

УДК 57.075

## ГЕНОМИКА ДРЕВНИХ ПАТОГЕНОВ: ПЕРВЫЕ УСПЕХИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

### Обзор

© 2022 А.Б. Малярчук<sup>1\*</sup>, Т.В. Андреева<sup>1,2</sup>, И.Л. Кузнецова<sup>2,3</sup>, С.С. Кунижева<sup>2,3</sup>,  
М.С. Протасова<sup>2</sup>, Л.И. Уральский<sup>2,3</sup>, Т.В. Тяжелова<sup>2</sup>,  
Ф.Е. Гусев<sup>2</sup>, А.Д. Манахов<sup>2,3</sup>, Е.И. Рогаев<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
кафедра генетики, Центр генетики и генетических технологий, 119234 Москва, Россия;  
электронная почта: a\_malyarchuk98@mail.ru

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: rogaev@vigg.ru

<sup>3</sup> Университет Сириус, Центр генетики и наук о жизни, 354340 Сочи, Россия

<sup>4</sup> Медицинская школа Чан Массачусетского университета, Департамент психиатрии, 01545 Шрусбери, США

Поступила в редакцию 14.12.2021

После доработки 08.01.2022

Принята к публикации 21.01.2022

Развитие палеогеномных исследований — одно из актуальных и перспективных направлений междисциплинарных исследований в современной мировой науке. Новые геномные методы анализа древней ДНК (дДНК), такие как технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS), позволяют не только получать подробную генетическую информацию об исторических и доисторических популяциях человека, но и изучать отдельные микробные и вирусные патогены и микробиомы из разных древних и исторических объектов. Исследования дДНК патогенов путём реконструкции их геномов позволили к настоящему времени получить полные последовательности древних геномов для патогенов, сыгравших значительную роль в истории человечества: *Yersinia pestis* (возбудитель чумы), *Variola virus* (оспа), *Vibrio cholerae* (холера), H5N1 (вирус гепатита В), а также не менее важных эндемичных инфекционных агентов человека — *Mycobacterium tuberculosis* (туберкулёз), *Mycobacterium leprae* (проказа) и *Treponema pallidum* (сифилис). Геномные данные этих патогенов дополнили сведения, полученные ранее палеопатологами, и позволили не только идентифицировать возбудителей пандемий прошлого, но и выявить ныне несуществующие линии патогенов, уточнить хронологию появления патогенов в популяциях человека, а также реконструировать эволюционную историю патогенных микроорганизмов, которые остаются актуальными для общественного здравоохранения сегодня. В настоящем обзоре описывается современное состояние геномных исследований происхождения и эволюции многих древних патогенных микроорганизмов и вирусов, а также рассматриваются механизмы возникновения и распространения древних инфекций в истории человечества.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** популяции человека, древняя ДНК, палеопатология, палеогеномика, патоген, чума, холера, лепра, сифилис, оспа, туберкулёз.

DOI: 10.31857/S0320972522020087

### ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия значительно возросли технические возможности в области секвенирования древней ДНК (дДНК), в том числе древних патогенов. Появляются всё более совершенные методы подготовки геномных библиотек, обогащения ДНК, секвенирования; развиваются и инструменты для биоинформатического анализа геномных данных. Растёт число работ, посвящённых идентификации и характеристике на молекулярно-генетическом уровне патогенных микроорганизмов, извлечённых из древних останков. Таким образом, появилась новая область исследований — молекулярная палеоэпидемиология [1], в задачи которой входит исследование вопросов возникновения инфекций и распространения патогенов в популяциях человека.

Долгое время изучение перенесённых инфекционных заболеваний проводилось тради-

Принятые сокращения: дДНК — древняя ДНК; CPXV — вирус коровьей оспы; NGS — высокопроизводительное секвенирование; TIR — инвертированные концевые повторы; VARV — вирус натуральной оспы человека; VACV — вакцинный вирус оспы.

\* Адресат для корреспонденции.

ционным путём палеопатологической оценки костей древних скелетов из археологических раскопок, однако этот подход имеет существенные ограничения, связанные с тем, что многие инфекции не оставляют видимых следов на костях, а другой материал оказывается недоступен для исследования [2].

Первые успехи в изучении ДНК древних бактерий и вирусов стали возможны с появлением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот подход позволяет обнаружить присутствие инфекционных агентов, но даёт ограниченную информацию об эволюционной истории патогена, поскольку генетический материал микроорганизмов в таком случае анализируется по одному или нескольким коротким фрагментам, амплифицированным из препаратов ДНК, выделенных из останков древних людей [3, 4]. Кроме того, дДНК, извлечённая из археологического материала, обычно присутствует в нём в небольших количествах, сильно фрагментирована и содержит химические модификации [5, 6], что затрудняет амплификацию.

С развитием методов высокопроизводительного секвенирования (NGS) в большом количестве стали появляться последовательности полных геномов современных организмов, включая микробы и вирусы. Таким образом, выросло количество референсных геномных последовательностей, включая отдельные штаммы. Для палеогенетических исследований такой прорыв позволил не только однозначно констатировать наличие инфекционного возбудителя в суммарной ДНК, выделенной из древнего образца, но и более точно определить филогению выделенного штамма. Первой удачной попыткой собрать полный геном древнего патогена стал геном известного бактериального возбудителя чумы *Yersinia pestis*, опубликованный в 2011 г., за которым последовало множество работ по геномным исследованиям различных патогенов.

К настоящему времени наибольшее количество геномных данных получено для *Y. pestis* (возбудитель чумы), *Variola virus* (оспа), *Vibrio cholerae* (холера), а также трёх не менее важных эндемичных инфекционных агентов человека — *Mycobacterium tuberculosis* (туберкулёз), *Mycobacterium leprae* (проказа) и *Treponema pallidum* (сифилис).

## ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ПАЛЕОГЕНЕТИКИ

При работе с дДНК, в том числе микробно-го происхождения, извлечённой из исторических и археологических образцов, существует ряд проблем и ограничений, обусловленных её

специфическими особенностями. Археологические образцы обычно содержат смеси эндогенной (прижизненной) и экзогенной (посмертной) микробной ДНК, которая может включать комменсальные бактерии (например, микробные колонии в зубном камне), эпидемические патогены (например, *Y. pestis* в пульповой полости зубов) и бактерии окружающей среды (например, почвенные микроорганизмы, участвующие в разложении). Кроме того, загрязнение дДНК в образце может возникнуть на всём протяжении анализа — с момента археологических раскопок и обработки древнего материала при контакте с исследователями (например, кожные микробы), при нарушении условий хранения (например, чрезмерный рост бактерий и грибов), а также от лабораторных источников загрязнения, таких как реагенты (например, ДНК-полимеразы и другие ферменты, буферы, загрязнённые бактериальной ДНК) [7]. Целевая составляющая выделенной дДНК насчитывает в среднем 1–10%, при этом на фракцию патогена, которую можно выделить, приходится менее 0,5% от общего метагенома. Исключения составляют образцы, полученные из вечной мерзлоты, либо препараты ДНК, выделенные из слуховых косточек. Поэтому важной задачей при исследовании древних патогенов и других микроорганизмов является подтверждение аутентичности полученных результатов, т.е. доказательство того, что выделенная ДНК принадлежит древнему образцу (бактерии или вирусу), а не является результатом контаминации. Следовательно, анализ дДНК и проверка полученных результатов требуют строгого соблюдения определённых методологических стандартов.

