

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

## АНАЛИЗ ПОЛНОГЕНОМНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* НА ОСНОВЕ СТУПЕНЧАТОГО 680-SNP АЛГОРИТМА

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

Создана оптимизированная схема SNP анализа полногеномных последовательностей штаммов возбудителя чумы, основанная на ступенчатом алгоритме кластеризации отдельных внутривидовых групп *Y. pestis*. В схему включены 680 единичных полиморфных нуклеотидов (SNPs), использование которых позволяет не только кластеризовать близкородственные штаммы, но и отражать филогенетические связи между группами штаммов, а также определять порядок их дивергенции от общего ствола эволюции возбудителя чумы.

На основе ступенчатого 680-SNP алгоритма проведен анализ полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* C-627 из Центрально-Кавказского высокогорного очага (Россия), штамма 1454 из Алтайского горного очага (Россия), штамма 231 (708) из Аксайского высокогорного очага (Киргизия) и вакцинного штамма EV НИИЭГ, используемого для вакцинации людей от чумы в Российской Федерации и ряде других стран. Определены геномные варианты этих штаммов: 1.ORI3 (EV НИИЭГ), 2.MED0 (C-627), 0.ANT3 (231(708)), 0.ANT4 (1454) и их положение в схеме мирового разнообразия *Y. pestis*. Доказано отсутствие в полногеномной последовательности вакцинного штамма EV НИИЭГ хромосомной области пигментации, что подтверждает безопасность его использования для специфической профилактики чумы.

**Ключевые слова:** возбудитель чумы, полногеномное секвенирование, SNP, очаги чумы России и сопредельных стран.

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

## Analysis of the Genome Wide Sequence of *Yersinia pestis* strains Based on the Consecutive 680-SNP Algorithm

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

Designed is an optimized scheme for SNP analysis of the genome wide sequences of plague agent strains, based on the consecutive algorithm of clusterization of individual intraspecific *Y. pestis* groups. The scheme comprises 680 singular polymorphic nucleotides (SNPs), the usage of which provides not only for the clustering of closely related strains, but for the determination of phylogenetic bonds between groups of strains and order of their divergence from the common tree-trunk of the plague agent evolution.

Based on the consecutive 680-SNP algorithm, carried out is the analysis of genome wide sequences of C-627 *Y. pestis* strain isolated in Central-Caucasian high-mountain focus (Russia), strain 1454 isolated in Altay mountain focus (Russia), strain 231 (708) – Aksay high mountain focus (Kirgizia), and vaccine EV NIEG (Research Institute of Epidemiology and Hygiene) strain, applied for immunization in the Russian Federation and in a number of other countries. Identified are the genome variants of the strains: 1. ORI3 (EV NIEG), 2. MED0 (C-627), 0.ANT3 (231(708)), 0.ANT4 (1454), and their place in the scheme of *Y. pestis* global variation. Evidenced is the absence of the chromosomal region responsible for pigmentation in the genome wide sequence of the vaccine strain EV NIEG, which testifies to its safe use for specific plague prophylaxis.

**Key words:** plague agent, genome wide sequencing, SNP, plague foci in the territory of Russia and bordering countries.

Штаммы *Yersinia pestis* в соответствии с отечественной классификацией, принятой в 1985 г., объединяют в пять подвидов (subspecies – ssp.): основной (ssp. *pestis*), кавказский (ssp. *caucasica*), алтайский (ssp. *altaica*), гиссарский (ssp. *hissarica*) и улегейский (ssp. *ulegeica*) [5]. Согласно распространенной зарубежной классификации, предложенной R.Devignat в 1951 г., штаммы *Y. pestis* ssp. *pestis* на основании различий по ряду биохимических признаков (редукции нитратов, утилизации глицерина) и по историко-географическому принципу разделяют на три классических биовара (biovar – bv.) – античный (bv. *antiqua*), средневековый (bv. *medievalis*) и восточный (bv. *orientalis*). Кроме того, зарубежные исследователи предлагают выделить в отдельные подвиды – ssp. *qinghaiensis*, ssp. *xilingolensis* и биовары – bv. *microtus*, bv. *intermedium* – штаммы из очагов Центральной и Восточной Азии, в подвид Ангола (ssp. *angola*) –

полевоочи штаммы с территории Африки, а некоторые отечественные исследователи предлагают выделить в таласский подвид (ssp. *talassica*) штаммы из одноименного очага в Киргизии [9, 10, 12].

