

В.В.Кутырев¹, А.Ю.Попова², Е.Б.Ежлова², Ю.В.Демина², Н.Д.Пакскина², И.Н.Шарова¹,
 А.И.Мищенко³, Е.Н.Рождественский³, Г.Х.Базарова³, Е.П.Михайлов³, Г.А.Ерошенко¹, Я.М.Краснов¹,
 Л.М.Куклева¹, А.В.Черкасов¹, Е.Г.Оглодин¹, В.Е.Куклев¹, Г.Н.Одинок¹, С.А.Щербакова¹,
 С.В.Балахонов⁴, М.В.Афанасьев⁴, С.А.Витязева⁴, М.Ю.Шестопалов⁴, В.Т.Климов⁴

**ЗАБОЛЕВАНИЕ ЧЕЛОВЕКА ЧУМОЙ
 В ГОРНО-АЛТАЙСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ В 2014 г.
 СООБЩЕНИЕ 2. ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
 И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ**

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; ³ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация; ⁴ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

Лабораторную диагностику чумы осуществляли в соответствии с действующими нормативно-методическими документами. Особенностью стало проведение диагностических исследований на фоне лечения антибактериальными препаратами, обладающими выраженной активностью в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе возбудителя чумы (цефтриаксон, ципролет, амикацин). Исследования показали, что в условиях антибиотикотерапии на ранних этапах заболевания наиболее эффективным методом лабораторной диагностики чумы является ПЦР, что позволяет на основании результатов этого метода осуществлять постановку не только предварительного, но и окончательного диагноза у больного. С помощью методов молекулярно-генетического анализа (ПЦР, мультилокусный VNTR-анализ, мультилокусное и полногеномное секвенирование) получена генетическая характеристика штаммов, выделенных от больного и сурка, изъятого на дому у больного, которые отнесены к античному биовару основного подвида возбудителя чумы. На основе филогенетического анализа установлено их близкое родство штамму *Y. pestis* основного подвида, изолированному в этом же очаге в 2012 г., а также штаммам из Монгольского Алтая и Тувинского горного очага.

Ключевые слова: чума, возбудитель чумы, основной и неосновные подвиды *Y. pestis*, лабораторная диагностика, молекулярно-генетический анализ.

V.V.Kutyrev¹, A.Yu.Popova², E.B.Ezhlova², Yu.V.Demina², N.D.Pakskina², I.N.Sharova¹, A.I.Mishchenko³,
 E.N.Rozhdestvensky³, G.Kh.Bazarova³, E.P.Mikhailov³, G.A.Eroshenko¹, Ya.M.Krasnov¹, L.M.Kukleva¹,
 A.V.Cherkasov¹, E.G.Oglodin¹, V.E.Kuklev¹, G.N.Odinokov¹, S.A.Shcherbakova¹, S.V.Balakhonov⁴,
 M.V.Afanasyev⁴, S.A.Vityazeva⁴, M.Yu.Shestopalov⁴, V.T.Klimov⁴

**Infection of an Individual with Plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2014.
 Communication 2. Peculiarities of Laboratory Diagnostics and Molecular-Genetic Characterization
 of the Isolated Strains**

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; ³Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation; ⁴Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Laboratory diagnostics of plague was carried out in compliance with valid operational guidelines and regulations. But its peculiarity consisted in the performance of diagnostic investigations secondary to antimicrobial therapy with application of preparations characterized by the expressed activity towards gram-negative microorganisms, including the agent of plague (ceftriaxone, ciprolet, and amikacin). The studies revealed that under antibiotic treatment during the early phase of infection the most effective method for the laboratory plague diagnostics was PCR. Based on the results of the assay it was possible to establish not only provisional, but also the final diagnosis in a patient. Obtained was genetic characteristics of the strains isolated from the patient and the marmot, withdrawn at the patient's place, using techniques of molecular-genetic analysis, in particular PCR, multilocus VNTR, and multilocus and genome-wide sequencing. Thereupon the strains were attributed to antique biovar of the main subspecies of plague agent. In addition, close relation to *Y. pestis* of the main subspecies isolated in the same focus in 2012 and to the strains from Mongolian Altai and Tuvian mountain focus was determined based on phylogenetic analysis of the isolates.

Key words: plague, plague agent, main and non-main subspecies of *Y. pestis*, laboratory diagnostics, molecular-genetic analysis.

В 2014 г. на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай зарегистрирован случай заболевания человека чумой.

Распоряжением руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека задачи по оказанию консультативно-методической и практической помо-

щи по проведению лабораторной диагностики чумы, а также изучению выделенных штаммов (в том числе их полногеномное секвенирование) были возложены на Референс Центр по чуме ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

12 сентября 2014 г. врач-инфекционист Кош-Агачской ЦРБ поставила больному А. предварительный диагноз «Подмышечный лимфаденит не ясной этиологии слева. Туляремия, бубонная форма? Чума, бубонная форма?» [6]. Для проведения лабораторных исследований на наличие возбудителей особо опасных инфекционных болезней в присутствии специалиста ФКУЗ «Алтайская ПЧС» с соблюдением требований нормативно-методических документов произведен забор материала от больного: кровь, содержащее бубона, мокрота, моча. Отбор проб осуществлен на фоне антибактериальной терапии препаратами широкого спектра противомикробного действия, обладающими выраженной активностью в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе возбудителя чумы (цефтриаксон назначен с 09.09.14 г., ципролет – с 11.09.14 г. и амикацин – с 12.09.14 г.). При заборе материала определено: в содержимом бубона нет, моча прозрачная.

