому актуальным вопросом является изучение свойств штаммов возбудителя чумы после длительного совместного культивирования с амёбами.

Цель исследования заключалась в моделировании длительного выживания *Y. pestis* в ассоциации с почвенными амёбами *A. castellanii* и изучении его влияния на свойства и вирулентность этого патогена.

Материалы и методы

Штаммы *Y. pestis*, условия культивирования, биохимический анализ, оценка вирулентности. Для изучения взаимоотношений возбудителя чумы с акантамёбами в работе использовали флуоресцентный штамм *Y. pestis* KM2083, полученный в результате трансформации природного штамма *Y. pestis* 216 античного биовара основного подвида, выделенного в 2017 г. от серого сурка *Marmota baibacina* на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы (координаты N 49.63350°, E 89.05306°). Трансформацию клеток осуществляли методом электропорации плазмидой pTurboGFP-B (ЗАО «Евроген», Россия), кодирующей гены зеленого флуоресцентного белка TurboGFP и β-лактамазы, обеспечивающей устойчивость к ампициллину [17]. Рекомбинантный штамм выращивали на твердой среде LB (pH 7,2) с добавлением 50 ед/мл ампициллина при 28 °C в течение 24 и 48 ч. Сравнение культуральных, биохимических свойств, чувствительности к диагностическим бактериофагам штаммов осуществляли по стандартным методикам [18].

Вирулентность оценивали заражением беспородных белых мышей подкожно в дозах $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Биомодели содержали в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. После вскрытия павших животных фрагменты органов засеивали на плотную среду LB и изготавливали мазки-отпечатки. Мазки органов грызунов просматривали в микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), часть из которых окрашивали по Граму, а другую часть фиксировали в 96° спирте в течение 30 мин и просматривали в образцах при длине волны 470 нм.

Культивирование амёб. Культура амёб выделена из почвы норы серого сурка в непосредственной близости от места выделения штамма *Y. pestis* 216 из точки с координатами N 49.36537°, E 89.05073°. Выделение культуры амёб проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [13]. Аксеническую культуру амёб выращивали в среде PYG (пептон – 20 г, дрожжевой экстракт – 2 г, глюкоза – 18 г, цитрат натрия – 1 г, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,98 г, $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$ – 0,355 г, KH_2PO_4 – 0,34 г, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$ – 0,02 г, вода – до 1000 мл) при 22 °C до концентрации $1 \cdot 10^6$ кл./мл. Культуру амёб отмывали от питательной среды трехкратным центрифугированием при 4 тыс. об/мин в течение 15 мин в 30 мл солевого буфера АВ (цитрат натрия – 1 г, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,98 г, $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$ – 0,355 г, KH_2PO_4 – 0,34 г, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$ – 0,02 г, вода – до 1000 мл). Концентрацию клеток определяли, используя счетную камеру Горяева.

Совместное культивирование возбудителя чумы и амёб. Совместное культивирование проводили в солевом буфере АВ с добавлением 50 ед/мл ампициллина. Концентрация амёб в образцах была равна $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл. Микробная нагрузка в первом образце составляла 1 КОЕ/клетка амёбы (концентрация *Y. pestis* KM2083 – $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл), во втором – 0,1 КОЕ/клетка амёбы ($1 \cdot 10^2$ КОЕ/мл). В качестве контрольного образца использован тот же рекомбинантный штамм *Y. pestis* KM2083 в концентрации $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл, но в отсутствие клеток амёб. Культивирование проводилось в климатической камере KBF 115 (Binder, Германия) при температуре 22 °C и влажности 60 %. Определение количества КОЕ в образцах совместных культур проводили путем нанесения на твердую питательную среду LB 100 мкл образца, культивирования при 28 °C в течение 48 часов и подсчета выросших колоний. Высевы проводили ежедневно на протяжении двух недель, затем раз в неделю, и через месяц со дня начала эксперимента высевы проводили 1 раз в месяц.

Определение систематической принадлежности простейших. Выделение ДНК из амёб осуществляли коммерческим набором «ДНК-сорб-Д» («АмплиСенс», Россия). Для определения видовой принадлежности амёб анализировали участок гена 18S рРНК, полученный методом полимеразной цеп-

ной реакции (ПЦР) с праймерами JDP1/JDP2 [19]. Амплификацию фрагментов проводили в приборе Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) с набором реагентов «БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×)» (ООО «Биолабмикс», Россия). Секвенирование продуктов ПЦР выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xL (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали алгоритмом BLAST на нуклеотидные последовательности простейших из базы данных NCBI GenBank. Изолят считали идентифицированным при проценте гомологии более 99 %.

Выявление нуклеотидных замен в геномных последовательностях *Y. pestis*. Выделение ДНК возбудителя чумы выполняли набором реагентов PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на платформе Ion Torrent (Life Technologies, США). Обработку полученных данных проводили в Ion Torrent Suite software package 5.12, Newbler gsAssembler 2.6. Поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP – single nucleotide polymorphism) осуществляли программой Wombac 2.0 (<https://github.com/tseemann/wombac>).

Результаты и обсуждение

Штаммы возбудителя чумы и амёб. Для моделирования природных условий взаимодействия *Y. pestis* с акантамебами в эксперимент взяты культура амёб и штамм возбудителя чумы, выделенные на одном участке Горно-Алтайского очага. Для проведения эксперимента использовали рекомбинантный флуоресцентный штамм *Y. pestis* KM2083, полученный из природного штамма *Y. pestis* 216 основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT. Трансформирование клеток возбудителя чумы плазмидой pTurboGFP-B не привело к изменению его культурально-морфологических, биохимических свойств, чувствительности к бактериофагам, вирулентности для белых мышей.

Из пробы почвы, взятой на эпизоотическом участке рядом с местом выделения штамма *Y. pestis* 216, получены простейшие, которые по морфологическим характеристикам отнесены к роду *Acanthamoeba*. Для установления систематической принадлежности амёб методом ПЦР с использованием праймеров JDP1/JDP2 на ген 18S рРНК получены фрагменты ДНК размером 450 п.н. При анализе данных капиллярного секвенирования получена нуклеотидная последовательность, при сравнении которой с имеющимися в NCBI GenBank последовательностями при 100 % покрытии и 100 % гомологии установлена принадлежность исследуемых простейших к виду *A. castellanii*. Следует отметить, что выявленное широкое распространение *A. castellanii* в очагах чумы Прикаспия [15] и Горного Алтая [13] свидетельствует о распространенности представителей этого вида в почве природно-очаговых территорий.

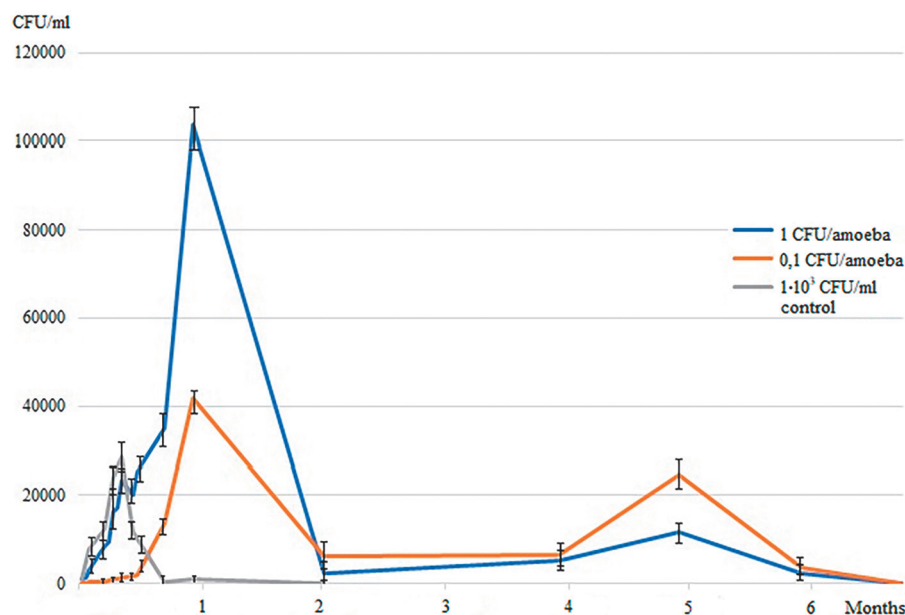


Рис. 1. Динамика изменения концентрации *Y. pestis* KM2083 при совместном культивировании с *A. castellanii* в экспериментальных и контрольном образцах на протяжении 7 месяцев. Планки погрешностей представляют собой доверительный интервал результатов трех измерений при уровне значимости $\alpha=0,05$

Fig. 1. Dynamics of changes in the concentration of *Y. pestis* KM2083 during co-cultivation with *A. castellanii* in experimental and control samples over 7 month period. Error bars represent the confidence interval of the results of three measurements at a significance level of $\alpha=0.05$

В сочетании с данными по сохранению *Y. pestis* в цистах амёб [7, 12] это может указывать на возможную роль этих простейших в персистенции возбудителя чумы в почвенных биоценозах.

Моделирование длительного сохранения *Y. pestis* в жидкой сокультуре с амёбами. Совместное культивирование проводили в жидкой среде в условиях отсутствия питательных для *Y. pestis* веществ при температуре и влажности, имитирующих природные условия. В экспериментальных образцах культуры возбудителя чумы и амёб объединяли в пробирках с буфером АВ с добавлением ампициллина в соотношениях 1 КОЕ и 0,1 КОЕ на 1 амёбу. В качестве контрольного образца использовали тот же рекомбинантный штамм *Y. pestis* KM2083 в концентрации $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл в отсутствие клеток амёб. Образцы инкубировали при температуре 22 °C и влажности 60 % и высевали через определенные промежутки времени на чашки Петри со средой LB для определения количества КОЕ в образце. Результаты изменения концентраций возбудителя чумы при совместном культивировании с акантамебами на протяжении 7 месяцев представлены на рис. 1. Для определения диапазона значений, который может содержать среднее значение с уровнем достоверности 95 %, рассчитывали доверительные интервалы для каждого экспериментального измерения.

При совместном культивировании *Y. pestis* с *A. castellanii* установлен значительно более длительный срок сохранения живых клеток возбудителя чумы в экспериментальных образцах по сравнению с контрольным, в котором клетки амёб отсутствовали. В первом образце (концентрация – 1 КОЕ/клетка амёбы) наличие бактерий фиксировали на протяжении 7 месяцев, в образце с более низкой исходной концентрацией клеток *Y. pestis* (0,1 КОЕ/клетка амёбы) присутствие бактерий наблюдали на протяжении всего срока эксперимента (22 месяца), что подтверждается результатами микроскопии (рис. 2),

в то время как в контрольном образце бактериальные клетки обнаруживали в течение 2 месяцев.

О взаимодействии культур амёб и *Y. pestis* в экспериментальных образцах говорят также факты повышения концентрации клеток возбудителя чумы в отсутствие питательных веществ. Через месяц, а затем и через 5 месяцев от начала эксперимента в обоих образцах зафиксировано двух-трехкратное (от 2,3 до 3,75 раза) увеличение концентрации клеток *Y. pestis* по сравнению с предыдущими значениями. Подъемы численности, вероятно, вызваны размножением клеток *Y. pestis* в амёбах с последующим выходом в среду, в то время как падения концентраций могут быть обусловлены поглощением бактериальных клеток амёбами или отмиранием клеток в среде без питательных веществ. Из-за чередования циклов размножения и отмирания клеток динамика изменения концентрации *Y. pestis* носила волнообразный характер. В контрольном образце на 10-е сутки концентрация возбудителя чумы достигла

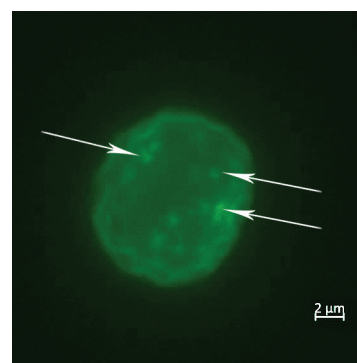


Рис. 2. Клетки штамма *Y. pestis* KM2083 в цисте *A. castellanii* после 22 месяцев сокультивирования (отмечены стрелками). Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Длина волны эмиссии – 502 нм, увеличение – 1500х

Fig. 2. *Y. pestis* KM2083 cells in an *A. castellanii* cyst after 22 months of co-culturing (marked with arrows). Microscope Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Germany). Emission wavelength – 502 nm, magnification – 1500x

максимума и затем в течение двух месяцев упала до нуля. Возможной причиной размножения *Y. pestis* в первые сутки были накопленные в клетках питательные вещества.

Также обращает на себя внимание разница динамики изменения концентрации *Y. pestis* в экспериментальных образцах с разными соотношениями клеток амёб и возбудителя чумы в первый месяц эксперимента. У первого образца (1 КОЕ/клетка амёбы) на протяжении первых 12 дней эксперимента динамика численности была аналогичной контрольному образцу, однако вместо падения концентрации (как в контрольном образце) у экспериментального образца рост концентрации продолжился и через месяц от начала эксперимента концентрация клеток возбудителя чумы достигла максимального значения. Второму образцу с меньшей микробной нагрузкой по отношению к амёбам потребовалось больше времени, чтобы увеличить концентрацию. Возможно, благодаря этому клетки *Y. pestis* лучше адаптировались к экспериментальной среде и высевались на протяжении 22 месяцев.

Взаимодействие амёб и возбудителя чумы на плотной питательной среде. По прошествии 24 ч совместного культивирования *Y. pestis* с культурой амёб в солевом буфере АВ 100 мкл образца (0,1 КОЕ/клетка амёбы) наносили на чашку Петри с агаром LB, содержащим ампициллин, в трех повторностях и инкубировали в климатической камере при 22 °C и 60 % влажности воздуха. На 2, 4, 16 и 21-й день чашки Петри с посевами просматривали под микроскопом. Результаты микроскопического исследования представлены на рис. 3. На 2-й день все амёбы находились в активной форме (трофозоиты), большинство из них располагались вблизи микробных колоний, что свидетельствует о положительном таксисе амёбных клеток к *Y. pestis*. При флуоресцентной микроскопии установлено, что трофозоиты

наполнены клетками *Y. pestis*. Наблюдение на 4-й и 16-й день после посева на твердую питательную среду показало, что часть клеток амёб переходит в неактивное состояние (цисты), покрываясь двуслойной оболочкой, внутри трофозоитов также наблюдались скопления фагоцитированных клеток возбудителя чумы. При изучении взаимоотношений возбудителя чумы и амёб инцистирование амёб *H. rhyssodes* [7] происходит уже через 2–3 суток, в то время как образование цист *A. castellanii* происходит на 3–4-е сутки [13], что соотносится с полученными данными. При сравнении фотографий 3 и 7 (рис. 3), выполненных на одном участке агара в видимом спектре света и с применением фильтра для специфической детекции, видно, что флуоресцентные клетки бактерий присутствуют не только в клетках трофозоитов, но и в цистах амёб. На 21-й день наблюдения все клетки акантамёб представлены инцистированными формами, собранными в группы. При микроскопии в зеленом спектре можно наблюдать флуоресценцию оболочек цист. Также зафиксировано образование вторичных колоний возбудителя чумы, что может свидетельствовать о разрушении амёбных клеток и выходе *Y. pestis* на поверхность агара.

Таким образом, при микроскопическом наблюдении за культурами *Y. pestis* и *A. castellanii* на плотной питательной среде выявлены общие закономерности взаимоотношений возбудителя чумы в ассоциации с простейшими в виде положительного таксиса, способствующего эффективному фагоцитозу клеток возбудителя чумы, и временных промежутков инцистирования амёб.

Изучение свойств *Y. pestis* после сокультивирования с амёбами. Признано, что хищничество простейших является ключевой движущей силой эволюции и экологии многих микробных патогенов [6, 20]. Поедание бактерий простейшими оказывает селективное давление, стимулируя вирулентность

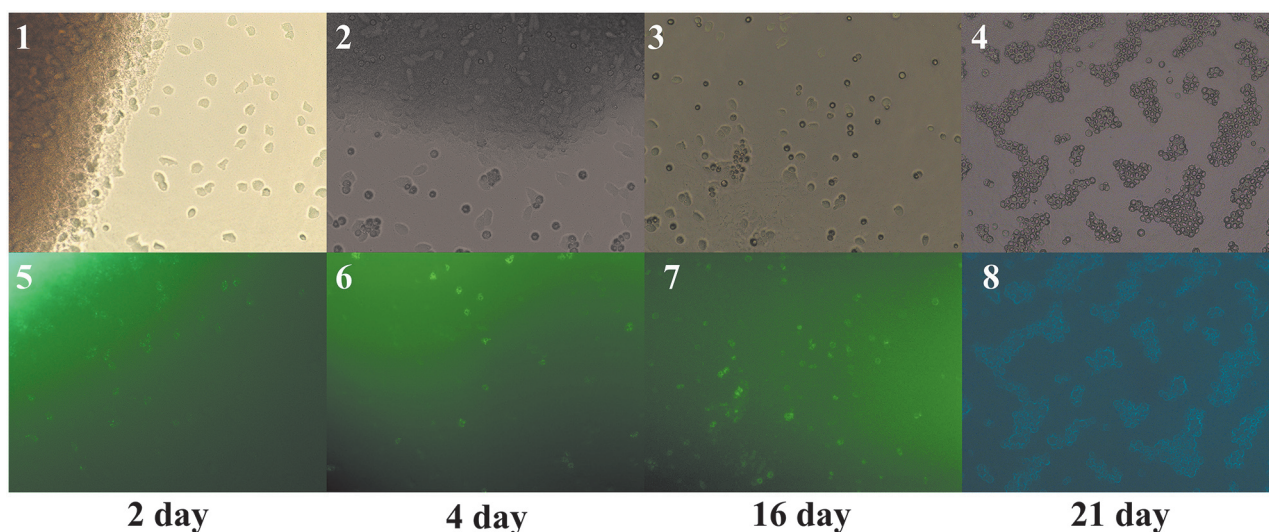


Рис. 3. Изучение взаимодействия клеток амёб и штамма *Y. pestis* KM2083 методами световой (1–4) и флуоресцентной (5–8) микроскопии. Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Длина волны эмиссии – 502 нм, увеличение – 100х

Fig. 3. Study of the interaction between amoeba cells and *Y. pestis* strain KM2083 using light (1–4) and fluorescence (5–8) microscopy. Microscope Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Germany). Emission wavelength – 502 nm, magnification – 100x

бактерий и формируя их геномы. Примечательно, что многие патогены становятся более вирулентными после прохождения через простейших [16, 21]. Для изучения длительного влияния амёб *A. castellanii* на клетки возбудителя чумы проведено сравнение свойств флуоресцентного штамма *Y. pestis* KM2083 pTurboGFP-B до и после 22 месяцев совместного культивирования с акантамебами в замкнутой системе в отсутствие в среде питательных веществ, необходимых для роста и размножения возбудителя.

Высеянные на твердую питательную среду LB после сокультивирования с амёбами изолированные колонии имели типичную R-форму с небольшой кружевной зоной по периферии. Бактериальные клетки в мазках имели форму биполярно-окрашенных грам-отрицательных палочек. Способность к продукции флуоресцентного белка сохранилась в 9 % колоний. Появление колоний, состоящих из клеток, утративших рекомбинантную плазмиду или неэкспрессирующих флуоресцентный белок, по-видимому, связано с деградацией в среде антибиотика ампициллина, оказывающего селективное давление на рост колоний, содержащих плазмиду pTurboGFP-B. В дальнейших экспериментах проводили сравнение исходного штамма с его производными, как сохранившимися, так и утратившими плазмиду pTurboGFP-B.

При сравнении биохимических свойств исходной, флуоресцентных и утративших это свойство производных культур *Y. pestis* KM2083 отличий не выявлено. Штаммы ферментировали глюкозу, арабинозу, маннозу, орто-нитрофенил-β-галактозидарабинозу, глицерин, восстанавливали нитраты в нитриты, не разлагали рамнозу, мелибиозу, лактозу, сахарозу, сорбит, инозит, мочевины. При проверке питательных потребностей зависимость роста культур – производных *Y. pestis* KM2083 от аминокислот метионина, фенилаланина и треонина не изменилась.

Сравнение вирулентности исходной и полученных культур штамма *Y. pestis* KM2083 методами *in vitro* позволило выявить зависимость роста от наличия в питательной среде ионов Ca^{2+} при 37 °C и способность сорбировать пигмент из среды, содержащей краситель Конго красный. Это свидетельствует о сохранении у прошедших сокультивирование с амёбами культур *Y. pestis* основных детерминант вирулентности: плазмиды кальций-зависимости и хромосомной *pgm*-области пигментации.

Оценку вирулентности исходного штамма *Y. pestis* KM2083 pTurboGFP-B и его производных после совместного культивирования с амёбами проводили методом *in vivo* – при подкожном заражении беспородных белых мышей. Для заражения использовали исходный штамм *Y. pestis* KM2083 TurboGFP-B и его производные (после сокультивирования), экспрессирующие и не экспрессирующие флуоресцентный белок TurboGFP. В результате установлено, что все варианты вызывали гибель животных в дозах $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл и $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. При микроскопическом исследовании мазков-отпечатков легких, пече-

ни, селезенки и крови павших животных выявлены клетки возбудителя чумы.

Определение влияния длительного совместного культивирования с амёбами на сохранение родоспецифичной (pCad) и видоспецифичных (pFra, pPst) плазмид в составе генома возбудителя чумы выполнено методом ПЦР со специфичными праймерами к плаздам возбудителя чумы (с использованием тест-системы «Ген *Y. pestis* идентификация – РГФ», регистрационное удостоверение ФСР 2011/12105). Из 111 исследованных колоний из экспериментальных образцов у одной колонии выявлено отсутствие плазмиды pPst (0,9 % от исследованных колоний). Выявленный факт утраты плазмиды может быть связан с жесткими условиями, в которых находился возбудитель чумы в течение эксперимента. Кроме указанных плазмид, в геноме возбудителя чумы филогенетической линии 4.ANT присутствует плазида pTP33, присутствие которой в составе всех исследованных культур подтверждалось методом C.I. Kado *et al.* [22]. В совокупности с низким процентом утраты плазмиды pPst можно сделать вывод, что длительное сокультивирование с акантамебами не влияет на плазмидный состав штамма *Y. pestis*, что может указывать на значение плазмид для сохранения возбудителя чумы в ассоциации с амёбами.