На основе анализа полногеномных последовательностей по локусам единичных полиморфных нуклеотидов (SNP) G.Morelli *et al.* в 2010 г. составили схему глобального генетического разнообразия штаммов *Y. pestis*, изолированных на территориях различных континентов [11]. На этой схеме определено положение не только подвидов и биоваров, но и различных геномных вариантов внутри биоваров *Y. pestis*. Так, штаммы античного биовара включают три эволюционные линии: древнюю 0.ANT из Китая, африканскую 1.ANT и азиатскую 2.ANT. При этом африканская античная линия 1.ANT эволюционно связана с линией 1.ORI восточного биовара и штаммами *intermedium* 1.IN, а азиатская антич-

ная линия – со средневековым биоваром 2.MED. Штаммы восточного биовара линии 1.ORI включают 3 ветви: 1.ORI1 (Северная и Южная Америки), 1.ORI2 (Китай) и 1.ORI3 (о. Мадагаскар, Турция). К линии 2.MED средневекового биовара, состоящей из 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3, отнесены штаммы, циркулирующие на территории Восточной и Юго-Западной Азии. Штаммы *intermedium* (Китай) линии 1.IN также включают 3 эволюционные ветви 1.IN1, 1.IN2 и 1.IN3, которые распространены в некоторых регионах Азиатского континента.

Таким образом, в настоящее время исследовано генетическое разнообразие штаммов *Y. pestis* из различных регионов мира – Азии, Европы, Африки, Северной и Южной Америки. Однако в этой филогенетической схеме не представлены полученные на основе полногеномного SNP анализа геномные варианты штаммов из природных очагов России и большинства стран ближнего зарубежья. Не определено филогенетическое родство этих штаммов со штаммами *Y. pestis* из других регионов мира, что в целом делает неполной схему мирового генетического разнообразия возбудителя чумы. Внедрение в РосНИПЧИ «Микроб» в практику научных исследований технологии полногеномного секвенирования и наличие обширной коллекции штаммов *Y. pestis* из очагов Российской Федерации и сопредельных стран делает решение этой проблемы задачей сегодняшнего дня.

В этой статье нами представлен оптимизированный алгоритм полногеномного анализа штаммов *Y. pestis* по 680 единичным полиморфным нуклеотидам (680-SNP), который обеспечивает определение принадлежности исследуемого штамма к одной из филогенетических линий возбудителя чумы. С помощью разработанного алгоритма определены геномные варианты и установлено филогенетическое положение штаммов *Y. pestis* C-627 из Центрально-Кавказского высокогорного очага (Россия), штамма 1454 из Алтайского горного очага (Россия), штамма 231 (708) из Аксайского высокогорного очага (Киргизия) и вакцинного штамма EV НИИЭГ, используемого для вакцинации людей от чумы в Российской Федерации и ряде других стран.

### Материалы и методы

Для полногеномного секвенирования использованы штаммы *Y. pestis* из Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб», где они хранились в лиофильно высушенном состоянии. Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* проводили по стандартной методике в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Секвенирование геномов штаммов осуществляли на генетическом анализаторе модели Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™). Сборку контигов (фрагментов геномной

последовательности) и определение их взаимного расположения проводили в Newbler Assembler 2.4.1 (454 Life Science). Анализ полногеномных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма BLAST (NCBI GenBank). Построение дендрограмм, на основании 680-SNP алгоритма, проводили с применением программного обеспечения Bionumerics v.7.0 (Applied Math NV, Бельгия).

### Результаты и обсуждение

С помощью алгоритма BLAST нами проведен полногеномный анализ полиморфных единичных нуклеотидов (SNP) у 22 штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, последовательности геномов которых представлены в международных базах данных NCBI GenBank, EMBL и PATRIC (табл. 1). Всего выявлено более 2500 SNPs, часть из которых была описана нами ранее [2, 3, 4, 6, 7], часть – представлена G. Morelli и соавт. [11], а часть впервые обнаружена в рамках этой работы. Для оптимизации алгоритма и упрощения схемы проведения анализа из них было отобрано 680 SNPs, комплексное использование которых позволяет не только кластеризовать близкородственные штаммы (за счет уникальных для внутривидовых групп SNPs), но и отражать филогенетические связи между группами и порядок дивергенции штаммов по наличию SNPs, общих для эволюционно близких групп.

