

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-122-129

УДК 616.98:579.842.23

К.А. Никифоров¹, О.А. Морозов¹, Г.А. Ерошенко¹, Е.Г. Оглодин¹, Л.М. Куклева¹, Е.А. Нарышкина¹,
Я.М. Краснов¹, В.М. Корзун², С.В. Балахонов², В.В. Кутырев¹

АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ *YERSINIA PESTIS* АЛТАЙСКОГО БИОВАРА ЦЕНТРАЛЬНОАЗИАТСКОГО ПОДВИДА ПО ДАННЫМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;

²ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

Цель работы – филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида, выделенных в 1965–2020 гг. в Горно-Алтайском высокогорном и Сайлюгемском природном очагах чумы на территории России и Монголии, по данным полногеномного секвенирования. **Материалы и методы.** Для определения популяционной структуры алтайского биовара центральноазиатского подвида были использованы 34 полногеномные последовательности (включая 20 штаммов *Y. pestis* алтайского биовара, 18 из которых секвенированы нами). Для выделения ДНК штаммов *Y. pestis* использовали набор реагентов PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Секвенирование нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* проводили в Ion PGM system Lifetechnologies. Анализ и обработку полученных данных выполняли в Newblergs Assembler 2.6 и IonTorrent Suite software package, 3.4.2. Поиск SNPs проводили, используя программу Wombac 2.0. Дендрограмму Maximum Likelihood строили с помощью программ PhyML 3.1. Визуализацию дендрограммы проводили с помощью программы FigTree 1.4.3. **Результаты и обсуждение.** По данным полногеномного анализа с учетом 1871 выявленного полиморфного нуклеотида определена пространственная структура алтайского биовара центральноазиатского подвида, включающая несколько филогеографических ветвей: Курайско-Тархатинскую (кластер 0.PE4a-1) и Уландрыкско-Монгольскую (0.PE4a-2), что находится в согласовании с географическими регионами выделения штаммов, образующих эти ветви в Горном Алтае. Курайско-Тархатинская ветвь делится с формированием Курайской (субкластер 0.PE4a-1-1, образованный штаммами 2009–2018 гг.) и Тархатинской (субкластер 0.PE4a-1-2, образованный штаммами 2012–2020 гг.) подветвей, а Уландрыкско-Монгольская ветвь эволюции делится на подветви, представленные штаммами из Уландрыкского мезоочага (субкластер 0.PE4a-2-2, штаммы 1965–2010 гг.) и Сайлюгемского очага Монголии (субкластер 0.PE4a-2-1, штаммы 1964–1990 гг.).

Ключевые слова: возбудитель чумы, природные очаги, алтайский биовар центральноазиатского подвида, филогенетический анализ.

Корреспондирующий автор: Никифоров Константин Алексеевич, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Для цитирования: Никифоров К.А., Морозов О.А., Ерошенко Г.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Корзун В.М., Балахонов С.В., Кутырев В.В. Анализ пространственной структуры популяции *Yersinia pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида по данным полногеномного секвенирования. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1:122–129. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-122-129

Поступила 09.07.2021. Отправлена на доработку 04.08.2021. Принята к публ. 23.12.2021.

К.А. Nikiforov¹, О.А. Morozov¹, Г.А. Eroshenko¹, Е.Г. Oglochin¹, Л.М. Kukleva¹, Е.А. Naryshkina¹,
Ya.M. Krasnov¹, V.M. Korzun², S.V. Balakhonov², V.V. Kutyrav¹

Spatial Structure of *Yersinia pestis* Population Belonging to Altai Biovar, Subspecies *central asiatica* According to Genome-Wide Sequencing Data

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

²Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to conduct phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains, biovar altaica ssp. *central asiatica*, isolated in Gorno-Altai high-mountain and Sailyugem natural plague foci on the territory of Russia and Mongolia in 1965–2020, by full-genome sequencing data. **Materials and methods.** To determine the population structure of the biovar altaica ssp. *central asiatica*, 34 whole genome sequences were used (including 20 *Y. pestis* strains of the biovar altaica, 18 of which were sequenced by us). To isolate DNA from the *Y. pestis* strains, a PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA) was applied. Sequencing of the nucleotide sequences of *Y. pestis* strains was carried out in Ion PGM system Lifetechnologies. The analysis and processing of the obtained data were performed with the help of Newblergs Assembler 2.6 and IonTorrent Suite software package, 3.4.2. The search for SNPs was performed using the Wombac 2.0 program. The Maximum Likelihood dendrogram was built in the PhyML 3.1. The dendrogram was visualized using the FigTree 1.4.3 software. **Results and discussion.** Based on the data of whole genome analysis, taking into account the 1871 revealed polymorphic nucleotides, the spatial structure of the biovar altaica ssp. *central asiatica* has been determined. It includes several phylogeographic branches: the Kurai-Tarkhatinskaya (cluster 0.PE4a-1) and the Ulandryk-Mongolian (0.PE4a-2), which is in agreement with the geographical regions of the isolation of strains forming these branches in the Altai Mountains. The Kurai-Tarkhatinskaya branch is further divided into the Kurai (sub-cluster 0.PE4a-1-1, formed by the strains of 2009–2018) and Tarkhatinskaya (subcluster 0.PE4a-1-2, formed by the strains of 2012–2020) sub-branches, while the Ulandryk-Mongolian branch of evolution is split into sub-branches represented by strains from the Ulandryk meso focus (sub-cluster 0.PE4a-2-2, strains 1965–2010) and the Sailyugem focus of Mongolia (sub-cluster 0.PE4a-2-1, strains 1964–1990).