Для выявления влияния эксперимента на генетический аппарат проведено полногеномное секвенирование двух производных штамма *Y. pestis* KM2083 (экспрессирующий и не экспрессирующий флуоресцентный белок) после сокультивирования с амёбами. При сравнении последовательностей с исходным штаммом выявлены 4 общие SNPs для обоих производных, две из которых привели к замене аминокислоты в продуктах генов (таблица). В геноме производного, утратившего свойство флуоресценции, дополнительно выявлено 5 SNP, две из которых являются несинонимичными, в то время как одна из них приводит к формированию стоп-кодона в продукте гена, а две находятся в межгенном пространстве. Следует сказать, что выявленные нуклеотидные замены не влияют на основные свойства *Y. pestis*.

Таким образом, в результате моделирования условий, при которых единственным способом для выживания клеток возбудителя чумы было использование ресурсов амёб, установлено длительное сохранение штамма *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT в ассоциации с *A. castellanii* до 22 месяцев, что существенно превышает срок выживания чистой культуры в отсутствие акантамеб. Кроме сохранения в цистах простейших для переживания неблагоприятных условий среды, возбудитель чумы может использовать клетки амёб для размножения с последующим высвобождением в окружающую среду, как это произошло на 1-й и 5-й месяцы эксперимента в виде «пиковых» значений концентраций *Y. pestis*. Длительное сохранение возбудителя чумы также может быть связано с адаптацией использованных в эксперименте организмов

Полиморфизм SNPs у производных штамма *Y. pestis* KM2083 pTurboGFP-B после длительного сокультивирования с *A. castellanii*
 SNP polymorphism in derivatives of *Y. pestis* strain KM2083 pTurboGFP-B after long-term co-cultivation with *A. castellanii*

Вариант штамма Strain variant	Координаты SNP* SNP position*	Замена нуклеотида Nucleotide substitution	Ген Gene	Кодируемый продукт Encoded product	Замена аминокислоты Amino acid substitution
1, 2**	2050377	C→A	YPO_RS10010	Белок Р-кольца базального тельца жгутика Flagellar basal body P-ring protein FlgI	Arg→Ser
1, 2	2124310	G→T	YPO_RS10405	Белок, содержащий домен рецептора toll/интерлейкина-1 Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein	Lys→Asn
1, 2	1686038	G→C	<i>tssF</i>	Субъединица базовой пластинки системы секреции VI типа TssF Type VI secretion system baseplate subunit TssF	–
1, 2	2125597	A→G	intergenic	–	–
2	2187586	A→T	YPO_RS10640	Белок, содержащий карбоксипептидазоподобный регуляторный домен Carboxypeptidase-like regulatory domain-containing protein	Tyr→Phe
2	3144064	T→A	YPO_RS15035	Фосфатаза PAP2 / белок семейства фосфатаз двойной специфичности Phosphatase PAP2 / dual specificity phosphatase family protein	Ile→Lys
2	684581	C→A	YPO_RS04100	Пиридоксальфосфат-зависимая аминотрансфераза Pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	Ser→стоп-кодон Ser→stop-codon
2	1094928-1094929	AT→TA	intergenic	–	–
2	4626509-4626510	AT→TA	intergenic	–	–

Примечание: *позиция указана по референсному геному *Y. pestis* CO92 (ID NCBI GenBank: NC_003143.1); **цифрой 1 отмечен производный *Y. pestis* KM2083, экспрессирующий флуоресцентный белок, цифрой 2 – производный *Y. pestis* KM2083, не экспрессирующий флуоресцентный белок.

Note: *position across the reference genome of *Y. pestis* CO92 (NCBI GenBank ID: NC_003143.1); **number 1 indicates the *Y. pestis* KM2083 derivative expressing the fluorescent protein, number 2 indicates the *Y. pestis* KM2083 derivative not expressing the fluorescent protein.

к сходным ландшафтно-климатическим условиям. Установлено, что длительное сокультивирование не привело к значительному изменению фенотипических, генетических и вирулентных свойств штамма возбудителя чумы. Сохранение патогенности штамма имеет решающее значение для последующего развития эпизоотии в природном очаге чумы. Все это в совокупности подтверждает возможность длительного сохранения *Y. pestis* в ассоциации с акантамебами в течение длительных межэпизоотических периодов и позволяет рассматривать *A. castellanii* в качестве природного резервуара возбудителя чумы. Дальнейшее накопление экспериментальных данных результатов совместного культивирования штаммов возбудителя чумы разных подвидов с различными представителями простейших при отличающихся условиях культивирования (температура, влажность, наличие питательных веществ) будет способствовать систематизации знаний и лучшему пониманию механизмов взаимодействия чумного микроба с членами почвенных биоценозов природных очагов чумы.

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

Список литературы

1. Al-Quadan T., Price C.T., Abu Kwaik Y. Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol.* 2012; 20(6):299–306. DOI: 10.1016/j.tim.2012.03.005.
2. Cirillo J.D., Falkow S., Tompkins L.S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion.

Infect. Immun. 1994; 62(8):3254–61. DOI: 10.1128/iai.62.8.3254-3261.1994.

3. Kennedy G.M., Morisaki J.H., DiGiuseppe P.A. Conserved mechanisms of *Mycobacterium marinum* pathogenesis within the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(6):2049–52. DOI: 10.1128/AEM.06965-11.

4. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.

5. El-Etr S.H., Margolis J.J., Monack D., Robison R.A., Cohen M., Moore E., Rasley A. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(23):7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.

6. Sun S., Noorian P., McDougald D. Dual role of mechanisms involved in resistance to predation by protozoa and virulence to humans. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1017. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01017.

7. Никульшин С.В., Онацкая Т.Г., Луканина Л.М., Бондаренко А.И. Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhysodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 1992; 9-10:2–5.

8. Пушкарева В.И. Экспериментальная оценка взаимодействия *Yersinia pestis* EV с почвенными инфузориями и возможности длительного сохранения бактерий в цистах простейших. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2003; 4:40–4.

9. Бренева Н.В., Марамович А.С., Климов В.Т. Экологические закономерности существования патогенных иерсиний в почвенных экосистемах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2005; 6:82–8.

10. Markman D.W., Antolin M.F., Bowen R.A., Wheat W.H., Woods M., Gonzalez-Juarrero M., Jackson M. *Yersinia pestis* survival and replication in potential amoeba reservoir. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(2):294–302. DOI: 10.3201/eid2402.171065.

11. Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Широков А.А., Буров А.М., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Оценка длительности сохранения штаммов *Yersinia pestis* в клетках почвенных амёб *Acanthamoeba* sp. в экспериментальных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 2:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.

12. Benavides-Montaño J.A., Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* re-sists predation by *Acanthamoeba castellanii* and exhibits prolonged intracellular survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(13):e00593-17. DOI: 10.1128/AEM.00593-17.
13. Оглодин Е.Г., Морозов О.А., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Шарапова Н.А., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Санаров П.П., Токмакова Е.Г., Макашова М.А., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Видовая принадлежность, численность и динамика взаимодействия акантамеб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы со штаммами *Yersinia pestis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 4:56–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-56-61.
14. Работнов Т.А. Об организации биогеоценоза. В кн.: Герасимов И.П., редактор. *Международная география-76 / XXIII Междунар. геогр. конгресс. Секция 4: Биогеография и география почв*. М.: 1976. С. 101–4.
15. Кошель Е.И., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Видяева Н.А., Гусева Н.П., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Определение систематической принадлежности почвенных амёб из очагов чумы Прикаспия на основе анализа участков рибосомного оперона. *Генетика*. 2015; 51(1):39–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.
16. Литвин В.Ю., Пушкарёва В.И. О вероятном механизме поддержания вирулентности бактерий в почвенных и водных сообществах. В кн.: Литвин В.Ю., редактор. *Патогенные бактерии в сообществах (механизмы и формы существования): сб. науч. тр. М.: Росагросервис; 1994. С. 24–34.*
17. Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглодин Е.Г., Девдариани З.Л., Морозов О.А., Кузнецов О.С., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А. Получение штамма *Yersinia pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и перспективы его использования. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:61–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66.
18. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. *Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.: Шико; 2013. 560 с.
19. Schroeder J.M., Botton G.C., Hay J., Niszl I.A., Seal D.V., Markus M.B., Fuerst P.A., Byers T.J. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):1903–11. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.
20. Casadevall A., Fu M.S., Guimaraes A.J., Albuquerque P. The 'amoeboid predator-fungal animal virulence' hypothesis. *J. Fungi (Basel)*. 2019; 5(1):10. DOI: 10.3390/jof5010010.
21. Espinoza-Vergara G., Noorian P., Silva-Valenzuela C.A., Raymond B.B.A., Allen C., Hoque M.M., Sun S., Johnson M.S., Pernice M., Kjelleberg S., Djordjevic S.P., Labbate M., Camilli A., McDougald D. *Vibrio cholerae* residing in food vacuoles expelled by protozoa are more infectious *in vivo*. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(12):2466–74. DOI: 10.1038/s41564-019-0563-x.
22. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73. DOI: 10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981.
8. Pushkareva V.I. [Experimental assessment of the interaction between *Yersinia pestis* EV and soil ciliates and the possibility of long-term preservation of bacteria in protozoan cysts]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2003; (4):40–44.
9. Breneva N.V., Maramovich A.S., Klimov V.T. [Ecological patterns of existence of pathogenic *Yersinia* in soil ecosystems]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2005; (6):82–8.
10. Markman D.W., Antolin M.F., Bowen R.A., Wheat W.H., Woods M., Gonzalez-Juarrero M., Jackson M. *Yersinia pestis* survival and replication in potential amoeba reservoir. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(2):294–302. DOI: 10.3201/eid2402.171065.
11. Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Shirokov A.A., Burov A.M., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. [Exploratory study of the long-term persistence of *Yersinia pestis* in the cells of soil-inhabiting amoeba – *Acanthamoeba* sp.] *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (2):69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.
12. Benavides-Montaño J.A., Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* re-sists predation by *Acanthamoeba castellanii* and exhibits prolonged intracellular survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(13):e00593-17. DOI: 10.1128/AEM.00593-17.
13. Oglodin E.G., Morozov O.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.K., Denisov A.V., Sanarov P.P., Tokmakova E.G., Makashova M.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Specific appearance, numbers, and dynamics of interaction of *Acanthamoeba* from soils of Gorno-Altai high-mountain plague focus with *Yersinia pestis* strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (4):56–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-56-61.
14. Rabotnov T.A. [Regarding the functioning of biogeocenosis]. In: Gerasimov I.P., editor. [International Geography-76 / XXIII International Geographical Congress. Section 4: Biogeography and Soil Geography]. Moscow; 1976. P. 101–4.
15. Koshel' E.I., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Vidyayeva N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [A study on the taxonomy of soil amoebas from Caspian plague foci based on the analysis of ribosomal operon sequences]. *Genetika [Genetics]*. 2015; 51(1):39–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.
16. Litvin V.Yu., Pushkareva V.I. [On a probable mechanism for retaining the virulence by bacteria of soil and water communities]. In: Litvin V.Yu., editor. [Pathogenic Bacteria in Communities (Mechanisms and Forms of Existence): Collection of Scientific Works]. Moscow: "Rosagroservis"; 1994. P. 24–34.
17. Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglodin E.G., Devdariani Z.L., Morozov O.A., Kuznetsov O.S., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A. [Construction of *Yersinia pestis* strain producing fluorescent protein GFP and prospects of its usage]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (4):61–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66.
18. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: Shiko; 2013. 560 p.
19. Schroeder J.M., Botton G.C., Hay J., Niszl I.A., Seal D.V., Markus M.B., Fuerst P.A., Byers T.J. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):1903–11. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.
20. Casadevall A., Fu M.S., Guimaraes A.J., Albuquerque P. The 'amoeboid predator-fungal animal virulence' hypothesis. *J. Fungi (Basel)*. 2019; 5(1):10. DOI: 10.3390/jof5010010.
21. Espinoza-Vergara G., Noorian P., Silva-Valenzuela C.A., Raymond B.B.A., Allen C., Hoque M.M., Sun S., Johnson M.S., Pernice M., Kjelleberg S., Djordjevic S.P., Labbate M., Camilli A., McDougald D. *Vibrio cholerae* residing in food vacuoles expelled by protozoa are more infectious *in vivo*. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(12):2466–74. DOI: 10.1038/s41564-019-0563-x.
22. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73. DOI: 10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981.

References

1. Al-Quadani T., Price C.T., Abu Kwaik Y. Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol.* 2012; 20(6):299–306. DOI: 10.1016/j.tim.2012.03.005.
2. Cirillo J.D., Falkow S., Tompkins L.S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* 1994; 62(8):3254–61. DOI: 10.1128/iai.62.8.3254-3261.1994.
3. Kennedy G.M., Morisaki J.H., DiGiuseppe Champion P.A. Conserved mechanisms of *Mycobacterium marinum* pathogenesis within the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(6):2049–52. DOI: 10.1128/AEM.06965-11.
4. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.
5. El-Etr S.H., Margolis J.J., Monack D., Robison R.A., Cohen M., Moore E., Rasley A. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(23):7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.
6. Sun S., Noorian P., McDougald D. Dual role of mechanisms involved in resistance to predation by protozoa and virulence to humans. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1017. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01017.
7. Nikul'shin S.V., Onatskaya T.G., Lukanina L.M., Bondarenko A.I. [The study of the association of soil amoebas *Hartmannella rhyssodes* with bacteria – the causative agents of plague and pseudotuberculosis in the experiment]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1992; (9-10):2–5.
8. Pushkareva V.I. [Experimental assessment of the interaction between *Yersinia pestis* EV and soil ciliates and the possibility of long-term preservation of bacteria in protozoan cysts]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2003; (4):40–44.
9. Breneva N.V., Maramovich A.S., Klimov V.T. [Ecological patterns of existence of pathogenic *Yersinia* in soil ecosystems]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2005; (6):82–8.
10. Markman D.W., Antolin M.F., Bowen R.A., Wheat W.H., Woods M., Gonzalez-Juarrero M., Jackson M. *Yersinia pestis* survival and replication in potential amoeba reservoir. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(2):294–302. DOI: 10.3201/eid2402.171065.
11. Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Shirokov A.A., Burov A.M., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. [Exploratory study of the long-term persistence of *Yersinia pestis* in the cells of soil-inhabiting amoeba – *Acanthamoeba* sp.] *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (2):69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.
12. Benavides-Montaño J.A., Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* re-sists predation by *Acanthamoeba castellanii* and exhibits prolonged intracellular survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(13):e00593-17. DOI: 10.1128/AEM.00593-17.
13. Oglodin E.G., Morozov O.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.K., Denisov A.V., Sanarov P.P., Tokmakova E.G., Makashova M.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Specific appearance, numbers, and dynamics of interaction of *Acanthamoeba* from soils of Gorno-Altai high-mountain plague focus with *Yersinia pestis* strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (4):56–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-56-61.
14. Rabotnov T.A. [Regarding the functioning of biogeocenosis]. In: Gerasimov I.P., editor. [International Geography-76 / XXIII International Geographical Congress. Section 4: Biogeography and Soil Geography]. Moscow; 1976. P. 101–4.
15. Koshel' E.I., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Vidyayeva N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [A study on the taxonomy of soil amoebas from Caspian plague foci based on the analysis of ribosomal operon sequences]. *Genetika [Genetics]*. 2015; 51(1):39–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.
16. Litvin V.Yu., Pushkareva V.I. [On a probable mechanism for retaining the virulence by bacteria of soil and water communities]. In: Litvin V.Yu., editor. [Pathogenic Bacteria in Communities (Mechanisms and Forms of Existence): Collection of Scientific Works]. Moscow: "Rosagroservis"; 1994. P. 24–34.
17. Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglodin E.G., Devdariani Z.L., Morozov O.A., Kuznetsov O.S., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A. [Construction of *Yersinia pestis* strain producing fluorescent protein GFP and prospects of its usage]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (4):61–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66.
18. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: Shiko; 2013. 560 p.
19. Schroeder J.M., Botton G.C., Hay J., Niszl I.A., Seal D.V., Markus M.B., Fuerst P.A., Byers T.J. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):1903–11. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.
20. Casadevall A., Fu M.S., Guimaraes A.J., Albuquerque P. The 'amoeboid predator-fungal animal virulence' hypothesis. *J. Fungi (Basel)*. 2019; 5(1):10. DOI: 10.3390/jof5010010.
21. Espinoza-Vergara G., Noorian P., Silva-Valenzuela C.A., Raymond B.B.A., Allen C., Hoque M.M., Sun S., Johnson M.S., Pernice M., Kjelleberg S., Djordjevic S.P., Labbate M., Camilli A., McDougald D. *Vibrio cholerae* residing in food vacuoles expelled by protozoa are more infectious *in vivo*. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(12):2466–74. DOI: 10.1038/s41564-019-0563-x.
22. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73. DOI: 10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981.

Authors:

Makashova M.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Naryshkina E.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Макашова М.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Шарапова Н.А., Нарышкина Е.А., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-90-95

УДК 616.98(479.25)

А. Манучарян, Р. Даниелян, Г. Мелик-Андреасян, Л. Аветисян, А. Ванян

Результаты полевых и лабораторных исследований носителей и переносчиков природно-очаговых инфекций на территории Республики Армения

ГНО «Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний», Ереван, Республика Армения

Целью работы является оценка современного эпизоотического потенциала Закавказского высокогорного и Приараксинского низкогорного природных очагов чумы на территории Республики Армения с применением ГИС-технологий. **Материалы и методы.** В работе использованы данные эпизоотологического обследования, учетов численности и видового состава, пространственного распределения грызунов и эктопаразитов на энзоотичных по чуме территориях Республики Армения в 2021 г. **Результаты и обсуждение.** По результатам исследований создана электронная база данных носителей и переносчиков возбудителей природно-очаговых зоонозных инфекций на энзоотичных по чуме территориях Республики Армения. С применением ГИС-технологий выполнена оценка пространственного распределения носителей и переносчиков чумы, выявлены участки циркуляции возбудителей туляремии и лептоспирозов. Полученные результаты служат основой повышения эффективности планирования и проведения профилактических мероприятий, направленных на обеспечение эпидемиологического благополучия по природно-очаговым инфекционным болезням на территории Республики Армения.

Ключевые слова: чума, природно-очаговые инфекции, переносчик, носитель.

Корреспондирующий автор: Аветисян Лилит, e-mail: info@ncdc.am.

Для цитирования: Манучарян А., Даниелян Р., Мелик-Андреасян Г., Аветисян Л., Ванян А. Результаты полевых и лабораторных исследований носителей и переносчиков природно-очаговых инфекций на территории Республики Армения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:90–95. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-90-95

Поступила 19.12.2022. Принята к публ. 23.12.2022.

A. Manucharyan, R. Danielyan, G. Melik-Andreasyan, L. Avetisyan, A. Vanyan

Results of Field and Laboratory Studies of Carriers and Vectors of Natural-Focal Infections on the Territory of the Republic of Armenia

National Center for Disease Control and Prevention, Yerevan, Republic of Armenia

Abstract. The purpose of the study was to assess the current epizootic potential of the Transcaucasian high-mountain and Pre-Araks low-mountain natural plague foci on the territory of the Republic of Armenia using GIS technologies. **Materials and methods.** We used the data from an epizootiological survey, records of the abundance and species composition, spatial distribution of rodents and ectoparasites in the plague-enzootic territories of the Republic of Armenia in 2021. **Results and discussion.** Based on the results of the research, an electronic database of carriers and vectors of pathogens of natural-focal zoonotic infections in the plague-enzootic territories of the Republic of Armenia has been created. Applying GIS technologies, an assessment of the spatial distribution of carriers and vectors of plague has been made and areas of circulation of tularemia and leptospirosis pathogens identified. The results obtained serve as the basis for improving the efficiency of planning and carrying out preventive measures aimed at ensuring the epidemiological welfare as regards natural-focal infectious diseases in the territory of the Republic of Armenia.

Key words: plague, natural-focal infections, vector, carrier.

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

Corresponding author: Lilit Avetisyan, e-mail: info@ncdc.am.

Citation: Manucharyan A., Danielyan R., Melik-Andreasyan G., Avetisyan L., Vanyan A. Results of Field and Laboratory Studies of Carriers and Vectors of Natural-Focal Infections on the Territory of the Republic of Armenia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:90–95. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-90-95

Received 19.12.2022. Accepted 23.12.2022.

Manucharyan A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6435-0005>

Danielyan R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3351-3625>

Melik-Andreasyan G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5796-8077>

Avetisyan L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6357-9238>

Vanyan A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3637-2469>

На территории Республики Армения расположены Закавказский высокогорный и Приараксинский низкогорный трансграничные природные очаги чумы с общей площадью 27800 км² [1–3]. Закавказский высокогорный очаг чумы (ЗВО) занимает пространство от границы с Грузией на северо-западе до Мегринского хребта на юго-востоке. С северо-востока на юго-восток граница очага проходит по Джавахетскому, Сомхетскому, Арегунийскому, Севанскому хребтам

и Карабахскому нагорью, а с северо-запада на юго-запад – по предгорьям Ширакской равнины, Араатской котловины и Зангезурского хребта. В состав ЗВО входят три автономных мезоочага: Гюмрийский, Присеванский и Зангезуро-Карабахский. В ЗВО основным носителем чумного микроба является обыкновенная полевка *Microtus arvalis*, а переносчиками специфических блох этого грызуна – *Nosopsyllus consimilis* (Wagner, 1898) и *Callopsylla caspia* (Ioff, Argutopulo, 1934) [4, 5]. Циркулирующий здесь воз-

будитель чумы относится к кавказскому подвиду *Yersinia pestis* ssp. *caucasica* (0.PE2) [6, 7]. Эпизоотии чумы в границах ЗВО неоднократно регистрировали в 1958–2008 гг. Известны три случая заражения людей бубонной формой чумы в 1958, 1969 и 1975 гг.

Приараксинский низкогорный природный очаг чумы (ПНО) расположен на территории юго-восточных районов Армении и Нахичеванской Автономной Республики. ПНО является частью обширного Курдо-Иранского природного очага чумы. Общая площадь очага в пределах Республики Армения составляет 5115 км². Основными носителями чумы в ПНО являются малые песчанки (*Meriones Illiger*, 1812): Виноградова (*M. vinogradovi* Heptner, 1931) и персидская (*M. persicus* Blandford, 1875) [8]. Основными переносчиками – блохи *Xenopsylla conformis* и *Nosopsyllus iranensis* [9, 10]. Эпизоотии чумы в границах ПНО неоднократно регистрировали в 1967–1990 гг. Заболевания чумой имели место в 1948 и 1967 гг. на территории Азербайджанской Республики. Штаммы чумного микроба, циркулирующие в Приараксинском очаге, принадлежат к основному подвиду *Y. pestis* ssp. *pestis*. Они относятся к средневековому биовару основного подвида филогенетической ветви 2.MED1. Здесь также же встречаются штаммы кавказского подвида *Y. pestis* ssp. *caucasica* (0.PE2).