Примеры отбора некоторых из 680 SNPs приведены в табл. 2. Так, локусы *YPO3038* (в позиции 3392521), *YPO0059* (71105), *YPO0019* (27020) и *YPO0059* (70649) обеспечивают кластеризацию штаммов кавказского подвида (O.CA), Ангола (O.ANG) и *microtus* (O.MIC). Локус *YPO0332* (341720) маркирует штаммы основного подвида возбудителя чумы, а дальнейшее их разделение по линиям 0ANT, 1ANT, 1IN, 1ORI (1-3), 2ANT и 2MED проводят по вариабельным нуклеотидам участков генов: *YPO0993* (1102174), *YPO0002* (1166), *YPO1285* (1443460), *YPO0711* (773110), *YPO0063* (74539), *YPO0032* (42303), *YPO0880* (965291), *YPO0282* (282762), *YPO0549* (593308) и *YPO3038* (3392953). Аналогично отбирались остальные из 680 SNPs.

Из 680 выбранных SNPs 574 имели внутривидовую локализацию, из них 419 SNPs представляли несинонимичные и 142 синонимичные замены, а 13 – нонсенс-мутации. 106 SNPs имели межвидовую локализацию, при этом 70 % (476) проходили по типу транзаций, а 30 % (204) – трансверсий. В отобранные 680 полиморфных нуклеотидов были включены 90 выявленных нами ранее вариабельных SNP участков, локализованных в генах жизнеобеспечения – ферментации сахаров и глицерина, редукции нитратов, в генах биосинтеза аминокислот, витаминов и флагеллярных белков, а также в генах, ассоциируемых с проявлением вирулентных свойств возбудителем чумы [2, 3, 4, 6, 7].

Предлагаемый нами метод 680-SNP филогенетического анализа предусматривает ступенчатый

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

Штамм	Подвид, ssp.	Биовар, группа	Место выделения
<i>Yersinia pestis</i>			
CO92	<i>pestis</i>	orientalis	США
A1122	«	«	«
CA88-4125	«	«	«
F1991016	«	«	Китай
IP674	«	«	Турция
MG05-1020	«	«	о. Мадагаскар
IP275	«	«	«
<b>EV НИИЭГ</b>	«	«	«
KIM10	«	medievalis	Курдистан
K1973002	«	«	Китай
<b>C-627</b>	«	«	Центрально-Кавказский высокогорный очаг (№ 01)
B42003004	«	antiqua	Китай
<b>231(708)</b>	«	«	Аксайский высокогорный очаг (№ 33)
<b>1454</b>	«	«	Алтайский горный очаг (№ 36)
Nepal516	«	«	Непал
Harbin35	«	«	Китай
Antiqua	«	«	Конго
UG05-0454	«	«	Уганда
D106004	«	группа intermedium	Китай
Z176003	«	«	«
D182038	«	«	«
E1979001	«	«	«
91001	неосновной	группа microtus	«
Angola	неосновной	–	Ангола
Pestoides F	<i>caucasica</i>	–	Закавказье
<i>Y. pseudotuberculosis</i>			
IP32953	–	–	–

алгоритм кластеризации штаммов отдельных внутривидовых групп *Y. pestis* (рис. 1). За исходные нуклеотидные последовательности каждого из 680 SNPs принимают соответствующие аллели генома *Y. pseudotuberculosis* IP32953 серотипа O:1b. В число 680 полиморфных нуклеотидов включены SNPs,

позволяющие дифференцировать каждую филогенетическую ветвь, а также SNPs, объединяющие близкородственные группы (рис. 1). В том числе 10 SNPs разделяют штаммы чумного и псевдотуберкулезного микробов, а 99 SNPs отделяют штаммы *Y. pestis* основного подвида от штаммов неосновных подвигов. Штаммы *Y. pestis* ssp. *caucasica* (обозначенные нами как линия 0.CA), отличаются в предложенной схеме по 80 маркерным SNPs, отсутствующим у штаммов из других филогенетических линий. Штамм неосновного подвида из Африки – Angola (обозначенный нами как линия 0.ANG) маркирован 59 SNPs, а штаммы *microtus* (линия 0.MIC) – 53 SNPs.