Key words: plague agent, natural foci, biovar altaica ssp. central asiatica, phylogenetic analysis.

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

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

Citation: Nikiforov K.A., Morozov O.A., Eroshenko G.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Krasnov Ya.M., Korzun V.M., Balakhonov S.V., Kutyrev V.V. Spatial Structure of *Yersinia pestis* Population Belonging to Altai Biovar, Subspecies *central asiatica* According to Genome-Wide Sequencing Data. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*, 2022; 1:122–129. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-122-129

Received 09.07.2021. Revised 04.08.2021. Accepted 23.12.2021.

Nikiforov K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4115-9486>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Oglodin E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>
Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>
Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>

Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>
Korzun V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1947-5252>
Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>
Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Чума – зооантропонозная особо опасная инфекция, природные очаги которой расположены на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды, в горных, степных, полупустынных и пустынных типах географического ландшафта [1]. Чума представляет угрозу общественному здравоохранению и в настоящее время, вызывая каждый год спорадические вспышки в очагах всего мира. В Российской Федерации и в странах бывшего СССР действуют 45 очагов чумы, расположенных в Прикаспии, Сибири, на Кавказе и в Центральной Азии [2, 3]. Ландшафтное и климатическое многообразие этих территорий послужило причиной существования различных популяций возбудителя чумы.

На севере центральноазиатской зоны природной очаговости чумы расположены Горно-Алтайский высокогорный очаг в Российской Федерации (представляет собой северную российскую часть Сайлюгемского природного очага) и Сайлюгемский природный очаг в Монголии. Площадь этих очагов составляет около 28600 кв. км. Эпизоотическая активность по чуме в монгольской части очага впервые зарегистрирована в 1953 г., в российской – позднее, в 1961 г. [2]. Выделенные здесь штаммы *Yersinia pestis* были отнесены к алтайскому подвиду *Y. pestis* subspecies (ssp.) *altaica* в соответствии с использовавшейся классификацией возбудителя чумы [4]. По разработанной зарубежными исследователями генетической номенклатуре ветвей эволюции алтайский подвид относят к филогенетической ветви 0.PE4 [5–7]. По новой усовершенствованной классификации возбудителя чумы алтайский подвид получил обозначение алтайского биовара центральноазиатского подвида – *Y. pestis* ssp. *central asiatica* biovar (bv.) *altaica* и отнесен к филогенетической ветви 0.PE4a [8, 9]. Кроме алтайского биовара в центральноазиатский подвид включены также три других биовара: гиссарский (0.PE4h), таласский (0.PE4t) и *microtus* (0.PE4m). Популяции биоваров центральноазиатского подвида распространены в центральноазиатской зоне природной очаговости чумы на территории таких стран, как Россия, Монголия, Китай, Киргизия, Таджикистан. Ареал алтайского биовара находится на территории Горно-Алтайского высокогорного очага (представляющего собой северную российскую часть Сайлюгемского природного очага), Сайлюгемского природного очага в Монголии [2, 4, 10] и ряда других природных очагов Монголии [7, 11, 12]. Штаммы алтайского биовара

имеют свои отличительные биохимические свойства, общие с тремя другими биоварами центральноазиатского подвида. Они, как и другие неосновные подвиды, утилизируют дисахариды рамнозу и мелибиозу, но не ферментируют дисахарид арабинозу и не редуцируют нитраты, что связано с мутациями в генах, кодирующих эти признаки [13, 14]. Эти отличия используются для дифференциации центральноазиатского от других подвидов *Y. pestis*. В 2012 г. в Горно-Алтайском высокогорном очаге впервые за всю историю наблюдения выделен штамм *Y. pestis* ssp. *pestis* античного биовара филогенетической ветви 4.ANT. Ранее штаммы 4.ANT выделяли только в Тувинском горном очаге в России и природных очагах Монгольского Алтая. В результате расширения ареала популяции 4.ANT в 2014–2016 гг. в Республике Алтай произошли случаи заболевания чумой человека [15]. По этой причине Горно-Алтайский высокогорный очаг был отнесен к сочетанным очагам с одновременной циркуляцией основного и алтайского биовара центральноазиатского подвида с повышением эпидемической значимости очага [9]. Основным носителем *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* в очаге является монгольская пищуха (*Ochotona pallasii*); в нем выделено три мезоочага, пространственно соответствующих популяциям этого животного [4]. Основным носителем *Y. pestis* ssp. *pestis* является серый сурок (*Marmota baibacina*) [16].