К настоящему времени древняя микробная ДНК была успешно выделена из различных типов образцов — костей, зубов, копролитов, музейных образцов, кальцинированного зубного налета, почвы и т.д. (таблица).

Однако основным объектом для извлечения ДНК древних патогенов пока остаются костные останки человека. Современные методологические подходы к выделению дДНК и подготовке её для проведения геномного секвенирования методом масштабного параллельного секвенирования на платформе «Illumina» представлены в обзоре [8]. В данном разделе мы ограничимся примерами специальных методов, которые используются для оценки и подтверждения подлинности ДНК древних патогенов (процессу идентификации таксономии, проверки и аутентификации древних микробов с использованием данных высокопроизводительного секвенирования ДНК).

Источники бактериальной древней ДНК и примеры микроорганизмов и патогенов, которые были выделены и охарактеризованы

Образец	Патоген
Кости	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Brucella melitensis</i> , <i>Brucella abortus</i> , <i>Treponema pallidum</i>
Зубы (пульпа)	различные патогены, передающиеся через кровь человека
Зубы (зубной камень)	бактерии микробиома полости рта ( <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> и др.)
Кальцинированные включения в легких	<i>M. tuberculosis</i>
Мумифицированные останки	различные патогены и различные комменсальные бактерии микробиома человека
Копролиты	источник кишечной микробиоты человека
Музейные медицинские образцы органов, залитые в парафин	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Variola virus (VARV)</i>
Янтарь	грамотрицательные протеобактерии <i>Brevundimonas</i>
Образцы ископаемого льда и вечной мерзлоты	палеовирусы, например, <i>Pithovirus sibericum</i>

**Проверка таксономии древних патогенов и микроорганизмов.** Традиционные методы определения таксономической принадлежности, такие как характеристика гомологий методом ДНК–ДНК-реассоциации, для которой необходимо изолировать и культивировать отдельные микроорганизмы, не могут применяться при исследовании древних бактерий. Поэтому на начальных этапах использовался генетический анализ древних патогенов методом ПЦР с использованием праймеров, специфичных для маркерных генов возбудителей инфекционных заболеваний, как, например, гена *rpoB* (возбудителя чумы *Y. Pestis*) [3, 4]. Основная сложность в интерпретации результатов ПЦР – присутствие в древних образцах смеси бактериальных организмов, что может привести к неспецифическим или даже ложноположительным результатам, как, например, в случае с ДНК почвенных бактерий, содержащих последовательности, высокогомологичные ДНК *M. tuberculosis* и *Y. pestis* [9, 10].

Другой метод идентификации микроорганизмов, получивший наиболее широкое распространение, основан на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК [11]. Так как последовательность гена 16S рРНК сходна у разных таксонов микробов, для его ПЦР-амплификации используют универсальные праймеры. Анализ нуклеотидных последовательностей 16S рРНК позволяет с высокой степенью достоверности определять как фило-

генетическое положение микроорганизмов, так и надёжно идентифицировать их на родовом, а иногда и на видовом уровнях. Возможность быстро и недорого секвенировать десятки или сотни тысяч целевых гипервариабельных последовательностей гена 16S рРНК одновременно с использованием методов секвенирования нового поколения была успешно применена в крупном проекте «Human Microbiome Project» [12]. Этот подход также применялся в исследованиях дДНК, например, для определения таксономии ДНК, полученной из смеси костных останков, принадлежащих различным видам животных [13]. Однако этот метод не может быть напрямую применён к исследованиям древних бактерий, т.к. целевые гипервариабельные области гена 16S рРНК превышают среднюю длину получаемых фрагментов молекулы бактериальной дДНК.

В настоящее время при изучении таксономии метагеномных данных используют биоинформатические подходы, ориентированные на сопоставление считываний с последовательностями генов 16S рРНК (например, QIIME [14] и Mothur [15]) или с панелями однокопийных генов (например, MetaPhlan2 [16, 17], MIDAS [18] и PhyloSift [19]), сопоставление всего генома на основе k-меров (например, Kraken [20] и CLARK [21, 22]), а также метод с гибридным сопоставлением на основе k-меров с расширением выравнивания (MALT [23, 24]). Целевая амплификация гена 16S рРНК популярна для профи-

лирования сложных микробных сообществ, а такие программы, как QIIME и Mothur, помогают обрабатывать данные ампликонов, проводить сортировку и таксономическое профилирование на основе больших баз данных генов 16S рРНК, таких как Greengenes [25]. DADA2 [26] и Deblur [27] – новые методы сортировки прочтений гена 16S рРНК, которые были внедрены в QIIME v2.0 и обеспечивают более точную группировку прочтений, чем методы, представленные в QIIME v1. Эти программы требуют нескольких копий каждой последовательности, которые, хотя и являются обычными в наборах данных ампликонов гена 16S рРНК, вряд ли могут иметь место в наборе древних прочтений, которые выбираются из набора метагеномных данных, полученных методом shotgun-секвенирования, из-за недостаточного покрытия. В исследовании Velsko et al. [28] было показано, что целевая амплификация гена 16S рРНК из сильно фрагментированных древних образцов ДНК может приводить к таксономическим ошибкам из-за длинных гипервариабельных областей и полиморфизмов длины [29], а ген 16S рРНК трудно собрать из метагеномов из-за его высококонсервативных областей [30].

Одно из основных различий между разными программами заключается в способе вычисления относительной численности. Используя набор однокопийных маркерных генов, MetaPhlan2 и MIDAS пытаются представить долю клеток каждого вида, обнаруженных в образце. Это отличается от методов на основе k-меров, таких как CLARK-S и MALT, которые сообщают о доле общей ДНК, отнесённой к каждому виду. Размер генома может существенно различаться между видами бактерий, и виды с большими геномами могут казаться более многочисленными в образце, потому что большая доля ДНК принадлежит этим видам, даже если количество клеток мало. Относительное число видов, полученное с помощью методов идентификации на основе k-меров, может быть нормировано на предсказанный размер генома, чтобы приблизительно определить число копий клеток, даже если точный штамм неизвестен, поскольку размер генома в значительной степени совпадает в пределах вида. При рассмотрении метагеномных профилей сообществ следует иметь в виду различие между относительной численностью, сообщаемой метагеномными профилировщиками, нормирующими (MetaPhlan2 и MIDAS) и ненормирующими (CLARK-S, MALT, QIIME) число копий клеток.

CLARK-S лучше всего подходит для получения наибольшего количества определённых прочтений или для выявления относительного содержания всех фрагментов ДНК (если, напри-

мер, нужно попытаться собрать геном из всех прочтений, отнесённых к одному виду). Однако обнаружение настоящих видов с малой численностью (особенно вирусов и бактериофагов) с помощью CLARK-S невозможно из-за высокой частоты ложноположительных идентификаций с численностью менее 0,1%.