Таблица 2

Примеры использования некоторых из 680 SNPs, включенных в схему полногеномного анализа штаммов *Y. pestis*

Локус	SNP, позиция в геноме относительно штамма CO92*	Маркируемая линия / ветвь
<i>YPO3038 (napA)</i>	A/G (3392521)	0.CA, 0.ANG, 0.MIC
<i>YPO0059</i>	C/A (71105)	0.MIC
<i>YPO0019</i>	C/T (27020)	0.ANG
<i>YPO0059</i>	C/T (70649)	0.CA
<i>YPO0332 (rhaS)</i>	G/A (341720)	ssp. <i>pestis</i>
<i>YPO0993</i>	A/G (1102174)	0.ANT
<i>YPO0002</i>	G/A (1166)	1.ANT
<i>YPO1285</i>	C/T (1443460)	1.IN
<i>YPO0711</i>	G/A (773110)	1.ORI
<i>YPO0063</i>	A/G (74539)	1.ORI1
<i>YPO0032</i>	C/T (42303)	1.ORI2
<i>YPO0880</i>	G/A (965291)	1.ORI3
<i>YPO0282</i>	C/T (282762)	2.ANT, 2.MED
<i>YPO0549</i>	G/T (593308)	2.ANT
<i>YPO3038 (napA)</i>	G/T (3392953)	2.MED
<i>YPO0169</i>	T/C (189227)	1.ANT, 1.IN, 1.ORI
<i>YPO2148</i>	A/C (2416786)	<i>Yersinia pestis</i>

\* Подчеркнут нуклеотид, присутствующий в аллельном варианте локуса соответствующей эволюционной линии возбудителя чумы.

Кроме того, в схему включены SNPs, объединяющие филогенетически близкие группы и отражающие порядок их дивергенции от общего ствола эволюции (рис. 1). Так, для штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 и ветви 0.CA (ssp. *caucasica*) показано наличие 14 общих SNPs, из которых 5 также встречались у линии 0.ANG (штамм Angola). Для линий 2.ANT (bv. *antiqua*) и 2.MED (bv. *medievalis*) отобрано 23 общих SNPs. Штаммы 1.ANT (bv. *antiqua*), 1.IN (ssp. *pestis* intermedium) и 1.ORI (bv. *orientalis*) объединены 15 общими SNPs. Штаммы линии 1.IN (ssp. *pestis* intermedium) и 1.ORI (bv. *orientalis*) имеют 19 общих SNPs.

В схеме 680-SNP филогенетического анализа древняя античная ветвь штаммов *Y. pestis* основного подвида 0.ANT маркирована нами 19 уникальными SNPs, а две другие линии античного биовара – афри-

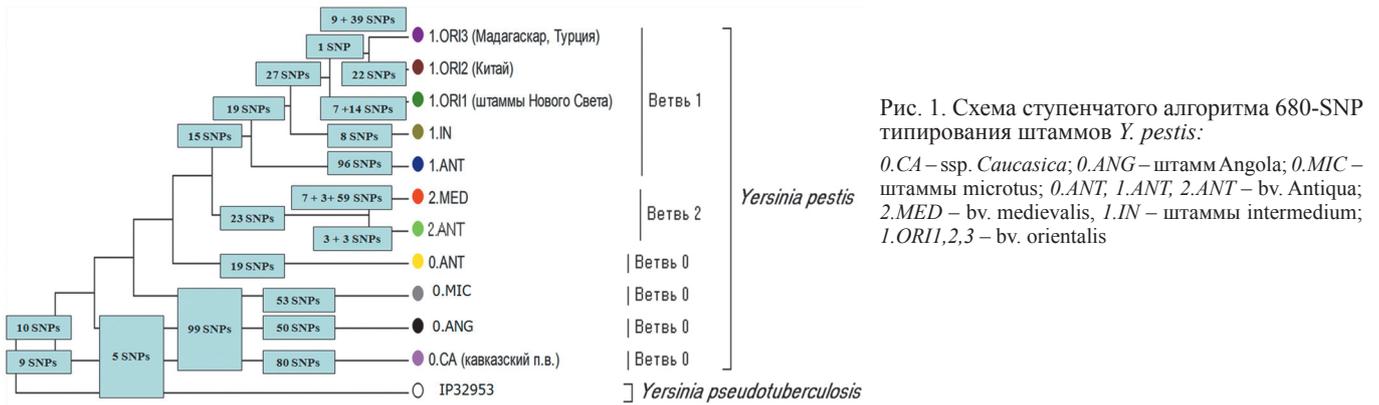


Рис. 1. Схема ступенчатого алгоритма 680-SNP типирования штаммов *Y. pestis*:  
 0. CA – ssp. *Caucasica*; 0. ANG – штамм Angola; 0. MIC – штаммы *microtus*; 0. ANT, 1. ANT, 2. ANT – bv. Antiqua; 2. MED – bv. *medievalis*, 1. IN – штаммы *intermedium*; 1. ORI1, 2, 3 – bv. *orientalis*