Для проведения диагностических исследований материал доставлен в лабораторию Ташантинского эпидотряда. В соответствии с действующими нормативно-методическими документами, регламентирующими проведение лабораторной диагностики чумы и туляремии, осуществлен посев проб исследуемого материала на плотные и жидкие питательные среды (питательная среда для культивирования чумного микроба (ЧПС) и бульон Хоттингера (рН 7,2) с добавлением гемолизированной крови, FT-агар); произведены бактериоскопия мазков, окрашенных по Граму, заражение биопробных животных (по 2 белые мыши от каждого образца материала п/к и в/бр); выполнена постановка серологических реакций, направленных на поиск антигена чумного и туляремиального микробов (РНГА/РНАт) и антител к чумному и туляремиальному микробам (РНГА/РНАг) [9].

При проведении серологических исследований с использованием антигенных и иммуноглобулиновых эритроцитарных диагностикумов получен отрицательный результат. В мазках клеток с морфологией, типичной для чумного и туляремиального микробов, не обнаружено. При просмотре посевов нативного материала на агаровых пластинках через 24 и 48 ч рост колоний, характерных для чумы и туляремии, не обнаружен. Все биопробные животные живы.

В условиях сложившейся ситуации полученные результаты вполне объяснимы. Раннее назначение антибиотиков изменяет свойственный чуме симптомокомплекс и затрудняет в дальнейшем не только клинический, но и бактериологический анализ. Лечение антибиотиками приводит к быстрому купированию инфекционного процесса и освобождению организма от возбудителя [2]. Установлено депрессивное влияние антибактериальных препаратов на

иммунную систему. Согласно литературным данным, своевременно начатое лечение антибиотиками зараженных животных препятствовало накоплению возбудителя в организме до пороговых концентраций, что снижало возможности как серологической, так и бактериологической диагностики. У животных, исследованных сразу после трехдневного лечения антибиотиками и в последующие сроки, выделить культуру чумного микроба не удавалось, антиген в серологических реакциях не определялся. Для проведения экспресс-диагностики (ПЦР, МФА, РНГА), бактериологических исследований и постановки биологической пробы часть клинического материала 13.09.2014 г. в 7.00 ч была направлена автотранспортом с сопровождающими лицами в стационарную лабораторию Алтайской ПЧС. В 19.00 в содержимом бубона методом ПЦР выявлена ДНК чумного микроба, единичные клетки со свечением на 4+ обнаружены в мазке пунктата бубона, окрашенном чумными флуоресцирующими иммуноглобулинами. В моче, крови, мокроте больного маркеров чумного микроба не обнаружено. Результаты исследований на туляремию отрицательные. По результатам индикации методами МФА через 2 ч и ПЦР через 6 ч от начала исследования выдан предварительный ответ о наличии в материале от больного антигена и ДНК возбудителя чумы.

Дальнейшие исследования проводили согласно схеме исследования клинического материала на чуму в соответствии с методическими указаниями по организации и проведению лабораторной диагностики чумы в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней. С учетом особенностей, при которых осуществлен забор материала от больного, для повышения эффективности выделения культуры возбудителя использовали плотные и жидкие питательные среды, куда в качестве стимулятора роста добавляли гемолизированную кровь: ЧПС (производитель ГНЦ ПМБ, Оболенск); агар и бульон Хоттингера, рН 7,2 (НИЦФ, Санкт-Петербург); среда для культивирования чумного микроба (ФКУЗ Иркутский НИПЧИ). Плотные питательные среды дополнительно обработали чумной антифаговой сывороткой.

Для снижения резистентности у животных при постановке биологической пробы на белых мышках на первом этапе применяли куриный желток, а при проведении слепых пассажей – гидрокортизон. Поэтапное исследование биопробных животных также использовали для повышения эффективности биологического метода.

Наблюдение за животными и просмотр посевов осуществляли ежедневно. Через 48 ч бульоны с посевами нативного материала дополнительно исследовали методами ИХА, МФА и ПЦР. Положительный результат получен только при использовании ПЦР. ДНК возбудителя чумы выявлена в бульоне с посевом пунктата бубона. Вероятно, это обусловлено низкой концентрацией возбудителя в пробе, значи-

тельно ниже предельных концентраций, выявляемых в ИХА и МФА.

В период всего хода исследований ПЦР применяли на различных этапах лабораторной диагностики: использовали для идентификации при выявлении подозрительных колоний, контроля роста бульонных культур, исследований суспензий органов биопробных животных, в том числе при осуществлении слепых пассажей. Полученные результаты убедительно указывали на наличие маркеров возбудителя чумы только в материале из бубона.

18.09.2014 г. на 6-е сутки от начала исследования специалистами эпидотряда с высева со среды накопления (бульон с посевом пунктата бубона) выделена культура чумного микроба от больного. Следует отметить, что выделить культуру удалось и от биопробных животных, но только на 13-е сутки после третьего пассажа суспензии органов белой мыши, зараженной пунктатом бубона (с предварительной премедикацией гидрокортизоном – 5 мг в объеме 0,3 мл подкожно в область бедра). Также 18.09.2014 г. прямым посевом культура чумного микроба выделена из подчелюстного лимфатического узла от одного из трех сурков, изъятых на дому у больного. Сурки были добыты в ур. Сербисту. Для установления подвидовой принадлежности культур проведено определение их ферментативной активности.

19.09.2014 г. выделенные культуры, объекты с посевами от больного и сурков, а также кровь больного, взятая повторно, направлены в лабораторию Алтайской ПЧС для проведения расширенной идентификации, в том числе с использованием методов молекулярно-генетического анализа. Кроме того, для исследования подготовлены суспензии органов умерщвленных на 6-е сутки биопробных животных, зараженных в лаборатории Алтайской ПЧС нативным материалом пунктата бубона, кровью, мочой, мокротой.

При проведении диагностических исследований указанного материала получены следующие результаты.

Методом ПЦР с тест-системами «Ген *Y. pestis* индентификация – РГФ» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») и «АмплиСенс *Y. pestis* – FL» (ООО «ИнтерЛабСервис») ДНК возбудителя чумы выявлена в бактериальных суспензиях выделенных культур; в бульоне с посевом пунктата бубона; в бульоне с посевами суспензий органов от одного сурка, изъятых у больного; в суспензии органов умерщвленной белой мыши, зараженной подкожно пунктатом бубона. При исследовании остальных проб получены отрицательные результаты.