MALT уникален тем, что он может обеспечить функциональную классификацию прочтений, а также таксономическую классификацию, но он испытывает трудности с присвоением, когда используемая база данных содержит большое количество близкородственных видов. Кроме того, как и CLARK-S, MALT имеет высокий процент ложноположительных определений в малочисленных таксонах.

Наименее точный метод QIIME/UCLUST включает множество ложноположительных результатов даже при отсеивании таксонов с низкой численностью. Также результаты работы Velsko et al. [28] показывают, что это единственная программа, чья производительность заметно отличалась между древними и современными образцами.

Влияние моделей повреждения ДНК на таксономическое распределение варьируется в разных программах, но большинство протестированных программ [28] подвержены неправильному распределению только в небольшой части прочтений из-за повреждения ДНК. В целом, результаты показывают, что для видов с высокой численностью таксономические ошибки сходны между современными и древними смоделированными наборами метагеномных данных.

Повреждение ДНК по-разному влияет на частоту ложных срабатываний пяти протестированных программ, но смещение базы данных гораздо сильнее влияет на профилирование наиболее распространённых видов. CLARK-S, MetaPhlan2, MIDAS и QIIME/UCLUST имеют большее количество ложноположительных определений в древних, чем в современных наборах данных, однако в MetaPhlan2 эти различия не существенны. Это может быть проблемой при сравнении и сопоставлении микробных профилей древних и современных метагеномов, особенно для определения присутствия и распределения видов с низкой численностью. Если не учесть более высокий процент ложноположительных результатов в древних образцах по сравнению с современными, можно сделать неверный вывод о том, что многочисленные виды с низкой частотой встречаемости были утрачены в процессе эволюции. Поэтому очень желательно иметь одинаковые показатели ложноположительных результатов для древних и современных наборов данных, и такие программы,

как MALT и MetaPhlan2, больше подходят для этих целей, чем CLARK-S, MIDAS и QIIME/UCLUST, поскольку показатели ложноположительных результатов в древних и современных образцах сопоставимы как до, так и после фильтрации.

Недавно Hübler et al. [31] разработали новый биоинформационный инструмент HOPS для эвристического скрининга патогенов на основе алгоритма mapDamage, который анализирует данные, полученные при помощи MALT, для идентификации и подтверждения подлинности бактериальных патогенов в древних метагеномных образцах и извлечения этой информации для дальнейшего анализа. В сочетании с гибридационным захватом для получения большего числа последовательностей древних эукариот HOPS может позволить оценить подлинность дДНК на основе профилей повреждения ДНК, даже если доступно очень мало последовательностей ( $\leq 50$  прочтений на вид).

Результаты выполнения HOPS можно визуализировать при помощи программы MaltExtract Interactive Plotting Application (MEx-IPA, автор J. Fellows Yates; <https://github.com/jfy133/MEx-IPA>) для визуализации профилей повреждения дДНК целевых таксонов.

**Базы данных, используемые при анализе древних патогенов и микроорганизмов.** В настоящее время доступно множество разнообразных баз данных, которые используются для метатаксономического анализа древних образцов. К ним относятся базы данных, ориентированные на один локус, такой как ген 16S рРНК, или другие гены, в которых представлены ортологи этих генов у всех видов микроорганизмов, содержащихся в базе данных. Существует несколько крупномасштабных общедоступных баз данных генов 16S рРНК, каждая из которых содержит миллионы выровненных эталонных последовательностей: например, Ribosomal Database Project (RDP) – <http://rdp.cme.msu.edu> (свыше 3 млн последовательностей), база данных Greengenes – <https://greengenes.secondgenome.com> и проект SILVA – <https://www.arb-silva.de> (больше 2 млн последовательностей).

Кроме того, существуют базы данных, основанные на нескольких локусах, состоящих из небольшого набора генов домашнего хозяйства бактерий. Среди них, например, база данных MetaPhlan36, которая содержит свыше миллиона уникальных маркерных генов, отобранных для определения конкретных микробных клад (бактериальных, архейных и вирусных – более 17 000 референсных последовательностей генома, полученных из более чем 7000 таксонов на уровне видов).

Третий вид баз данных – базы данных, содержащие полные геномы. Их преимущество заключается в том, что они позволяют идентифицировать известные микроорганизмы и патогены, присутствующие даже в небольших количествах в образце, так как любой секвенированный фрагмент ДНК определённого вида микроорганизма потенциально содержится в целевой базе данных. Следовательно, именно полногеномные базы данных могут быть наиболее полезны в исследованиях по обнаружению древних патогенов, когда в образце ожидается присутствие только следовых количеств ДНК патогенного организма. Ниже приводится перечень баз данных, доступных в настоящее время.

- Genomes OnLine Database (GOLD; <https://gold.jgi.doe.gov>), DOE Joint Genome Institute, США.
- NCBI Reference Sequence Database (RefSeq; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, США.
- NCBI GenBank Sequence Database (GenBank; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, США.
- Metagenome analyzer (MEGAN; <https://computomics.com/services/megan6.html>), Center for Bioinformatics, Tübingen University, Германия.
- Microbial Database for Activated Sludge (MiDAS; <https://www.midasfieldguide.org/global>), Center for Microbial Communities, Department of Chemistry and Bioscience, Aalborg University, Дания.
- Virus Pathogen Resource (ViPR; <https://www.viprbrc.org/>), collaboration between the University of Chicago and J. Craig Venter Institute, США.
- Greengenes 16S rRNA gene database (Greengenes, <https://greengenes.secondgenome.com>), Center for Environmental Biotechnology, Lawrence Berkeley National Laboratory, California, США.
- Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID; <http://gisaid.org>).
- Virus-Host DB (<https://www.genome.jp/virus-hostdb/>), Institute for Chemical Research, Kyoto University, Япония.
- Viral Bioinformatics Resource Center (VBRC; <https://4virology.net/organisms/dsdna-viruses/poxviridae/>), University of Victoria, Канада.
- Nextstrain (<https://nextstrain.org/>), collaboration between researchers in Seattle, США и Basel, Швейцария.

**Оценка повреждений ДНК.** Так как дДНК сильно фрагментирована в результате процесса депуринизации с последующим гидролизом основной цепи ДНК, молекулы древней ДНК представляют собой короткие фрагменты, чаще

всего 30–60 п.н., этот признак можно использовать как один из маркёров для дифференциации древних последовательностей ДНК от контаминации современной ДНК, характеризующейся более длинными последовательностями. Присутствие дезаминирования цитозина, специфичных замен  $C \rightarrow T$  и  $G \rightarrow A$  в анализируемых фрагментах также может считаться признаком того, что это аутентичная дДНК [6]. Оценку предполагаемого уровня дезаминирования цитозина возможно провести при анализе результатов полногеномного секвенирования по профилю неправильного включения нуклеотидов (сдвиг нуклеотидного состава  $GC > TA$ ), при сравнении секвенированной последовательности с референсным геномом, используемым при выравнивании последовательности. В настоящее время для более достоверной количественной оценки паттернов повреждений дДНК патогенов широко используются биоинформационные программы, такие как, например, *mapDamage* [32].

