

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

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАН

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

Цель исследования – филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из очагов чумы в России и сопредельных странах с помощью SNP-анализа полногеномных последовательностей этих штаммов. **Материалы и методы.** Проведено секвенирование геномов 14 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из 13 природных очагов чумы России и стран ближнего зарубежья и их сравнение с 9 штаммами этого биовара из базы данных NCBI GenBank. С помощью программ Wombac 2.0 и Bionumerics 7.1 выявлено наличие 1875 коровых SNPs, на основе которых построена дендрограмма филогенетических связей средневековых штаммов. **Результаты и выводы.** По данным полногеномного SNP-анализа установлено, что штаммы *Y. pestis* средневекового биовара из очагов чумы в России и стран ближнего зарубежья относятся к филогенетической линии 2.MED1 и делятся на две основные эволюционные ветви, первая из которых включает штаммы из регионов Кавказа и Прикаспия, а вторая – из Средней Азии и Китая. Полученные данные могут быть использованы для разработки молекулярно-генетических способов дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара.

Ключевые слова: возбудитель чумы, штаммы средневекового биовара, филогенетический анализ.

Корреспондирующий автор: Носов Никита Юрьевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

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

Phylogenetic Analysis of *Yersinia pestis* Strains of Medieval Biovar from Natural Plague Foci of the Russian Federation and Bordering Countries

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

Objective of the study is to conduct phylogenetic investigation of *Yersinia pestis* strains (medieval biovar) from plague foci of Russia and bordering countries, using SNP-analysis of the genome-wide sequences of these strains. **Materials and methods.** Carried out has been sequencing of 14 *Y. pestis* strains, medieval biovar, from 13 natural plague foci of Russia and neighboring states, as well as their comparison to 9 strains of the same biovar, contained in the NCBI GenBank database. Using software products – Wombac 2.0 and Bionumerics 7.1, revealed is the presence of 1875 core SNPs, on the basis of which a dendrogram of phylogenetic relations between medieval strains is constructed. **Results and conclusions.** In consequence of genome-wide SNP-analysis, it is established that *Y. pestis* strains, medieval biovar, from plague foci of Russia and bordering states are assigned to 2.MED1 phylogenetic line and fall under two major evolutionary branches, the first one of which includes strains from the Caucasus and Caspian-Sea regions, and the second one – from Central Asia and China. The data obtained can be used for the development of molecular-genetic methods for differentiation of *Y. pestis* strains, medieval biovar.

Key words: plague agent, strains of medieval biovar, phylogenetic analysis.

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

Corresponding author: Nikita Yu. Nosov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Nosov N.Yu., Oglodin E.G., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Phylogenetic Analysis of *Yersinia pestis* Strains of Medieval Biovar from Natural Plague Foci of the Russian Federation and Bordering Countries. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:75–78. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-75-78

Штаммы *Yersinia pestis* основного подвида средневекового биовара широко распространены в природных очагах чумы в Российской Федерации и в большинстве стран СНГ, в том числе они циркулируют в 7 из 11 очагов России [4]. Эти штаммы отличаются высокой вирулентностью и имеют высокую эпидемическую значимость. Считается, что штаммы средневекового биовара явились этиологическим агентом второй пандемии чумы под названием «Черная смерть», унесшей в средние века более трети населения Европы [2, 7]. Эпидемии и вспышки чумы, регистрировавшиеся в России вплоть до начала XX века, возможно, были вызваны штаммами средневекового биовара, и впоследствии отдельные случаи чумы на этой территории были также вызваны преимущественно штаммами средневекового биовара.

Считается, что штаммы средневекового биовара возникли незадолго до начала второй пандемии чумы, и что эта пандемия чумы началась в регионе Прикаспия [7]. Однако в последнее время это мнение оспаривается китайскими исследователями, которые считают, что штаммы средневекового биовара появились на территории Китая, откуда были занесены в Европу [10, 12].