Методом ПЦР с экспериментальным набором праймеров *ur2769ms06* Иркутского НИПЧИ для дифференциации основного и алтайского подвидов возбудителя чумы культуры, выделенные от больного и сурка, предварительно идентифицированы как основной подвид. МФА подтверждено наличие синтеза капсульного антигена (Ф1) в культурах вы-

деленных штаммов возбудителя чумы. В мазках из культур, окрашенных по Граму, выявлены грамотрицательные палочки.

При исследовании методом ИФА и в РНГА парных сывороток крови больного, взятых 12.09.2014 и 19.09.2014 гг., установлено: с первой сывороткой от 12.09.2014 г. получены отрицательные результаты; в сыворотке крови больного, взятой 19.09.2014 г., выявлены антитела в титрах 1:200 (в РНГА с антигенным эритроцитарным диагностикумом, производства Республики Казахстан) и 1:80 (в ИФА с тест-системой «ИФА–Ат–Ф1 *Yersinia pestis*», производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), что указывает на наличие сероконверсии и свидетельствует о формировании иммунного ответа к возбудителю чумы.

По результатам идентификации штаммы, выделенные от больного и сурка, изъятых на дому у больного, обладают типичными для основного подвида (*Yersinia pestis* ssp. *pestis*) культурально-морфологическими свойствами, лизируются цельными псевдотуберкулезным, чумными Л413«С» и Покровской бактериофагами. Штаммы ферментируют арабинозу, глицерин, не разлагают рамнозу, мелибиозу, лактозу, сахарозу, дульцит, сорбит, инозит, восстанавливают нитраты в нитриты, не обладают уреазной активностью, неподвижны. 100 % клеток сорбируют гемин на среде Джексона-Берроуза, обладают фибринолизин-пестицин-плазмокоагулазной активностью, продуцируют капсульный антиген Ф1. Установлено наличие четырех плазмид, три из которых (pYP, pYV, pYT) являются типичными для возбудителя чумы, и дополнительной плазмиды pTP33, характерной для штаммов *Y. pestis* из Тувинского горного очага чумы и участков Монгольского Алтая [1], а также хромосомной области пигментации (*ybt*, *pgm*), что свидетельствует о вирулентности штаммов.

Штаммы чувствительны к антибактериальным препаратам: амикацину, гентамицину, доксициклину, ко-тримоксазолу, офлоксацину, рифампицину, тобрамицину, цефтриаксону, пенициллину G, полимиксину, тетрациклину, канамицину, стрептомицину, ципрофлоксацину, ампициллину, цефотаксиму.

По результатам лабораторных исследований на основании выделения культуры от больного и ее идентификации как *Yersinia pestis* ssp. *pestis*, а также наличия сероконверсии подтвержден клинический диагноз «Бубонная чума».

Кроме материала от больного, в лабораториях Алтайской ПЧС и эпидотряда были проведены исследования бактериологическим, серологическими и/или молекулярно-генетическими методами материала от контактных лиц, тушек сурков, изъятых у населения, а также грызунов и эктопаразитов, добытых в ходе эпизоотологического мониторинга участков Сербисту, Ирбисту, Кок-Озек, Курайского хребта Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы [6, 10]. 18.09.2014 г., одновременно со штаммами от больного и сурка, выделена культура *Y. pestis*