канская и азиатская (1. ANT и 2. ANT) маркированы 96 и 29 SNPs соответственно. Для отделения штаммов средневекового биовара (линия 2. MED) выбрано 69 уникальных SNPs, штаммов *intermedium* (линия 1. IN) – 8 SNPs, а штаммов восточного биовара (линия 1. ORI) – 27 уникальных SNPs. Все штаммы линии 1. ORI подразделяются на изоляты Нового Света 1. ORI1 (по 21 SNPs), азиатскую ветвь 1. ORI2 (по 22 SNPs) и штаммы 1. ORI3 с территории Мадагаскара и Турции (по 48 SNPs).

типичные для штаммов всех неосновных подвидов, что подтверждает их принадлежность к основному подвиду (*subsp. pestis*).

На следующем этапе исследования предложенный нами ступенчатый алгоритм 680-SNP типирования был использован для анализа полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ, C-627, 231(708) и 1454, секвенирование которых было проведено в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Как и следовало ожидать, в геноме этих штаммов присутствуют 10 SNPs, характерные для всех штаммов *Y. pestis*, но не для псевдотуберкулезного микроба, и отсутствуют переменные единичные нуклеотиды,

В геноме вакцинного штамма EV НИИЭГ обнаружено 27 SNPs, которые в соответствии с 680-SNP алгоритмом маркируют филогенетическую линию 1. ORI (*subsp. pestis* bv. *orientalis*) и, следовательно, относят его к этой линии. Наличие других 48 SNPs определяет принадлежность штамма EV НИИЭГ к ветви 1. ORI3 (штаммы с территории о. Мадагаскар). В то же время в геноме вакцинного штамма EV НИИЭГ отсутствуют 7 SNPs, являющиеся генетическими метками штаммов восточного биовара Нового Света (ветвь 1. ORI1) и 22 SNPs, характерные для штаммов азиатской ветви этого биовара (1. ORI2). Кроме того, для штамма EV НИИЭГ обнаружены 29 уникальных SNP локусов, отличающих его от других штаммов геномного варианта 1. ORI3 (с территории о. Мадагаскар), которые в совокупности с SNP, ниже лежащими по схеме анализа, могут рассматриваться