Для штаммов *Y. pestis* средневекового биовара характерно значительное единообразие их свойств. Они не редуцируют нитраты, не ферментируют рамнозу, но ферментируют глицерин и арабинозу. В связи с «эволюционной молодостью» и генетической однородностью штаммы средневекового биовара с трудом поддаются внутрибиоварной дифференциации с помощью традиционных методов молекулярного типирования – анализа полиморфизма длин

рестрикционных фрагментов (IS-типирование, рибо-типирование), ПЦР-типирования, мультилокусного сиквенс-типирования [1, 3, 5, 9, 11]. Наибольшую разрешающую способность в отношении штаммов средневекового биовара имеет метод анализа вариабельного числа tandemных повторов, однако этот метод применялся для исследования ограниченного числа штаммов *Y. pestis* из природных очагов Российской Федерации и сопредельных стран [8]. По данным SNP-анализа полногеномных последовательностей, штаммы средневекового биовара зарубежного происхождения делятся на три филогенетические линии 2.MED1 (штаммы из Ирана и Китая), 2.MED2 и 2.MED3 (штаммы из Китая) [10, 13], Отечественными исследователями, по данным полногеномного секвенирования, установлено, что наиболее древние средневековые штаммы линии 2.MED0 циркулируют в Центрально-Кавказском высокогорном очаге чумы в России, что подтверждает гипотезу возникновения средневекового биовара в регионе Кавказа – Прикаспия [6]. В то же время филогенетическая принадлежность штаммов средневекового биовара из очагов России и сопредельных стран остается малоисследованной.

Целью этой работы был филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из очагов чумы в России и сопредельных стран с помощью SNP-анализа полногеномных последовательностей этих штаммов.

Материалы и методы

В работе использовано 14 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из 13 природных очагов России и других стран СНГ (таблица). Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб». Выделение ДНК штаммов проводили с помощью набора AxyPrep производства AXYGEN Biosciences. Для секвенирования геномов штаммов использовали систему Ion PGM (Life Technologies, США). Для обработки данных секвенирования применяли пакет программ Ion Torrent Suite software версии 3.4.2. и Newbler gsAssembler версии 2.6. Полногеномный SNP-анализ штаммов *Y. pestis* проводили с помощью программ Wombac версии 2.0 и Bionumerics версии 7.1.

Результаты и обсуждение

Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* средневекового биовара выполняли на основе анализа данных полногеномного секвенирования 14 штаммов из 13 природных очагов Российской Федерации и других стран СНГ, в том числе из всех 7 очагов России, в которых циркулируют штаммы средневекового биовара (таблица).

Для построения дендрограммы, отражающей филогенетические связи средневековых штаммов, использовали также зарубежные штаммы средневе-

Штаммы *Y. pestis* средневекового биовара, использованные в работе

Штамм <i>Y. pestis</i>	Место и год выделения	Принадлежность к филогенетической линии
C-627	Центрально-Кавказский высокогорный, 1986	2.MED0
M-978	Прикаспийский Северо-Западный степной, 1990	2.MED1, Кавказско-Прикаспийская ветвь
M-1484	Волго-Уральский степной. 1992	«
M-1773	Волго-Уральский песчаный, 2002	«
M-1864	Прикаспийский песчаный. 2009	«
1906	Прикаспийский песчаный, 2014	«
173	Мангышлакский пустынный, 1978	«
C-791	Дагестанский равнинно-предгорный, 2003	«
1116-Д	Терско-Сунженский низкогорный, 1970	«
KM918	Центрально-Кавказский высокогорный, 1986	«
A-1809	Таласский высокогорный, 1980	2.MED1, Среднеазиатско-Китайская ветвь
A-1920	Прибалхашский пустынный, 1988	«
244	Северо-Приаральский пустынный. 1967	«
A-1825	Кызылкумский пустынный, 1983	«
NCBI GenBank		
KIM10	Иран/Курдистан, 1968	2.MED1, Кавказско-Прикаспийская ветвь
2506	Китай, 2005	2.MED1, Среднеазиатско-Китайская ветвь
2654	Китай, 2006	«
2501	Китай, 2005	«
2504	Китай, 2005	«
K197302	Китай, 1983	2.MED2
91	Китай, 1988	«
CMCC125002	Китай, 1964	2.MED3
J1978002	Китай, 1978	«