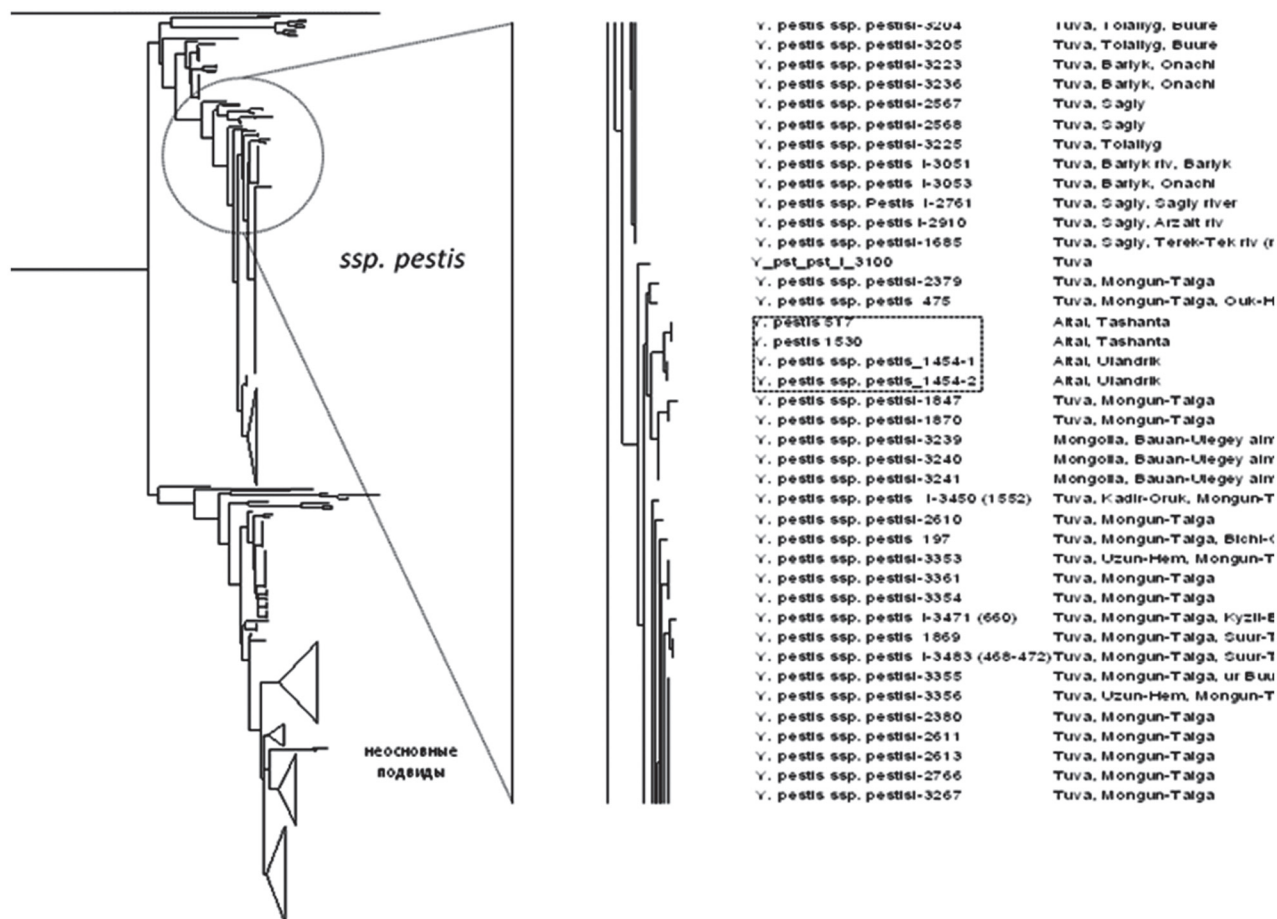


Рис. 1. Филогенетическое родство штаммов *Y. pestis* основного подвида (выделены рамкой), изолированных в 2012 и 2014 гг. в Горно-Алтайском высокогорном очаге, со штаммами из Тувинского горного очага и Монголии по результатам VNTR₂₅-анализа

от блох *Paradoxopsyllus scorodumovi* (4 экз.), собранных из входов нор монгольской пищухи при проведении эпизоотологического обследования территории ур. «Сербисту». Выделенный штамм по своим культурально-морфологическим свойствам и биохимической активности относится к неосновному алтайскому подвиду (*Yersinia pestis* ssp. *altaica*) чумного микроба: не ферментирует арабинозу, лактозу, сахарозу, дульцит, сорбит, инозит, не восстанавливает нитраты в нитриты, ферментирует глицерин, рамнозу, ксилозу, мелибиозу, глюкозу, мальтозу, маннит, не обладает уреазной активностью. По результатам молекулярно-генетического анализа штамм имеет три плазмиды (pYP, pYV, pYT). Методом ПЦР с экспериментальным набором праймеров ур2769ms06 Иркутского НИПЧИ культура возбудителя чумы от блох монгольской пищухи также идентифицирована как алтайский подвид.

Полученные результаты и проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что в условиях антибиотикотерапии наиболее эффективным методом лабораторной диагностики чумы является ПЦР, и в определенных условиях (наличие характерных клинических проявлений, эпидемиологического анамнеза) на основании результатов этого метода может быть установлен окончательный диагноз. Последнее требует решения вопроса о внесении

соответствующих изменений в нормативно-методические документы, регламентирующие проведение лабораторной диагностики чумы.

Использование зарегистрированных ПЦР-тест-систем в лабораторной диагностике чумы уже на этапе индикации позволяет установить видовую принадлежность возбудителя, но не дифференцирует подвиды, что в конкретных условиях оказалось важным. Следовательно, необходима разработка и внедрение в практику простых и надежных диагностических препаратов для осуществления подвидовой дифференциации возбудителя чумы, которые могут быть использованы в лабораториях регионального уровня (противочумные станции) еще на этапе индикации.

Следующим этапом исследований было проведение молекулярно-генетического анализа выделенных в 2014 г. в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы штаммов *Y. pestis*. Штаммам, выделенным от больного и сурка, присвоены номера *Y. pestis* 517 и *Y. pestis* 1530 соответственно, штамму от блох *P. scorodumovi* – *Y. pestis* 1313.

Методом мультилокусного анализа по 25 VNTR локусам получены цифровые VNTR-профили штаммов, на основе которых с помощью базы данных BioNumerics (Applied Maths) проведено их филогенетическое исследование (рис. 1).

Установлено, что штаммы *Y. pestis* 517 и *Y. pestis*

1530 имеют полностью идентичные VNTR-профили, которые значительно отличаются от профиля штамма *Y. pestis* 1313, изолированного в этот же период в очаге от блох *P. scorodumovi*, а также от типичных штаммов *Y. pestis*, выделяемых в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы с 1961 г. по настоящее время.

Штаммы *Y. pestis* 517 и *Y. pestis* 1530 так же, как и выделенный в 2012 г. в этом природном очаге штамм основного подвида 1454, попали в одну группу со штаммами, изолированными в конце 80-х годов на территории Хуух-Сэрх-Мунх-Хайрхаан природного очага чумы (Дэлуун-сомон Баян-Ульгийского аймака Монголии), что является свидетельством близкого филогенетического родства этих штаммов (рис. 1).

Дальнейший молекулярно-генетический анализ штаммов *Y. pestis* 517, 1530 и 1313 проведен в Референс-центре по мониторингу за возбудителем чумы и другими опасными инфекциями в РосНИПЧИ «Микроб».

Молекулярно-генетический анализ выделенных штаммов Y. pestis методами ПЦР и мультилокусного секвенирования

Определение подвидовой принадлежности выделенных штаммов *Y. pestis* осуществляли в соответствии со стандартным алгоритмом молекулярного типирования возбудителя чумы [4]. Для проведения анализа использовали экспериментальный набор праймеров, комплементарных нуклеотидным последовательностям генов *terC*, *ilvN*, *inv*, *rhaS*, *araC*, *ssuA*, *melB*, *metB*, *glpD*, *napA* [3, 4, 5, 7, 8].

