

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

УДК 616.98:579.842.23

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

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

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

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

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

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

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

Поступила 30.11.2022. Принята к публ. 01.12.2022.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Received 30.11.2022. Accepted 01.12.2022.

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

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

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

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

Материалы и методы

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

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

Идентификация SNPs-локусов, подбор праймеров, проведение ПЦР, фрагментное секвенирование. Для ПЦР-амплификации и фрагментного секвенирования ДНК 190 штаммов *Y. pestis* выделяли с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США) по инструкции производителя. Идентификацию SNPs проводили путем выравнивания нуклеотидных последовательностей штаммов на геном CO92, при помощи программы snippy 4.6 (<https://github.com/tseemann/snippy>), с последующим удалением 13 SNPs из области гомоплазий [8]. Полученный набор SNPs содержал только коровую область генома (1621 SNPs). Филогенетическую реконструкцию методом максимального правдоподобия Maximum Likelihood осуществляли с использованием программы SeaView 5.0 [9] с последующей визуализацией в FigTree 1.4.3. Подбор модели нуклеотидных замен проводили в программе jModelTest 2.1.7 [10], в результате выбрана модель GTR (Bootstrap-500). В качестве внешней группы в филогенетическом анализе использованы геномы 8 штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI Genbank: Pestoides A(0.PE4a, NZ_ACNT00000000), Pestoides F(0.PE2, NC_009381), 620024(0.PE7, ADPM00000000), CO92 (1.ORI1, AL590842.1), 351001 (2.ANT2, ADPF00000000), 91 (2.MED2, ADPU00000000), CMCC125002 (2.MED3, ADQN00000000), KIM10 (2.MED1, AE009952.1).

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

Результаты и обсуждение

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

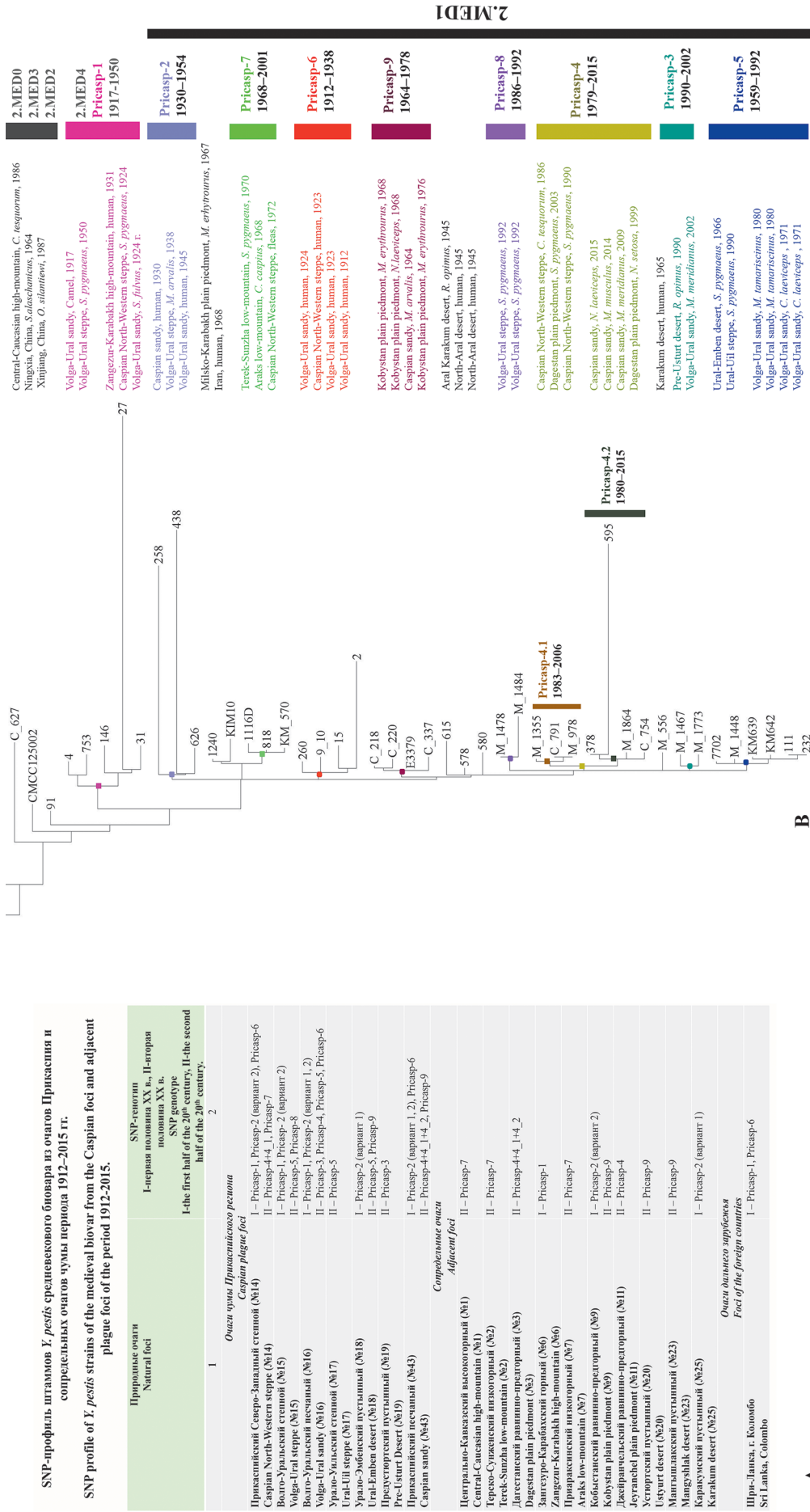
рий в 1912–2015 гг. Все изученные штаммы относились к средневековому биовару основного подвида чумного микроба и имели типичный фенотип: ферментировали глицерин и арабинозу, не ферментировали рамнозу и мелибиозу, не обладали денитрифицирующей активностью.