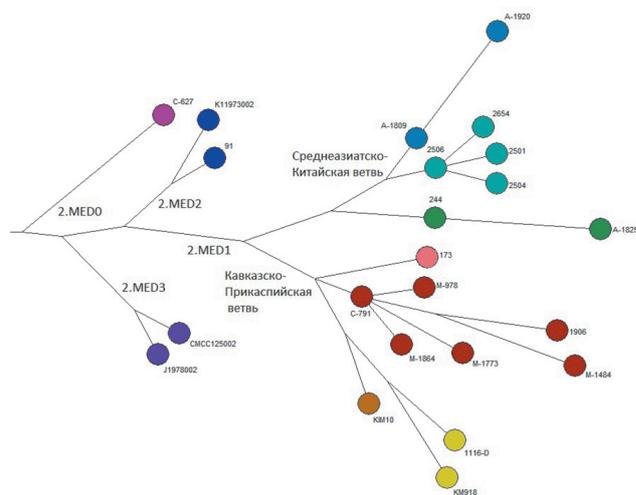
кового биовара, полногеномные последовательности которых представлены в базе данных NCBI GenBank. В анализ для сравнения включены штаммы *Y. pestis* K1197302 и 91 филогенетической линии 2.MED2 из Китая, штаммы CMCC125002 и J1978002 линии 2.MED3 из Китая, а также штамм KIM10 линии 2.MED1 из Ирана и штаммы 2506, 2654, 2501, 2504 этой же линии из Китая (таблица, рисунок).

С помощью программы Wombac 2.0 у всех 23 взятых в анализ штаммов было выявлено 1875 коровых (общих для всех штаммов) вариабельных единичных нуклеотидов (SNPs). Построение дендрограммы на основе этих SNPs выявило четкую кластеризацию штаммов средневекового биовара по их принадлежности к филогенетическим линиям и географическим регионам происхождения (рисунок). Отдельную и наиболее раннюю эволюционную ветвь средневекового биовара представил штамм *Y. pestis* C-627 из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы, который был ранее выделен в отдельную филогенетическую линию 2.MED0 [6]. Два отдельных кластера составили штаммы линий 2.MED2 и 2.MED3 из Китая. Все исследованные штаммы из очагов России и других стран СНГ вошли в отдельный большой кластер филогенетической линии 2.MED1, в который также вошел штамм этой линии *Y. pestis* KIM10 из Ирана и штаммы 2506, 2654, 2501, 2504 этой же линии из Китая.

Как следует из дендрограммы, все штаммы, принадлежащие к линии 2.MED1, разделились на две крупные ветви. Одну из них мы обозначили как Кавказско-Прикаспийская ветвь по региону происхождения входящих в нее штаммов. Эта ветвь представлена двумя отдельными кластерами. Один из них включает штаммы *Y. pestis* 1116-Д из Терско-Сунженского низкогорного очага и 918 из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы. В этот же кластер вошел штамм KIM10 из Ирана. Второй кластер Кавказско-Прикаспийской ветви составили 6 штаммов из пяти очагов Прикаспия: Прикаспийского Северо-Западного, Волго-Уральского степного, Волго-Уральского песчаного, Прикаспийского песчаного очагов. И, наконец, третий кластер Кавказско-Прикаспийской ветви составил один штамм *Y. pestis* 173 из Мангышлакского пустынного очага.

Вторая ветвь микроэволюции средневековых штаммов линии 2.MED1 обозначена нами как Среднеазиатско-Китайская ветвь. Один из ее кластеров составили штаммы *Y. pestis* 244 и A-1825 из Северо-Приаральского пустынного и Кызылкумского пустынного очагов. Отдельный кластер представлен штаммами *Y. pestis* A-1809 и A-1920 из Таласского высокогорного и Прибалхашского пустынного очагов. Также отдельный кластер составили штаммы 2506, 2654, 2501, 2504 линии 2.MED1 из Китая.

Таким образом, впервые установлено, что штаммы средневекового биовара из очагов России, а также из шести других очагов стран СНГ относятся к филогенетической линии 2.MED1. Ранее было показано,



Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов России и сопредельных государств. Программа BioNumerics 7.1 алгоритм Maximum Parsimony с логарифмической обработкой длины ветвей

что на территории Центрально-Кавказского высокогорного очага, наряду со штаммами линии 2.MED1, циркулируют штаммы древней линии 2.MED0 [6].