С помощью мультилокусной ПЦР с праймерами на последовательность генов *terC*, *ilvN* и *inv* была проведена дифференциация исследуемых штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к основному и неосновным подвидам возбудителя чумы. В результате штаммы *Y. pestis* 517 и 1530, полученные от больного и сурка, отнесены к основному подвиду *Yersinia pestis* ssp. *pestis* (рис. 2, А). В гене *terC* у них присутствует делеция в 89 п.н. (размер ПЦР-фрагмента 300 п.н.), а в гене *ilvN* – делеция в 45 п.н. (размер ПЦР-фрагмента 515 п.н.). Обе делеции являются маркерными для штаммов *Y. pestis* основного подвида. Эти мутации отсутствуют в образце ДНК штамма *Y. pestis* 1313, выделенного от блох монгольской пищухи, у которого гены *terC* и *ilvN* находятся в интактном состоянии. Размеры образуемых в ПЦР фрагментов ДНК штамма *Y. pestis* 1313 составили: *terC* – 389 п.н.; *ilvN* – 560 п.н. На основании полученных результатов штамм *Y. pestis*, выделенный от блох монгольской пищухи, отнесен к неосновному подвиду. Все три образца ДНК четко отличались от ДНК близкородственной возбудителю чумы бактерии *Y. pseudotuberculosis* по наличию вставки инсерционной последовательности *IS1541* в гене *inv* (размер образуемого ПЦР-фрагмента у штаммов *Y. pestis* составляет 877 п.н, у *Y. pseudotuberculosis* – 169 п.н.).

В монолокусной ПЦР с праймерами на межгенный участок *YPO3333–YPO3332* установлено, что штамм *Y. pestis* 1313 от блох монгольской пищухи относится к алтайскому (неосновному) подвиду, поскольку в этом межгенном участке у него выявлена маркерная для штаммов алтайского подвида делеция размером 122 п.н., которая отсутствует у штаммов *Y. pestis* других подвигов (рис. 2, Б). Размер образуемого ПЦР-фрагмента составил у штамма *Y. pestis* 1313 (как и у других штаммов алтайского подвида) 90 п.н., у всех остальных подвигов он равен 212 п.н.

Также для подтверждения принадлежности выделенных штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 к основному, а штамма 1313 к алтайскому подвидам проведено определение их генотипов на основе мультилокусного секвенирования с использованием вариабельности нуклеотидной последовательности генов дифференциальных биохимических признаков *rhaS*, *araC*, *glpD*, *napA* [4]. В результате установлено, что штаммы 517 и 1530 от больного и сурка имеют генотип rhS1-arC1-np1-gpD1, характерный для штаммов основного подвида. Гены имеют интактную структуру за исключением гена *rhaS*, в позиции 671 которого присутствует нуклеотидная замена G→A, маркерная для штаммов основного подвида, и которая отсутствует у штаммов неосновных подвигов и *Y. pseudotuberculosis*. Дополнительно на основе интактности генов *glpD* и *napA* установлена принадлежность штаммов 517 и 1530 основного подвида к античному биовару возбудителя чумы. Штамм *Y. pestis* 1313 от блох монгольской пищухи имеет характерный для алтайского подвида генотип rhS3-arC2-np3-gpD1 и содержит вставку единичного нуклеотида G после 773 нуклеотида от начала гена *araC* при интактности других генов *araC*, *glpD* и *napA*. Таким образом, ме-

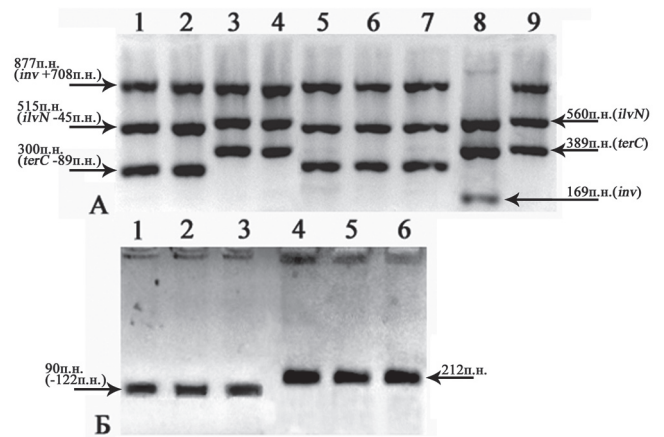


Рис. 2. ПЦР-анализ штаммов *Y. pestis*, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы в 2014 г.

А – дифференциация основного подвида *Y. pestis* от неосновных подвигов и от *Y. pseudotuberculosis*. Штаммы *Y. pestis*, основной подвида: 1 – И-3358 (Тувинский горный очаг), 2 – KM932 (И-3223) (Тувинский горный), 5 – 1530 (Горно-Алтайский высокогорный), 6 – 517 (Горно-Алтайский высокогорный), 7 – И-3244 (Баян-Ульгийский аймак, Монголия); алтайский подвида (Горно-Алтайский высокогорный): 3 – KM683 (И-2359), 4 – 1313, 9 – И-2998, 8 – *Y. pseudotuberculosis* IV. Б – ПЦР-детекция штаммов *Y. pestis* алтайского подвида. Алтайский подвида: 1 – KM638 (И-2359), 2 – 1313, 3 – И-2998; основной подвида: 4 – 1530, 5 – 517, 6 – KM932 (И-3223)

Таблица 1

Генетические основы фенотипических отличий между штаммами основного и алтайского подвидов возбудителя чумы

Штамм <i>Y. pestis</i>	Мутации в генах				
	<i>rhaS</i> (671*)	<i>araC</i> (773*)	<i>melB</i> (1231*)	<i>ssuA</i> (302*)	<i>metB</i> (988*)
517 (основной подвид), от больного	A	-	+ IS285	-	- G
1530 (основной подвид), от сурка	A	-	+ IS285	-	- G
1313 (алтайский подвид), от блох <i>P. scrodamovi</i>	G	+ G	-	+ G	-

* Позиция варибельного нуклеотида в гене.