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

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

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

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



2.MED1
A – SNP-профили штаммов *Y. pestis* средневекового биоара из очагов Прикаспия и сопредельных территорий (линия 2.MED) из природных очагов Прикаспия и сопредельных территорий. Значение логарифма функции правдоподобия (Maximum Likelihood) 50 штаммов *Y. pestis* средневекового биоара (линия 2.MED) из природных очагов Прикаспия и сопредельных территорий. The value of the logarithm of the likelihood function PhyML ln(L) = -10312.4; 1621 SNPs, модель GTR
B – SNP-профили штаммов *Y. pestis* средневекового биоара из очагов чумы Прикаспия и сопредельных территорий. Значение логарифма функции правдоподобия (Maximum Likelihood) 50 штаммов *Y. pestis* средневекового биоара (линия 2.MED) из природных очагов Прикаспия и сопредельных территорий. The value of the logarithm of the likelihood function PhyML ln(L) = -10312.4; 1621 SNPs, модель GTR

SNP-профиль штаммов *Y. pestis* средневекового биоара из очагов Прикаспия и сопредельных территорий периода 1912–2015 гг.
SNP profile of the medieval biovar from the Caspian foci and adjacent territories of the period 1912–2015.

Природные очаги Natural foci	SNP-генотип I-первая половина XX в., II-вторая половина XX в. SNP genotype I-the first half of the 20 th century, II-the second half of the 20 th century.
1	2
Очаги чумы Прикаспийского региона <i>Caspian plague foci</i>	
Центрально-Кавказский высокогорный (№14)	I – Pricasp-1, Pricasp-2 (вариант 2), Pricasp-6
Центрально-Кавказский высокогорный (№14)	II – Pricasp-4+4.1, Pricasp-7
Восточно-Уральский степной (№15)	I – Pricasp-1, Pricasp-2 (вариант 2)
Восточно-Уральский степной (№15)	II – Pricasp-5, Pricasp-8
Волго-Уральский пещинный (№16)	I – Pricasp-1, Pricasp-2 (вариант 1, 2)
Волго-Уральский степной (№17)	II – Pricasp-3, Pricasp-4, Pricasp-5, Pricasp-6
Ураль-Ембенский пустынный (№18)	I – Pricasp-2 (вариант 1)
Ураль-Ембенский пустынный (№18)	II – Pricasp-5, Pricasp-9
Предкавказский пустынный (№19)	II – Pricasp-3
Пре-Устуртский пустынный (№19)	I – Pricasp-2 (вариант 1, 2), Pricasp-6
Прикаспийский степной (№43)	II – Pricasp-4+4.1+4.2, Pricasp-9
Сарпайский степной (№44)	
Сопредельные очаги <i>Adjacent foci</i>	
Центрально-Кавказский высокогорный (№1)	II – Pricasp-7
Центрально-Кавказский высокогорный (№1)	II – Pricasp-7
Терек-Сулакский низкогорный (№2)	II – Pricasp-7
Терек-Сулакский низкогорный (№2)	II – Pricasp-4+4.1+4.2
Джуга-Карабахский высокогорный (№3)	II – Pricasp-4+4.1+4.2
Джуга-Карабахский высокогорный (№3)	I – Pricasp-1
Джуга-Карабахский высокогорный (№3)	II – Pricasp-7
Джуга-Карабахский высокогорный (№3)	I – Pricasp-2 (вариант 2)
Джуга-Карабахский высокогорный (№3)	II – Pricasp-9
Джуга-Карабахский высокогорный (№3)	II – Pricasp-4
Джуга-Карабахский высокогорный (№3)	II – Pricasp-9
Устуртский пустынный (№20)	II – Pricasp-9
Устуртский пустынный (№20)	II – Pricasp-9
Мангышлакский пустынный (№23)	II – Pricasp-9
Мангышлакский пустынный (№23)	II – Pricasp-9
Каракумский пустынный (№25)	I – Pricasp-2 (вариант 1)
Каракумский пустынный (№25)	I – Pricasp-1, Pricasp-6
Очаги дальнего зарубежья <i>Foci of the foreign countries</i>	
Шри-Ланка, г. Коломбо	I – Pricasp-1, Pricasp-6
Sri Lanka, Colombo	