**Оценка стойкости возбудителя.** При оценке повреждений дДНК патогенов необходимо учитывать разное время сохранности различных микроорганизмов. Например, известно, что грамположительные бактерии, такие как возбудители туберкулёза и проказы (*M. tuberculosis* и *M. leprae*), имеют клеточную стенку в несколько раз толще, чем грамотрицательные, а присутствие определённых химических компонентов в их бактериальной стенке, служащих, вероятно, защитой от повреждающего действия воды, может играть ключевую роль в сохранности их ДНК. Это учитывается при оценке повреждений дДНК у этих патогенов, так, например, анализ древних геномов *M. leprae* показал снижение сигнала дезаминирования [33].

**Моделирование источника древней ДНК микроорганизмов** – один из инструментов для оценки аутентичности. Для анализа древних бактерий из таких источников, как зубной камень и палеофекалии, рекомендуется проведение оценки на биологическую достоверность состава микробиомного сообщества перед дальнейшим анализом. Например, в исследовании *Warinner et al.* [34] совокупность выделенной ДНК из образца зубного камня была смоделирована с помощью программного инструмента *SourceTracker* как смесь ДНК, происходящая из бактерий, образующих зубной налет, кожных бактерий, почвенных бактерий и др. Используя сравнение с референсными наборами современных метагеномных данных, выбранными для каждого из этих источников, алгоритм оценивал долю образца зубного камня, происходящего из каждого источника, перед дальнейшим

анализом структуры и функций микробиома [34]. Авторы работы установили, что археологические образцы зубного камня, демонстрирующие плохие профили *SourceTracker*, не подходят для определения древнего микробиоценоза полости рта, так как он мог быть изменён в результате процессов разложения или загрязнения [34].

**Обогащение геномных библиотек.** Вслед за возросшей доступностью технологии массивного параллельного секвенирования ДНК были разработаны и методы обогащения библиотек ДНК для изучения древних микробов. Во многих случаях нет необходимости секвенировать весь геном патогена – иногда для целей исследования бывает достаточно получить последовательности нуклеотидов нескольких определённых локусов. В таких случаях проводят обогащение библиотек для секвенирования целевыми фрагментами ДНК с помощью гибридизации, используя в качестве зондов одноцепочечные последовательности ДНК или РНК с высокой гомологией (*Hybridization capture*). Таким способом был, например, идентифицирован древний штамм патогена *Y. pestis*, ответственный за вспышку первой эпидемии чумы (VI–VIII вв.) [35].

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

**Лепра** (проказа, болезнь Хансена) считается одной из старейших известных болезней человека, основным возбудителем которой является бактерия *M. leprae* (открытая в XIX в., она стала первым известным человечеству возбудителем болезни). Небольшое количество случаев наиболее тяжёлой формы проказы связано с *Mycobacterium lepromatosis*, бактерией из сестринского таксона [36]. Лепра – это хроническое заболевание, передающееся воздушно-капельным путём от человека к человеку, характерной особенностью болезни является поражение костей черепа (риномаксиллярный синдром) и деформации кистей и стоп. Сложность диагностики лепры в древних скелетных останках связана с тем, что идентичные изменения скелета могут быть вызваны другими заболеваниями, такими как сифилис или псориатический артрит [37]. Поскольку *M. leprae* является облигатным патогеном, его присутствие в останках древних людей считается явным доказательством инфекции [38].

Ранее на основе исторических и эпидемиологических данных был проведён анализ географического распространения проказы в древности, и было установлено, что вспышки проказы

связаны с периодами глобализации, такими как эпоха Великого переселения народов или создание Римской империи, когда формировались обширные пространства, связанные с регулярными контактами населения различных территорий или торговыми путями [39–43]. В России проказа известна со времён Киевской Руси, о чём свидетельствуют палеопатологические исследования костных останков из погребений X в. на территории Киева, который находился на пересечении Великого шёлкового пути в Европе и входил в зону риска распространения проказы в древности [44].

Впервые схема эволюции возбудителя проказы была предложена Monot et al. [45] на основе сравнительного генетического анализа большого количества современных образцов из разных географических мест. Исследование показало, что все ныне существующие случаи лепры можно отнести к одному клону, было определено четыре основных штамма *M. leprae*, на основании распространения которых была предложена гипотеза о возникновении заболевания в Восточной Африке или на Ближнем Востоке и о его последующем распространении в процессе миграций людей. Европейцы или выходцы из Северной Африки занесли проказу в Западную Африку и Америку в течение последних 500 лет. Дополнительные исследования с использованием в том числе генетических данных бактерии *M. leprae*, выделенной из древних останков (возраст которых 1500 лет) больного проказой из Египта, увеличили количество сохранившихся до наших дней разновидностей *M. leprae* до шестнадцати [46].

С целью анализа генетического разнообразия и популяционной структуры *M. leprae* в исследовании Schuenemann et al. [47] были получены геномы десяти штаммов *M. leprae* из костных останков больных проказой из различных регионов средневековой Европы (Италии, Венгрии, Чехии, Великобритании и Дании), датированных IV–XIV вв. Филогения, реконструированная на основе всех опубликованных средневековых и современных геномов, продемонстрировала высокое разнообразие штаммов *M. leprae* в средневековой Европе, относящихся к четырём основным филогенетическим ветвям *M. leprae*, включая самые базальные из них, редко обнаруживаемые где бы то ни было [47]. Было также показано, что два древних штамма *M. leprae* и 52 современных штамма из США являются филогенетически близкими, что может свидетельствовать о том, что Европа являлась ключевым регионом для раннего распространения проказы [48–50].

В работе Fotakis et al. [48] на примере норвежского индивида XVI в. была впервые продемон-

стрирована возможность успешного выделения ДНК и реконструкции генома *M. leprae* из зубного камня для дальнейшего полногеномного секвенирования на платформе «Illumina» в режиме одноконцевых прочтений. Авторы получили дДНК *M. leprae*, где 76% генома было представлено с 5-кратным покрытием. Филогенетический анализ с использованием 164 ранее опубликованных древних и современных геномов *M. leprae* показал выраженное генетическое сходство полученного древнего норвежского генома *M. leprae* с геномами других современных и древних штаммов из Северной Европы. Таким образом, было показано, что зубной камень человека может служить альтернативным материалом для обнаружения и геномного анализа *M. leprae* в древних скелетных останках вместо использования материала из костей и зубов, что особенно актуально в случае невозможности диагностики данного заболевания палеопатологическими методами.

Вопрос о происхождении лепры на островах Тихого океана является спорным. Считалось, что проказа была завезена на острова европейцами во время колонизации в XIX в., но некоторые палеопатологические данные предполагают более раннее распространение болезни [51]. Результаты недавнего исследования девяти геномов *M. leprae* с островов Тихого океана [52] позволяют предположить, что бактерия могла быть завезена в Океанию во время первых миграций человека около 3000 лет назад с повторной интродукцией во время последующих миграций, что подтверждает гипотезу о более раннем занесении лепры в Тихоокеанский регион [53].