тодом мультилокусного секвенирования подтверждена принадлежность штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 к основному подвиду, от блох монгольской пищухи *Y. pestis* 1313 – к алтайскому подвиду.

У выделенных штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 относительно штамма 1313 выявлены отличия в генах, кодирующих другие фенотипические отличия (ферментация мелибиозы, редукция нитратов, питательная потребность в аминокислоте метионине) (табл. 1) [3, 8].

Для установления принадлежности штаммов 517 и 1530, выделенных от больного и сурка, к конкретной филогенетической линии основного подвида возбудителя чумы использован комплект экспериментальных праймеров, выявляющих единичные нуклеотидные замены, маркерные для основных филогенетических линий возбудителя чумы. В результате проведенного анализа определена маркерная для филогенетической линии 4.ANT мутация – замена единичного нуклеотида G→A позиции 124 гена *YPO1418*. Это доказывает принадлежность выделенных штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 к линии 4.ANT, штаммы которой циркулируют в Тувинском горном очаге и пограничном с Горно-Алтайским высокогорным природным очагом районе Монголии.

Таким образом, на основе комплексного генетического анализа генов жизнеобеспечения – ферментации сахаров (*rhaS*, *araC*, *melB*) и глицерина (*glpD*), редукции нитратов (*napA*, *ssuA*) и биосинтеза аминокислоты метионина (*metB*), а также маркерных мутаций различных филогенетических линий возбудителя чумы установлено, что штаммы *Y. pestis* 517 и 1530, выделенные от больного и сурка, относятся к штаммам античного биовара основного подвида линии 4.ANT. Штамм *Y. pestis* 1313 от блох монгольской пищухи принадлежит к алтайскому подвиду.

Полногеномное секвенирование ДНК штаммов *Y. pestis* 517, 1530, 1313 и биоинформационный анализ полученных данных

Секвенирование геномной ДНК осуществляли на платформе Ion PGM (Life Technologies) с использованием набора реагентов, позволяющих получать длину прочтения единичного фрагмента ДНК около

400 п.н. Далее с использованием программы Newbler v. 2.6 (454 Life Sciences, Roche Diagnostics), единичные прочтения собраны в контиги и аннотированы с использованием программы Prokka (<http://www.vicbioinformatics.com/software.prokka.shtml>).

При анализе полногеномных последовательностей выделенных штаммов установлено, что во всех трех исследованных пробах присутствуют хромосомная область пигментации (*pgm*), включающая *hms* оперон и остров высокой патогенности HPI с *ybt* локусом, гены *pla* и *pst* (плазмида pPst), *caf* и *ymt* (pFra), *lcrV*; *yopM* и *yopN* (pCad). Таким образом, штаммы *Y. pestis* 517, 1530 и 1313 имеют набор основных генов, ассоциируемых с вирулентностью возбудителя чумы.

Для реконструкции филогенетических отношений проведено сравнение полученных нуклеотидных последовательностей ДНК полных геномов штаммов, выделенных от человека (*Y. pestis* 517) и сурка (*Y. pestis* 1530), от блох монгольской пищухи (*Y. pestis* 1313), с ранее секвенированными нами геномами штаммов *Y. pestis*, выделенных на территориях природных очагов чумы Российской Федерации и сопредельных стран, а также с геномами возбудителя чумы, представленными в международной базе данных NCBI GenBank, изолированными на территории Монголии, Китая, Непала и США.

Филогенетический анализ методом сравнения полиморфизма единичных нуклеотидов (Single Nucleotide Polymorphism – SNP) полученных черновых (draft) геномов проводили с помощью программы Wombac (<https://github.com/Victorian-Bioinformatics-Consortium/wombac>). Суть филогенетического анализа заключалась в определении матрицы полиморфизмов единичных нуклеотидов (SNPs) высокой степени достоверности у 46 геномов штаммов *Y. pestis*, относительно коровой части генома референтского штамма *Y. pestis* CO92. Количество варибельных позиций (SNPs) в данной матрице составило 2102. Полученная матрица SNPs кластеризована с помощью программного обеспечения BioNumerics v. 7.1 (Applied Maths) с использованием алгоритма максимальной экономии (Maximum parsimony tree).

Анализ показал, что максимальное совпадение по матрице SNPs (99,9 %) нуклеотидные последовательности ДНК полных геномов штаммов *Y. pestis* 1530 и 517 имеют как между собой, так и с нуклеотидной последовательностью ДНК штамма *Y. pestis* 1454, выделенного в 2012 г. на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в ур. Большие Сары-Гобо (рис. 3, группа № 37, 38 и 39 соответственно). Степень подобия в 98,5 % по матрице SNPs нуклеотидные последовательности этих штаммов показали со штаммом основного подвида *Y. pestis* MGJZ12 (NCBI GenBank), выделенного в Сайлюгемском природном очаге чумы (район озер Даян Нур и Халгашин Нур) Баян-Ульгийского аймака Монголии [13], который граничит с Горно-Алтайским высокогорным очагом чумы (рис. 3, № 36).