Целью работы является оценка современного эпизоотического потенциала Закавказского высокогорного и Приараксинского низкогорного природных очагов чумы на территории Республики Армения с применением ГИС-технологий.

Материалы и методы

Использованы данные эпизоотологического обследования, учетов численности и видового состава, пространственного распределения грызунов и эктопаразитов на энзоотичных по чуме территориях Республики Армения в 2021 г. Сбор материала для лабораторных исследований на территориях со сплошными и равномерными поселениями грызунов производился путем взятия проб (выборок) из популяций животных и сбора на территории их трупов. Единицей обследования являлась проба полевого материала с участка площадью примерно 1 км². В очагах полевого типа на каждом участке вылова производился отлов грызунов, раскопка и сбор гнезд полевок из 30–40 их нор. Сбор иксодовых клещей осуществлялся с помощью фланелевых флажков, а также с сельскохозяйственных животных. Лабораторные исследования проб полевого материала проводились бактериологическими, биологическими и иммунологическими методами. Для пространственного и статистического анализа полевых и лабораторных данных использовались ГИС-технологии. В полевых условиях для адресации проб полевого материала использовались системы глобального позиционирования (GPS).

Результаты и обсуждение

В 1958–2008 гг. Закавказский высокогорный очаг характеризовался высокой эпизоотической активностью. После 2008 г. зараженных чумой животных здесь не выявлено, т.е. последние 13 лет ЗВО находится в состоянии межэпизоотического периода.

В Приараксинском низкогорном очаге эпизоотия чумы среди песчанок Виноградова в первый раз была зарегистрирована в 1967 г. на территории Нахичеванской Автономной Республики, а в 1970 г. – на территории Араратской области Республики Армения. Штаммы чумного микроба, выделенные в 1970, 1971, 1974 и 1990 гг. от песчанок Виноградова и персидских песчанок, а также их блох, принадлежали к основному подвиду *Y. pestis* ssp. *pestis*. Очаг после 1990 г. не функционировал и более 30 лет находится в состоянии межэпизоотического периода. В очаге также выделялись штаммы кавказского подвида *Y. pestis* ssp. *caucasica*. В 1990 г. в Абовянском районе Армении от персидских песчанок выделено 3 штамма кавказского подвида [11].

Аридизация климата в 1997–2001 гг. неблагоприятно повлияла на состояние кормовой базы обыкновенной полевки, что повлекло за собой снижение генеративного потенциала популяций этого вида грызунов. При этом в 2002–2003 гг. на отдельных участках ЗВО отмечено сохранение высокого уровня численности обыкновенных полевок. Летом 2003 г. активная эпизоотия туляремии привела к гибели около 90 % грызунов на площади 3000 км². В последующем, в 2004–2021 гг., вследствие неблагоприятного влияния повышения температур летних и зимних месяцев на генеративное состояние популяций обыкновенной полевки, имело место развитие глубокой депрессии численности этого вида.

Согласно Третьему национальному сообщению об изменении климата ожидается, что к 2100 г. изменения климата приведут к повышению среднегодовой температуры в Армении до 10,2 °С. Это превышает базовый уровень на 4,7 °С, и ожидается, что количество осадков уменьшится на 23 %. Прогнозируется, что эти изменения приведут к расширению пустынных, полупустынных, засушливых и редколесных районов Армении, что повлечет за собой дальнейшее сокращение площади территории, пригодной для обитания обыкновенной полевки [5]. Многолетние наблюдения показывают, что интенсивные эпизоотии чумы в ЗВО возникали обычно на фоне весьма высокой численности обыкновенных полевок и их блох, в первую очередь *C. caspia*. Однако в последние десятилетия численность обыкновенных полевок, даже в самых благоприятных биотопах, редко превышает 100–120 особей на 1 га. В последние годы фоновые показатели численности обыкновенных полевок на 1 га не превышают средние многолетние значения и продолжают снижаться. Последнее определяет и низкую современную фоновую численность блох на территории ЗВО.

Обследования природных очагов весной 2021 г. показали, что плотность носителей чумы колебалась от низкой до средне-низкой в зависимости от пригодности местообитаний и в среднем составила 35,3 особи/га. Среднегодовая плотность в 2021 г. составляет около 47,7 особи/га и является средним значением по многолетней шкале плотности поселений этого вида в ЗФО. По сравнению с 2020 г., в 2021 г. уменьшилась плотность популяций обыкновенной полевки на территории Гюмрийского мезоочага, Ширакского, Амасийского и Ашюцкого плато, склонов гор Арагац, хребтов Памбак и Джаджур. В 2021 г. среднегодовая фоновая плотность поселений обыкновенной полевки составила всего 27,7 особи/га. Причем в 2021 г. выявлены участки (Туфашен, Айгабац, Лорасар, Дзорагет, Техер, Воскетас) с плотностью поселений 6,6–19 особи/га. Максимальная плотность 60,0–49,3 особи/га отмечена на участках Сепасар, Амбурдак и Сараландж. Следует отметить, что в секторах Гюмрийского мезоочага в 2021 г. преобладают низкие фоновые показатели плотности обыкновенной полевки, а самый высокий показатель зафиксирован только на участке Сараландж – 60 особи/га (рис. 1).

В 2021 г., по сравнению с 2020 г., в Присеванском мезоочаге плотность обыкновенной полевки снизилась примерно на 20 % и колебалась от 0 особи/га (участки Цовагюх, курган Исавунц, Мец Маймех) до 91 особи/га (участок Калаван), а на восточных склонах Варденисского хребта и Гегамских гор плотность полевков достигала 70,0–104,4 особи/га, при среднегодовых значениях – около 86,2 особи/га.

В 2021 г. в Зангезуро-Карабахском мезоочаге на высокогорных участках Вайка и Сисиана летом

плотность обыкновенной полевки была близкой к средним многолетним показателям и достигала на отдельных участках 41,8 особи/га (Габур) и 50,4 особи/га (Сараван). Осенью 2021 г. показатели плотности снизились здесь почти в три раза. В высокогорьях Сисианского района колебания численности обыкновенной полевки летом составили от 4,0 до 50,0 особи/га, в среднем – 17,1 особи/га, а осенью – от 3,0 до 19,8 особи/га; в среднем – 8,2 особи/га. Летом 2021 г. показатели численности полевков в горно-степном поясе Сисиана и Гориса составляли в среднем 7,2 особи/га. В Капанском районе в высокогорном поясе плотность обыкновенной полевки колебалась от 24,0 до 115,0 особи/га, в среднем составляла 70,56 особи/га. В целом среднегодовая плотность обыкновенной полевки в Зангезуро-Карабахском мезоочаге составила 27,15 особи/га.

В 2021 г. в ЗВО весенние показатели общего запаса блох составили 8,7 экз/га, летом возросли до 42,4 экз/га, а осенью достигли 80,68 экз/га, что считается средним показателем. Следует отметить, что усредненный показатель, зарегистрированный осенью, обусловлен относительно высоким уровнем запасов блох в Гюмрийском мезоочаге – 166,25 экз/га, высокая плотность переносчиков зафиксирована здесь на участках Сепасар, Овтун, Лусахбюр, Гогаран (рис. 2). В 2021 г., по сравнению с 2020 г., плотность основных носителей в ЗВО вышла за среднюю границу шкалы плотностей, и, как следствие, наблюдалось некоторое увеличение общего запаса блох – до 43,95 экз/га.

В 2021 г. при проведении эпизоотологического обследования Приараксинского низкогорного очага зараженных чумой животных не выявлено.

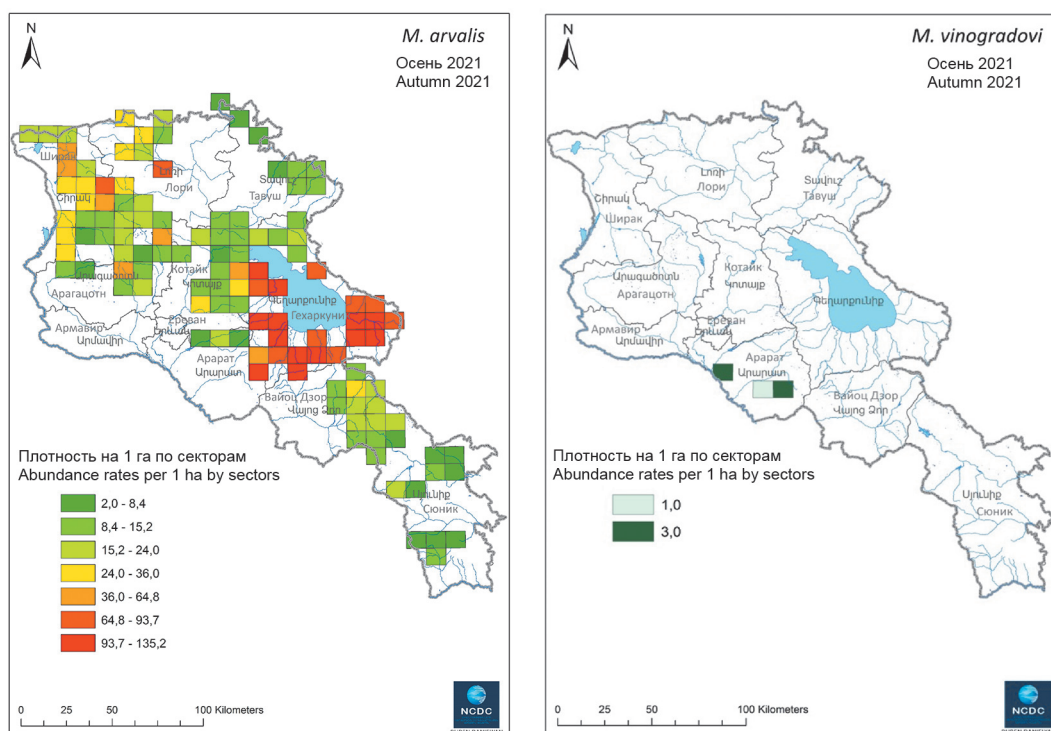


Рис. 1. Осенние показатели плотности носителей в 2021 г.:

A – *M. arvalis* в Закавказском высокогорном очаге; B – *M. vinogradovi* в Приараксинском низкогорном очаге

Fig. 1. Carrier abundance rates in autumn, 2021:

A – *M. arvalis* in the Transcaucasian high-mountain focus; B – *M. vinogradovi* in the Pre-Araks low-mountain focus

A

B

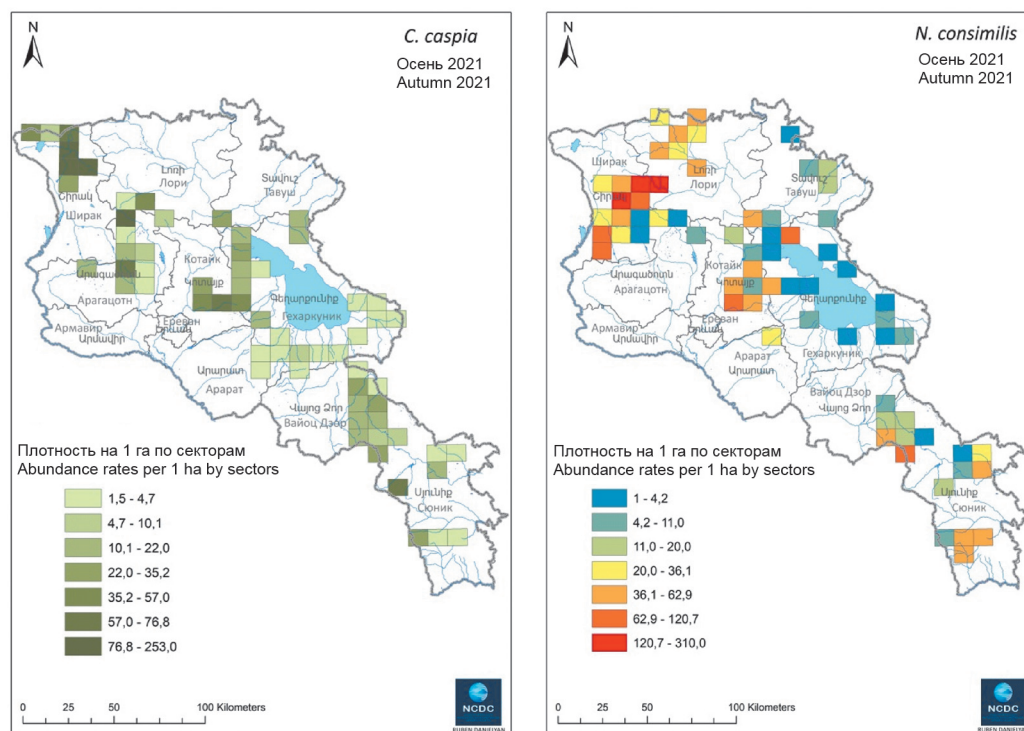


Рис. 2. Осенние запасы блох в ЗВО в 2021 г.:

 A – *C. caspia*; B – *N. consimilis*

Fig. 2. Numbers of fleas in the Transcaucasian high-mountain plague focus in autumn, 2021:

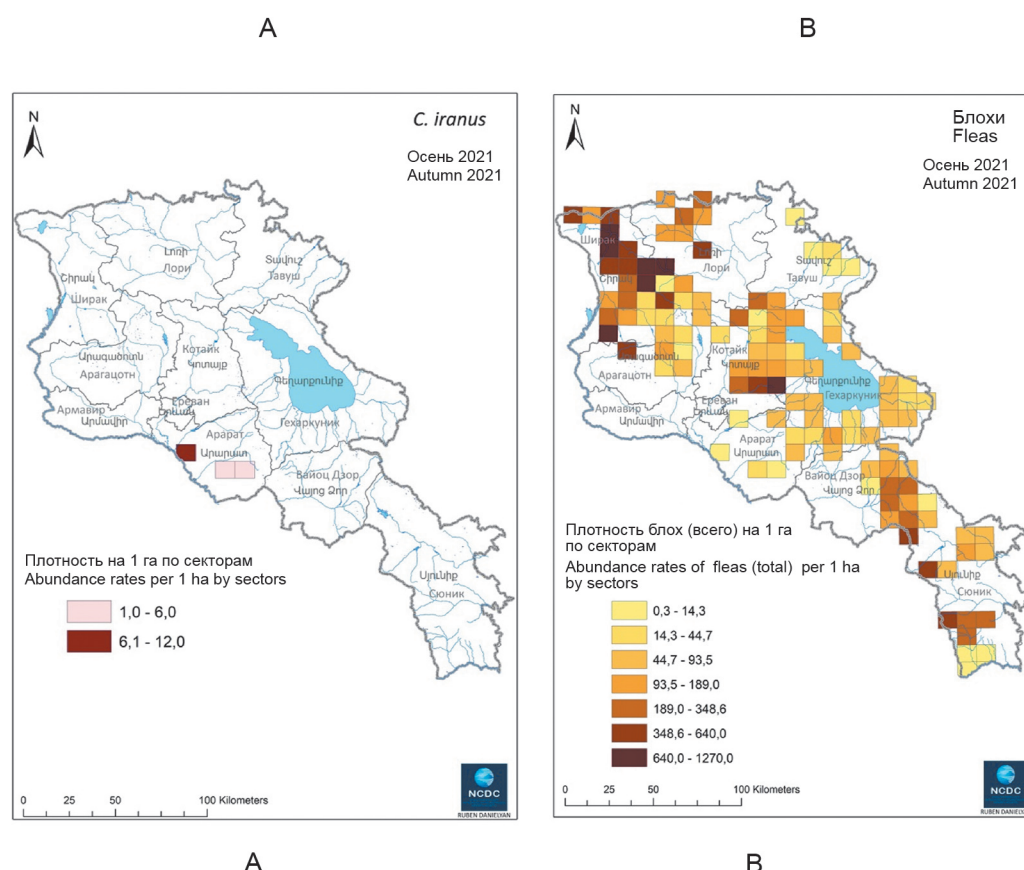
 A – *C. caspia*; B – *N. consimilis*


Рис. 3. Осенние показатели запаса блох в Приараксинском низкогорном очаге в 2021 г.:

 A – *C. iranica*; B – общее

Fig. 3. Autumn indicators of the numbers of fleas in the Pre-Araks low-mountain focus in 2021:

 A – *C. iranica*; B – total count

Плотность песчанки Виноградова в Араратской области в 2021 г. резко снизилась и осенью составила 2,0 экз/га. Осенний средний запас блох песчанок составлял здесь всего 4,8 экз/га (рис. 3).

При исследовании проб полевого материала бактериологическим методом выделено 3 культуры возбудителя туляремии в Зангезуро-Карабахском мезоочаге и 20 культур *Y. enterocoli-*

tica в Гюмрийском и Зангезуро-Карабахском мезоочагах от обыкновенной полевки, лесной и домашней мыши. Иммунологическими методами получено 137 положительных результатов на лептоспироз. В 2021 г. положительные результаты на лептоспироз получены и в других частях Республики Армения (кроме г. Еревана и Армавирской области) (рис. 4).

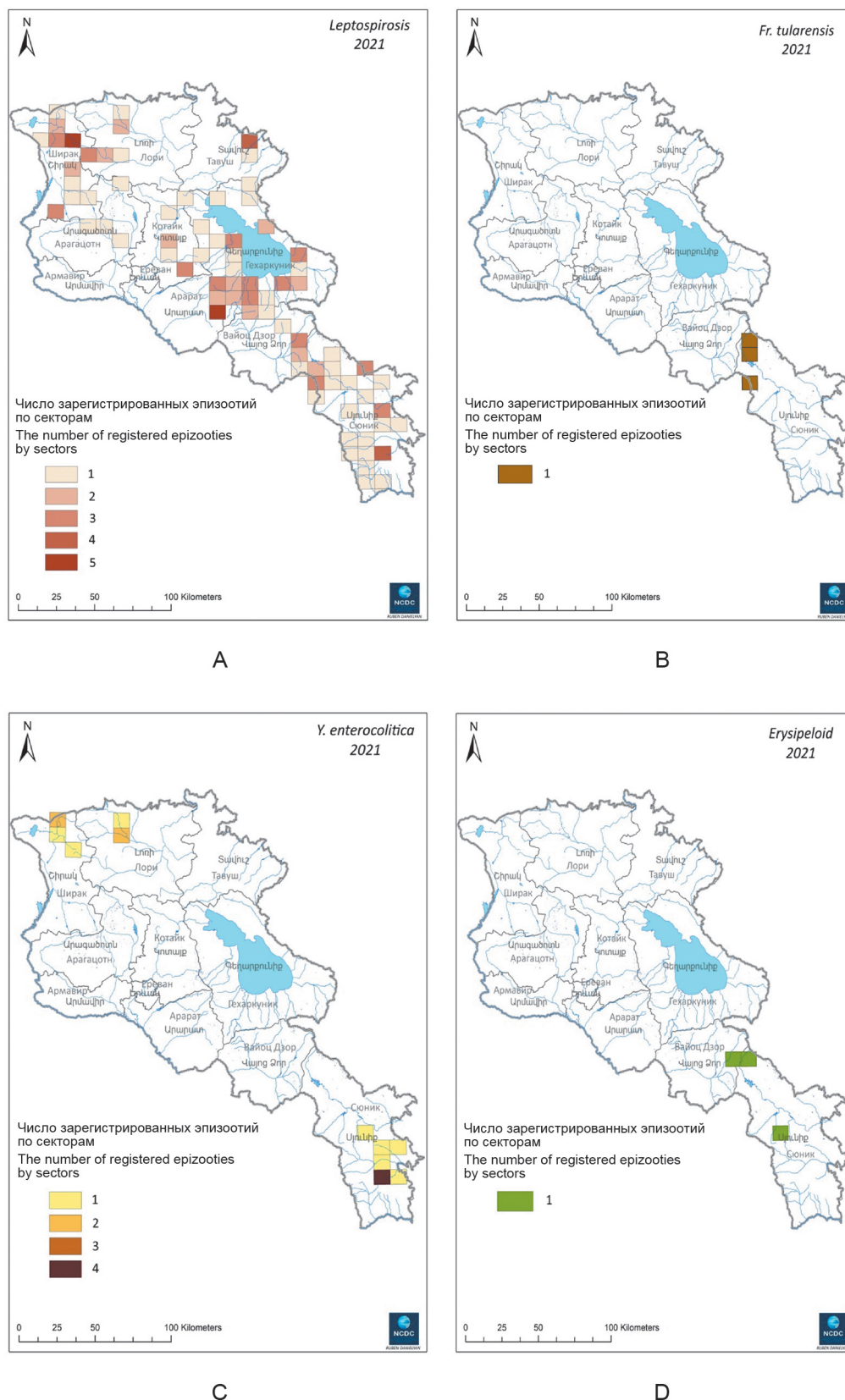


Рис. 4. Участки циркуляции возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней на территории Республики Армения в 2021 г.:

A – лептоспироз; B – туляремия; C – иерсиниоз; D – еризипелоид

Fig. 4. Areas of circulation of pathogens of natural-focal infectious diseases in the territory of the Republic of Armenia in 2021:

A – leptospirosis; B – tularemia; C – yersiniosis; D – erysipeloid

По результатам исследований 2021 г. оцифрованы данные полевых и лабораторных исследований, составлены карты территорий с положительными результатами на природно-очаговые инфекции, а также пространственного распределения и численности фоновых видов грызунов и их блох на энзоотических по чуме территориях Республики Армения. Полученные результаты служат основой повышения эффективности планирования и проведения профилактических мероприятий, направленных на обеспечение эпидемиологического благополучия по природно-очаговым инфекционным болезням на территории Республики Армения.