Культура изоляции людей, больных проказой, и, соответственно, организация отдельных захоронений при лепрозориях дала возможность проведения уникального сравнительного генетического анализа останков людей, заражённых лепрой с останками из обычных захоронений из той же местности и того же периода. Например, был проведён популяционный анализ индивидов из кладбища лепрозория St. Jørgen (Дания, XIII–XVI вв.), в котором были исследованы гены, связанные с иммунным статусом. Были показаны значимые ассоциации аллеля лейкоцитарного антигена человека DRB1\*15:01 и сочетание гаплотипов DRB1\*15:01 и DQB1\*06:02 с заболеванием лепроматозной проказой в средневековых популяциях [54]. В современных популяциях аллель DRB1\*15:01 также является фактором восприимчивости к проказе. Интересно, что комбинация аллелей DRB1\*15:01–DQB1\*06:02 представляет собой гаплотип, широко распростра-

ненный у современных европейцев [55, 56], который является генетическим фактором риска развития язвенного колита, саркоидоза и рассеянного склероза [57–59], в то же время он защищает от диабета 1-го типа [60].

Эти различные ассоциации заболеваний подчёркивают хорошо известную плейотропию вариантов HLA, которые влияют на популяционную частоту определённых гаплотипов и вносят вклад в генетическое разнообразие в области HLA в целом. В более общем плане эти результаты предоставляют новые доказательства гипотезы о том, что древние эпидемии, например, такие как проказа, повлияли на частоту аллелей генов, связанных с воспалительными заболеваниями в современных популяциях [61–63]. В перспективе реконструкция того, как люди адаптировались к крупным эпидемиям в прошлом, поможет понять генетические факторы, участвующие в нашей нынешней предрасположенности к инфекционным заболеваниям.

**Холера** – острое заболевание, вызываемое граммотрицательными бактериями *V. cholerae*, колонизирующими тонкий кишечник и вырабатывающими холерный токсин [64]. До начала XIX в. холера была эндемична в Азии, но в 1817 г. глобализация привела к распространению заболевания из Индии в другие регионы и возникновению первой пандемии. Всего в XIX–XX вв. было 6 волн эпидемии, седьмая началась в конце XX в. и продолжается до сих пор; случаи холеры регистрируются в эндемичных районах Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки [65]. Причиной всех волн эпидемии является загрязнённая вода.

К настоящему времени проведены лишь единичные геномные исследования холерных вибрионов из палеобразцов. Так, в 2014 г. группа исследователей с использованием методов NGS реконструировала геном *V. cholerae* из сохранённого желудка жертвы второй пандемии холеры (вспышки в Филадельфии в 1849 г.). Было показано, что этот штамм гомологичен на 95–97% референсному штамму классического биовара холеры O395, отличаясь от него 203 однонуклеотидными заменами, отсутствием трёх геномных локусов и наличием tandemных повторов профага, содержащего ген холерного токсина, потенциально влияющих на вирулентность [66]. Выявление холерного вибриона в археологических образцах затруднено тем, что в наиболее удобном материале для выделения ДНК – костной ткани и зубной эмали, по-видимому, невозможно обнаружить ДНК данного вибриона. Однако при исследовании останков «холерного» кладбища времен пятой волны эпидемии холеры в Аргентине наличие холерного

вибриона в одном из образцов седиментов крестцовых отверстий удалось выявить методом ПЦР и секвенирования по Сэнгеру [67]. На сегодняшний день это единственный случай обнаружения дДНК *V. cholerae*, что подтверждает расширение возможностей обнаружения патогенов в археологических образцах при включении в анализ образцов седиментов.

**Туберкулёз.** Ещё одно заболевание, поражающее людей на протяжении тысячелетий и являющееся самым смертельным из бактериальных инфекций – это туберкулёз, вызываемый бактерией *M. tuberculosis* [68]. Несмотря на то что геном палочки Коха активно изучается, единого мнения о происхождении болезни и времени её появления до сих пор нет [69]. Выявление патогена в древних останках обычно производится с помощью метода ПЦР с использованием праймеров на гены пероксидазы, каталазы (*katG*) и фосфолипазы C (*mpt40*), которые обнаружены исключительно у бактерий *M. tuberculosis complex* (хотя *mpt40* отсутствует у *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* и, возможно, в некоторых других штаммах туберкулёза), и, следовательно, используются в качестве специфических маркёров наличия ДНК *M. tuberculosis* [70].

На основе молекулярных исследований современных геномов бактерии *M. tuberculosis* была выдвинута гипотеза, предполагающая, что самый недавний общий предок *M. tuberculosis* следовал вместе с людьми во время миграций из Африки на протяжении примерно 70 000 лет. В то же время исследования с использованием древних геномов в качестве точек калибровки дают гораздо более молодой возраст общего предка – менее 6000 лет [70, 71]. Например, результаты байесовского филогенетического анализа недавно реконструированного генома *M. tuberculosis* из останков шведского епископа XVII в. Педера Винструпа (на сегодняшний день – это бактериальный геном с самым высоким покрытием (141-кратным) и самого высокого качества), пять ранее опубликованных древних и 255 современных геномов этого возбудителя свидетельствуют о появлении комплекса *M. tuberculosis* в неолите [72].

Штаммы *M. tuberculosis* из человеческих останков тысячелетнего возраста с территории прибрежного Перу оказались наиболее близки к штаммам *Mycobacterium pinnipedii*, поражающим тюленей и морских львов [70]. Авторами высказано предположение, что ластоногие могли переносить микобактерию от неизвестного вида хозяина с берегов Африки к побережью Перу, где добыча мяса и меха морского зверя способствовала передаче бактерий людям [73]. Также



существуют палеопатологические свидетельства наличия туберкулёзных поражений в человеческих останках с островов Тихого океана, которые могли появиться ещё до контакта с европейцами [74].

Недавнее открытие того, что гомозиготы по полиморфизму TUK2 P1104A подвержены более высокому риску развития клинических форм туберкулёза, стало первым доказательством моногенной предрасположенности к туберкулёзу, тем самым дав нам уникальную возможность изучать совместную эволюцию человека и смертельного патогена *M. tuberculosis* [75]. С использованием методов байесовского анализа на большом наборе данных (1013 древних человеческих геномов, принадлежащих к семи историческим эпохам) было показано, что современный вариант P1104A произошёл от варианта общих предков жителей Западной Евразии около 30 000 лет назад [76]. Кроме того, было выявлено заметное колебание частоты P1104A в течение последних 10 000 лет европейской истории после крупномасштабных миграций анатолийских неолитических фермеров и евразийских степных пастухов в Европу. Также результатом анализа стало обнаружение резкого уменьшения частоты полиморфизма после бронзового века, что может быть связано с сильным отрицательным отбором, начавшимся около 2000 лет назад, с относительным снижением приспособленности гомозигот на 20%, такой показатель является одним из самых высоких в геноме человека.

Таким образом, источники появления и распространения туберкулёза в популяциях человека остаются не до конца изученными, поэтому дальнейшие исследования, в том числе с помощью методов палеогенетики, являются весьма актуальными.