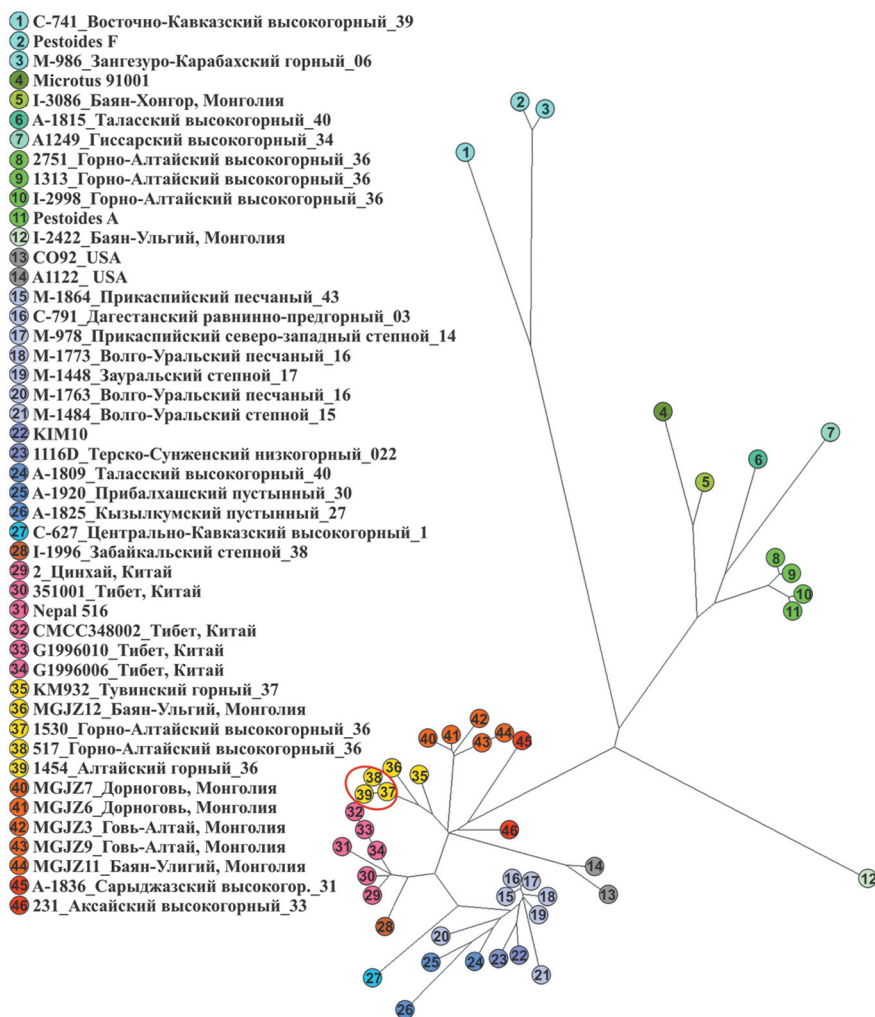


Рис. 3. Филогенетическое родство выделенных в 2014 г. в Горно-Алтайском высокогорном очаге штаммов *Y. pestis* со штаммами из других природных очагов на основе анализа полиморфизмов единичных нуклеотидов (SNPs)

Кроме того, нуклеотидные последовательности этих штаммов показали степень подобия в 98,1 % по матрице SNPs с последовательностью ДНК штамма основного подвида *Y. pestis* KM932 из Тувинского горного природного очага чумы, граничащего с Горно-Алтайским высокогорным природным очагом чумы на северо-востоке (рис. 3, № 35).

Штамм *Y. pestis* 1313 (алтайский подвида, изолирован от блох монгольской пищухи в 2014 г.) имеет максимальное совпадение нуклеотидной последовательности ДНК генома по матрице SNP (99,7 %) со штаммом алтайского подвида *Y. pestis* 2751-55 (2012 г.) из Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы (рис. 3, № 9 и 8 соответственно).

Согласно результатам проведенной кластеризации (рис. 3) анализируемые геномы 46 штаммов *Y. pestis* разделились на ряд групп, близких по набору единичных точечных мутаций нуклеотидов. Отдельный кластер сформировали три штамма *Y. pestis* основного подвида из Горно-Алтайского высокогорного очага – 1454, 1530, 517 и штаммы KM932 из Тувинского горного очага и MGJZ12 из Баян-Ульгийского аймака Монголии. Ближайший к нему кластер состоит из других штаммов *Y. pestis* основного подвида, выделенных на территории Монголии (рис. 3, № 40–44). Более удаленно распола-

гаются штаммы *Y. pestis* основного подвида из Тянь-Шаньских высокогорных очагов чумы (№ 45, 46), а так же Китая и Непала (рис. 3, № 29–34). Остальные штаммы *Y. pestis* основного подвида также сформировали отдельные кластеры, представленные на дендрограмме (рис. 3). Как следует из этой дендрограммы группа штаммов *Y. pestis* неосновных подвида (№ 1–12) значительно удалена от кластеров штаммов основного подвида. Штамм *Y. pestis* 1313 (№ 9) расположился в кластере штаммов алтайского подвида из Горно-Алтайского высокогорного очага (№ 8–11). Он имеет максимальное подобие со штаммом *Y. pestis* 2751-55 (№ 8), выделенным в 2012 г. в этом очаге.

На основе сравнения геномов 46 использованных штаммов *Y. pestis* выявлена 61 уникальная точечная мутация нуклеотидов в последовательности ДНК штаммов 1530, 517, 1454, MGJZ12 и KM932, которая отличает их от всех представленных 229 геномов *Y. pestis* в NCBI GenBank и группы геномов *Y. pestis*, секвенированных нами ранее. Из выделенной 61 мутации 12 SNPs характерны только для штаммов *Y. pestis* 517, 1530 и 1454 (табл. 2); 9 SNPs – для штаммов *Y. pestis* 517, 1530, 1454 и MGJZ12; 13 SNPs – для штаммов *Y. pestis* 517, 1530, 1454, MGJZ12 и KM932; 14 SNPs – для штамма *Y. pestis* MGJZ12 и 13 SNPs – для штамма *Y. pestis* KM932. Найденные уникальные

Уникальные точечные мутации нуклеотидов штаммов *Y. pestis* 517, 1530 и 1454 основного подвида, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге