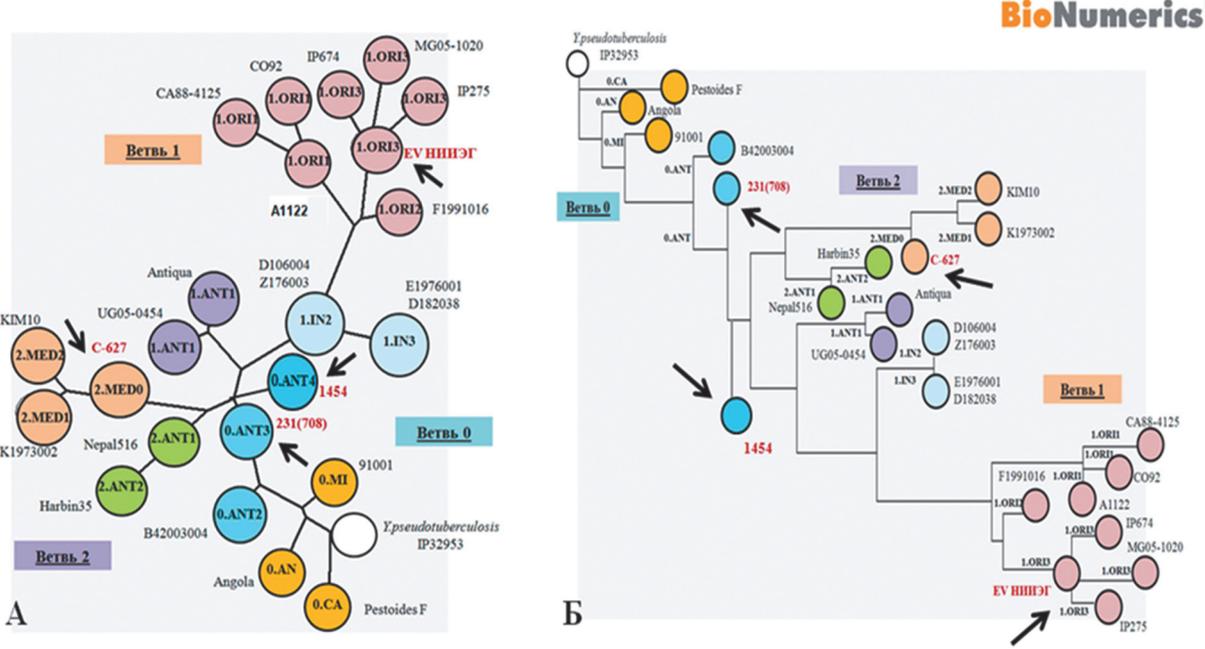


Рис. 2. Филогенетические деревья штаммов *Y. pestis*, построенные на основе полногеномного 680-SNP анализа с использованием программы BioNumerics v7.0 (Applied Math NV, Бельгия) и методов: **А** – Maximum parsimony, **Б** – Neighbour-Joining. Линии: 0. CA – ssp. *caucasica*; 0. ANG – штамм Angola; 0. MIC – штаммы *microtus*; 0. ANT2,3, 1. ANTI, 2. ANTI, 2 – bv. *antiqua*; 2. MED0, 1, 2 – bv. *medievalis*; 1. IN2, 3 – штаммы *intermedium*; 1. ORI1, 2, 3 – bv. *orientalis*. Положение штаммов EV НИИЭГ, C-627 и 231(708), 1454 отмечено стрелками

как его характерные генетические маркеры.

Наиболее важным результатом полногеномного секвенирования вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ является получение окончательного доказательства отсутствия в его геноме всей хромосомной области пигментации – *pgm* области, включающей остров высокой патогенности НР1 с генами сидерофорзависимой системы потребления железа. Наличие *pgm* области в хромосоме обязательно для проявления вирулентности штаммами *Y. pestis*. Ввиду наличия такой протяженной делеции размером около 102 т.п.н. реверсия вакцинного штамма EV НИИЭГ к вирулентности невозможна, что еще раз подтверждает безопасность его использования, которая на практике подтверждена многолетним опытом применения вакцины для профилактики чумы у людей.

В Российской Федерации существует 11 природных очагов чумы, большинство из которых занимают очаги сусликового и песчаночного типов, в которых циркулируют штаммы *Y. pestis* средневекового биовара [8]. Поэтому особый интерес представлял анализ полногеномной последовательности штамма С-627 из Центрально-Кавказского высокогорного очага (№01), относящегося к средневековому биовару. Кроме того, штамм С-627 интересен тем, что он выделен в Кубано-Малкинском районе Центрально-Кавказского высокогорного очага, где циркулируют изоляты с уникальными особенностями, не встречающимися у других представителей *Y. pestis*. Они ауксотрофны по аминокислоте пролину и содержат дополнительную плазмиду размером около 3 мДа с неизвестными функциями. Такие пролинзависимые штаммы, как С-627, в схеме мирового генетического разнообразия возбудителя чумы не представлены и было интересно определить их локализацию на филогенетическом древе *Y. pestis*.

Как показал проведенный нами 680-SNP анализ полногеномной последовательности штамма С-627, в его геноме присутствуют 23 SNPs, определяющие его принадлежность к филогенетической линии 2.ANT (bv. antiqua)/2.MED (bv. medievalis), и 7 SNPs, относящих этот штамм к линии 2.MED. Также выявлено 54 SNPs, отделяющие штамм С-627 от других изолятов средневекового биовара ветви 2.MED, 3 из которых были общими со штаммами азиатской линии античного биовара 2.ANT. Уникальный набор мутаций, сочетающий SNPs, характерные для средневекового (2.MED) и античного (2.ANT) биоваров, а также наличие 54 SNPs, не встречающихся у штаммов 2.MED, позволяет нам выделить штамм С-627 в отдельную древнюю ветвь 2.MED0, которая расположена в основании этой ветви и ранее не была представлена на схеме мирового разнообразия *Y. pestis*.