SNP-генотипирование штаммов *Y. pestis* средневекового биоара из очагов чумы Прикаспия и сопредельных территорий. Значение логарифма функции правдоподобия (Maximum Likelihood) 50 штаммов *Y. pestis* средневекового биоара (линия 2.MED) из природных очагов Прикаспия и сопредельных территорий. The value of the logarithm of the likelihood function PhyML ln(L) = -10312.4; 1621 SNPs, модель GTR

Таблица 1 / Table 1

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

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

SNP-генотип SNP-genotype	Последовательности праймеров 5'→3' The primer sequences 5'→3'
Pricasp-1	<i>apaH-S</i> : GGGACCACGGGCAACTAAA <i>apaH-AS</i> : TGGCTGCCTCGATGAAT
	<i>phnL-S</i> : ACGCTGCTACGCTCCCTCTA <i>phnL-AS</i> : TGA CTGACCCAACCGACA
	<i>priA-S</i> : TCAGCCGTTGCAGCAGTT <i>priA-AS</i> : GGCGTTATGGATTATGGG
Pricasp-2	<i>radC-S</i> : TCGTGTATTTCGCCATGAAG <i>radC-AS</i> : TCACCTGCGTCGTTATCAAA
	<i>upo0842-S</i> : CGGGGGCAAAGCATTACA <i>upo0842-AS</i> : CGTATTGGTGCCGTCATCAT
	<i>narP-S</i> : ATCGTTGACGACCATCCG <i>narP-AS</i> : TTTTAACGTATCCAGCCCG
Pricasp-3	<i>asnA-S</i> : AGATGCTAAAGGCCGTGAAC <i>asnA-AS</i> : ATGTCGCCGTTTAATCCAG
	<i>ssrA-S</i> : GGATGGACACGCTACTGACA <i>ssrA-AS</i> : CAAACGACGAAAACTACGCAC
	<i>flgK-S</i> : CCGGTTACTACGCCAGC <i>flgK-AS</i> : TCGCGGCACTGAGAGAGGAA
Pricasp-4	<i>upo1240-S</i> : TGTCAGGCGTCTCATT <i>upo1240-AS</i> : TGGCGGGATAGGTGGTTA
	<i>upo1564-S</i> : CCGTCCGCTGCCATATATCA <i>upo1564-AS</i> : ATCACGTAACGGACGCGGGA
	<i>bglY-S</i> : TTGCCTTGCTCTTCAATGGC <i>bglY-AS</i> : TGCTGCACGTCCTGCTAAAT
Pricasp-4.2	<i>tssG-S</i> : TCTGGTGCTGTTGCGGGTCT <i>tssG-AS</i> : CCGCAGCCACTGAGCAACAA
Pricasp-5	<i>sel-S</i> : GCTATTGCTATTTGGGGTGG <i>sel-AS</i> : GGTTTCAGGGGCATCAAT
	<i>upo4015-S</i> : GAATGCCAGCCGAGCGACTT <i>upo4015-AS</i> : GCTGTGCGGTGTGGTATTGA
Pricasp-6	<i>upo0379-S</i> : TGGTGTCTCTCGAATCA <i>upo0379-AS</i> : AGACGGCAAGCAGGTGTT
	<i>cysJ-S</i> : CCCATCAACTTCACGCTGT <i>cysJ-AS</i> : TGGGTGTGGTGCGTATGA
	<i>aspB-S</i> : GCCGAAACAGACAACGATCT <i>aspB-AS</i> : CGTTGCTGTAACCAAACCTGC
Pricasp-7	<i>upo3544-S</i> : TAACGGTGTGTATAAAGCGGG <i>upo3544-AS</i> : GCGTAGTCCATAACCGTAAATC
	<i>upo4104-S</i> : TACGCGGCTTTATCTGTGTG <i>upo4104-AS</i> : CAAATGCTGCTGTGATCCG
	<i>upo0033-S</i> : TACCGGCATTCAACACCA <i>upo0033-AS</i> : CGAACGATTGGAACAGCT
Pricasp-8	<i>ptsP-S</i> : GTGGGAGATGGCAAGAGCGT <i>ptsP-AS</i> : TGCAAGTGGGCTAACGAGGC
	<i>selenide-S</i> : CTATTGCTATTTGGGGTGGC <i>selenide-AS</i> : AAGATGCCAATGCCCAAT
	<i>gltP-S</i> : ACGGCTAGCTGTACCACCGTC <i>gltp-AS</i> : TGAGGCGAATACCAGCGGCA