Позиция по референс-штамму CO92, п.н.	Точечная мутация (SNP)	Название (номер) штаммов <i>Y. pestis</i>					Область или ген, содержащие SNP
		517	1530	1454	MGJZ12	KM932	
394234	C > A	+	+	+	-	-	перед YPO0379
928294	G > T	+	+	+	-	-	между YPO0847 и YPO0847
1484392	C > T	+	+	+	-	-	<i>dacC</i> (YPO1320)
1996447	C > T	+	+	+	-	-	YPO1751a
2057419	C > A	+	+	+	-	-	YPO1811
2092484	T > G	+	+	+	-	-	<i>yecC</i> (YPO1811)
3270727	G > A	+	+	+	-	-	<i>murQ</i> (YPO2925)
3362591	A > G	+	+	+	-	-	YPO3009
3495476	C > T	+	+	+	-	-	перед <i>rpmE2</i>
3693309	G > T	+	+	+	-	-	YPO3311
3718023	A > G	+	+	+	-	-	YPO3332
4339797	G > A	+	+	+	-	-	<i>wzzE</i> (YPO3865)

точечные мутации могут быть использованы для идентификации штаммов *Y. pestis* основного подвида из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и близких к ним штаммов *Y. pestis* из сопредельных территорий (табл. 2).

Штаммы основного подвида *Y. pestis* 1530, 517 и выделенный ранее 1454 имеют высокое подобие по структуре хромосомной области ДНК, а также одинаковый плазмидный состав (три основные плазмиды: pCD1 pMT1 pPCP1 и дополнительную pTP33), отличающий их от всех ранее выделявшихся в очаге алтайских штаммов *Y. pestis*, которые обладают типичным для возбудителя чумы набором из трех плазмид [2].

Таким образом, на основании полученных с помощью методов ПЦР, мультилокусного VNTR-анализа, мультилокусного и полногеномного секвенирования данных можно сделать вывод о принадлежности выделенных от больного и сурка штаммов *Y. pestis* (517 и 1530 соответственно) в 2014 г. в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы к основному подвиду, а штамма *Y. pestis* 1313 от блох монгольской пищухи – к алтайскому подвиду. Проведенный филогенетический анализ полиморфизмов единичных нуклеотидов (SNPs) коровой части геномов выделенных штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 основного подвида указывает на их максимальную близость штамму основного подвида *Y. pestis* 1454, выделенному в 2012 г. на территории этого же очага чумы, а также штамму основного подвида *Y. pestis* MGJZ12 из Баян-Ульгийского аймака Монголии. Все эти штаммы относятся к филогенетической линии 4.ANT, которая не встречается в других регионах мира. Полученные молекулярно-генетические данные позволяют сделать обоснованное предположение о том, что для всей территории Юго-Восточной области Горного Алтая характерна циркуляция штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара линии 4.ANT («Тувинский вариант»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Денисов А.В., Ивженко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:60–5.
2. Дмитриевский А.М., Белозеров Е.С. Чума. Алматы; 1995. 172 с.
3. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Генетические основы вариативности признака редукции нитратов у штаммов *Yersinia pestis*. *Генетика*. 2014; 50(5):522–30.
4. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. *Журн. эпидемиол. микробиол. и иммунобиол.* 2012; 3:25–35.
5. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Одинокоев Г.Н., Кутырев В.В. Сравнение полной нуклеотидной последовательности гена *rhaS* у штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвигов. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 3(97):38–42.
6. 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. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:9–16.
7. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Павлова А.И., Анисимова Л.В., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвигов и возбудителя псевдотуберкулеза методом полимеразной цепной реакции. Патент RU 2425891. Опубл.10.08.2011., Бюл. 22.
8. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Павлова А.И., Кутырев В.В. Генетические основы метионинзависимости штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов. *Генетика*. 2011; 47 (3):332–8.
9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней: Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
10. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
11. 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*. *PNAS*. 2013; 110(2):577–82.

References

- Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivzhenko N.I., Rozhdestvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. [The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of Altai mountain natural plague focus. Communication 1. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:60–5.
- Dmitrovsky A.M., Belozero E.S. [Plague]. *Almaty*, 1995. 172 p.
- Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Kutyr V.V. [Genetic foundations of nitrate reduction variability in *Yersinia pestis* strains]. *Genetika*. 2014; 50(5):522–30.
- Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Kukleva L.M., Pavlova A.I., Krasnov Ya.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Vinogradova N.A., Kutyr V.V. [Standard algorithm for molecular typing of *Yersinia pestis* strains]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2012; 3:25–35.
- Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kuklev V.E., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Odinkov G.N., Kutyr V.V. [Comparison of complete nucleotide sequence of *rhaS* gene in the strains of plague etiologic agent of main and minor subspecies]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 3(97):38–42.
- Kutyr V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., 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]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:9–16.
- Odinkov G.N., Eroshenko G.A., Pavlova A.I., Anisimova L.V., Kutyr V.V. [Method of differentiation between *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* using polymerase chain reaction]. RF Patent 2425891.
- Odinkov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Pavlova A.I., Kutyr V.V. [Genetic foundations of methionine-dependency in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies]. *Genetika*. 2011; 47(3):332–8.
- Onishchenko G.G., Kutyr V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infections: Practice Guidelines]. M.: ZAO "Shiko", 2013. 560 p.
- Onishchenko G.G., Kutyr V.V., editors [Natural Plague Foci in the Territory of the Caucasus, Caspian-Sea Region, Central Asia, and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.
- 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*. *PNAS*. 2013; 110(2):577–82.

Authors:

Kutyr V.V., Sharova I.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Oglodin E.G., Kuklev V.E., Odinkov G.N., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. Moscow, Russian Federation.

Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Mikhailov E.P. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru

Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Vityazeva S.A., Shestopalov M.Yu., 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:

Кутырев В.В., Шарова И.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Оглодин Е.Г., Куклев В.Е., Одинок Г.Н., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва, Российская Федерация.

Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Михайлов Е.П. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chuma@mail.gorny.ru

Балахонov С.В., Афанасьев М.В., Витязева С.А., Шестопалов М.Ю., Климов В.Т. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 26.11.14.