**Сифилис** – это древнее инфекционное заболевание, вызываемое спирохетой *T. pallidum* (бледная трепонема). Эпидемия этой болезни разразилась в Европе в конце XV в., и с тех пор вспышки сифилиса периодически возникают в разных частях мира (с миллионами заболевших каждый год), даже несмотря на открытие антибиотиков. Вопрос происхождения сифилиса остаётся спорным, выдвигались две основные гипотезы: «колумбовая» (американская) и «доколумбовая» (европейская). Ещё одна гипотеза предполагает общее доколумбовое происхождения сифилиса и других патологий, вызванных бактериями рода *Treponema* [77].

Согласно американской гипотезе, сифилис возник в Новом Свете и был завезён в Европу экипажем первой американской экспедиции, так как время вспышки этой болезни совпадает

с возвращением Колумба. Быстрое распространение заболевания среди европейцев при этом объясняют отсутствием у них иммунитета к новой болезни.

Вторая гипотеза, называемая «доколумбовой», предполагает, что сифилис присутствовал у населения Старого Света ещё до контакта с Америкой, и болезнь могла распространиться в Евразии и Африке ещё в доисторические времена [78]. Согласно этой версии, сифилис в древних европейских образцах мог быть не диагностирован из-за сходства симптомов с другими патологиями, например с лепрой [79], или болезнь могла стать более вирулентной, а её течение более тяжёлым только в XV в., начав быстро распространяться в том числе из-за социальных факторов.

Третья гипотеза возникновения сифилиса является разновидностью «доколумбовой» гипотезы и предполагает, что все трепонематозы (сифилис, фрамбезия, пинта, беджель) являются одним заболеванием, проявляющимся в разных формах в зависимости от климата и других условий. Однако в настоящее время пока нет достоверных подтверждений этой гипотезы, хотя высказаны предположения о возможных рекомбинационных событиях между разными штаммами трепонем [80].

ДНК бледной трепонемы была впервые выявлена в образцах ДНК из костей человека в 1999 г. [81] с помощью ПЦР, но более поздние попытки закончились неудачей [82]. Исследователи долгое время считали трепонему неподходящим объектом для палеогенетических исследований: спирохеты присутствуют в небольшом количестве в организме и даже при жизни пациентов их бывает сложно детектировать генетическими методами [83]. Филогенетические исследования, выполненные на материале от современных пациентов и образцах, собранных в 1912 г. и культивируемых в лабораторных условиях, позволили реконструировать эволюционную историю *T. pallidum* и обнаружить доминирующий кластер, всё разнообразие которого сформировалось в XX в. после открытия антибиотиков [84].

Возможность проведения полногеномных исследований стала прорывом в изучении сифилиса, поскольку короткие участки, амплифицированные с использованием ПЦР, не могли дать достаточной информации о медленно эволюционирующем патогене [77]. Исследования, основанные на методах NGS, были впервые успешно выполнены на трепонемах из костей приматов. После этого стало появляться всё больше и больше работ, связанных с извлечением ДНК трепонемы из археологических образцов.

В 2018 г. был проведён первый сравнительный анализ полных геномов *T. pallidum* из древних человеческих скелетов из колониальной Мексики XVII–XIX вв., в результате которого были получены данные, свидетельствующие о вероятных рекомбинационных событиях между разными подвидами трепонем [85].

Анализ последовательностей ДНК 25 костных образцов из Рио-де-Жанейро позволил выявить присутствие сифилиса в Бразилии времён колониального периода [86]. Также подтверждено с помощью молекулярных методов палеопатологическое предположение о случае сифилиса в 150-летних останках плода (29 недель) во Франции [87]. Недавнее исследование, показавшее более сложную, чем считалось ранее, картину географического распределения ранних эпидемий трепонем, было основано на реконструкции четырёх геномов *T. pallidum* из средневековой Европы (XIV–XVII вв.). Исследованные древние геномы свидетельствуют о генетическом разнообразии *T. pallidum*, существовавшем в Средние века в Старом Свете, в частности, было показано присутствие как трепонем, вызывающих сифилис, так и подвидов, связанных с другими типами трепонематозов. Однако эти результаты не опровергают гипотезы об интродукции новых штаммов трепонем из Нового Света участниками европейских экспедиций и потенциальных изменений в геномах в результате рекомбинационных событий между ними и европейскими трепонемами [80].

**Чума.** *Yersinia pestis* является возбудителем чумы – болезни, унесшей жизни около 60% населения Старого Света во время трёх разрушительных пандемий: первой, или юстиниановой чумы (VI–VIII вв.), второй, или Чёрной смерти (XIV–XVIII вв.), и третьей, или современной пандемии (XVIII–XIX вв.), начавшейся в Китае [88–90]. Сейчас чума считается проблемой прошлого, хотя до сих пор ежегодно регистрируются сотни случаев заболевания в африканских странах [91].

Подробное описание последних достижений в области генетических исследований *Y. pestis* и полученные с их помощью новые данные о наиболее известных эпидемиях чумы в истории человечества представлены в обзоре Кузнецовой с соавт. [92]. Наиболее важными, с точки зрения пополнения исторических фактов и изучения эволюции чумной палочки, были находки *Y. pestis* в останках, датированных бронзовым веком, т.е. намного ранее известных пандемий. Кроме того, по мере накопления геномных данных были установлены возможные причины окончания исторически известных пандемий.

## ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Как и в случае бактерий, гипотезы об эволюции вирусов высказывались только на основе данных о разнообразии современных штаммов. Накопление геномных данных из археологических образцов позволило сочетать в анализе древние и современные геномы. Так, исходя из эволюционного анализа штаммов вируса гепатита В, начиная с эпохи неолита, было высказано предположение о том, что данный вирус существует не менее 20 000 лет [93, 94]. Помимо изучения разнообразия штаммов вирусов во временном разрезе, ещё одним актуальным направлением изучения истории пандемий, вызванных вирусами, является анализ результатов медицинской защиты человека от заболеваний, в том числе вакцинации. Таким историческим примером служит борьба с вирусом оспы.

**Оспа.** Натуральная оспа является высокозаразным вирусным заболеванием, возбудителем которого является вирус оспы VARV, относящийся к семейству Poxviridae, роду *Orthopoxvirus*. Род *Orthopoxvirus* включает множество иммунологически родственных поксвирусов, которые сильно различаются по своей способности инфицировать разных хозяев. Вирус натуральной оспы VARV уникален среди других видов *Orthopoxvirus* тем, что является исключительно человеческим патогеном.