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

Список литературы

1. Котти Б.К., Жильцова М.В. Значение блох (Siphonaptera) в природных очагах чумы. *Паразитология*. 2019; 53(6):506–17. DOI: 10.1134/S0031184719060061.
2. Медведев С.Г., Котти Б.К., Вержуцкий Д.Б. Разнообразие блох (Siphonaptera) – переносчиков возбудителей чумы: паразит сусликов – блоха *Citellophilus tesquorum* (Wagner, 1898). *Паразитология*. 2019; 53(3):179–97. DOI: 10.1134/S0031184719030013.
3. Гончаров А.И., Елкин Ю.М., Локтев Н.А., Осипова С.П. Об изменениях в преджелудке блох *Nosopsyllus consimilis* и *Callopsylla caspia*, инфицированных чумой. *Паразитология*. 1974; 8(4):348–52.
4. Слудский А.А. Эпизоотология чумы (обзор исследований и гипотез). Часть 2 (Деп. в ВИНТИ 11.08.2014, № 232-В 2014). Саратов; 2014. 182 с. [Электронный ресурс]. URL: https://www.microbe.ru/files/Sludsky_Pt2_1.pdf.
5. Danielyan R., Sahakyan L. The possible reduction of the areas of natural foci of tularemia due to forecasted climate changes in Armenia. Conference: BIOTHEATS ASM 2019. [Электронный ресурс]. URL: https://www.researchgate.net/publication/334657725_The_Possible_Reduction_of_the_Areas_of_Natural_Foci_of_Tularemia_Due_to_Forecasted_Climate_Changes_in_Armenia.
6. 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.
7. Никифоров К.А., Альхова Ж.В., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* кавказского подвида из очагов Кавказа и Закавказья по данным полногеномного секвенирования. *Генетика*. 2019; 55(4):398–405. DOI: 10.1134/S0016675819040076.
8. Danielyan R., Sahakyan L. Geostatistical analysis of the density of primary reservoir of Plague in Armenia. Conference: The 5th International One Health Congress 2018. [Электронный ресурс]. URL: https://www.researchgate.net/publication/334670990_Geostatistical_analysis_of_the_density_of_primary_reservoir_of_Plague_in_Armenia.
9. Danielyan R. Animals positive for *Yersinia pestis* in Armenia. *Online Journal of Public Health Informatics*. 2018; 10(1):e94. DOI: 10.5210/ojphi.v10i1.8688.
10. Даниелян Р.Р., Мовсисян О.Н., Саакян Л.В. Блохи (Siphonaptera) обыкновенной полевки северо-запада Армении. *Евразийский энтомологический журнал*. 2016; 15(3):213–8. [Электронный ресурс]. URL: http://www.eco.nsc.ru/EEJ/eej_2016_15_3.html.

11. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.

References

1. Kotti B.K., Zhil'tsova M.V. [Value of fleas (Siphonaptera) in the natural foci of plague]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 2019; 53(6):506–17. DOI: 10.1134/S0031184719060061.
2. Medvedev S.G., Kotti B.K., Verzhutsky D.B. [Diversity of fleas (Siphonaptera), vectors of plague pathogens: the flea *Citellophilus tesquorum* (Wagner, 1898), parasite of ground squirrels of the genus *Spermophilus*]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 2019; 53(3):179–97. DOI: 10.1134/S0031184719030013.
3. Goncharov A.I., Elkin Yu.M., Loktev N.A., Osipova S.P. [Changes in the proventriculus of the plague-infected fleas *Nosopsyllus consimilis* and *Callopsylla caspia*]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 1974; 8(4):348–52.
4. Sludsky A.A. [Epizootiology of plague (review of studies and hypotheses). Part 2 (Deposited into VINITI on August 11, 2014, No. 232-B 2014)]. Saratov; 2014. 182 p. [Internet]. Available from: https://www.microbe.ru/files/Sludsky_Pt2_1.pdf.
5. Danielyan R., Sahakyan L. The possible reduction of the areas of natural foci of tularemia due to forecasted climate changes in Armenia. Conference: BIOTHEATS ASM 2019. [Internet]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/334657725_The_Possible_Reduction_of_the_Areas_of_Natural_Foci_of_Tularemia_Due_to_Forecasted_Climate_Changes_in_Armenia.
6. 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.
7. Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Oglodin E.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* strains of the Caucasian subspecies from the foci of the Caucasus and Transcaucasia according to whole genome sequencing data]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2019; 55(4):398–405. DOI: 10.1134/S0016675819040076.
8. Danielyan R., Sahakyan L. Geostatistical analysis of the density of primary reservoir of Plague in Armenia. Conference: The 5th International One Health Congress 2018. [Internet]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/334670990_Geostatistical_analysis_of_the_density_of_primary_reservoir_of_Plague_in_Armenia.
9. Danielyan R. Animals positive for *Yersinia pestis* in Armenia. *Online Journal of Public Health Informatics*. 2018; 10(1):e94. DOI: 10.5210/ojphi.v10i1.8688.
10. Danielyan R.R., Movsisyan O.N., Sahakyan L.V. [Fleas (Siphonaptera) of the common vole in the northwestern Armenia]. *Evrasijskiy Entomologicheskij Zhurnal [Eurasian Entomological Journal]*. 2016; 15(3):213–8. [Internet]. Available from: http://www.eco.nsc.ru/EEJ/eej_2016_15_3.html.
11. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: Medicine; 2004. 192 p.

Authors:

Manucharyan A., Danielyan R., Melik-Andreasyan G., Avetisyan L., Vanyan A. National Center for Disease Control and Prevention, 12, Mkhitar Heratsi St., Yerevan, 0025, Republic of Armenia. E-mail: info@ncdc.am.

Об авторах:

Манучарян А., Даниелян Р., Мелик-Андреасян Г., Аветисян Л., Ванян А. Национальный центр по контролю и профилактике заболеваний. Республика Армения, 0025, Ереван, ул. Мхитар Герацци, 12. E-mail: info@ncdc.am.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-96-101

УДК 595.775:599.322.2+616.98:579.842.23(571.52)

Е.Г. Токмакова¹, Н.Ф. Галацевич², Л.П. Базанова¹, Н.И. Ковалёва², А.А. Чалбакай², И.С. Акимова²**Зараженность блох длиннохвостого суслика энтомопаразитическими нематодами в Тувинском горном природном очаге чумы**¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Тувинская противочумная станция», Кызыл, Российская Федерация

Предполагается, что энтомопаразитические нематоды блох являются связующим звеном между частями популяции *Yersinia pestis* во внешней среде и в блохе-переносчике. **Цель** исследования – анализ экстенсивности и интенсивности нематодной инвазии у блох длиннохвостого суслика на территории Монгун-Тайгинского стационара в Тувинском природном очаге чумы. **Материалы и методы.** Блох собирали в процессе плановых эпизоотологических обследований в 2019–2021 гг. При проведении таксономической идентификации регистрировали наличие паразитических нематод. Для оценки интенсивности нематодной инвазии вскрыто 190 блох. Фиксировали количество взрослых паразитирующих самок нематод и наличие личинок. Статистическую обработку данных провели общепринятыми методами с применением программы Excel. Использовали критерий χ^2 , влияние двух факторов (вид, пол блох) на изучаемые показатели оценивали с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализа. **Результаты и обсуждение.** За три года наблюдений энтомопаразитические нематоды обнаружены в блохах шести видов: *Citellophilus tesquorum*, *Frontopsylla elatoides*, *Rhadinopsylla li transbaikalica*, *Frontopsylla hetera*, *Oropsylla alaskensis*, *Neopsylla mana*. Показаны видовые различия блох в зараженности нематодами. Наивысшая инвазированность – 25,1–25,6 % – отмечена у *Rh. li transbaikalica*. Половая принадлежность блох не влияла на их зараженность. Установлено, что зараженные блохи чаще находятся в гнезде, чем в шерсти прокормителя, и менее активно, чем незараженные эктопаразиты, мигрируют ко входам нор. По результатам оценки интенсивности инвазии блохи *Rh. li transbaikalica* являются хозяевами нематод моно- или олигоксенного вида, который не встречается у других блох.

Ключевые слова: энтомопаразитические нематоды, блохи, Тувинский горный очаг чумы.

Корреспондирующий автор: Токмакова Елена Геннадьевна, e-mail: flea98@mail.ru.

Для цитирования: Токмакова Е.Г., Галацевич Н.Ф., Базанова Л.П., Ковалёва Н.И., Чалбакай А.А., Акимова И.С. Зараженность блох длиннохвостого суслика энтомопаразитическими нематодами в Тувинском горном природном очаге чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:96–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-96-101

Поступила 09.12.2022. Отправлена на доработку 20.12.2022. Принята к публ. 22.12.2022.

E.G. Tokmakova¹, N.F. Galatsevich², L.P. Bazanova¹, N.I. Kovaleva², A.A. Chalbakai², I.S. Akimova²**The Infestation of Fleas of the Long-Tailed Souslik with Entomoparasitic Nematodes in Tuva Mountain Natural Plague Focus**¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation;²Tuva Plague Control Station, Kyzyl, Russian Federation

Abstract. Entomoparasitic nematodes are supposed to be a link between parts of *Yersinia pestis* population in the environment and the flea vector. **The aim** of the study was to assess the prevalence and intensity of infestation in the fleas of the long-tailed souslik with entomoparasitic nematodes on the territory of Mongun-Taiginsky station in the Tuva natural plague focus. **Materials and methods.** Fleas were collected during the scheduled epizootiological surveys in 2019–2021. In the course of taxonomic identification the presence of parasitic nematodes was registered. In order to evaluate the intensity of nematode invasion, a total of 190 fleas were dissected. The number of adult parasitizing females and presence of larvae was recorded. Statistical processing of the data was performed with the help of conventional methods using the Excel software. The criterion χ^2 was applied; the influence of various factors (species, gender of fleas) on the studied parameters was assessed through single- and two-factor analysis of variance. **Results and discussion.** During three years of observations, entomoparasitic nematodes were found in six species of fleas: *Citellophilus tesquorum*, *Frontopsylla elatoides*, *Rhadinopsylla li transbaikalica*, *Frontopsylla hetera*, *Oropsylla alaskensis*, and *Neopsylla mana*. The differences in infestation with nematodes between the species are presented. The highest invasion rate – 25.1–25.6 % – is observed in *Rh. li transbaikalica*. The gender of fleas does not influence their infestation. It is established that invaded fleas are more often found in the nest than in the fur of animals, they are less actively migrate to the burrow entrance compared to not invaded ones. Evaluation of infestation prevalence has revealed that fleas *Rh. li transbaikalica* are the hosts for nematodes of mono- or oligoxenic species, which do not occur in other fleas.

Key words: entomoparasitic nematodes, fleas, Tuva mountain natural plague focus.

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

Corresponding author: Elena G. Tokmakova, e-mail: flea98@mail.ru.

Citation: Tokmakova E.G., Galatsevich N.F., Bazanova L.P., Kovaleva N.I., Chalbakai A.A., Akimova I.S. The Infestation of Fleas of the Long-Tailed Souslik with Entomoparasitic Nematodes in Tuva Mountain Natural Plague Focus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 4:96–101. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-96-101

Received 09.12.2022. Revised 20.12.2022. Accepted 22.12.2022.

Tokmakova E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3416-6602>

Bazanova L.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8086-9886>

Предполагается, что энтомопаразитические нематоды блох являются связующим звеном между частями популяции *Yersinia pestis* во внешней среде и в блохе-переносчике, обеспечивая вынос биопленок возбудителя чумы из почвенных резервуаров [1]. Специфичными для блох являются представители трех родов: *Rubzovinema*, *Spilotylenchus* и *Psyllostylenchus*. По современной классификации они относятся к разным семействам отряда Tylenchida: Deladenidae, Allantonematidae и Parasytylenchidae, – соответственно имеют заметные различия в жизненном цикле и строении, но анализ рибосомальных генов указывает на их близкое родство [2]. Исследований, посвященных нематодам-паразитам насекомых азиатской части России, крайне мало [3–6]. До 2014 г. был известен только один монохозяинный вид – *Rubzovinema ceratophylla*, однако обнаруженные в Волго-Уральском степном очаге чумы изоляты охарактеризованы как принадлежащие к новому виду – *Rubzovinema polyxenica* [7, 8]. Данные о встречаемости паразитических нематод в блохах традиционно входили в отчетные материалы противочумных станций Сибири и Дальнего Востока, но не были представлены широкой аудитории. **Цель** данной работы – анализ экстенсивности и интенсивности нематодной инвазии у блох в Тувинском природном очаге чумы.

Материалы и методы

Блох собирали методами, описанными в МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней», в соответствии с планами Тувинской противочумной станции. В процессе таксономической идентификации отбирали особей, зараженных или подозрительных на зараженность гельминтами. Такие блохи часто выглядят «толстыми», с мутным брюшком, а под микроскопом на фоне пищеварительного тракта просматриваются личинки и (или) взрослые гельминты.

Для оценки интенсивности инвазии нематод извлекали из блох, добытых при плановом обследовании участков эпизоотологического стационара в Тувинском горном природном очаге чумы (Монгун-Тайгинский кожуун Республики Тыва): в 2019 и 2021 гг. – во второй половине мая, в 2020 г. – во второй половине сентября. Вскрытие проводили на предметном стекле с лункой, которое укладывали в крышку от чашки Петри. Блоху помещали в каплю 0,9 % изотонического раствора хлорида натрия и разрывали при помощи двух препаровальных игл в области пронотума. Зрелые гамогенетические самки нематод достаточно крупные, и в чашках Петри на темном фоне их можно подсчитать невооруженным глазом. Нематод, выпавших из разрыва, собирали вместе с физиологическим раствором, добавляя его, при необходимости, пипеткой-дозатором, и переносили в микропробирки, содержавшие 80 мкл глицерина, для таксономической идентификации молекулярно-

генетическими методами. Всего вскрыто 190 блох. Для анализа экстенсивности инвазии использованы данные отчетов Тувинской противочумной станции. Статистическую обработку провели общепринятыми методами [9] с применением программы Excel. Использовали критерий χ^2 , влияние двух факторов (вид, пол блох) на изучаемые показатели оценивали с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализа.

Результаты и обсуждение

Экстенсивность инвазии у блох. За три года наблюдений энтомопаразитические нематоды обнаружены в блохах шести видов: *Citellophilus tesquorum*, *Frontopsylla elatoides*, *Rhadinopsylla li transbaikalica*, *Frontopsylla hetera*, *Oropsylla alaskensis*, *Neopsylla mana*. В эктопаразитах последних двух видов гельминты встречались эпизодически (табл. 1).

В течение года зараженность блох гельминтами может изменяться в несколько раз. У массового вида – *C. tesquorum* – наибольшее количество инвазированных самок встречали в мае: 2019 г. – 6,3 %; 2020 г. – 9,4 %; 2021 г. – 7,8 %. Минимальное их количество составило 1,8 % (апрель 2019 г.), 1,1 % (август 2020 г.) и 0 % (апрель 2021 г.).

Установлено, что влияние фактора «пол», так же как и влияние сочетанных факторов «вид+пол», на пораженность блох нематодами – недостоверно (табл. 2).

Тем не менее доля инвазированных самцов в 10 из 18 итоговых величин за сезон была меньше, чем самок, в пяти – практически не различалась, и только в трех – была больше (табл. 1).

Еще одна причина колебаний экстенсивности инвазии по месяцам может быть в том, что совокупности блох и гельминтов в них распределены неодинаково между объектами сбора, а объекты сбора, как источник формирования выборки, представлены в течение года неравномерно (табл. 3).

Из приведенных данных следует, что блохи, собранные с разных групп объектов, в неодинаковой степени поражены нематодами. Максимальная доля особей с инвазией отмечена у блох из гнезд, причем это прослеживается как у отдельных видов, так и по общему их количеству. У *O. alaskensis* и *F. hetera* гельминты обнаружены только в блохах из гнезд. При этом большинство особей *O. alaskensis* выбрано из гнездового субстрата, а у *F. hetera* распределение между объектами сбора более равномерно (табл. 3). Наивысшая зараженность – 25,1–25,6 % при достаточном объеме выборки – отмечена у *Rh. li transbaikalica*, которые концентрировались в гнездах, а на зверьках и во входах попадались редко. По критерию χ^2 установлена связь между зараженностью блох нематодами и объектами сбора – 44,72; $P < 0,001$.

Интенсивность инвазии у блох. На одну особь *C. tesquorum* и *F. elatoides* приходилось от 1 до 12 взрослых крупных гамогенетических самок нематод, модальное значение – 1. В среднем в одной сам-

Таблица 1 / Table 1

Экстенсивность инвазии блох в 2019–2021 гг. по данным Тувинской противочумной станции
Extensiveness of flea infestation in 2019–2021 according to the data from Tuva Plague Control Station

Вид Species	Год Year	Самки Females			Самцы Males		
		Собрано Collected	Заражено Invaded	%	Собрано Collected	Заражено Invaded	%
<i>C. tesquorum</i>	2019	2856	106	3,7	973	29	3,0
	2020	2639	143	5,4	1158	64	5,5
	2021	2703	166	6,1	1355	68	5,0
<i>F. elatoides</i>	2019	384	26	6,8	76	0	0,0
	2020	423	19	4,5	85	2	2,4
	2021	325	17	5,2	81	2	2,5
<i>Rh. li transbaikalia</i>	2019	182	20	11,0	148	12	8,1
	2020	159	30	18,9	169	25	14,8
	2021	72	13	18,1	79	6	7,6
<i>F. hetera</i>	2019	193	6	3,1	104	3	2,9
	2020	82	7	8,5	29	3	10,3
	2021	144	10	6,9	41	5	12,2
<i>O. alaskensis</i>	2019	133	1	0,8	98	0	0,0
	2020	129	0	0,0	98	0	0,0
	2021	190	1	0,5	103	1	1,0
<i>N. mana</i>	2019	105	0	0,0	58	0	0,0
	2020	62	0	0,0	40	0	0,0
	2021	63	1	1,6	25	0	0,0

ке *C. tesquorum* паразитировало 2,0 зрелых гельминта, в самце – 1,7; в самке *F. elatoides* – 1,6; зараженных самцов имаго этого вида обнаружено всего два экземпляра, в каждом – по одной самке нематоды.

Не установлено влияния на интенсивность инвазии блох видовых (однофакторный дисперсионный анализ, $F=1,08$), половых особенностей ($F=0,50$) или объекта сбора блох: зверек, гнездо, вход в нору ($F=0,52$). За три периода наблюдений учтено по две блохи *C. tesquorum* и *F. elatoides*, содержащих 1–2 самок нематод без личинок.

Большая часть блох *Rh. li transbaikalia* поражены некрупными самками нематод – 38 из 46 в выбор-

ке 2020 г., 6 из 10 – 2021 г. Все блохи содержали также и личинок нематод, что указывает на то, что эти мелкие самки приступили к размножению. За редким исключением, при наличии единичных крупных самок нематод в блохе, мелкие самки не встречаются.

Интенсивность инвазии у *Rh. li transbaikalia* с крупными самками нематод составила 2,0 (сентябрь 2020 г.) и 1,0 особи (май 2021 г.) на блоху, с мелкими самками – 15,9 и 16,6 соответственно. Так же как у *C. tesquorum* и *F. elatoides*, у *Rh. li transbaikalia* с крупными самками нематод паразитирование трех и более половозрелых гельминтов встречали только у самок блох. В то же время при разбросе числа мелких самок от 2 до 58, свыше 50 взрослых нематод выделяли как из самок, так и из самцов блох, при среднем показателе инвазии – 18,4 на самку *Rh. li transbaikalia* и 14,3 на самца, фактор «пол блохи» на интенсивность инвазии не влияет ($F=1,56$). Отмечено несколько случаев обнаружения в самках блох только личинок: три – у *C. tesquorum*, по одному – у *F. elatoides*, *F. hetera* и *Rh. li transbaikalia*.

Состояние инвазированных блох. Определение половой принадлежности инвазированных блох не вызывало затруднений, «интерсексов», описанных у *Amphipsylla sibirica* [10], не отмечали. Внешне, по своей двигательной активности и поведению пораженные гельминтами особи не отличались от остальных. Однако на генеративное состояние блох присутствие нематод оказывает негативное влияние. Как правило, подавляется развитие яиц, хотя яйцевые трубки у самок присутствовали. Визуально у самцов внешние морфологические изменения выражались в некотором уменьшении половой клешни. При этом они имели нормальные семенники.

Таблица 2 / Table 2

Влияние видовой и половой принадлежности блох на экстенсивность инвазии, 2019–2021 гг.
Двухфакторный дисперсионный анализ

Effects of species and gender of fleas on invasion extensiveness, 2019–2021. ANOVA

Источник вариации Source of variation	df	MS	F
Вид Species	5	163,95	4,38**
Пол Gender	1	124,19	3,32
Взаимодействие Interaction	5	37,11	0,99
Случайная Random	168*	37,43	
Итого Total	179		

Примечание: *помесячные данные с апреля по сентябрь каждого года; ** $P<0,001$.

Note: *monthly data from April to September of each year; ** $P<0,001$.

Таблица 3 / Table 3

Экстенсивность инвазии у блох, собранных с различных объектов в 2019–2021 гг., по данным обследования Монгун-Тайгинского стационара
 Extensiveness of invasion in fleas collected from various objects in 2019–2021, according to the results of survey of the Mongun-Tayga station

Вид блох Flea species	<i>C. tesquorum</i>				<i>F. elatoides</i>				<i>Rh. li transbaikalica</i>				<i>O. alaskensis</i>				<i>F. hetera</i>				<i>N. mana</i>				Всего блох по каждой группе объектов сбора Total number of fleas for each group of objects
Объекты, с которых собрали блох Objects from which the fleas were collected	Время сбора Time of collecting																								
	Май 2019 г. May, 2019	Сентябрь 2020 г. September, 2020	Май 2021 г. May, 2021	Май 2019 г. May, 2019	Сентябрь 2020 г. September, 2020	Май 2021 г. May, 2021	Май 2019 г. May, 2019	Сентябрь 2020 г. September, 2020	Май 2021 г. May, 2021	Май 2019 г. May, 2019	Сентябрь 2020 г. September, 2020	Май 2021 г. May, 2021	Май 2019 г. May, 2019	Сентябрь 2020 г. September, 2020	Май 2021 г. May, 2021	Май 2019 г. May, 2019	Сентябрь 2020 г. September, 2020	Май 2021 г. May, 2021	Май 2019 г. May, 2019	Сентябрь 2020 г. September, 2020	Май 2021 г. May, 2021				
Зверьки Mammals	4,8 / 42	2,6 / 38	6,4 / 78	7,1 / 14	0,0 / 3	4,0 / 25	0,0 / 1	0,0 / 5	0,0 / 2	–	0,0 / 1	0,0 / 9	–	–	0,0 / 4	–	–	–	–	–	0,0 / 6	4,4 / 228			
Гнезда Nests	15,9 / 182	24,1 / 54	6,7 / 434	13,8 / 58	0,0 / 7	2,4 / 126	0,0 / 14	25,1 / 175	25,6 / 39	4,8 / 21	0,0 / 16	28,6 / 7	–	–	–	0,0 / 7	0,0 / 8	0,0 / 55	–	–	–	11,2 / 1238			
Входы нор Burrow entrances	4,0 / 779	2,3 / 216	7,4 / 592	2,5 / 158	42,9 / 14	5,2 / 97	0,0 / 2	28,6 / 7	–	0,0 / 1	0,0 / 4	0,0 / 10	0,0 / 2	0,0 / 2	0,0 / 2	0,0 / 5	–	0,0 / 1	–	–	–	5,1 / 1903			
Всего Total	6,2 / 1003	6,2 / 308	7,1 / 1104	5,7 / 230	25,0 / 24	3,6 / 248	0,0 / 17	24,6 / 187	24,4 / 41	4,5 / 22	0,0 / 20	7,7 / 26	0,0 / 49	0,0 / 2	0,0 / 6	0,0 / 12	0,0 / 8	0,0 / 62	0,0 / 12	0,0 / 8	0,0 / 62	7,3 / 3369			

Примечание: для каждой ячейки – доля блох с гельминтами, % / количество собранных особей.
 Note: for each table cell – the percentage of fleas with helminthes, % / the number of collected specimens.