По аналогичному алгоритму проведен анализ античного штамма 231(708) из Аксайского высокогорного очага чумы (№ 33) в Киргизии (группа Тянь-Шаньских высокогорных очагов). Штамм 231(708) широко используется в практике лабораторных исследований в качестве высоковирулентного штамма *Y. pestis*. Следует отметить, что в схеме мировой

эволюции штаммов возбудителя чумы отсутствуют штаммы из Тянь-Шаньской высокогорной группы очагов, и их эволюционное положение в системе глобального разнообразия возбудителя чумы не установлено. При анализе полногеномной последовательности штамма 231(708) на основе 680-SNP алгоритма нами выявлено наличие у него 10 SNPs, маркерных для филогенетической линии 0, включающей все неосновные подвиды и древнюю группу штаммов античного биовара, а также 99 SNP локусов, характерных для основного подвида возбудителя чумы. В то же время в геноме штамма 231(708) отсутствовали SNPs, характерные для двух других линий античного биовара – азиатской 1.ANT (96 SNPs) и африканской 2.ANT (29 SNPs) и эволюционно связанных с ними восточным 1.ORI (27 SNPs) и средневековым 2.MED (69 SNPs) биоварами. Все это указывает на эволюционную древность штамма 231(708) из Аксайского высокогорного очага, и устанавливает его принадлежность к ветви античного биовара 0.ANT. Штамм 231(708) отнесен нами к ветви 0.ANT3 по 19 уникальным SNP-локусам, отсутствующим у другой древней ветви штаммов античного биовара 0.ANT2, выделенных в Китае. В дальнейшем представляет значительный интерес исследование полногеномной последовательности на основе 680-SNP алгоритма штаммов из других высокогорных очагов Тянь-Шаня для выявления генетического разнообразия *Y. pestis* в этом участке Центрально-Азиатской зоны очаговости чумы.

В 2012 г. в Алтайском горном очаге (№ 36) был впервые изолирован штамм основного подвида *Y. pestis* 1454, в то время как ранее на этой территории выделялись только штаммы алтайского подвида. По комплексу фенотипических и генетических признаков штамм 1454 был отнесен к тувинскому варианту основного подвида, который циркулирует в Тувинском горном очаге чумы [1]. Штаммы тувинского варианта содержат дополнительную плазмиду 22 мДа. Поскольку такие штаммы не представлены в мировой схеме эволюции возбудителя чумы, нами был проведен анализ его полногеномной последовательности на основе 680-SNP алгоритма. В геноме штамма 1454 выявлено 10 SNPs, характерных для эволюционной линии 0, включающей 0.ANT, 0.CA, 0.ANG, 0.MIC и 99 SNPs, маркерных для основного подвида возбудителя чумы. Штамм 1454 отнесен нами к 0.ANT, поскольку в его геноме не обнаружены SNPs, характерные для других линий античного биовара – азиатской 1.ANT (96 SNPs) и африканской 2.ANT (29 SNPs). Он выделен нами в новую ветвь 0.ANT4, поскольку у него отсутствуют маркерные SNPs ветвей 0.ANT2 (штамм В42003004) и 0.ANT3 (штамм 231(708)). В геноме штамма 1454 обнаружено 30 уникальных SNPs (22 внутригенной и 8 межгенной локализации), которые не встречаются ни у одной из ветвей *Y. pestis*, и, вероятно, являются характерными генетическими метками тувинского варианта.

Мы провели филогенетический анализ *Y. pestis* EV НИИЭГ, С-627, 231(708), 1454 и других штам-

мов, использованных в этой работе (табл. 1), на основе 680 SNPs, и построение дендрограмм с применением программного обеспечения Bionumerics v.7.0 (Applied Math NV, Бельгия) (рис. 2). Из этих дендрограмм следует, что три исследованных нами штамма *Y. pestis* C-627 средневекового биовара из Центрально-Кавказского высокогорного очага, 231(708) из Аксайского высокогорного очага и 1454 из Алтайского горного очага относятся к древним линиям эволюции возбудителя чумы. При этом две из них 2.MED0 и 0.ANT4, представленные штаммами C-627 и 1454, ранее не были включены в схему мирового генетического разнообразия. Дальнейший полногеномный 680-SNP анализ штаммов *Y. pestis* из природных очагов России и стран ближнего зарубежья, безусловно, расширит схему мирового генетического разнообразия возбудителя чумы.