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

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

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

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

Таблица 2 / Table 2

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

SNP-генотип / филогенетическая ветвь / год SNP-genotype / phylogenetic branch / year	Ген / замена нуклеотида / аминокислоты Gene / nucleotide / amino acid substitution	Природный очаг (количество штаммов) Natural focus (number of strains)
1	2	3
Pricasp-1 2.MED4 1917–1950	<i>apaH</i> 802C>A, His268Asn	№ 14 Прикаспийский Северо-Западный (9) № 15 Волго-Уральский степной (5) № 16 Волго-Уральский песчаный (2) № 6 Зангезуро-Карабахский горный (1) Шри-Ланка (1)
	<i>phnL</i> 247G>A, Ala83Thr	
	<i>priA</i> 164A>G, sSNP	№ 14 Caspian North-Western steppe (9) № 15 Volga-Ural steppe (5) № 16 Volga-Ural sandy (2) № 6 Zangezur-Karabakh mountain (1) Sri Lanka (1)
Pricasp-2 2.MED1 1930–1954	<i>Общая (Common) narP</i> 101C>A, Ala34Asp	№ 9 Кобыстанский равнинно-предгорный (2) № 14 Прикаспийский Северо-Западный степной (1) № 15 Волго-Уральский степной (4) № 16 Волго-Уральский песчаный (7) № 18 Урало-Эмбенский пустынный (1) № 25 Каракумский пустынный (1) № 43 Прикаспийский песчаный (4) № 9 Kobystan plain-piedmont (2) № 14 Caspian North-Western steppe (1) № 15 Volga-Ural steppe (4) № 16 Volga-Ural sandy (7) № 18 Ural-Emben desert (1) № 25 Karakum desert (1) № 43 Caspian sandy (4)
	<i>Вариант 1 (Variant 1)</i> <i>narP</i> <i>radC</i> 456G>T, sSNP	№ 16, № 18, № 25, № 43
	<i>Вариант 2 (Variant 2)</i> <i>narP</i> <i>уро0842</i> 1358C>T, Thr453Ile	№ 9, № 14, № 15, № 16, № 43
Pricasp-3 2.MED1 1990–2002	<i>asnA</i> 618A>T, sSNP	№ 16 Волго-Уральский песчаный (5) № 19 Предустуртский пустынный (1)
	<i>ssrA</i> 197C>T, Pro66Leu	№ 16 Volga-Ural sandy (5) № 19 Pre-Usturt desert (1)
Pricasp-4 2.MED1 1979–2015	<i>flgK</i> 244C>T, Gln82*	№ 3 Дагестанский равнинно-предгорный (4) № 11 Джейранчельский равнинно-предгорный (1) № 14 Прикаспийский Северо-Западный (3) № 16 Волго-Уральский песчаный (1) № 43 Прикаспийский песчаный (32)
	<i>уро1240</i> 127A>G, Thr43Ala	
	<i>уро1564</i> 265C>T, Gln89*	№ 3 Dagestan plain-piedmont (4) № 11 Jeyranchel plain-piedmont (1) № 14 Caspian North-Western (3) № 16 Volga-Ural sandy (1) № 43 Caspian sandy (32)
Pricasp-4.1 2.MED1 1983–2006	<i>bglY</i> 96C>T, sSNP	№ 3, № 14, № 43 – (6)
Pricasp-4.2 2.MED1 1980–2015	<i>tssG</i> 1023T>G, sSNP	№ 3, № 43 – (10)