В Методических рекомендациях «Выделение и определение систематической принадлежности энтомопаразитических нематод из блох в условиях природного очага чумы» (Саратов, 2014) наибольшая зараженность ими блох суслика в Волго-Уральском природном очаге чумы составила 21 % для *F. setimura* (из 19 особей) и 17,1 % для *C. tesquorum* (всего исследован 41 экземпляр). Блохи того и другого вида были счесаны со зверьков [7, 8]. В наших наблюдениях экстенсивность инвазии *C. tesquorum* и *F. elatoides*, собранных при очесе, не превысила 7,1 % (табл. 3). Фактором, ограничивающим зараженность этих видов блох, может быть их зимовка в фазе имаго отдельно от прокормителя в нежилых летних гнездах, в которых температура февраля опускается до минус 12 °C [12]. По данным диссертации Е.А. Литвиновой (Владивосток, 1994), инвазированные блохи и личинки нематод неспособны пережить зиму в таких условиях, гибель первых до наступления зимы является естественным завершением цикла развития гельминтов внутри насекомого, жизнеспособность вторых обеспечивается положительными, пусть и невысокими, температурами.

Говоря о зараженности блох нематодами, одни авторы не обсуждают половые различия по инвазированности [12, 13], другие же находят, что самки поражаются чаще, чем самцы [10, 14]. Мы на достаточно большой выборке (табл. 1) выявили экстенсивность инвазии самок и самцов блох приблизительно в равных соотношениях.

Фактор «объект сбора», как показывают наши результаты, имеет достоверное влияние на количество блох с гельминтами. С биологической точки зрения паразит выбирает себе хозяев среди «оседлых» блох гнезда или же изменяет их поведение, «склоняя» к оседлости. К экологической группе «блох гнезда» относятся *Rh. li transbaikalica*, *O. alaskensis* и *N. mana*. Первые часто поражаются нематодами, вторые – редко, третьи – очень редко. Блохи *N. mana* – ксерофильный вид, встречается преимущественно в сухих степных биотопах. *Rh. li transbaikalica* и *O. alaskensis*, наоборот, – гигрофилы [15]. Даже у одного и того же вида блох инвазированность повышается в более влажных районах [12, 13]. Кроме того, так же как *C. tesquorum* и *F. elatoides*, *N. mana* зимует преимущественно в гнездах летнего типа без контакта с хозяином [15]. Редкую инвазированность *O. alaskensis*, большая часть которых добыта в гнездах, объяснить можно развитием личиночной стадии с октября по март [15], когда свободноживущие паразитические нематоды находятся в состоянии оцепенения (Е.А. Литвинова, 1994). Свойством нематод, ограничивающим их присутствие в блохах определенных видов, является избирательность гельминтов в выборе хозяев, которая отмечена как у узкоспецифичных паразитов блох [12, 13], так и у неспециализированных видов [16].

Другая сторона вопроса – интенсивность инвазии. Нематоды могут присутствовать в блохе в виде трех фаз: гамогенетической самки, партеногенетической самки и личинки. Вторые от первых внешне

отличаются только размерами. Мы наблюдали два взаимоисключающих варианта паразитирования нематод в блохах: 1) обычно одна-две крупные яйцеживородящие самки и личинки разного возраста; 2) до нескольких десятков визуально не различимых по размеру мелких, но вполне плодовитых самок в присутствии личинок. Первый случай типичен для блох всех рассмотренных видов, второй – встречается только у *Rh. li transbaikalica*. Можно предположить, что в силу каких-то причин блохи *Rh. li transbaikalica* на личиночной стадии являются мишенью для массового нападения нематод, скорее, другого вида, с более мелкими половозрелыми особями. Или же появившееся в блохе партеногенетическое поколение быстро догоняет в росте родителей и начинает размножаться, а количество в несколько десятков особей все-таки более соответствует партеногенетическим самкам [10]. В этом случае появляется еще одна причина отнести мелких нематод из *Rh. li transbaikalica* к другому виду: для *Rubzovinema* характерна одна паразитическая генерация [8].

Преимущественное обнаружение трех и более самок гельминтов в самках блох – 21 против 2 самцов, – скорее всего, связано с большими размерами и соответственно объемом брюшной полости первых. К таким же выводам пришли G. Brinck-Lindroth и F.G.A.M. Smit [10], наблюдая зараженных нематодами *A. sibirica*. Следует отметить, что в вышеуказанной работе сообщается о зараженности нематодами блох пяти видов, но аномалии внешнего строения обнаружены только у *A. sibirica* [10]. Видимо, степень репродуктивных нарушений зависит от видовой принадлежности как блох, так и паразитирующих в них нематод, и их взаимоотношений. В одних случаях ограничения фертильности проявляются морфологическими отклонениями, а в других – имеют функциональную природу [17].

Таким образом, впервые рассмотрены особенности количественного распределения энтомопаразитических нематод в блохах длиннохвостого суслика в Тувинском горном природном очаге чумы. Показаны видовые различия блох в зараженности энтомопаразитическими нематодами, которые, вероятно, определяются их экологическими особенностями, а также специфичностью паразито-хозяинных связей. Гендерная принадлежность блох не влияла на присутствие в них нематод. Установлено, что зараженные блохи предпочитают находиться в гнезде, менее активно мигрируют ко входам нор, реже встречаются на прокормителе, чем незараженные особи. По интенсивности инвазии блохи *Rh. li transbaikalica* являются хозяевами нематод моно- или олигоксенного вида, который не встречается у других блох.

Данные о видовом составе нематод, паразитирующих в блохах Юго-Восточной Тувы, в настоящее время отсутствуют. В соседней Республике Алтай нематоды, выделенные из блох разных видов, отнесены к роду *Rubzovinema* [6]. Можно предположить, что и в блохах Республики Тыва паразитируют гельминты той же систематической принадлежности. После таксономической идентификации собранных

образцов это предположение может быть как подтверждено, так и опровергнуто.

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

Список литературы

1. Попов Н.В., Слудский А.А., Удовиков А.И., Коннов Н.П., Караваева Т.Б., Храмов В.Н. Роль биопленок *Yersinia pestis* в механизме энзоотии чумы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008; 4:118–9.
2. Чижов В.Н., Буторина Н.Н., Таболин С.Б., Лиманцева Л.А., Субботин С.А. Энтомопаразитические нематоды отрядов Tylenchida и Aphelenchida (обзор мировой фауны). М.: Товарищество научных изданий КМК; 2019. 690 с.
3. Коренченко Е.А. *Parasitylenchus klimentorum* sp. n. (Nematoda, Allantonematidae) – паразит малого лиственничного короеда *Orthotomicus laricis* (Coleoptera, Ipsidae). *Паразитология*. 1987; 21(4):567–76.
4. Коренченко Е.А. Особенности биологии нематоды *Phaenopsitylenchus laricis* (Sphaerularioidea, Phaenopsitylenchidae). *Паразитология*. 1989; 23(5):407–11.
5. Шепелёва Н.С. Энтомопатогенные нематоды Республики Саха (Якутия): видовой состав и филетические отношения. *Наука и образование*. 2013; 1:102–6.
6. Оглодин Е.Г., Токмакова Е.Г., Никифоров К.А., Денисов А.В., Шарапова Н.А., Ерошенко Г.А. Систематическая принадлежность энтомопаразитических нематод, выделенных от блох в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:79–83. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-79-83.
7. Koshel E.I., Aleshin V.V., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. Phylogenetic analysis of entomoparasitic nematodes, potential control agents of flea populations in natural foci of plague. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014:135218. DOI: 10.1155/2014/135218.
8. Ерошенко Г.А., Кощель Е.И., Поршаков А.М., Князева Т.В., Краснов Я.М., Мокроусова Т.В., Новичкова Л.А., Анисимова Л.В. Характеристика энтомопаразитических нематод блох мелких грызунов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 3:32–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-32-37.
9. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа; 1973. 320 с.
10. Brinck-Lindroth G., Smit F.G.A.M. Parasitic nematodes in fleas in Northern Scandinavia and notes on intersexuality and castration in *Amphipsylla sibirica* Wagn. *Ent. Scand.* 1973; 4:302–22.
11. Ткаченко В.А., Вержуцкий Д.Б., Верзилова Т.Н., Чарная Т.Г., Колосов В.М. О сохранении возбудителя чумы в межэпизоотический сезон в Тувинском природном очаге. В сб.: *Задорожный В.Ф., редактор. Природно-очаговые инфекции в Забайкалье: Тезисы докладов научной конференции. Чита; 1983. С. 17–9.*
12. Самуров М.А. О влиянии аллantonематид на размножение и численность блохи *Ceratophyllus laeviceps* (Siphonaptera). *Паразитология*. 1981; 15(4):360–3.
13. Козлов М.П., Чумакова И.В., Аветисян Г.А. Распространение и экстенсивность инвазии нематодами блох обыкновенной полевки на Кавказе. *Паразитология*. 1987; 21(1):22–5.
14. Чумакова И.В., Товканев Ф.И. О зараженности нематодами и простейшими блох малого суслика (*Citellus pygmaeus* Pall.). В сб.: Пилипенко В.Г., Таран И.Ф., Емельянов П.Ф., Гончаров А.И., Дятлов А.И., Козлов М.П., Найденов П.Е., Петров П.А., Тинкер А.И., Чернова Э.А., редакторы. Особо опасные инфекции на Кавказе: Тезисы докл. IV краевой науч.-практ. конф. по природной очаговости, эпидемиологии и профилактике особо опасных инфекц. болезней, Ставрополь, 20–22 дек. 1978 г. Ставрополь; 1978. С. 281.
15. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., редакторы. Тувинский природный очаг чумы. Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та; 2019. 286 с.
16. Чумакова И.В., Козлов М.П., Веремчук Г.В. Заражение личинок блох диких грызунов нематодой *Neoaplectana carposarcae* в лабораторных условиях. В сб.: Сучков Ю.Г., редактор. Профилактика природноочаговых инфекций: Тезисы докл. Всесоюз. науч.-практ. конф., 6–8 дек. 1983 г. Ставрополь; 1983. С. 427–9.
17. Козлов М.П., Чумакова И.В., Белокопытова А.М. Влияние нематод *Aphanitylenchus* sp. на репродуктивную способность блох *Ceratophyllus consimilis*. *Паразитология*. 1985; 19(5):407–9.

References

1. Popov N.V., Sludsky A.A., Udovikov A.I., Konnov N.P., Kravaeva T.B., Khramov V.N. [Role of *Yersinia pestis* biofilms in mechanisms of plague enzootics]. *Zhurnal Mikrobiologii,*

Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2008; (4):118–9.

2. Chizhov V.N., Butorina N.N., Tabolin S.B., Limantseva L.A., Subbotin S.A. [Entomoparasitic Nematodes of the Orders Tylenchida and Aphelenchida (Review of the World Fauna)]. Moscow: KMK Publishers; 2019. 690 p.

3. Korenchenko E.A. [*Parasitylenchus klimentorum* sp. n. (Nematoda, Allantonematidae) – a parasite of *Orthotomicus laricis* Fabr. (Coleoptera, Ipsidae)]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 1987; 21(4):567–76.

4. Korenchenko E.A. [Peculiarities of the biology of the nematode *Phaenopsitylenchus laricis* (Sphaerularioidea, Phaenopsitylenchidae)]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 1989; 23(5):407–11.

5. Shepeleva N.S. [Entomopathogenic nematodes of the Republic of Sakha (Yakutia): species composition and phyletic relations]. *Nauka i Obrazovanie [Science and Education]*. 2013; (1):102–6.

6. Oglodin E.G., Tokmakova E.G., Nikiforov K.A., Denisov A.V., Sharapova N.A., Eroshenko G.A. [Taxonomic position of entomoparasitic nematodes isolated from fleas in Gorno-Altai high-mountain natural plague focus]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (2):79–83. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-79-83.

7. Koshel E.I., Aleshin V.V., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. Phylogenetic analysis of entomoparasitic nematodes, potential control agents of flea populations in natural foci of plague. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014:135218. DOI: 10.1155/2014/135218.

8. Eroshenko G.A., Koshel E.I., Porshakov A.M., Knyazeva T.V., Krasnov Ya.M., Mokrousova T.V., Novichkova L.A., Anisimova L.V. [Characteristics of entomoparasitic nematodes of small rodent fleas]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (3):32–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-32-37.

9. Rokitsky P.F. [Biological Statistics]. Minsk; 1973. 320 p.

10. Brinck-Lindroth G., Smit F.G.A.M. Parasitic nematodes in fleas in Northern Scandinavia and notes on intersexuality and castration in *Amphipsylla sibirica* Wagn. *Ent. Scand.* 1973; 4:302–22.

11. Tkachenko V.A., Verzhutsky D.B., Verziylova T.N., Charnaya T.G., Kolosov V.M. [On preservation of plague agent during interepizootic season in Tuva natural focus]. In: [Zadorozhny V.F., editor. Natural-Focal Infections in Transbaikalian region. Proceedings of the Scientific Conference]. Chita; 1983. P. 17–9.

12. Samurov M.A. [Regarding the effect of allantonematids on the reproduction and abundance of the flea *Ceratophyllus laeviceps* (Siphonaptera)]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 1981; 15(4):360–3.

13. Kozlov M.P., Chumakova I.V., Avetisyan G.A. [Distribution and extensiveness of the common vole flea invasion with nematodes in the Caucasus]. *Parazitologia [Parasitology]*. 1987; 21(1):22–5.

14. Chumakova I.V., Tovkanev F.I. [On infestation of little ground squirrel (*Citellus pygmaeus* Pall.) fleas with nematodes and protozoa]. In: [Pilipenko V.G., Taran I.F., Yemel'yanov P.F., Goncharov A.I., Dyatlov A.I., Kozlov M.P., Nayden P.E., Petrov P.A., Tinker A.I., Chernova E.A., editors. Particularly Dangerous Infections in Caucasus. Proceedings of the IV Regional Scientific and Practical Conference on Natural Focality, Epidemiology and Prevention of Particularly Dangerous Infectious Diseases, Stavropol, Russia, 20–22 December 1978]. Stavropol; 1978. P. 281.

15. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., editors. [Tuva Natural Plague Focus]. Irkutsk: Irkutsk State University Publishing House; 2019. 286 p.

16. Chumakova I.V., Kozlov M.P., Veremchuk G.V. [Infestation of wild rodent flea larvae with *Neoaplectana carposarcae* nematode in laboratory setting]. In: [Suchkov Yu.G., editor. Prevention of Natural-Focal Diseases. Proceedings of the All-Union Scientific and Practical Conference, Stavropol, Russia, 6–8 December 1983]. Stavropol; 1983. P. 427–429.

17. Kozlov M.P., Chumakova I.V., Belokopytova A.M. [Effect of *Aphanitylenchus* sp. on the reproductive ability of the flea *Ceratophyllus consimilis*]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 1985; 19(5):407–9.

Authors:

Tokmakova E.G., Bazanova L.P. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Galatsevich N.F., Kovaleva N.I., Chalbakai A.A., Akimova I.S. Tuva Plague Control Station. 13, Moskovskaya St., Kyzyl, 667010, Russian Federation. E-mail: pchs@tuva.ru.

Об авторах:

Токмакова Е.Г., Базанова Л.П. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилессера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Галацевич Н.Ф., Ковалёва Н.И., Чалбакай А.А., Акимова И.С. Тувинская противочумная станция. Российская Федерация, 667010, Кызыл, ул. Московская, 13. E-mail: pchs@tuva.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109

УДК 616.98:579.842.23

А.Л. Трухачев¹, М.Г. Мелоян¹, Е.А. Воскресенская², А.С. Водопьянов¹, С.О. Водопьянов¹,
О.Н. Подладчикова¹, Р.В. Писанов¹, М.В. Чеснокова³, В.А. Рыкова¹, Д.А. Кузнецова¹, В.Т. Климов³,
Г.И. Кокорина², Е.А. Богумильчик²

INDEL-типирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

²ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ³ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

Цель исследования – разработка нового способа внутривидовой генетической дифференциации *Yersinia pseudotuberculosis*, основанного на выявлении INDEL-маркеров с помощью ПЦР. **Материалы и методы.** Проведен анализ 308 штаммов из базы данных NCBI и 15 штаммов, секвенированных в настоящем исследовании. Определение нуклеотидных последовательностей штаммов осуществили при использовании технологической платформы MiSeq. Анализ геномов секвенированных штаммов, а также геномов из базы данных NCBI выполнили с помощью ПЦР *in silico* с 7 парами сконструированных праймеров. **Результаты и обсуждение.** В результате сравнения с помощью авторского программного обеспечения (GenExpert) полногеномных последовательностей 22 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI отобрано 7 INDEL-маркеров, позволяющих эффективно различать штаммы возбудителя псевдотуберкулеза. На основе этих маркеров сконструированы и синтезированы 7 пар праймеров для анализа разных штаммов с помощью ПЦР. Анализ 323 штаммов в ПЦР *in silico* и 70 штаммов в ПЦР *in vitro* позволил разделить их на 30 генетических групп. Сопоставление результатов ПЦР *in silico* и *in vitro* подтвердило возможность использования предложенных праймеров для внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis*. На основе полученных данных построена дендрограмма, отражающая филогенетические связи разных штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Выявлен ряд закономерностей при анализе распределения штаммов *Y. pseudotuberculosis* по различным кластерам и генетическим группам. Показано, что предложенный способ INDEL-типирования может быть использован для внутривидовой генетической дифференциации возбудителя псевдотуберкулеза.

Ключевые слова: генотипирование, *Y. pseudotuberculosis*, псевдотуберкулез, INDEL-маркеры.

Корреспондирующий автор: Трухачев Алексей Леонидович, e-mail: trukhachev_al@antiplague.ru.

Для цитирования: Трухачев А.Л., Мелоян М.Г., Воскресенская Е.А., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Подладчикова О.Н., Писанов Р.В., Чеснокова М.В., Рыкова В.А., Кузнецова Д.А., Климов В.Т., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А. INDEL-типирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:102–109. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109

Поступила 14.11.2022. Принята к публ. 28.11.2022.

A.L. Trukhachev¹, M.G. Meloyan¹, E.A. Voskresenskaya², A.S. Vodop'yanov¹, S.O. Vodop'yanov¹,
O.N. Podladchikova¹, R.V. Pisanov¹, M.V. Chesnokova³, V.A. Rykova¹, D.A. Kuznetsova¹, V.T. Klimov³,
G.I. Kokorina², E.A. Bogumil'chik²

INDEL-Typing of *Yersinia pseudotuberculosis* Strains

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Pasteur Saint Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation;

³Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and the Far East, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to develop a new method of intraspecific genetic differentiation of *Yersinia pseudotuberculosis*, based on the detection of INDEL-markers using PCR. **Materials and methods.** Analyzed were 308 strains from the NCBI database and 15 strains sequenced within the frames of this study. The nucleotide sequences of the strains were determined using the MiSeq technology platform. The genomes of the strains sequenced in the work, as well as genomes from the NCBI database, were assessed using *in silico* PCR with 7 pairs of primers designed in the study. As a result of a comparison of genome-wide sequences of 22 *Y. pseudotuberculosis* strains from the NCBI database, using the author's software (GenExpert), 7 INDEL-markers were selected that make it possible to effectively distinguish between strains of the causative agent of pseudotuberculosis. Based on these markers, 7 pairs of primers were designed and synthesized for the analysis of different strains using PCR. Analysis of 323 strains in PCR *in silico* and 70 strains in PCR *in vitro* allowed for dividing them into 30 genetic groups. Comparison of the results of PCR *in silico* and *in vitro* confirmed the possibility of using the proposed primers for intraspecific differentiation of *Y. pseudotuberculosis*. Based on the data obtained, a dendrogram reflecting the phylogenetic relations of different strains of *Y. pseudotuberculosis* was constructed. When analyzing the distribution of *Y. pseudotuberculosis* strains by various clusters and genetic groups, a number of patterns were revealed. Conducted *in silico* and *in vitro* PCR show that the proposed method of INDEL-typing can be used for intraspecific genetic differentiation of the causative agent of pseudotuberculosis.

Key words: genotyping, *Y. pseudotuberculosis*, pseudotuberculosis, INDEL-markers.

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

Corresponding author: Aleksey L. Trukhachev, e-mail: trukhachev_al@antiplague.ru.

Citation: Trukhachev A.L., Meloyan M.G., Voskresenskaya E.A., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Podladchikova O.N., Pisanov R.V., Chesnokova M.V., Rykova V.A., Kuznetsova D.A., Klimov V.T., Kokorina G.I., Bogumil'chik E.A. INDEL-Typing of *Yersinia pseudotuberculosis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 4:102–109. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109

Received 14.11.2022. Accepted 28.11.2022.