Установлено разделение штаммов *Y. pestis* средневекового биовара по региону происхождения с выделением кластеров штаммов из районов Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Китая. Такая популяционная структура средневекового биовара является результатом адаптации штаммов к природным биоценозам различных ландшафтно-географических зон, которая сопровождалась специфическими изменениями генома отдельных популяций этого биовара. Полученные данные по внутрибиоварному разнообразию средневековых штаммов представляют не только теоретический интерес, но и создают основу для разработки методов молекулярной идентификации этих штаммов в целях практического использования в системе молекулярно-эпидемиологического мониторинга возбудителя чумы.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобров А.Г., Филиппов А.А. Распространенность IS285 и IS100 в геномах *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 1997; 2:36–40.
2. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998. 176 с.
3. Ерошенко Г.А., Павлова А.И., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis* на основе вариабельности генов биосинтеза рРНК. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 3:6–10.
4. Павлова А.И., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Анализ генетической изменчивости штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы России и Монголии. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):49–53.
5. Попов Ю.А., Савостина Е.П., Каштанова Т.Н., Яшечкин Ю.И. Анализ геномного полиморфизма типовых и атипичных штаммов возбудителя чумы с использованием полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2004; 1:22–6.
6. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Анализ полногеномной последовательности штаммов *Yersinia pestis* на основе ступенчатого 680-SNP алгоритма. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:49–54.

7. Супотницкий М.В., Супотницкая Н.С. Очерки истории чумы. М.: Вузовская книга; 2006. 468 с.

8. Сучков И.Ю., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Шишняну М.В., Мишанькин Б.Н. Мультилокусный VNTR-анализ в изучении популяционной структуры *Yersinia pestis* в природных очагах. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2004;4:19–23.

9. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:14043–48.

10. 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 variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.

11. Kotetishvili M., Kreger A., Wauters G.J., Morris J.G., Sulakvelidze A., Stine O.C. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:2674–24. DOI: 10.1128/JCM.43.6.2674-2684.2005.

12. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S., 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.

13. 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.

References

1. Bobrov A.G., Filippov A.A. [Occurrence of IS285 and IS100 in genomes of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 1997; 2:36–40.

2. Domaradsky I.V. [Plague]. М.: Meditsina; 1998. 176 p.

3. Eroshenko G.A., Pavlova A.I., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Kuttyrev V.V. [Genotyping of *Yersinia pestis* strains based on rRNA biosynthesis gene variability]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007; 3:6–10.

4. Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Odnokov G.N., Koukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kuttyrev V.V. [Analysis of genetic variability of *Yersinia pestis* strains (medieval biovar) isolated in natural plague foci of the Russian Federation and Mongolia]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4(114):49–53.

5. Popov Yu.A., Savostina E.P., Kashtanova T.N., Yashechkin Yu.I. [Analysis of genomic polymorphism in typical and atypical strains of plague

agent, using polymerase chain reaction with universal primers]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2004; 1:22–6.

6. Odnokov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Shavina N.Yu., Kuttyrev V.V. [Analysis of the genome wide sequence of *Yersinia pestis* strains based on the consecutive 680-SNP algorithm]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3:49–54.

7. Supotnitsky M.V., Supotnitskaya N.S. [An Outline of Plague History]. М.: “Vuzovskaya Kniga”; 2006. 468 p.

8. Suchkov I.Yu., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Shishnyanu M.V., Mishan'kin B.N. [Multi-locus VNTR-Analysis in Studies of Population Structure of *Yersinia pestis* in Natural Foci]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2004; 4:19–23.

9. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:14043–48.

10. 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 variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.

11. Kotetishvili M., Kreger A., Wauters G.J., Morris J.G., Sulakvelidze A., Stine O.C. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:2674–24. DOI: 10.1128/JCM.43.6.2674-2684.2005.

12. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S., 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.

13. 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.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 16.06.15.