Окончание табл. 2 / Ending of table 2

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

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

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

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

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

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

Таким образом, по результатам проведенного молекулярного генотипирования определены основные SNP-генотипы, характерные для *Y. pestis* средневекового биовара из очагов Прикаспия, которые могут быть использованы для детализации паспортизации и молекулярного мониторинга этих очаговых по чуме территорий. С помощью WG-SNP-анализа и филогенетической реконструкции определены 24 гена, составляющие 9 SNP-генотипов средневекового биовара *Y. pestis*, штаммы которого выделены с 1912 по 2015 год в Прикаспии и сопредельных очагах чумы. Разработан способ и подобраны праймеры для SNP-генотипирования методом ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. По результатам генотипирования 190 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара основного подвида из 17 природных очагов Прикаспия, Кавказа и Центральной Азии установлена принадлежность 176 штаммов к выявленным генотипам: Pricasp-1 – 18 шт., Pricasp-2 – 20 шт., Pricasp-3 – 6 шт., Pricasp-4 (включая 4_1+4_2) – 41 шт., Pricasp-5 – 48 шт., Pricasp-6 – 14 шт., Pricasp-7 – 12 шт., Pricasp-8 – 9 шт., Pricasp-9 – 8 шт. Применение этого метода обеспечивает дифференциацию геновариантов штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, распространенных в природных очагах Прикаспия, по маркерным полиморфным нуклеотидам SNPs, периоду выделения и географической принадлежности. Установленные SNP-профили штаммов средневекового биовара *Y. pestis*, полученных более чем за столетний период в очагах Прикаспийского региона, создают предпосылки для создания канонического SNP-профиля (canSNP) для молекулярно-генетической детализации паспортизации очагов, в которых циркулирует этот высоковирулентный биовар. Это также может повысить эффективность эпидемиологического отслеживания происхождения геновариантов *Y. pestis* при проведении молекулярно-эпидемиологического мониторинга.

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

Список литературы

1. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/FMICB.2018.01106.
2. Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Оглодин Е.Г., Никифоров К.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Чипанин Е.В., Аязбаев Т.З., Джапарова А.К., Бердиев С.К., Лопатин А.А., Дубянский В.М., Щербак С.А., Балахонov С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпидемиологическая ситуация по чуме в 2020 г. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации и других стран СНГ на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 1:52–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-52-62.
3. Кутырев В.В., Попова А.Ю., редакторы. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: Амирит; 2016. 248 с.
4. Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'khova Z.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kutyrev V.V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS One.* 2021; 16(2):e0244615. DOI: 10.1371/journal.pone.0244615.
5. Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: From phenotypes to whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 37:21–36. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.024.
6. Lärkeryd A., Myrtenäs K., Karlsson E., Dwibedi C.H., Forsman M., Larsson P., Johansson A., Sjödin A. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics.* 2014; 30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Шико; 2013. 560 с.
8. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
9. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(2):221–4. DOI: 10.1093/molbev/msp259.
10. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModel-Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 2012; 9(8):772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.
11. Balykova A.N., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Five draft genome sequences of historical *Yersinia pestis* strains of phylogroups 2.MED4 and 2.MED1 of the medieval biovar. *Microbiol. Resour. Announc.* 2022; 11(5):e0004422. DOI: 10.1128/mra.00044-22.

References

1. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'hova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/FMICB.2018.01106.
2. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Oglodin E.G., Nikiforov K.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Chipanin E.V., Ayazbaev T.Z., Dzharparova A.K., Berdiev S.K., Lopatin A.A., Dubyansky V.M., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Epidemiological situation on plague in 2020. Forecast of epizootic activity of natural plague foci in the Russian Federation and other CIS countries for 2021]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):52–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-52-62.
3. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague in the Territory of the Russian Federation and Former Soviet Union Countries (1876–2016)]. Saratov: LLC “Amirit”; 2016. 248 p.
4. Eroshenko G.A., Popov N.V., Al'khova Z.V., Kukleva L.M., Balykova A.N., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kutyrev V.V. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th–21st centuries. *PLoS One.* 2021; 16(2):e0244615. DOI: 10.1371/journal.pone.0244615.

5. Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: From phenotypes to whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 37:21–36. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.024.
6. Lärkeryd A., Myrtenäs K., Karlsson E., Dwibedi C.H., Forsman M., Larsson P., Johansson A., Sjödin A. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics.* 2014; 30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113.
7. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: CJSC “Shiko”; 2013. 560 p.
8. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
9. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(2):221–4. DOI: 10.1093/molbev/msp259.
10. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModel-Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 2012; 9(8):772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.
11. Balykova A.N., Kukleva L.M., Naryshkina E.A., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. Five draft genome sequences of historical *Yersinia pestis* strains of phylogroups 2.MED4 and 2.MED1 of the medieval biovar. *Microbiol. Resour. Announc.* 2022; 11(5):e0004422. DOI: 10.1128/mra.00044-22.

Authors:

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

Об авторах:

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