Таким образом, нами разработан оптимизированный алгоритм полногеномного 680-SNP анализа, использование которого позволяет провести молекулярную идентификацию исследуемого штамма *Y. pestis* и определить его принадлежность к одной из филогенетических линий возбудителя чумы. С его помощью получены молекулярные портреты штаммов *Y. pestis* из двух природных очагов России и одного очага в Киргизии, а также вакцинного штамма EV НИИЭГ. Определены их геномные варианты: 1.ORI3 (для штамма EV НИИЭГ), 2.MED0 (C-627), 0.ANT3 (231/708/), 0.ANT4 (1454), и положение в схеме мирового разнообразия *Y. pestis*. В перспективе будут определены геномные варианты штаммов *Y. pestis* из всех очагов России и ближнего зарубежья.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонov С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязев С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Изженко 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. Ерошенко Г.А., Одинокov Г.Н., Куклева Л.М., Кутырев В.В. Генетический анализ биохимических различий штаммов *Yersinia pestis*. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 2012; 3:90–5.
3. Ерошенко Г.А., Одинокov Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Вариативные локусы генов *parA*, *aspA*, *rhaS*, *zwf* и *icaB* как эффективные ДНК-мишени для генотипирования штаммов *Yersinia pestis*. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):57–9.
4. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Одинокov Г.Н., Кутырев В.В. Сравнение полной нуклеотидной последовательности гена *rhaS* у штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):38–42.
5. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis*. Пробл. особо опасных инф. 1998; (78):11–2.
6. Одинокov Г.Н., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Структурно-функциональный анализ генов *par* оперона у *Yersinia pestis* разных подвидов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 4(98):40–2.
7. Одинокov Г.Н., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Определение генетических основ аукотрофности штаммов *Yersinia pestis* кавказского подвида. Генетика. 2012; 48(4):376–82.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.

Медицина; 2004. 192 с.

9. Eppinger M., Worsham P.L., Nikolich M.P., Riley D.R., Sebastian Y., Mou S., Achtman M., Lindler L.E., Ravel J. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangeneome of the plague bacterium. J. Bacteriol. 2010; 192(6):1685–99.
10. 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.
11. Morelli G., Song Y., Mazzone 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. Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of *Yersinia pestis*. Nat Genet. 2010; 42(12):1140–3.
12. 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 proposal of a new biovar, microtus. J. Bacteriol. 2004; 186:5147–62.

## References

1. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vitязeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivzhenko N.I., Rozhdvestvensky 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.
2. Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Kukleva L.M., Kutyrev V.V. [Genetic analysis of biochemical differences between *Yersinia pestis* strains]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2012; 3:90–5.
3. Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Koukleva L.M., Pavlova A.I., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Kutyrev V.V. [Variable loci of the *parA*, *rhaS*, *zwf* and *icaB* genes as effective DNA-targets for *Yersinia pestis* strains genotyping]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; (104):57–9.
4. Koukleva L.M., Eroshenko G.A., Kouklev V.E., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Odinokov G.N., Kutyrev V.V. [Comparison of complete nucleotide sequence of *rhaS* gene in the strains of plague etiological agent of main and minor subspecies]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; (97):38–42.
5. Kutyrev V.V., Protsenko O.A. [Classification and molecular-genetic studies of *Yersinia pestis*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1998; (78):11–2.
6. Odinokov G.N., Eroshenko G.A., Vidyaeva N.A., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Kutyrev V.V. [Structural and functional analysis of *par* operon genes in *Yersinia pestis* strains of different subspecies]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; (98):40–2.
7. Odinokov G.N., Eroshenko G.A., Koukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. [Determination of genetic bases of auxotrophy in *Yersinia pestis* spp. Caucasic strains]. Genetika. 2012; 48(4):376–82.
8. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Natural Plague Foci in the territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia, and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.
9. Eppinger M., Worsham P.L., Nikolich M.P., Riley D.R., Sebastian Y., Mou S., Achtman M., Lindler L.E., Ravel J. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangeneome of the plague bacterium. J. Bacteriol. 2010; 192(6):1685–99.
10. 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.
11. Morelli G., Song Y., Mazzone 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. Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of *Yersinia pestis*. Nat Genet. 2010; 42(12):1140–3.
12. 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 proposal of a new biovar, microtus. J. Bacteriol. 2004; 186:5147–62.

## Authors:

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

## Об авторах:

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

Поступила 07.06.13.