Патогенный вирус VARV существует в двух разновидностях: *Variola major*, вызывающий более тяжёлую клиническую форму болезни с летальностью 20–40%, а в некоторых эпидемиях – до 90%, и *Variola minor*, отличающийся низкой летальностью (1–3%) [95]. На протяжении многих столетий оспа, или как её называли в древности «Чёрная оспа», вызывала несколько крупномасштабных эпидемий, уровень смертности в которых доходил до 70% [96]. Так, уже в XX в. от оспы погибло свыше 300 млн человек [97]. В настоящее время натуральная оспа является единственной болезнью человека, которая была ликвидирована в мире в результате кампании всеобщей вакцинации к 1980 г., и это достижение остаётся одним из величайших триумфов современной медицинской науки [95]. Геном вируса натуральной оспы представляет собой линейную двухцепочечную ДНК, содержащую 186–187 т.п.н., с инвертированными концевыми повторами (TIR) на обоих концах последовательности. Локализация генов с различными функциями в геноме вируса натуральной оспы не случайна: центральная часть генома размером ~100 т.п.н. занята генами, которые являются общими с другими поксвирусами и кодируют ~100 белков, участвующих в первую очередь в



вирусов оспы VARV были реконструированы из сибирских мумий XVII–XVIII вв., мумии ребёнка из Литвы, датированной XVII в., и из чешских музейных образцов XIX в. [107–109]. Древнюю ДНК патогена удалось выделить из мягких тканей мумии, для обогащения геномных библиотек была использована стратегия гибридизации с последующим массивным параллельным секвенированием на платформе «Illumina», а затем было проведено сравнение с референсным геномом современного образца вируса оспы VARV. В случае анализа древнего вируса из мумии ребёнка из Литвы, датированной XVII в., авторы также предприняли попытку сборки *de novo* генома древнего штамма VARV. Конечный геном *de novo* имел длину 187 565 п.н., а консенсусная последовательность *de novo* имела идентичность 97,5% по 185 578 п.н. с референсной последовательностью современного штамма VARV. Также был реконструирован геном вируса натуральной оспы из музейного образца XVIII в. в Англии, представляющего собой сохранённые в парафине ткани ребёнка, поражённые оспой. В данном случае выделенную ДНК использовали для создания библиотек и последующего полногеномного секвенирования на платформе «Illumina» без предварительного обогащения геномных библиотек. Филогенетический анализ древнего генома со всеми доступными современными и историческими геномами VARV продемонстрировал, что вирус XVIII в. относится к самостоятельной линии древних штаммов, отличной от геномов вируса XVII в., и занимает эволюционное положение между историческими образцами вирусов XVII в. из Литвы и современными европейскими штаммами XX в. [110]. На основе собранных данных ранее был сделан вывод о времени существования общего предка всех штаммов вируса натуральной оспы – между XIV и XVII вв. Однако исторические источники, упоминающие об оспе, такие как письменные свидетельства о возможных инфекциях оспы в Индии, датируются 1500 г. до н.э., а египетские мумии с кожными поражениями, сходными с оспой, датируются ещё раньше (3570 г. до н.э.) [111].

Результаты недавнего исследования 13 полногеномных последовательностей вируса натуральной оспы, выделенных из археологических останков, обнаруженных на севере Европы и датируемых эпохой викингов (600–1050 г. н.э.), сдвинули дату самого раннего случая заболевания натуральной оспой на тысячелетие и дали возможность говорить о присутствии вируса оспы в Европе уже в конце VI–начале VII в. [105]. Авторы провели сравнение геномных последовательностей древних вирусов и современных

штаммов VARV, в результате которого были обнаружены различия в количестве функциональных генов, относящихся к группе вспомогательных генов поксвирусов, отвечающих за противодействие антивирусным ответам. В последовательностях ряда генов были выявлены мутации (а именно: вставки, делеции или точечные замены, которые приводили к появлению стоп-кодонов либо сдвигу рамки считывания), которые приводят к инактивации гена. Оказалось, что по крайней мере 3 гена (*CrmB*, *C1L* и *E5R*), активные во всех образцах современных вирусов VARV, инактивированы у древних штаммов вирусов оспы, существовавших более 1000 лет назад.

В то же время 14 генов, инактивированных или отсутствующих у современных штаммов вируса VARV, предположительно были активны в некоторых или во всех образцах древнего вируса. Среди них обнаружилось 8 генов, которые кодируют различные факторы вирулентности, например, такие как *C2L*, *F3L* и *A55R* или, например, ген *IL1B*, кодирующий цитокин IL-1-бета семейства интерлейкина 1 (IL-1), участвующий в регуляции иммунных реакций и в воспалительных процессах [105] (рис. 1). Как уже упоминалось выше, потеря подобных генов ведёт к изменению вирулентности и приводит к ограничению круга «хозяев» поксвирусов [112]. Обнаруженные древние варианты вируса оспы эпохи викингов оказались частью ранее неизвестной, а ныне вымершей вирусной клады, которая эволюционировала независимо от современного VARV. Полученные данные подтверждают теорию редуцированной эволюции поксвирусов о том, что уменьшение количества генов предполагаемого предкового вируса играет решающую роль в видообразовании и приводит к тому, что любой вновь появляющийся вид вируса ограничивается определённой, только ему присущей экологической нишей (одним «хозяином») [105, 113].

Данные анализа геномов древних штаммов вируса натуральной оспы свидетельствуют о существовавшем высоком генетическом разнообразии вирусов оспы VARV в Европе до разработки противооспенной вакцины. Давление отбора со стороны возрастающего уровня вакцинации, вероятно, постепенно привело к исчезновению сразу нескольких древних линий вируса VARV, а доступные в настоящее время геномы вируса оспы VARV представляют лишь часть генетического разнообразия VARV в прошлом [108, 110].

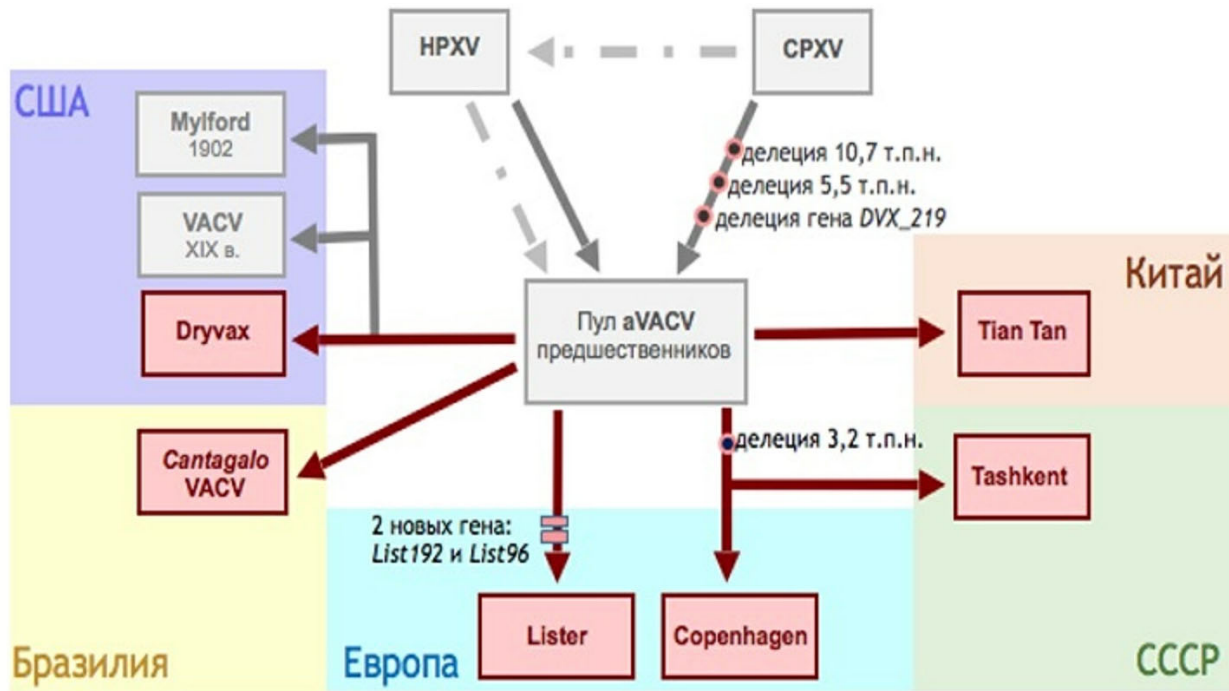
Другим направлением в изучении древних штаммов вируса оспы является вопрос истории и эволюционных отношений различных штаммов противооспенной вакцины, который до сих