Trukhachev A.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>
Meloyan M.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7268-9298>
Voskresenskaya E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>
Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>
Podladchikova O.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7178-2255>
Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Chesnokova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5489-9363>
Rykova V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3484-5100>
Kuznetsova D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4198-0629>
Klimov V.T., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>
Kokorina G.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1973-3138>
Bogumil'chik E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3181-4328>

Псевдотуберкулез – природно-очаговое инфекционное заболевание, которое регистрируют в различных регионах и климатических зонах мира. Этиологическим агентом псевдотуберкулеза является бактерия *Yersinia pseudotuberculosis*, которая вместе с близкородственной бактерией *Y. enterocolitica* относится к энтеропатогенным иерсиниям, ответственным за одну треть всех зоонозных кишечных инфекций в Европе [1]. В нашей стране на разных территориях периодически регистрируют вспышки этого заболевания, преимущественно в возрастной группе детей до 17 лет [2]. Штаммы *Y. pseudotuberculosis*, выделяемые в Российской Федерации и других странах мира, характеризуются генетическим разнообразием и при выделении новых штаммов важным является их генотипирование. Подобная внутривидовая дифференциация *Y. pseudotuberculosis* необходима не только для генетической паспортизации штаммов, но и для эпидемиологического анализа выделяемых культур и определения генетического разнообразия штаммов, выделенных на определенных территориях. В первых работах в этом направлении авторы разделяли исследованные штаммы по наличию хромосомных и плазмидных генов, имеющих отношение к вирулентности [3, 4]. В дальнейшем разными авторами предложено несколько различающихся по дискриминирующей способности методов генотипирования *Y. pseudotuberculosis*, которые могут быть использованы на этапах лабораторного исследования материала до проведения секвенирования. Эти методы включают риботипирование [5], IS-RFLP-типирование [6, 7], а также мультилокусный анализ полиморфизма варибельного числа tandemных повторов (MLVA – multiple loci variable number of tandem repeat polymorphism analysis) [8, 9]. Последний метод включен в Методические указания «Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях» (МУК 4.2.3019-12). Метод MLVA имеет высокую дифференцирующую способность и прост в исполнении. Однако в ряде случаев дифференцировать генотипы с помощью MLVA довольно сложно, так как различия в количестве tandemных повторов у штаммов могут быть минимальны и тогда необходимо использовать другие методы. Эффективное разделение штаммов по генотипам было проведено путем анализа данных их полногеномного секвенирования. При этом результаты секвенирования анализировались с помощью определения однонуклеотидных по-

лиморфизмов (SNP – single-nucleotide polymorphism) [10, 11] и сравнения коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeat) [12, 13]. Альтернативой полногеномному секвенированию для генотипирования *Y. pseudotuberculosis* является метод мультилокусного секвенирования-типирования (MLST – multi-locus sequence typing), основанный на определении структуры главным образом генов «домашнего хозяйства» [14, 15]. Однако в силу экспериментальных сложностей эти методы доступны далеко не всем диагностическим лабораториям. Для решения задачи эффективной внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis* необходима разработка простых и доступных в лабораториях различного уровня методов генетической дифференциации, которые позволят получать важную для специалистов информацию о генетической характеристике выделяемых штаммов возбудителя псевдотуберкулеза. В настоящей работе в геномах штаммов, выделенных в различных географических зонах и имеющих различные серотипы, проведен поиск небольших делеций и инсерций (indel-мутации) и оценка возможности их использования в качестве INDEL-маркеров, характерных для разных групп штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Цель исследования – разработка нового способа внутривидовой генетической дифференциации *Y. pseudotuberculosis*, основанного на выявлении INDEL-маркеров с помощью ПЦР.

Материалы и методы

В работе использованы 70 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенные на различных территориях мира. Из 70 штаммов 60 выделены в России, 10 штаммов – в Германии, Франции, Японии.

Для анализа геномов широкого набора штаммов *Y. pseudotuberculosis* использовали нуклеотидные последовательности 308 штаммов различных серотипов, выделенных в разных регионах России и мира и представленных в базе данных NCBI.

Биоинформационный анализ геномов *Y. pseudotuberculosis* и конструирование праймеров для выявления INDEL-маркеров. Анализ INDEL-маркеров среди всех имеющихся в нашем распоряжении нуклеотидных последовательностей секвенированных штаммов проводился с помощью двух авторских компьютерных программ: GenExpert и ContigSearcher. GenExpert позволяет при последо-

вательном фрагментарном анализе всех генов сравниваемых штаммов иерсиний выявлять в них инсерционные и делеционные мутации (indel-мутации). ContigSearcher проводит поиск среди нуклеотидных последовательностей штаммов микроорганизмов, представленных в виде контигов, любых нуклеотидных последовательностей и генов. В результате такого анализа в геномах разных штаммов выявлены участки ДНК, которые использованы в качестве INDEL-маркеров для генотипирования штаммов псевдотуберкулезного микроба.

Конструирование олигонуклеотидных праймеров для выявления INDEL-маркеров в ПЦР проводилось на основе полногеномных нуклеотидных последовательностей разных штаммов с помощью специализированных компьютерных программ Vector NTI9 (Invitrogen) и BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Сконструированные праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия) и ЗАО «Евроген» (Москва, Россия).

Филогенетические связи использованных в работе штаммов *Y. pseudotuberculosis* определены путем построения дендрограмм на основе сравнительного анализа их INDEL-маркеров с помощью авторской программы «Астролябия». Способ распределения штаммов основан на методе UPGMA (метод невзвешенного попарного среднего – unweighted pair-group method using arithmetic averages).

Выделение, секвенирование и ПЦР-анализ ДНК *Y. pseudotuberculosis*. Для секвенирования ДНК 15 имеющихся в нашем распоряжении штаммов из микробных клеток выделяли ДНК, используя набор для выделения ДНК «Проба НК» (ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия). Определение нуклеотидных последовательностей штаммов проводили при использовании технологической платформы MiSeq (Illumina, www.illumina.com). Библиотеки го-

товили с помощью коммерческого набора Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina). Для секвенирования полученных библиотек использовали набор картриджей MiSeq v.2 Reagents Kit 300 Cycles PE (Illumina). Результаты секвенирования представлены в виде набора ридов, содержащих текстовые файлы двух типов (fasta и fastaQ), которые использовали для сборки геномов *de novo* или на референсном штамме *Y. pseudotuberculosis* IP32953.

Анализ геномов секвенированных в работе штаммов, а также геномов из базы данных NCBI проводили методом ПЦР *in silico* с 7 парами сконструированных в работе праймеров. При этом использовали авторскую программу VirtualPCR, разработанную для проведения виртуальной ПЦР. ПЦР проводили в стандартной комплектации реакционной смеси, используя температурный режим, который определен исходя из структуры синтезированных праймеров.

Результаты и обсуждение

С целью поиска инсерционных и делеционных мутаций (indel-мутаций), характерных для разных групп штаммов, проведен анализ полногеномных последовательностей *Y. pseudotuberculosis* с помощью авторской компьютерной программы GenExpert. Сравнительный анализ полных собранных геномов 22 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI позволил отобрать в них 7 генов, в которых содержались indel-мутации, различающиеся у разных штаммов. Вариабельные участки этих генов использованы в настоящем исследовании в качестве INDEL-маркеров различных групп штаммов псевдотуберкулезного микроба. Для выявления этих маркеров сконструированы 7 пар праймеров (табл. 1), обозначенных в соответствии с номерами генов в штамме *Y. pseudotuberculosis* YPIII (ps397, ps866,

Таблица 1 / Table 1

Праймеры, сконструированные для выявления INDEL-маркеров
Primers designed to identify INDEL-markers

Праймеры Primers		Последовательность праймера Primer sequence	Продукты амплификации (п.н.) Amplification products (b.p.)
ps397	F	GGGGCCACAAAAAGAGAGTT	115/79/97
	R	GTTTTACGCAGGAACCACT	
ps866	F	CACCGCCAGTGTGTGTCTAA	148/124/0
	R	TAACTCGGGCGACTGACAAC	
ps1105	F	CCGAACAGCATGCACAGA	72/81/0
	R	AACCTCTCGGGTGCTATTT	
ps1452	F	GCGAGGAAAATCTGATTGTGA	88/103/0
	R	CAGCGGCTACAATAGGGTGT	
ps1509	F	TGGCCGTGGCTTTTATTTAT	72/90
	R	GCCGGAGAATTCCTATTTT	
ps1779	F	TGGATTGATGGCGGTATCT	71/92
	R	CTGTAAAGGGGTATTGTTTCA	
ps1969	F	CTCCGATATTGATCCATTCCT	114/233/70/92/0
	R	GGTATCAATCGCCATTTCCT	

ps1105, ps1452, ps1509, ps1779, ps1969). Эти праймеры использованы в дальнейшей работе для генотипирования штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью ПЦР *in silico* и *in vitro*. С каждой парой праймеров разные штаммы давали различающиеся по длине ампликоны. При этом анализ структуры ампликонов не выявил в них последовательностей варьируемых тандемных повторов, которые могли бы потенциально обуславливать различие в величине ампликонов.

Сконструированные 7 пар праймеров использованы для тестирования в ПЦР *in silico* полных нуклеотидных последовательностей 323 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, различающихся по серотипу, источнику и месту выделения. Последовательности ДНК 308 штаммов взяты из базы данных NCBI, а 15 штаммов, имеющих в коллекции живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института, секвенированы в настоящем исследовании. В ре-

зультате ПЦР *in silico* с 7 парами праймеров получены различные сочетания фрагментов амплификации, характерные для каждого из исследованных штаммов. Сравнение набора ампликонов, образуемых разными штаммами, позволило распределить их по 30 генетическим группам (табл. 2). При этом каждый из штаммов можно отнести к определенной генетической группе (INDEL-типу). Большинство исследованных штаммов входило в генетические группы 1–5-го INDEL-типа, однако отдельные INDEL-типы представлены единичными штаммами.

Анализ 15 штаммов, секвенированных в данном исследовании, подтвердил идентичность результатов ПЦР *in silico* и *in vitro*, что позволяет сопоставлять результаты, полученные обоими методами. Исследование 70 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из коллекции живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института показало, что резуль-

Таблица 2 / Table 2

INDEL-генотипы 323 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, полученные при анализе результатов ПЦР *in silico*
INDEL-genotypes of 323 *Y. pseudotuberculosis* strains obtained through analyzing the results of *in silico* PCR

Количество штаммов Amount of strains	Размер ампликона с праймерами к INDEL-локусу (п.н.) Amplicon length with primers to INDEL-locus (b.p.)							INDEL-типы INDEL-types
	ps397	ps866	ps1105	ps1452	ps1509	ps1779	ps1969	
47	97	148	72	88	72	92	92	1
66	97	148	81	88	90	92	70	2
15	97	148	72	88	90	92	70	3
26	97	124	81	103	72	92	70	4
31	97	148	81	103	90	92	70	5
2	97	148	72	88	90	71	70	6
18	79	124	81	88	72	92	0	7
3	79	124	81	103	72	92	70	8
4	97	148	72	88	90	71	92	9
13	97	148	72	88	72	71	70	10
1	97	148	81	103	90	92	0	11
1	115	0	72	88	90	71	70	12
2	97	124	72	88	90	92	70	13
8	97	124	81	88	90	92	70	14
6	97	148	72	88	90	92	92	15
1	97	148	72	88	72	92	114	16
21	97	124	81	88	72	92	70	17
20	97	124	72	88	72	92	70	18
20	97	124	72	88	72	71	70	19
2	97	148	81	88	72	92	92	20
2	97	124	72	88	90	92	92	21
1	97	148	0	88	90	92	70	22
1	97	148	72	88	72	92	233	23
2	97	148	81	103	90	92	70	24
1	97	148	81	103	90	92	92	25
1	97	148	81	0	90	92	70	26
1	97	124	72	103	72	92	70	27
1	97	124	81	103	90	92	70	28
2	97	148	72	88	72	92	70	29
5	97	124	72	88	90	71	92	30

таты ПЦР *in vitro* с 7 парами праймеров позволяют отнести каждый из штаммов к определенному INDEL-типу. Большинство исследованных штаммов (60) представлено изолятами, выделенными на территории России из полевого материала и от больных. INDEL-типирование этих штаммов в ПЦР *in vitro* и 12 штаммов из базы данных NCBI в ПЦР *in silico* позволило определить основные генотипы штаммов, циркулирующих на территории России (табл. 3). Исследованные штаммы относились к 1, 2, 3, 4, 5, 9-му INDEL-типам, однако основная часть штаммов, имеющих серотип O:1b, принадлежала к 1-й INDEL-генетической группе. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1a входили в группы 2 и 5 INDEL-типов, а генетическая группа 3 объединяла штаммы серотипа O:3.

Для выяснения филогенетических связей исследованных штаммов полученные в ПЦР результаты проанализированы с помощью авторской программы «Астролябия». Для построения дендрограммы использованы ДНК 75 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, о которых имелась информация о серотипе и месте выделения. Программа построила филогенетическое дерево и распределила все исследованные штаммы по разным кластерам и генетическим группам (рисунок).

Можно отметить ряд закономерностей, выявленных при анализе распределения штаммов *Y. pseudotuberculosis* по различным кластерам и генетическим группам (рисунок). Распределение по генетическим кластерам было связано с серотипом штамма за некоторыми исключениями. Так, штаммы

Таблица 3 / Table 3

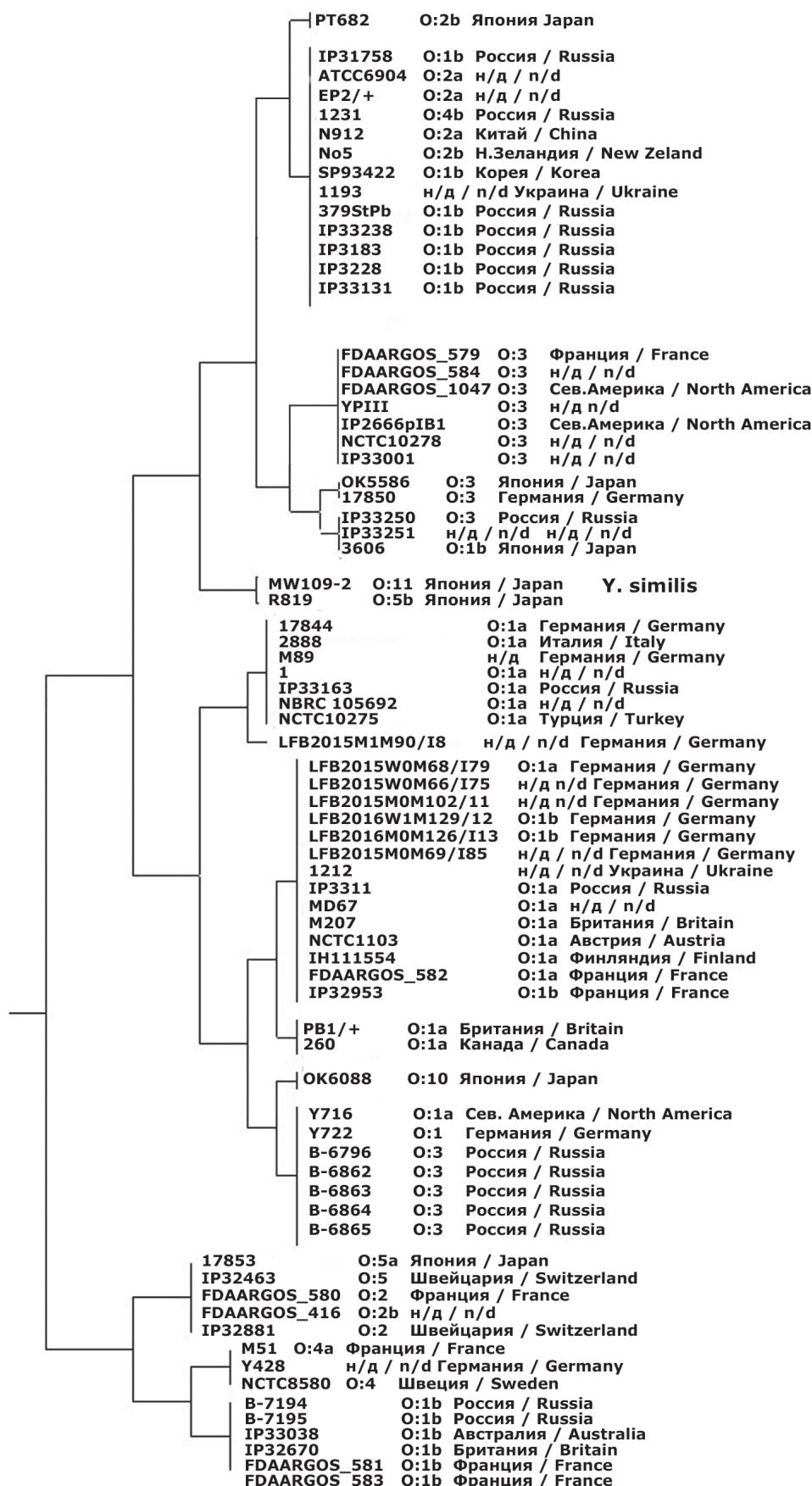
Результаты INDEL-типирования с помощью ПЦР *in silico* и *in vitro* штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории России

In silico and in vitro PCR results of INDEL-typing of *Y. pseudotuberculosis* strains isolated in Russia

Количество штаммов / название штамма Amount of strains / name of a strain	Серовар Serovar	Место выделения Site of isolation	Год выделения Year of isolation	INDEL-тип INDEL-type
12	O:1b	Россия, Санкт Петербург Russia, Saint-Petersburg	2000	1
1	O:1a	Россия, г. Зима Russia, Zima	1998	5
18	O:1b	Россия, г. Зима Russia, Zima	1999–2000	1
1	O:1b	Россия, Горно-Алтайск Russia, Gorno-Altaysk	1993	1
1	O:1a	Россия, Великий Новгород Russia, Veliky Novgorod	н/д n/d	2
8	O:1b	Россия, Томск Russia, Tomsk	2021	1
9	O:1b	Россия, Красноярск Russia, Krasnoyarsk	2021	1
9	O:1b	Россия, Новый Уренгой Russia, Novy Urengoy	2007	1
3*	O:3	Россия, Ставропольский край Russia, Stavropol Territory	1940–1961	3
2*	O:3	Россия, Ленинградская область Russia, Leningrad Region	1955	3
B-7194*	O:1b	Россия Russia	н/д n/d	4
B-7195*	O:1b	Россия Russia	1975	4
IP33177*	O:1b	Россия Russia	н/д n/d	1
IP33250*	O:3	Россия Russia	н/д n/d	9
1231*	O:4b	Россия Russia	1985	1
IP 31758*	O:1b	Россия Russia	1966	1
379StPbP1*	O:1b	Россия Russia	2000	1

Примечание: *сведения о штаммах из базы данных NCBI; н/д – нет данных.

Note: *information about the strains from NCBI database; n/d – no data.



Дендрограмма филогенетических связей 74 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, построенная на основе данных распределения семи INDEL-маркеров

Dendrogram of phylogenetic relations between 74 *Y. pseudotuberculosis* strains, built on the basis of the data on the distribution of seven INDEL-markers

серотипа O:1b объединялись в большие кластеры, содержащие преимущественно штаммы этого серотипа. Штаммы серотипа O:1a входили в три генетических кластера, а штаммы серотипа O:3 – в четыре кластера, в двух из которых находилось по одному штамму других серотипов. Отмечается тенденция распределения штаммов *Y. pseudotuberculosis* по кластерам также и в зависимости от места выделения штамма, хотя во многих генетических группах присутствуют штаммы, выделенные на различных континентах. Тем не менее штаммы, выделенные в Европе, попадали в кластеры, содержащие преимущественно штаммы из этой же географической зоны. Штаммы, выделенные в Азии, находятся в других кластерах, однако и в «европейской», и в «азиатской» группах присутствуют единичные штаммы, выделенные на других территориях, но сходные по генотипу. Это возможно объяснить заносом штаммов из Азии в Европу и из Европы в Азию. В нашем исследовании есть несколько таких примеров. Один штамм из Украины – *Y. pseudotuberculosis* 1212 – попал в кластер филогенетического дерева вместе со штаммами из Германии, Великобритании, Финляндии, Франции, России и Австрии, а второй штамм из Украины – *Y. pseudotuberculosis* 1193 – оказался в одном кластере со штаммами из Японии, Кореи, России, Китая, Новой Зеландии.

Такая же закономерность прослеживается и в отношении штаммов, выделенных в России. Большинство российских штаммов, выделенных в последние годы от больных и относящихся к серотипу O:1b, принадлежат к одному 1-му INDEL-типу и имеют близкие филогенетические связи с азиатскими штаммами. Штаммы серовара O:1a, выделенные на территории России, попали в генетические кластеры, содержащие европейские штаммы. Помимо одного украинского штамма, к штаммам европейского типа можно отнести российские штаммы IP33111, IP33122, а также штамм IP33163, который попал в другой генетический кластер, содержащий штаммы из Германии, Италии и Турции. Два штамма – R819 и MW109-2 – из Японии, относятся к виду *Y. similis* и входят в одну INDEL-группу и один кластер на дендрограмме.

Таким образом, проведенное исследование 323 штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью ПЦР *in silico* и *in vitro* показало, что предложенный способ INDEL-типирования может быть использован для внутривидовой генетической дифференциации возбудителя псевдотуберкулеза. Этот способ не уступает по разрешающей способности и воспроизводимости более сложным и трудоемким методам генотипирования. В результате исследования установлено, что на территории России выделяются штаммы, относящиеся к 1, 2, 3, 4, 5, 9-му INDEL-типам, которые могут быть отнесены как к азиатским, так и европейским группам штаммов. Распределение штаммов по генотипам и кладам филогенетического дерева, построенного при ана-

лизе результатов INDEL-генотипирования, в большинстве случаев коррелирует с местом выделения и серотипом штаммов.