Популяционная структура алтайского биовара до сих пор была исследована в основном с помощью метода мультилокусного VNTR-анализа (от англ. variable number tandem repeats) по 25 локусам переменных тандемных повторов – MLVA25 [4, 16]. Этот метод обладает высокой разрешающей способностью для разделения штаммов *Y. pestis*, но имеет ограниченное применение для реконструкции долговременной эволюции и анализа филогенетического родства штаммов. Более эффективным методом для решения этих задач является анализ полиморфизма единичных нуклеотидов (SNP) в полногеномных последовательностях штаммов. Точность филогенетической реконструкции зависит от набора штаммов, использованного для анализа исследуемой популяции.

Цель работы – филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида, выделенных с 1964 по 2020 год на территории России и Монголии, по данным полногеномного секвенирования.

Материалы и методы

Штаммы *Y. pestis*, условия культивирования, биохимический анализ. Используемые в работе штаммы *Y. pestis* получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (табл. 1). Штаммы выращивали на LB агаре и в LB

бульоне (рН 7,2) при 28 °С в течение 24–48 ч. Анализ биохимических свойств штаммов проводили общепринятыми методами, используемыми в лабораторной диагностике чумы [17].

Определение нуклеотидных последовательностей, выявление SNPs и филогенетический анализ. Для выделения ДНК штаммов *Y. pestis* использова-

Таблица 1 / Table 1

Штаммы *Y. pestis* алтайского биоара, полногеномные последовательности которых использованы в работе
Strains of *Y. pestis* of the biovar altaica, whose genome-wide sequences were used in the work

Штамм Strain	Место выделения Site of isolation	Год, объект выделения Year, object of isolation
912-914	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Центральная часть Курайского хребта Republic of Altai, Kosh-Agach district, Central part of Kuraisky range	2018 г., монгольская пищуха <i>Ochotona pallasi</i> 2018, Mongolian pika, <i>Ochotona pallasi</i>
И-3531	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Восточная часть Курайского хребта Republic of Altai, Kosh-Agach district, Eastern part of Kuraisky range	2009 г., блохи <i>Amphalius runatus</i> 2009, <i>Amphalius runatus</i> fleas
И-3705	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Восточная часть Курайского хребта Republic of Altai, Kosh-Agach district, Eastern part of Kuraisky range	2019 г., блохи <i>Ctenophyllus hirticrus</i> 2019, <i>Ctenophyllus hirticrus</i> fleas
И-3704	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Восточная часть Курайского хребта Republic of Altai, Kosh-Agach district, Eastern part of Kuraisky range	2019 г., блохи <i>Paramonopsyllus scalonae</i> 2019, <i>Paramonopsyllus scalonae</i> fleas
1313	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Сербисту Republic of Altai, Kosh-Agach district, Serbistu plot	2014 г., блохи <i>Paradoxopsyllus scorodumovi</i> 2014, <i>Paradoxopsyllus scorodumovi</i> fleas
1139	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Восточная часть Курайского хребта Republic of Altai, Kosh-Agach district, Eastern part of Kuraisky range	2018 г., блохи <i>P. scorodumovi</i> 2018, <i>P. scorodumovi</i> fleas
М-1948 (2751-55)	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Кок-Озёк Republic of Altai, Kosh-Agach district, Kok-Ozek plot	2012 г., монгольская пищуха <i>O. pallasi</i> 2012, Mongolian pika <i>O. pallasi</i>
2183(И-1023)	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Стационар Republic of Altai, Kosh-Agach district, Stasionar plot	1965 г., серый сурок <i>Marmota baibacina</i> 1965, gray marmot <i>Marmota baibacina</i>
И-1031	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Стационар Republic of Altai, Kosh-Agach district, Stasionar plot	1965 г., длиннохвостый суслик <i>Spermophilus undulates</i> 1965, long-tailed souslik <i>Spermophilus undulates</i>
И-2998	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Стационар, лог Кызыл-Тас Republic of Altai, Kosh-Agach district, Stasionar plot, Kyzyl-Tas ravine	1982 г., монгольская пищуха <i>O. pallasi</i> 1982, Mongolian pika <i>O. pallasi</i>
М-1912	Республика Алтай, Кош-Агачский район, Уландрыкский мезоочаг Republic of Altai, Kosh-Agach district, Ulandryksky meso focus	2010 г., блохи <i>C. hirticrus</i> 2010, <i>C. hirticrus</i> fleas
И-971	МНР, Завханский аймак, Шилуустэй сомон, местность Дуутын ор Хонхор Mongolian People's Republic (MPR), Shiluustey sum, Duutyn or Khonkhor area	1964 г., полевка Брандта <i>Lasiopodomys brandti</i> 1964, Brandt's vole <i>Lasiopodomys brandti</i>
И-2795	МНР, Баян-Улгийский аймак, Ногоон нуур сомон, участок Дурбет-Даба MPR, Bayan-Ulgi aimak, Nogoon nuur sum, Durbet-Daba plot	1978 г., длиннохвостый суслик <i>S. undulates</i> 1978, long-tailed souslik <i>S. undulates</i>
И-2637	МНР, Баян-Улгийский аймак, Ногоон нуур сомон, участок Ортен-Булаг MPR, Bayan-Ulgi aimak, Nogoon nuur sum, Orten-Bulag plot	1977 г., серый сурок <i>M. baibacina</i> 1977, gray marmot <i>M. baibacina</i>
И-3281	МНР, Баян-Улгийский аймак, Улаанхус сомон, участок Худак MPR, Bayan-Ulgi aimak, Ulaankhus sum, Khudag plot	1990 г., блохи <i>P. scorodumovi</i> 1990, <i>P. scorodumovi</i> fleas
И-3280	МНР, Баян-Улгий аймак, Улаанхус сомон, участок Худак MPR, Bayan-Ulgi aimak, Ulaankhus sum, Khudag plot	1990 г., монгольская пищуха <i>O. pallasi</i> 1990, Mongolian pika <i>O. pallasi</i>
И-3727	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Середина реки Чаган-Узун Republic of Altai, Kosh-Agach district, mid-stream of the river Chagan-Uzun	2020 г., блохи <i>P. scalonae</i> 2020, <i>P. scalonae</i> fleas
И-3724	Республика Алтай, Кош-Агачский район, участок Середина реки Чаган-Узун Republic of Altai, Kosh-Agach district, mid-stream of the river Chagan-Uzun	2020 г. блохи <i>C. hirticrus</i> 2020, <i>C. hirticrus</i> fleas
Pestoides A*	Неизвестно Unknown	Неизвестно Unknown
Pestoides B*	Неизвестно Unknown	Неизвестно Unknown

Примечание: * – штаммы взяты из GenBank; МНР – Монгольская Народная Республика.

Note: * – strains obtained from GenBank. MPR – Mongolian People's Republic.

ли набор реагентов PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Секвенирование нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* проводили в Ion PGM system Lifetechnologies. Анализ и обработку полученных данных выполняли в Newblergs Assembler 2.6 и IonTorrent Suite soft warepackage, 3.4.2. Для поиска SNPs применяли Wombac 2.0 (<https://github.com/tseemann/wombac>), затем удаляли единичные нуклеотидные замены, находящиеся в областях гомоплазии генома [7]. Дендрограмму Maximum Likelihood получали с помощью программы PhyML 3.1 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>), используя модель НКУ85. Визуализацию дендрограммы проводили с помощью программы FigTree 1.4.3 (<http://influenza.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Результаты и обсуждение

Для филогенетического анализа и определения популяционной структуры *Y. pestis* алтайского биовара нами использовано 34 полногеномных последовательности штаммов *Y. pestis*, 20 из которых принадлежали к алтайскому биовару центральноазиатского подвида (18 секвенировано нами), выделенных в период с 1964 по 2020 год в России и Монголии от различных носителей и переносчиков.

Филогенетический анализ и построение дендрограммы по алгоритму Maximum Likelihood осуществ-

ляли на основе обнаруженной 1871 коровой SNPs в нуклеотидных последовательностях 34 штаммов *Y. pestis* (рис. 1). На дендрограмме штаммы центральноазиатского подвида образовали отдельную филогенетическую ветвь 0. PE4, делящуюся на четыре подветви: 0. PE4m (биовар microtus), 0. PE4h (гиссарский биовар), 0. PE4t (таласский биовар) и 0. PE4a (алтайский биовар). Все 20 штаммов алтайского биовара вошли в состав подветви 0. PE4a, расположенной изолированно в составе центральноазиатского подвида. У штаммов, входящих в состав подветви 0. PE4a, выявлено 23 общих уникальных SNPs (преимущественно в кодирующих последовательностях), отделяющих их от других штаммов *Y. pestis* (табл. 2).

Различия между штаммами внутри подветви 0. PE4a составляют от 1 до 11 SNPs. На дендрограмме подветвь 0. PE4a делится на два кластера. Первый кластер 0. PE4a-1 (9 штаммов) имеет 4 уникальных SNPs (две – в кодирующих последовательностях). У второго кластера 0. PE4a-2 (11 штаммов) присутствуют 11 уникальных SNPs (9 – в кодирующих последовательностях) (табл. 2). Кластер 0. PE4a-1 образован штаммами, выделенными на территории Курайского и Тархатинского мезоочагов Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы, представляющего собой российскую часть трансграничного Сайлюгемского очага. Штаммы, вы-