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

Список литературы

1. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSAJ*. 2016; 14(12):4634. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4634.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2021. 256 с.
3. Воскресенская Е.А., Бургасова О.А. Методы генетического типирования *Yersinia pseudotuberculosis*. *Инфекционные болезни*. 2011; 9(2):81–8.
4. Каримова Т.В., Климов В.Т., Чеснокова М.В. Молекулярно-биологическая характеристика *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2016; 1(3-1):60–4.
5. Voskressenskaya E., Leclercq A., Tseneva G., Carniel E. Evaluation of ribotyping as a tool for molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains of worldwide origin. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(12):6155–60. DOI: 10.1128/JCM.43.12.6155-6160.2005.
6. Torrea G., Chenal-Francisque V., Leclercq A., Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(6):2084–92. DOI: 10.1128/JCM.02618-05.
7. Voskressenskaya E., Savin C., Leclercq A., Tseneva G., Carniel E. Typing and clustering of *Yersinia pseudotuberculosis* isolates by restriction fragment length polymorphism analysis using insertion sequences. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(6):1978–89. DOI: 10.1128/JCM.00397-14.
8. Halkilahti J., Haukka K., Siitonen A. Genotyping of outbreak-associated and sporadic *Yersinia pseudotuberculosis* strains by novel multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). *J. Microbiol. Methods*. 2013; 95(2):245–50. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.09.007.
9. Евсеева В.В., Платонов М.Е., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Типирование *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью мультислокусного анализа варибельного числа тандемных повторов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:55–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-55-57.
10. Zhgenti E., Hu P., Chanturia G., Tsereteli D., Kekelidze M., Chubinidze S., Zangaladze E., Imnadze P., Andersen G., Torok T. Investigation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains from Georgia and neighboring countries in the Caucasus by high-density SNP microarray. *Arch. Microbiol.* 2018; 200(9):1345–55. DOI: 10.1007/s00203-018-1545-8.
11. Джапарова А.К., Ерошенко Г.А., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Альхова Ж.В., Бердиев С.К., Кутырев В.В. Характеристика и филогенетический анализ штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* из Сарыджазского высокогорного очага в Тянь-Шане. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:87–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-87-93.
12. Seecharran T., Kalin-Manttari L., Koskela K., Nikkari S., Dickins B., Corander J., Skurnik M., McNally A. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Genom.* 2017; 3(10):e000133. DOI: 10.1099/mgen.0.000133.
13. Перетолчина Н.П., Климов В.Т., Воскресенская Е.А., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А., Трухачев А.Л., Игумнова С.В., Джигоев Ю.П., Злобин В.И. Локусный состав CRISPR-CAS системы *Yersinia pseudotuberculosis* различных генетических вариантов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020; 19(2):31–9. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-31-39.
14. Hall M., Chattaway M.A., Reuter S., Savin C., Strauch E., Carniel E., Connor T., Van Damme I., Rajakaruna L., Rajendram D., Jenkins C., Thomson N.R., McNally A. Use of whole-genome sequence data to develop a multilocus sequence typing tool that accurately identifies *Yersinia* isolates to the species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(1):35–42. DOI: 10.1128/JCM.02395-14.
15. Duan R., Liang J., Shi G., Cui Z., Hai R., Wang P., Xiao Y., Li K., Qiu H., Gu W., Du X., Jing H., Wang X. Homology analysis of

pathogenic *Yersinia* species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(1):20–9. DOI: 10.1128/JCM.02185-13.

References

1. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSAJ.* 2016; 14(12):4634. DOI: 10.2903/j.efs.2016.4634.
2. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2020: State Report]. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumers Rights Protection and Human Well-being; 2021. 256 p.
3. Voskresenskaya E.A., Burgasova O.A. [Methods of genetic typing of *Yersinia pseudotuberculosis*]. *Infektsionnye Bolezni [Infectious Diseases]*. 2011; 9(2):81–8.
4. Karimova T.V., Klimov V.T., Chesnokova M.V. [Molecular-biological characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* isolated in Siberia and the Far East]. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016; 1(3-1):60–4.
5. Voskresenskaya E., Leclercq A., Tseneva G., Carniel E. Evaluation of ribotyping as a tool for molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains of worldwide origin. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(12):6155–60. DOI: 10.1128/JCM.43.12.6155-6160.2005.
6. Torrea G., Chenal-Francisque V., Leclercq A., Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(6):2084–92. DOI: 10.1128/JCM.02618-05.
7. Voskresenskaya E., Savin C., Leclercq A., Tseneva G., Carniel E. Typing and clustering of *Yersinia pseudotuberculosis* isolates by restriction fragment length polymorphism analysis using insertion sequences. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(6):1978–89. DOI: 10.1128/JCM.00397-14.
8. Halkilahti J., Haukka K., Siitonen A. Genotyping of outbreak-associated and sporadic *Yersinia pseudotuberculosis* strains by novel multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). *J. Microbiol. Methods*. 2013; 95(2):245–50. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.09.007.
9. Evseeva V.V., Platonov M.E., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [*Yersinia pseudotuberculosis* typing using multi-locus variable-number tandem repeat analysis]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (4):55–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-55-57.
10. Zhgenti E., Hu P., Chanturia G., Tsereteli D., Kekelidze M., Chubinidze S., Zangaladze E., Imnadze P., Andersen G., Torok T. Investigation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains from Georgia and neighboring countries in the Caucasus by high-density SNP microarray. *Arch. Microbiol.* 2018; 200(9):1345–55. DOI: 10.1007/s00203-018-1545-8.
11. Dzhaparova A.K., Eroshenko G.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Al'khova Z.V., Berdiev S.K., Kutyrev V.V. [Characteristics and phylogenetic analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* strains from the

Sarydzhas high-mountain focus in the Tien-Shan]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (2):87–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-87-93.

12. Seecharran T., Kalin-Manttari L., Koskela K., Nikkari S., Dickins B., Corander J., Skurnik M., McNally A. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Genom.* 2017; 3(10):e000133. DOI: 10.1099/mgen.0.000133.
13. Peretolchina N.P., Klimov V.T., Voskresenskaya E.A., Kokorina G.I., Bogumilchik E.A., Trukhachev A.L., Igumnova S.V., Dzhioev Y.P., Zlobin V.I. [CRISPR-CAS loci of *Yersinia pseudotuberculosis* strains with different genetic determinants]. *Epidemiologiya i Vaksinooprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2020; 19(2):31–9. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-31-39.
14. Hall M., Chattaway M.A., Reuter S., Savin C., Strauch E., Carniel E., Connor T., Van Damme I., Rajakaruna L., Rajendram D., Jenkins C., Thomson N.R., McNally A. Use of whole-genome sequence data to develop a multilocus sequence typing tool that accurately identifies *Yersinia* isolates to the species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(1):35–42. DOI: 10.1128/JCM.02395-14.
15. Duan R., Liang J., Shi G., Cui Z., Hai R., Wang P., Xiao Y., Li K., Qiu H., Gu W., Du X., Jing H., Wang X. Homology analysis of pathogenic *Yersinia* species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(1):20–9. DOI: 10.1128/JCM.02185-13.

Authors:

Trukhachev A.L., Meloyan M.G., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Podladchikova O.N., Pisanov R.V., Rykova V.A., Kuznetsova D.A. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.
 Voskresenskaya E.A., Kokorina G.I., Bogumil'chik E.A. Pasteur Saint Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14, Mira St., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.
 Chesnokova M.V., Klimov V.T. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Трухачев А.Л., Мелоян М.Г., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Подладчикова О.Н., Писанов Р.В., Рыкова В.А., Кузнецова Д.А. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.
 Воскресенская Е.А., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.
 Чеснокова М.В., Климов В.Т. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилессера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-110-116

УДК 616.98:579.842.23

М.Б. Ярыгина¹, С.А. Витязева¹, В.М. Корзун¹, Х. Тунгалаг², Д. Цэрэнноров², С.В. Балахонов¹**Пространственная MLVA25-генотипическая структура *Yersinia pestis* ssp. *pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы**¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ²Национальный центр зоонозных инфекций, Улан-Батор, Монголия

Для осуществления эпидемиологического надзора за чумой в Сайлюгемском природном очаге совместно с монгольскими специалистами внедрены и применяются современные молекулярно-генетические методы диагностики и типирования *Yersinia pestis* ssp. *pestis* в полевом и клиническом материале. **Цель** работы – изучить пространственную генотипическую структуру *Y. pestis* ssp. *pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы методом MLVA25-типирования. **Материалы и методы.** Проведено MLVA25-типирование 160 штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, изолированных в Сайлюгемском природном очаге чумы в 2012–2021 гг. Построение филогенетического древа осуществляли методами UPGMA и MST. **Результаты и обсуждение.** На основе кластерного анализа 25 VNTR-локусов штаммы *Y. pestis* ssp. *pestis*, изолированные в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы, дифференцированы на 15 MLVA-типов. Установлено, что исследуемые штаммы образуют однородный комплекс MLVA25-типов без выраженной географической структурированности их по семи пространственным группам. При анализе частоты встречаемости числа tandemных повторов по трем вариабельным локусам у штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* выявлено, что между выборками из монгольской и российской частей очага наблюдаются значимые различия. Наиболее выраженные различия пространственной генотипической структуры прослеживаются по локусу *yp4280ms62*.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, MLVA25-типирование, Сайлюгемский природный очаг чумы.

Корреспондирующий автор: Ярыгина Марина Борисовна, e-mail: migmarina78@mail.

Для цитирования: Ярыгина М.Б., Витязева С.А., Корзун В.М., Тунгалаг Х., Цэрэнноров Д., Балахонов С.В. Пространственная MLVA25-генотипическая структура *Yersinia pestis* ssp. *pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:110–116. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-110-116

Поступила 02.12.2022. Отправлена на доработку 06.12.2022. Принята к публ. 09.12.2022.

M.B. Yarygina¹, S.A. Vityazeva¹, V.M. Korzun¹, H. Tungalag², D. Tserennorov², S.V. Balakhonov¹***Yersinia pestis* ssp. *pestis* Spatial MLVA25 Genotypic Structure in the Transboundary Saylyugem Natural Plague Focus**¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation;²National Centre of Zoonotic Infections, Ulan-Bator, Mongolia

Abstract. Advanced molecular-genetic methods for the diagnosis and typing of *Yersinia pestis* ssp. *pestis* in the field and clinical material are used for epidemiological surveillance of plague in the Saylyugem natural focus. **The aim** of the work was to study the spatial genotypic structure of *Y. pestis* ssp. *pestis* in the transboundary Saylyugem natural plague focus using MLVA25 typing. **Materials and methods.** The MLVA25 typing of 160 strains of *Y. pestis* ssp. *pestis* isolated in the Saylyugem natural plague focus in 2012–2021 was carried out. Phylogenetic tree construction was performed with the help of UPGMA and MST methods. **Results and discussion.** The *Y. pestis* ssp. *pestis* strains isolated from the Saylyugem natural plague focus were differentiated into 15 MLVA types by the 25 VNTR loci cluster analysis. The studied strains form a homogeneous complex of MLVA25 types without marked geographical distribution across seven spatial groups. The analysis of the frequency of occurrence of the tandem repeats number for three variable loci of *Y. pestis* ssp. *pestis* strains shows the significant differences between the samples from the Mongolian and Russian parts of the Saylyugem natural plague focus. The most pronounced differences in spatial genotypic structure are traced through the *yp4280ms62* locus.

Key words: *Yersinia pestis*, MLVA25-typing, Saylyugem natural plague focus.

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

Corresponding author: Marina B. Yarygina, e-mail: migmarina78@mail.

Citation: Yarygina M.B., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Tungalag H., Tserennorov D., Balakhonov S.V. *Yersinia pestis* ssp. *pestis* Spatial MLVA25 Genotypic Structure in the Transboundary Saylyugem Natural Plague Focus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:110–116. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-110-116

Received 02.12.2022. Revised 06.12.2022. Accepted 09.12.2022.

Yarygina M.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7665-4367>
Vityazeva S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0959-4987>

Korzun V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1947-5252>
Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

В течение текущего столетия отмечается повышение эпизоотической активности ряда природных очагов чумы Центральной Азии [1–3], в том числе и трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы [4, 5].

Трансграничный Сайлюгемский природный очаг чумы расположен на севере центральноазиатской зоны природной очаговости чумы, включает в себя северную часть, которая находится в Российской Федерации – Горно-Алтайский высокогорный очаг,

и южную – в Монголии – Сайлюгемский природный очаг [5]. В настоящее время в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы наблюдается совместная циркуляция двух подвидов чумного микроба: *Yersinia pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*, основным носителем, которого является монгольская пищуха (*Ochotona pallasii*), и *Y. pestis* ssp. *pestis* – основной носитель серый сурок (*Marmota baibacina*) [4, 5].

Для осуществления эпидемиологического надзора за чумой в данном очаге совместно с монгольскими специалистами внедрены и применяются современные молекулярно-генетические методы диагностики и типирования в полевом и клиническом материале.

С помощью полногеномного секвенирования стало возможным проведение филогенетического анализа и определение микроэволюции и путей распространения чумного микроба [6, 7]. Филогенетический анализ методом SNP-типирования штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, изолированных в приграничных природных очагах чумы России и Монголии: Тувинском, Сайлюгемском (российская и монгольская части), Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирханском, – свидетельствует об их близком генетическом родстве и принадлежности к филогенетической линии 4.ANT [8]. Применение MLVA-типирования позволяет выявить особенности пространственной генотипической структуры *Y. pestis* как между разными природными очагами чумы, так и внутри одного очага [9–11].

Эпизоотические проявления, обусловленные *Y. pestis* ssp. *pestis*, регистрируются ежегодно: в российской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы с 2012 г., а в монгольской части – с 2017 г. [4, 5]. С 2012 по 2021 год в монгольской части Сайлюгемского очага выделено 110 штаммов чумного микроба, в российской – 163.

Цель работы – изучить пространственную генотипическую структуру *Y. pestis* ssp. *pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы при MLVA25-типировании.

Материалы и методы

В работе проанализировано 160 штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* (76 из монгольской части, 69,1 % от всех выделенных в ней, и 84, 51,5 %, – из российской), изолированных в Сайлюгемском природном очаге чумы при проведении эпизоотологического обследования в 2012–2021 гг. и эпидемиологического исследования эпидемических случаев в 2014–2016, 2019 гг., что составляет 58,6 % от их общего количества за этот период.

Для анализа пространственной структуры *Y. pestis* ssp. *pestis* условно выделили семь групп чумного микроба основного подвида на территории Сайлюгемского природного очага чумы, из них четыре в российской части очага: Уландрыкская,

Тархатинская, Талдуайрская, Джазаторская – и три в монгольской: Кок-Сайская, Цаган-Нуурская и Ойгорская. Места изоляции штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* представлены на рис. 1.

Из Уландрыкской группы исследовано 45 штаммов (46,9 % от всех выделенных в ней), из Тархатинской – 22 (84,6 %), Талдуайрской – 10 (41,6 %), Джазаторской – 7 (50 %), Цаган-Нуурской – 19 (67,8 %), Кок-Сайской – 16 (69,5 %), Ойгорской – 41 (69,5 %). По объектам выделения: от основного носителя *Y. pestis* ssp. *pestis* – серого сурка (*M. baibacina*) – изучено 128 штаммов (80 % от всего числа исследованных), от других млекопитающих (длиннохвостый суслик, степной хорь) – 5 (3,1 %), от основного переносчика – блохи *Oropsylla silantiewi* – 17 (10,6 %), от других эктопаразитов (*Oropsylla alaskensis*, *Paramonopsyllus scalonae*, вши) – 5 (3,1 %), от людей – 5 (3,1 %).

Получение геномной ДНК *Y. pestis* осуществляли методом J. Marmur [12] в нашей модификации. MLVA25-типирование проводили согласно [9, 13, 14]. Размер полученных ампликонов определяли методом капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABIPrism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США; Hitachi, Япония) путем сравнения с маркером молекулярного веса GeneScan™ 500 LIZ™ SizeStandard. Исходя из размера (в п.о.) получаемого ампликона, определяли число tandemных повторов в каждом из исследованных локусов. Построение филогенетического древа осуществляли методами UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, попарное невзвешенное кластирование с арифметическим усреднением) и MST (minimum spanning tree, минимальное остовное дерево) при помощи программного комплекса Bionumerics v7.6 (Applied Maths, Бельгия). Сравнение распределений проводили по критерию согласия.

Результаты и обсуждение

В результате MLVA25-анализа 160 исследованных штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* дифференцированы на 15 MLVA-типов, названных S1–S15 (рис. 2). Из них 2 – S8 и S9 – были уникальные (т.е. обнаруживались только у одного штамма в изученной выборке), 7 небольших по объему типов объединяли от 2 до 8 штаммов (S3, S4, S5, S6, S10, S15, S12, S14), в состав трех средних входили 11 (S13), 16 (S2) и 21 (S11) штамм, один крупный (S1) включал 70 штаммов (таблица).

При анализе изменчивости локусов оказалось, что 22 из них не вариабельны (рис. 2). По двум локусам изменчивость очень низкая; редкими аллелями по локусу *yp2769ms06* оказались 7 повторов, *yp1335ms46* – 18 повторов. По локусу *yp4280ms62* наблюдается выраженное разнообразие.

Результаты кластерного анализа показали, что 159 штаммов образуют один кластер A, но следует отметить, что один штамм *Y. pestis* ssp. *pestis*

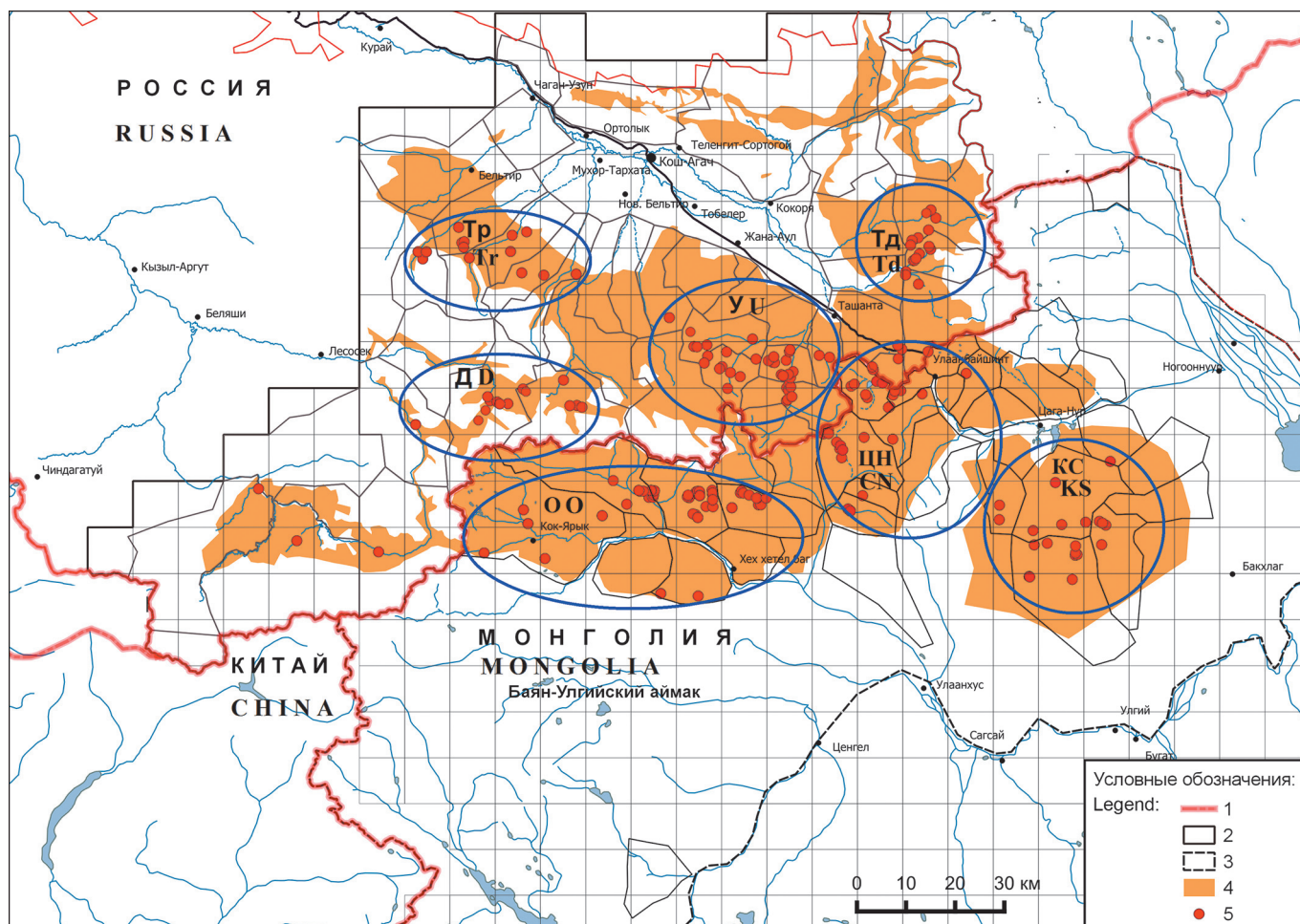


Рис. 1. Места изоляции *Y. pestis* ssp. *pestis* в российской и монгольской частях трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы.