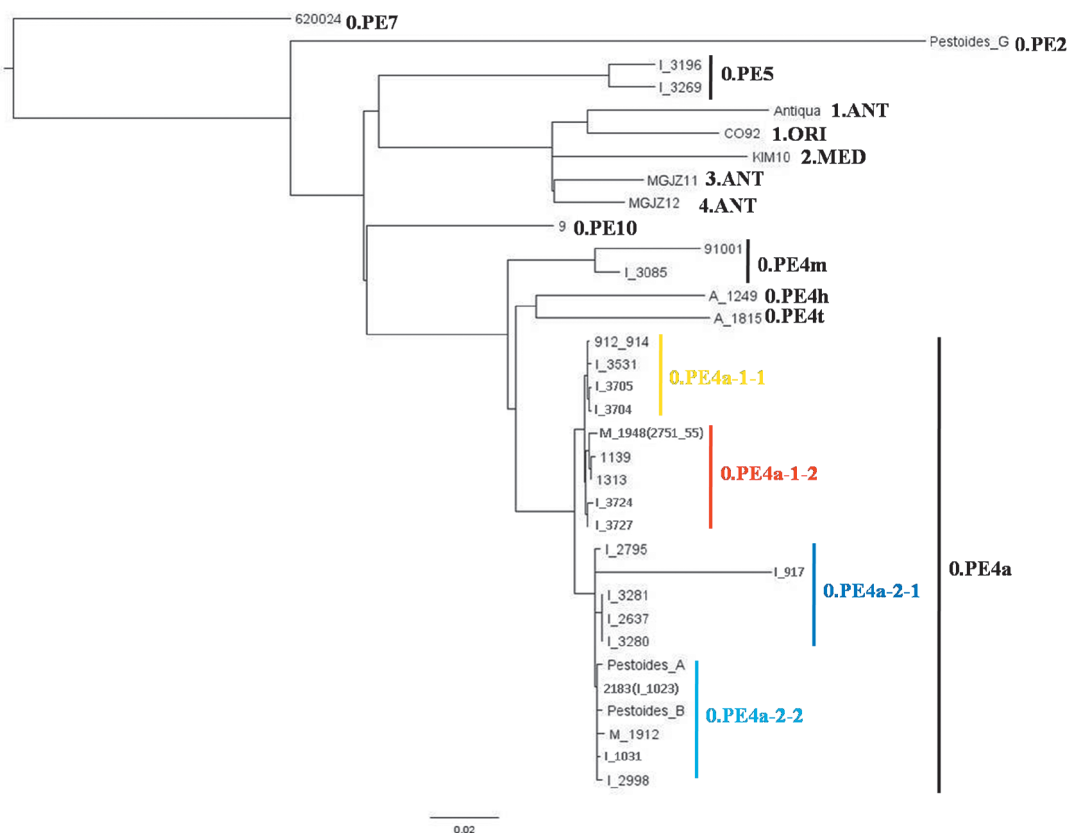


Рис. 1. Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида на основе выявленной 1871 коровой SNPs 34 штаммов из природных очагов России, Монголии, а также штаммов из других регионов мира. Алгоритм Maximum Likelihood, программа PhyML 3.1, модель НКУ85

Fig. 1. Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains, biovar altaica, subspecies central asiatica, based on identified 1871 core SNPs of 34 strains from natural foci in Russia, Mongolia, as well as strains from other regions of the world. Maximum Likelihood algorithm, PhyML 3.1, model НКУ85

Таблица 2 / Table 2

SNPs, уникальные для штаммов *Y. pestis* алтайского биоэара центральноазиатского подвида
SNPs unique to *Y. pestis* strains of the altaica biovar, subspecies *central asiatica*

Позиция SNP от начала генома* Position of the SNP from the beginning of the genome*	Мутация Mutation	Замена аминокислоты Amino acid substitution	Ген, локус, межгенное пространство Gene, locus, intergenic space	Филогенетическая ветвь Phylogenetic branch
96740	G → A	–	<i>tri</i>	0.PE4a
101221	G → A	–	<i>glpK</i>	
469276	A → G	–	<i>YPO0496, b4391</i>	
794121	A → C	Valine→Glycine	<i>YPO0763</i>	
1224618	G → T	–	<i>YPO1076 – YPO1077</i>	
1280052	T → C	Tryptophan→Arginine	<i>aroG</i>	
1715235	G → A	–	<i>mglC – sanA</i>	
1763809	G → A	Proline→Serine	<i>hisD</i>	
1798946	G → T	–	<i>YPO1576 – YPO1577</i>	
2162210	A → T	–	<i>irp2 – ybtA</i>	
2184227	C → T	Glutamic acid→Glycine	<i>YPO1926</i>	
2095334	G → A	Alanine→Valine	<i>poaA</i>	
2276678	C → T	–	<i>YPO2774 – YPO2475</i>	
2349205	C → T	Leucine→Phenylalanine	<i>YPO2068</i>	
3106018	T → G	Valine→Glycine	<i>cvpA</i>	
3219815	A → T	–	<i>ndk</i>	
3355215	C → A	Glycine→Cysteine	<i>YPO3002</i>	
4064027	A → C	Leucine→Arginine	<i>YPO3641</i>	
4308402	G → T	–	<i>YPO3839</i>	
4412614	G → A	–	<i>argC – argE</i>	
4431907	G → T	Proline→Glutamine	<i>glgB</i>	
4464500	G → T	Aspartic acid→Tyrosine	<i>YPO3965</i>	
4638911	A → T	–	<i>pstS – glmS</i>	
330713	G → A	–	<i>tyrB – YPO0323</i>	
1393685	T → C	–	<i>YPO1223 – YPO1234</i>	
1784361	C → T	Leucine→Proline	<i>YPO1563</i>	
3771762	G → T	Glycine→Valine	<i>barA</i>	
959824	C → A	Arginine→Leucine	<i>YPO0873</i>	
493535	A → G	Asparagine→Serine	<i>YPO0465</i>	
41536	C → T	Histidine→Tyrosine	<i>fabY</i>	
721592	G → C	Threonine→Arginine	<i>YPO_RS04280</i>	
774000	G → T	–	<i>glbD</i>	
1864073	A → C	–	<i>asuE</i>	
1966375	G → A	Glutamine→Nonsense Mutation	<i>YPO1712</i>	
2246161	G → A	–	<i>YPO1976 – YPO1977</i>	
2306367	C → T	Arginine→Cysteine	<i>YPO3799</i>	
2666347	C → T	–	<i>pep</i>	
3761271	G → A	Serine→Leucine	<i>cysG</i>	
3810544	C → T	–	<i>speD</i>	
4052890	A → G	–	<i>YPO3632 – YPO3633</i>	
3178225	G → T	Arginine→Leucine	<i>YPO2846</i>	
				0.PE4a-2

Примечание: * – указана позиция по геному референтного штамма *Y. pestis* CO92 (номер доступа в NCBI Genbank № NC_003143.1).

Note: * – indicates the position across the genome of the reference strain, *Y. pestis* CO92 (access number in NCBI Genbank no. NC_003143.1).

деленные на территории Уландрыкского мезочага Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и монгольской части Сайлюгемского очага, а также один штамм с территории аймака Завхан в Монголии вошел в кластер 0.PE4a-2.

В свою очередь кластер 0.PE4a-1 делится на два субкластера. Субкластер 0.PE4a-1-1, включаю-

щий четыре штамма: 912-914, И-3531, И-3705 и И-3704 (2009–2019 гг.), – имеет одну общую SNP в кодирующей последовательности. Штаммы, входящие в состав этого субкластера, выделены в период с 2009 по 2019 год на территории Курайского мезочага на участках Восточной и Центральной частей Курайского хребта (рис. 2). Второй субкластер

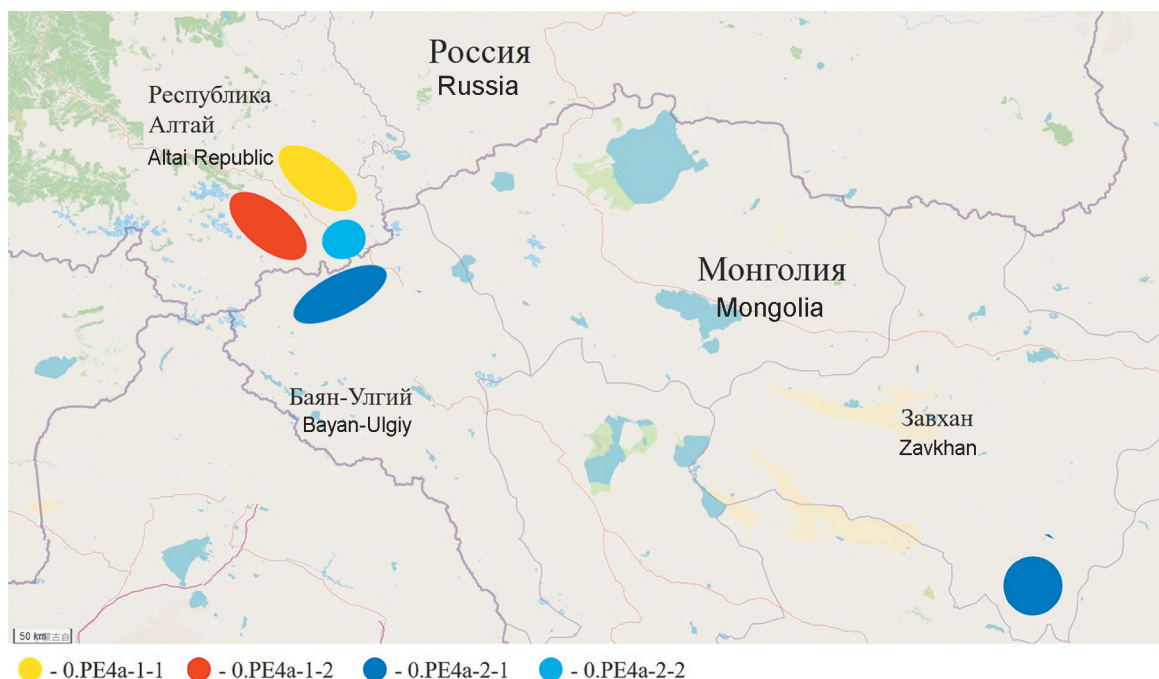


Рис. 2. Географическое распространение различных популяций *Y. pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида филогенетической ветви 0. PE4a. Для рисунка использована карта с сайта OpenStreetMap (www.openstreetmap.org/copyright)

Fig. 2. Geographical distribution of different populations of *Y. pestis*, biovar altaica subspecies central asiatica, of the 0. PE4a phylogenetic branch. The map used in this figure is downloaded from the OpenStreetMap website (www.openstreetmap.org/copyright)

0. PE4a-1-2, образованный пятью штаммами: М-1948 (2751-55), 1139, 1313, И-3724 и И-3727, – отличается одной SNP, тоже расположенной в кодирующей последовательности. Штаммы, которые вошли в состав этого субкластера, выделены в период с 2012 по 2020 год на территории Тархатинского мезоочага. Исключение составил штамм 1139, полученный в Курайском мезоочаге, но, возможно, занесенный сюда из Тархатинского мезоочага.