У – Уландрыкская пространственная группа возбудителя чумы; Тр – Тархатинская; Тл – Талдуайская; Д – Джазаторская; КС – Кок-Сайская; ЦН – Цаган-Нуурская; О – Ойгорская; 1 – государственная граница; 2 – граница российской части Сайлюгемского природного очага чумы; 3 – граница монгольской части Сайлюгемского природного очага чумы; 4 – область распространения серого сурка; 5 – точки изоляции *Y. pestis* ssp. *pestis*

Fig. 1. Sites of *Y. pestis* ssp. *pestis* isolation in the Russian and Mongolian parts of the transboundary Saylyugem natural plague focus:

U – Ulandryk; Tr – Tarkhatin; Tl – Talduair; D – Dzhazator; KS – Kok-Sai; TN – Tsagan-Nuur; O – Oigor; 1 – State border; 2 – the border of the Russian part of the Saylyugem natural plague focus; 3 – the border of the Mongolian part of the Saylyugem natural plague focus; 4 – the area of gray marmot dissemination; 5 – Sites of *Y. pestis* ssp. *pestis* isolation

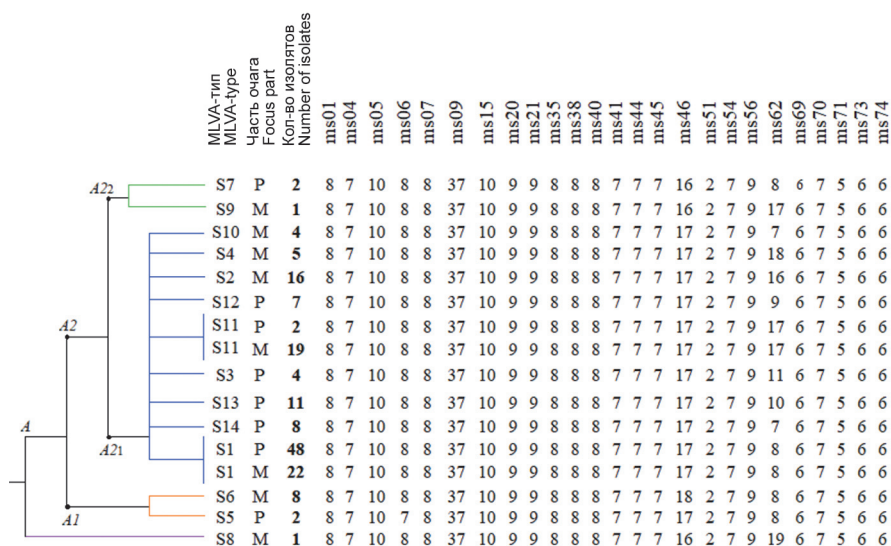


Рис. 2. Схема MLVA25-типов, обнаруженных у 160 штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, изолированных в российской и монгольской частях Сайлюгемского природного очага чумы:

P – российская часть, в которой изолированы штаммы; M – монгольская часть

Fig. 2. The scheme of MLVA25 types found in 160 strains of *Y. pestis* ssp. *pestis* isolated in the Russian and Mongolian parts of the Saylyugem natural plague focus:

R – the Russian part of the focus in which the strains were isolated; M – the Mongolian part

Характеристика MLVA25-типов *Y. pestis ssp. pestis* в Сайлюгемском природном очаге чумы по месту и времени изоляции штаммов
Characteristics of *Y. pestis ssp. pestis* MLVA25-types in the Saylyugem natural plague focus by place and time of strain isolation

MLVA25-тип MLVA25-type	Часть Сайлюгемского очага чумы (число штаммов) The part of the Saylyugem natural plague focus (number of strains)	Год выделения Years of isolation
S1	Российская часть (48) / the Russian part (48) Монгольская часть (22) / the Mongolian part (22)	2012, 2015–2019
S2	Монгольская часть (16) / the Mongolian part (16)	2018
S3	Российская часть (1) / the Russian part (1)	2015
S4	Монгольская часть (5) / the Mongolian part (5)	2019
S5	Российская часть (2) / the Russian part (2)	2014
S6	Монгольская часть (8) / the Mongolian part (8)	2017
S7	Российская часть (1) / the Russian part (1)	2015
S8	Монгольская часть (1) / the Mongolian part (1)	2019
S9	Монгольская часть (1) / the Mongolian part (1)	2019
S10	Монгольская часть (4) / the Mongolian part (4)	2019
S11	Российская часть (2) / the Russian part (2) Монгольская часть (19) / the Mongolian part (19)	2017–2019
S12	Российская часть (4) / the Russian part (4)	2016
S13	Российская часть (11) / the Russian part (11)	2015, 2016
S14	Российская часть (8) / the Russian part (8)	2015, 2016
S15	Российская часть (7) / the Russian part (7)	2015–2017

(генотип S8), изолированный в 2019 г. в монгольской части очага, расположен отдельно (рис. 2). Кластер A включает в себя два подкластера (A1 и A2). В A1 вошли 10 штаммов чумного микроба основного подвида, из них 2 (S5) изолированы в российской части очага (Тархатинский мезоочаг) в 2014 г., выделенные от человека и серого сурка при расследовании эпидслучая, и 8 (S6) – в монгольской (по четыре из Цаган-Нуурской и Кок-Сайской групп) при эпизоотологическом обследовании в 2017 г. (рис. 2, 3). Подкластер A2 состоит из двух ветвей: A2₁ – включает 146 штаммов *Y. pestis ssp. pestis*, из них 66 выделены на территории Монголии (2018, 2019 гг.) и 80 – в России (2012, 2015–2018 гг.); A2₂ – включает три изолята чумного микроба, причем один из них имеет свой уникальный генотип S9, выделенный в Ойгорской группе монгольской части Сайлюгемского очага в 2019 г. Генотип S7 включает штаммы, изолированные в 2015 г. в Талдуайской группе российской части очага.

Ветвь A2₁ включает в себя девять генотипов, в том числе два самых крупных по составу генотипа – S1 и S11. Генотип S1 содержит 70 штаммов, из них 48 выделены в российской части очага (в 70 % случаях от основного носителя) и 22 – в монгольской части, включая два штамма, изолированные от людей. Этот генотип наиболее гетерогенный по составу, так как содержит штаммы из всех семи пространственных групп, при этом наибольшее их количество изолировано в российской части – в Уландрыкской группе (48,6 %), в монгольской – в Цаган-Нуурской группе (14,3 %).

Генотип S11 состоит из 21 штамма. Следует отметить, что 19 выделены в трех пространственных группах монгольской части очага в 2018–2019 гг.: из Ойгорской группировки 76,2 % от общего ко-

личества штаммов этого генотипа, Кок-Сайской – 9,5 % и Цаган-Нуурской – 4,8 %. Из российской части (Джазатовская группа) вошли только 2 штамма (9,5 %).

Генотипы S2, S4 и S10 включают штаммы, полученные в монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. При этом в генотипах S2 и S10 наибольшее количество штаммов из Ойгорской группы (75 и 100 % соответственно), S4 – из Цаган-Нуурской (60 %).

Генотипы S3, S12–S14 содержат штаммы, выделенные в российской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. Следует отметить, что генотип S3 содержит 4 штамма, выделенные от человека и серого сурка при расследовании эпидслучая в 2016 г. В генотип S12 вошли 8 штаммов из Уландрыкской группы; S13 – 10 штаммов, из которых 9 изолированы в Тархатинской группе; S14 включает 5 штаммов из Талдуайской и 3 из Уландрыкской групп.

Таким образом, показано, что в целом наблюдается низкая изменчивость по VNTR-локусам и выделяется однородный комплекс MLVA25-типов штаммов чумного микроба, и наглядно продемонстрировано отсутствие выраженной географической структурированности штаммов по их пространственным группам. Для рассмотрения особенностей генотипической структуры *Y. pestis ssp. pestis* на территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы проведена сравнительная оценка частоты встречаемости аллелей в трех изменчивых локусах между штаммами, изолированными в российской и монгольской частях очага (рис. 4).

Наиболее слабые различия между сравниваемыми выборками наблюдаются по локусу *yp2769ms06* (рис. 4). В изучаемых совокупностях в основном

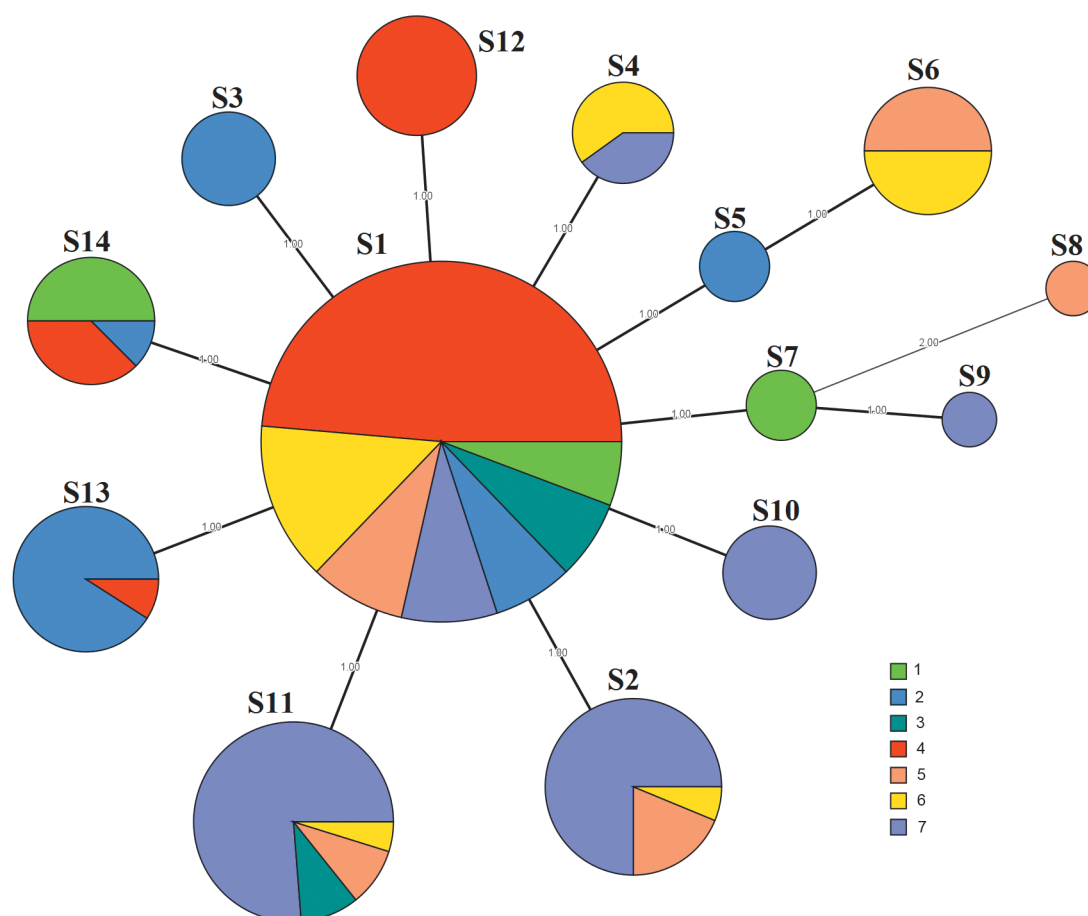


Рис. 3. Минимальное остовное дерево (MST), построенное на основании данных MLVA25-типирования 160 штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, изолированных на российской и монгольской территориях Сайлюгемского природного очага чумы:

S1–S14 – MLVA25-типы, размер круга показывает число штаммов; 1–4 – штаммы, выделенные в разных пространственных группах российской части очага; 5–7 – монгольской части очага: 1 – Талдуайская группа; 2 – Тархатинская; 3 – Джазаторская; 4 – Уландрыкская; 5 – Кок-Сайская; 6 – Цаган-Нуурская; 7 – Ойгорская группа

Fig. 3. Minimum spanning tree (MST) based on MLVA25 typing of 160 strains of *Y. pestis* ssp. *pestis* isolated in the Russian and Mongolian territory of the Saylyugem natural plague focus:

S1–S14 are MLVA25 types, the size of the circle indicates the number of strains; 1–4 – the strains isolated in different spatial groups of the Russian part of the focus; 5–7 – the strains from the Mongolian part of the focus: 1 – Talduair group; 2 – Tarkhatin; 3 – Dzhazator; 4 – Ulandryk; 5 – Kok-Sai; 6 – Tsagan-Nuur; 7 – Oigor group

представлены аллели с 8 повторами как на российской, так и на монгольской территориях очага. Тем не менее различия между ними статистически значимы ($\chi^2=4,5$; $P<0,05$).

В локусе *yp1335ms46* в обеих частях Сайлюгемского природного очага чумы преимущественно обнаруживаются 17 tandemных повторов. При этом 18 повторов выявлены только на монгольской части, на российской они не встречались (рис. 4). Различия между анализируемыми выборками высоко достоверны ($\chi^2=12,9$; $P<0,01$).

Ярко выражена неоднородность выборок из двух частей природного очага чумы по локусу *yp4280ms62*. На российской территории очага абсолютно преобладали 8 повторов (61,9 %). На монгольской части природного очага чумы – 16–17 повторов. Следует отметить, что 18–19 повторов выявлялись только на монгольской части Сайлюгемского очага. Наоборот, 9–11 повторов обнаруживались только на российской части очага (рис. 4). Различия между

штаммами из российской и монгольской частей очага высоко достоверны ($\chi^2=65,7$; $P<0,001$).

Сравнение частот аллелей по трем изменчивым локусам показало, что по каждому из них отличия между выборками штаммов из разных частей Сайлюгемского природного очага чумы характеризуются своими индивидуальными особенностями. При этом локус *yp4280ms62* является основным для пространственной дифференциации *Y. pestis* ssp. *pestis* внутри очага при MLVA25-типировании.

Изложенные результаты MLVA25-типирования показывают низкую изменчивость *Y. pestis* ssp. *pestis* из Сайлюгемского природного очага чумы по 25 VNTR-локусам в пространственных группах. Это характерно для «молодых», относительно недавно образовавшихся групп штаммов на определенной географической территории [11]. J.M. Girard *et al.* [15] предполагают, что кластеризация похожих генотипов в географическом пространстве является первоначальным распространением чумного микро-

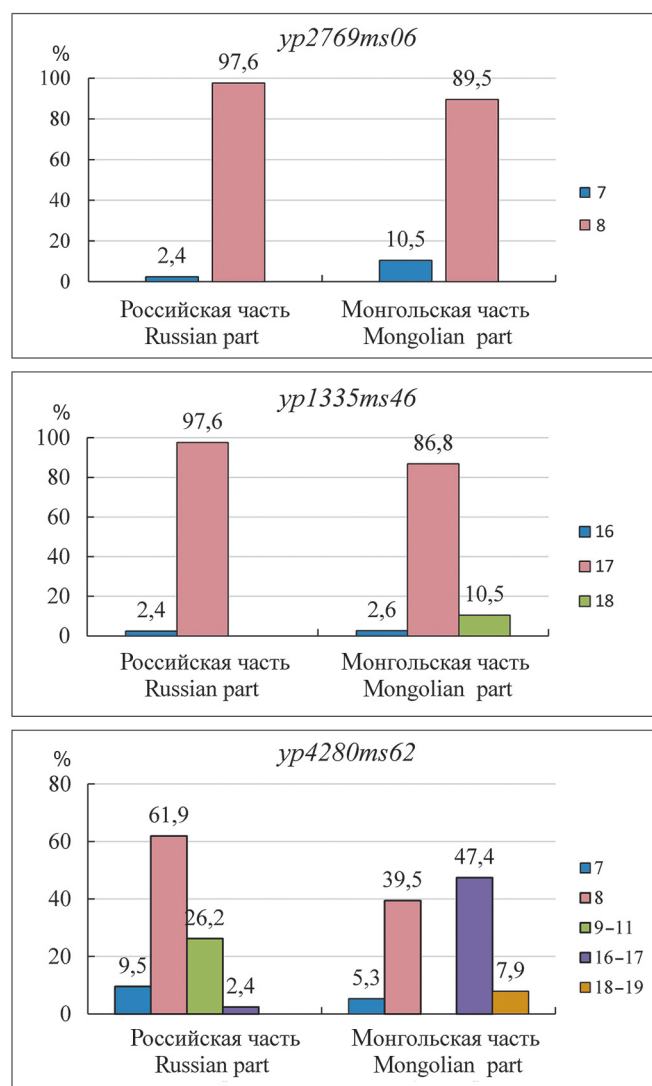


Рис. 4. Частота встречаемости числа tandemных повторов по трем варибельным локусам у штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* Сайлюгемского природного очага чумы

Fig. 4. Frequency of occurrence of tandem repeats at three variable loci in *Y. pestis* ssp. *pestis* strains in the Saylyugem natural plague focus

ба по всему ландшафту. Данный процесс происходил довольно быстро и, возможно, включал один общий генотип, который позже дифференцировался в пределах локальных популяций. Это прослеживается в нашем исследовании, где наибольшее количество штаммов вошли в один генотип (S1), и следует отметить, что он включает изоляты за весь анализируемый период, кроме 2014 г., из всех семи пространственных групп. Далее с 2014 г. формировались небольшие по количеству штаммов генотипы, но имеющие четкую дифференциацию по месту выделения – в российской или монгольской частях очага.

Длительная циркуляция возбудителя на территории очага может приводить к дифференциации генотипической структуры в разных пространственных группах, что наглядно нами показано в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы у штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* [16].

Таким образом, установлено, что у штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, изолированных в трансграничном

Сайлюгемском природном очаге чумы, выявлена незначительная варибельность геномов в семи пространственных группах при MLVA25-типировании. Однако сравнение частот аллелей по трем варибельным локусам (*yp2769ms06*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*) у штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* показало, что между выборками из монгольской и российской частей очага наблюдаются различия, особенно значимые по локусу *yp4280ms62*.

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

Список литературы

1. Zhao S.S., Pulati Y., Yin X.P., Li W., Wang B.J., Yang K., Chen C.F., Wang Y.Z. Wildlife plague surveillance near the China-Kazakhstan border: 2012–2015. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(6):e48–e51. DOI: 10.1111/tbed.12603.
2. Wang P., Shi L., Zhang F., Guo Y., Zhang Z., Tan H., Cui Z., Ding Y., Liang Y., Liang Y., Yu D., Xu J., Li W., Song Z. Ten years of surveillance of the Yulong plague focus in China and the molecular typing and source tracing of the isolates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(3):e0006352. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006352.
3. Вержуцкий Д.Б. Активизация природных очагов чумы в Центральной Азии: беспочвенные опасения или реальная угроза. *Природа Внутренней Азии. Nature of Inner Asia.* 2018; 1:7–18. DOI: 10.18101/2542-0623-2018-1-7-18.
4. Корзун В.М., Чипанин Е.В., Денисов А.В., Курепина Н.Ю. Ареал и пространственная структура населения монгольской пищухи (*Ochotona pallasi*, Ochotonidae, Lagomorpha) в Юго-Восточном Алтае. *Байкальский зоологический журнал.* 2017; 1:72–82.
5. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях. Ижевск: ООО «Принт»; 2018. 336 с.
6. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francisque V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(51):17837–42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101.
7. 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. DOI: 10.1038/ng.705.
8. Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Краснов Я.М., Никифоров К.А., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Кутырев В.В. Природный мегаочаг основного подвида *Yersinia pestis* античного биовара филогенетической ветви 4.ANT в Горном Алтае. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; 2:49–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-49-56.
9. 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0006000.
10. Zhang X., Hai R., Wei J., Cui Z., Zhang E., Song Z., Yu D. MLVA distribution characteristics of *Yersinia pestis* in China and the correlation analysis. *BMC Microbiology.* 2009; 9:205. DOI: 10.1186/1471-2180-9-205.
11. Vogler A.J., Chan F., Wagner D.M., Roumagnac P., Lee J., Nera R., Eppinger M., Ravel J., Rahalison L., Rasomanana B.W., Beckstrom-Sternberg S.M., Achtman M., Chanteau S., Keim P. Phylogeography and molecular epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(9):e1319. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001319.
12. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 1961; 3:208–18. DOI: 10.1016/S0022-2836(61)80047-8.
13. 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.
14. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud 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.

15. Girard J.M., Wagner D.M., Vogler A.J., Keys C., Allender C.J., Drickamer L.C., Keim P. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004; 101(22):8408–13. DOI: 10.1073/pnas.0401561101.

16. Ярыгина М.Б., Корзун В.М., Балахонов С.В., Рождественский Е.Н., Денисов А.В. Генотипическая структура *Yersinia pestis* ssp. *central asiatica* биовара алтаика в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы при MLVA25-типировании. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 2:138–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-138-147.

References

1. Zhao S.S., Pulati Y., Yin X.P., Li W., Wang B.J., Yang K., Chen C.F., Wang Y.Z. Wildlife plague surveillance near the China-Kazakhstan border: 2012–2015. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(6):e48–e51. DOI: 10.1111/tbed.12603.

2. Wang P., Shi L., Zhang F., Guo Y., Zhang Z., Tan H., Cui Z., Ding Y., Liang Y., Liang Y., Yu D., Xu J., Li W., Song Z. Ten years of surveillance of the Yulong plague focus in China and the molecular typing and source tracing of the isolates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(3):e0006352. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006352.

3. Verzhutsky D.B. [Activation of natural plague foci in Central Asia: groundless fears or a real threat]. *Priroda Vnutrenney Azii. [Nature of Inner Asia]*. 2018; 1:7–18. DOI: 10.18101/2542-0623-2018-1-7-18.

4. Korzun V.M., Chipanin E.V., Denisov A.V., Kurepina N.Yu. [Areal and spatial structure of the population of the Mongolian pika (*Ochotona pallasi*, Ochotonidae, Lagomorpha) in the South-Eastern Altai]. *Baikal'sky Zoologicheskyy Zhurnal [Baikal Zoological Journal]*. 2017; (1):72–82.

5. Popova A.Yu., Kutuyev V.V., editors. [Ensuring Epidemiological Welfare in Natural Plague Foci in the Territory of CIS Countries and Mongolia under Current Conditions]. Izhevsk: LLC "Print"; 2018. 336 p.

6. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francisque V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004; 101(51):17837–42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101.

7. 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. DOI: 10.1038/ng.705.

8. Eroshenko G.A., Popov N.V., Krasnov Y.M., Nikiforov K.A., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Kutuyev V.V. [Natural Mega-Focus of *Yersinia pestis* main subspecies, antique biovar, phylogenetic line 4.ANT in Gorny Altai]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (2):49–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-49-56.

9. 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0006000.

10. Zhang X., Hai R., Wei J., Cui Z., Zhang E., Song Z., Yu D. MLVA distribution characteristics of *Yersinia pestis* in China and the correlation analysis. *BMC Microbiology.* 2009; 9:205. DOI: 10.1186/1471-2180-9-205.

11. Vogler A.J., Chan F., Wagner D.M., Roumagnac P., Lee J., Nera R., Eppinger M., Ravel J., Rahalison L., Rasoamanana B.W., Beckstrom-Sternberg S.M., Achtman M., Chanteau S., Keim P. Phylogeography and molecular epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(9):e1319. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001319.

12. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 1961; 3:208–18. DOI: 10.1016/S0022-2836(61)80047-8.

13. 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.

14. 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.

15. Girard J.M., Wagner D.M., Vogler A.J., Keys C., Allender C.J., Drickamer L.C., Keim P. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004; 101(22):8408–13. DOI: 10.1073/pnas.0401561101.

16. Yarygina M.B., Korzun V.M., Balakhonov S.V., Rozhdestvensky E.N., Denisov A.V. [MLVA25-typed *Yersinia pestis* ssp. *central asiatica* biovar altaica genotype structure in Gorno-Altai mountain natural plague focus]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (2):138–147. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-138-147.

Authors:

Yarygina M.B., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Tungalag H., Tserennorov D. National Centre of Zoonotic Infections. Ulan-Bator, Mongolia, 18131.

Об авторах:

Ярыгина М.Б., Витязева С.А., Корзун В.М., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Тунгалаг Х., Цэрэнноров Д. Национальный центр зоонозных инфекций. Монголия, 18131, г. Улаанбаатар, Сонгинохайрхан микрорайон, 20 хоро.