Второй кластер 0. PE4a-2 объединяет штаммы, нуклеотидные последовательности которых имеют 11 общих SNPs. В составе этого кластера штаммы И-2795, И-3281, И-2637, И-3280 и И-971 образовали субкластер 0. PE4a-2-1. Эти штаммы выделены в Монголии на территории Баян-Улгийского и Завханского аймаков в период с 1964 по 1990 год. Штаммы 2183 (И-1023), И-1031, И-2998 и М-1912, полученные в Уландрыкском мезоочаге в период с 1965 по 2010 год, вместе со штаммами Pestoides A и Pestoides B (NCBI GenBank) (скорее всего, они выделены в том же мезоочаге) образовали другой субкластер 0. PE4a-2-2 (1 SNP) в составе кластера 0. PE4a-2 (рис. 1). Штаммы, циркулирующие в Уландрыкском мезоочаге, имеют наименьшее количество единичных нуклеотидных замен среди всего кластера алтайского биовара, что позволяет предположить, что они более близки к предковым формам алтайского биовара. Эти данные согласуются с гипотезой, высказанной на основании анализа популяционно-экологических закономерностей распространения *Y. pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида в Юго-Восточном Алтае, о вероятном заносе возбудителя из Северо-Западной Монголии в

Уландрыкскую популяцию монгольской пищухи, а затем из нее в Тархатинскую и Курайскую популяции основного носителя [18].

Полученные нами данные полногеномного секвенирования и молекулярно-генетического анализа штаммов алтайского биовара центральноазиатского подвида свидетельствуют о существовании двух основных ветвей эволюции: Курайско-Тархатинской (кластер 0. PE4a-1) и Уландрыкско-Монгольской (0. PE4a-2), что согласуется с географическими регионами выделения этих штаммов в Горном Алтае. В свою очередь Курайско-Тархатинская ветвь делится на Курайскую (субкластер 0. PE4a-1-1, штаммы 2009–2018 гг.) и Тархатинскую (субкластер 0. PE4a-1-2, штаммы 2012–2020 гг.) подветви, а Уландрыкско-Монгольская ветвь эволюции делится на подветви из Уландрыкского мезоочага (субкластер 0. PE4a-2-2, штаммы 1965–2010 гг.) и Сайлюгемского очага Монголии (субкластер 0. PE4a-2-1, штаммы 1964–1990 гг.). Эти результаты хорошо согласуются с ранее полученными данными, показывающими, что в каждом из трех мезоочагов Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы (Уландрыкском, Тархатинском и Курайском) циркулирует чумной микроб, характеризующийся генотипическим своеобразием [4, 18–20].

Таким образом, нами проведен филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида за период наблюдения с 1965 по 2020 год, в том числе штаммов, выделенных в последнее время на территории России и Монголии. С помощью полногеномного SNP-анализа показано наличие нескольких ветвей эволюции (Курайская,

Тархатинская, Уландрыкская и Монгольская), соответствующих территориям их распространения в мезоочагах Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, являющегося северной частью Сайлюгемского природного очага, в Сайлюгемском природном очаге и Завханском аймаке Монголии. Проведен анализ количества и локализации в геноме специфических для основных ветвей эволюции алтайского биовара полиморфных нуклеотидов. Показана относительная генетическая однородность штаммов алтайского биовара центральноазиатского подвида, что, вероятно, обусловлено достаточно стабильными условиями существования в местах циркуляции штаммов алтайского биовара.

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

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
2. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: ООО «Амирит»; 2016. 248 с.
3. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):434–64. DOI: 10.1128/CMR.17.2.434-464.2004.
4. Балахонов С.В., Корзун В.М., редакторы. Горно-Алтайский природный очаг чумы: ретроспективный анализ, эпизоотологический мониторинг, современное состояние. Новосибирск: Наука-Центр; 2014. 272 с.
5. 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(24):14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.
6. 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.
7. 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.
8. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Ogolodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
9. Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Поршаков А.М., Ляпин М.Н., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Аязбаев Т.З., Лопатин А.А., Ашибаков У.М., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по чуме в Российской Федерации и прогноз ее развития на 2020–2025 гг. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 1:43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-50.
10. Никифоров К.А., Морозов О.А., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Популяционная структура, таксономия и генетические особенности штаммов *Yersinia pestis* центральноазиатского подвида. *Генетика.* 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.
11. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zoller L., Wölfel R., Le Fleche P., Scholz H.C. *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One.* 2012; 7(2):e30624. DOI: 10.1371/journal.pone.0030624.
12. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Ефременко Д.В., Афанасьев М.В., Вержуцкий Д.Б., Кузнецова И.В., Шестопалов М.Ю., Дентовская С.В., Куличенко А.Н., Балахонов С.В., Анисимов А.П. Внутривидовая принадлежность рамнозопозитивных штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов чумы Монголии. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2015; 33(1):23–28.
13. 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(15):5147–52. DOI: 10.1128/JB.186.15.5147-5152.2004.
14. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Генетические основы вариабельности признака редукции нитратов у штаммов *Yersinia pestis*. *Генетика.* 2014; 50(5):522–30. DOI: 10.7868/S001667581405004X.
15. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., 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 I. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; 1:60–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.
16. Корзун В.М., Балахонов С.В., Денисов А.В., Чипанин Е.В., Косило С.А., Рождественский Е.Н., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Базарова Г.Х., Ярыгина М.Б. Интродукция возбудителя чумы основного подвида в поселения серого сурка в Юго-Восточном Алтае. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 2017; 4:20–9.
17. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
18. Корзун В.М., Чипанин Е.В., Балахонов С.В., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Михайлов Е.П., Ярыгина М.Б., Косило С.А. Изменение ареала *Yersinia pestis* в Горно-Алтайском природном очаге чумы. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 2014; 4:11–9.
19. Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю., Романова И.Ф. Результаты VNTR-анализа по локусу (5'-CAAA-3')_n штаммов *Yersinia pestis* из активных природных очагов чумы Сибири. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2009; 3:14–6.
20. Ярыгина М.Б., Корзун В.М., Балахонов С.В. Генотипическая структурированность *Yersinia pestis* ssp. *altaiica* в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии.* 2019; 37:86–7.

References

1. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: "Medicine"; 2004. 192 p.
2. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague in the Territory of the Russian Federation and Former Soviet Union (1876–2016)]. Saratov: "Amirit" LLC; 2016. 248 p.
3. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):434–64. DOI: 10.1128/CMR.17.2.434-464.2004.
4. Balakhonov S.V., Korzun V.M., editors. [Gorno-Altai Natural Plague Focus: Retrospective Analysis, Epizootiological Monitoring, Current State]. Novosibirsk: "Nauka Tsentr"; 2014. 272 p.
5. 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(24):14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.
6. 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.
7. 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.
8. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Ogolodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.

9. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Porshakov A.M., Lyapin M.N., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Ayazbaev T.Z., Lopatin A.A., Ashibokov U.M., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutuyev V.V. [Epidemiological and epizootic situation on plague in the Russian Federation and forecast for its development for 2020–2025]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-50.
10. Nikiforov K.A., Morozov O.A., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutuyev V.V. [Population structure, taxonomy and genetic features of *Yersinia pestis* strains of the subspecies *central asiatica*]. *Genetika [Genetics]*. 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.
11. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zoller L., Wölfel R., Le Fleche P., Scholz H.C. *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One*. 2012; 7(2):e30624. DOI: 10.1371/journal.pone.0030624.
12. Platonov M.E., Evseeva V.V., Efremenko D.V., Afanasiev M.V., Verzhutsky D.B., Kuznetsova I.V., Shestopalov M.Yu., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Balakhonov S.V., Anisimov A.P. [Intraspecific appurtenance of rhamnose-positive *Yersinia pestis* strains from natural plague foci in Mongolia]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2015; 33(1):23–8.
13. 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(15):5147–52. DOI: 10.1128/JB.186.15.5147-5152.2004.
14. Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Kutuyev V.V. [Genetic basis of the nitrate reduction variability in *Yersinia pestis* strains]. *Genetika [Genetics]*. 2014; 50(5):522–30. DOI: 10.7868/S001667581405004X.
15. 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]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (1):60–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.
16. Korzun V.M., Balakhonov S.V., Denisov A.V., Chipanin E.V., Kosilko S.A., Rozhdestvensky E.N., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Bazarova G.Kh., Yarygina M.B. [Introduction of the plague agent of the main subspecies into the gray marmot settlements in the South-Eastern Altai]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2017; (4):20–9.
17. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: “Shiko”; 2013. 560 p.
18. Korzun V.M., Chipanin E.V., Balakhonov S.V., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Mikhailov E.P., Yarygina M.B., Kosilko S.A. [Changes in the range of *Yersinia pestis* in the Gorno-Altai natural plague focus]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2014; (4):11–719.
19. Balakhonov S.V., Shestopalov M.Yu., Romanova I.F. [Results of VNTR analysis by the (5'-CAAA-3')ⁿ locus of *Yersinia pestis* strains from active natural foci of plague in Siberia]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2009; (3):14–6.
20. Yarygina M.B., Korzun V.M., Balakhonov S.V. [Genotypic structuring of *Yersinia pestis* ssp. *altaica* in the Gorno-Altai high-mountain natural plague focus]. *Dal'nevostochny Zhurnal Infektsionnoy Patologii [Far East Journal of Infectious Pathology]*. 2019; 37:86–7.

Authors:

Nikiforov K.A., Morozov O.A., Eroshenko G.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Krasnov Ya.M., Kutuyev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Korzun V.M., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Никифоров К.А., Морозов О.А., Ерошенко Г.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Корзун В.М., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.