пор остаётся неясным, так как нет достоверных данных о происхождении и разнообразии вирусов, используемых в программах ранней вакцинации. В конце XVIII в. первооткрыватель вакцины от оспы, Эдвард Дженнер, показал, что людей можно вакцинировать против заражения оспой, используя материал на основе вируса коровьей оспы (СРХV), что было намного безопаснее, чем существующая на тот момент практика «вариоляции» с помощью вируса оспы VARV [114]. Вирус коровьей оспы СРХV, в отличие от вируса натуральной оспы VARV, обладает наибольшим генетическим разнообразием и широким кругом хозяев и имеет весь набор генов, присутствующих во всех других ортопоксвирусах. Предполагают, что потеря генов сыграла важную роль в эволюции *Orthopoxvirus* и что предковые СРХV-подобные штаммы эволюционировали во все современные ортопоксвирусы в результате «редуктивной эволюции» [113]. Однако вирус осповакцины (VACV), который в конечном итоге был использован для искоренения оспы и который содержится во всех современных противооспенных вакцинах, отличается от любого известного современного штамма СРХV. Биологическое происхождение VACV неизвестно, хотя было высказано предположение о том, что его предком мог быть вирус, похожий на вирус конской оспы, хотя геном современного вируса конской оспы (НРХV) несет в себе множество дополнительных генов [115]. Эта гипотеза подтверждается сообщением Jenner [114] о том, что он получил свою более позднюю инокуляцию от инфекции лошадей.

Геномный анализ вируса, ассоциированного с вакциной в исторических образцах, позволил получить данные об исторических вакцинных штаммах вируса оспы VACV, циркулирующих в Филадельфии в XIX в. во время активной вакцинации американских военнослужащих [116]. Авторы исследовали происхождение, разнообразие и распространение ранних штаммов противооспенной вакцины методом полногеномного анализа как вириона, так и метагенома, выделенных из исторических музейных «наборов» для вакцинации. Проведенный авторами филогенетический анализ помещает выделенные исторические вакцинные штаммы в кладу *Orthopoxvirus* (ОРХV). Наиболее близкими к историческим вакцинным штаммам вируса оказались как современные североамериканские вакцинные штаммы VACV, так и различные штаммы вируса осповакцины, циркулирующие в природной среде обитания, включая южноамериканский крупный рогатый скот (Бразилия) и буйволов из Юго-Восточной Азии (Индия), а также вирус *Cantagalo* (СТГV), представляющий

собой отдельный штамм коровьего вируса [116]. Ранее был проведен полногеномный анализ исторического штамма вируса осповакцины, выделенного из глицеринового образца, содержащего противооспенную вакцину «Mulford» 1902 г. из Европы. В результате анализа было обнаружено, что геном этого штамма вируса осповакцины VACV на 99,7% совпадает с вирусом оспы лошади НРХV, что подтверждает предполагаемую роль вируса конской оспы в происхождении исторической противооспенной вакцины. Также авторы обнаружили у «Mulford» уникальные делеции на обоих концах последовательности размером 10,7 т.п.н. слева и 5,5 т.п.н. справа, примыкающие к области TIR-повторов, присутствующие в современных штаммах VACV, но отсутствующие в геноме вирусов конской оспы НРХV и коровьей оспы СРХV [117]. Таким образом, на основании данных исследований исторических штаммов осповакцины можно заключить, что для иммунизации европейского населения в XIX в. взаимозаменяемо использовались прививки, полученные как от коровьей, так и от конской оспы. Вероятно, что существовал и предковый вирус осповакцины (aVACV), который мог циркулировать в популяциях различных домашних животных (лошадей и коров) в Европе в XIX в., но затем исчез и теперь не имеет естественных хозяев, за исключением случаев заражения животных в отдельных странах, таких как Бразилия и Индия.

В настоящее время на основе полногеномного анализа современных и исторических вакцинных штаммов все существующие штаммы осповакцины разделены на 3 основных филогенетических кластера: евразийский кластер, включающий британский штамм *Lister*, китайский штамм *Tian-tan* и российский штамм *Tashkent*; южноамериканский кластер, включающий бразильские полевые штаммы осповакцины, представленные вирусом *Cantagalo*; и американский или *Dryvax*-кластер, который объединяет все вирусные клоны, выделенные из американской вакцины *Dryvax* [118]. Авторы показали, что центральная часть генома VACV оказалась высококонсервативна у всех вакцинных штаммов, а наибольшая часть основного генетического разнообразия (делеции и инверсии) находится в районе теломер. Обнаружено, что все современные штаммы осповакцины VACV характеризуются тремя генетическими особенностями: две делеции 10,7 и 5,5 т.п.н, расположенные в области повторов TIR на концах вирусной ДНК, а также мутация или делеция гена *DVX\_213*, кодирующего анкириновый белок F-домена, гомолога гена *B18R* у вируса натуральной оспы (Бангладеш), потеря которого



**Рис. 2.** Схема-модель эволюции вируса осповакцины VACV, составленная на основе геномов современных штаммов осповакцины VACV и исторических штаммов осповакцины, полученных из разных источников. Показаны эволюционные процессы, которые привели к разнообразию штаммов вакцинных вирусов натуральной оспы VACV. Красным отмечены современные вакцинные штаммы, серым — исторические вакцинные штаммы; aVACV — пул из различных исторических предшественников всех современных вакцинных штаммов; HPXV — вирус конской оспы, гипотетический предшественник исторического вакцинного вируса; CPXV — вирус коровьей оспы, гипотетический предшественник исторического вакцинного вируса; пунктиром показан один из вероятных эволюционных процессов происхождения вируса конской оспы HPXV от вируса коровьей оспы CPXV

могла повлиять на вирулентность вируса VACV. Нужно отметить, что современные штаммы вируса осповакцины VACV не всегда группируются в простые филогенетические деревья, соответствующие известным историческим отношениям между этими штаммами. Скорее, можно предположить, что все существующие штаммы осповакцины VACV происходят из сложного набора различных вакцинных вирусов (пула вирусов), предшественников современного VACV, которые в течение продолжительного времени вакцинации в XIX–XX вв. были многократно пассированы, распределены и произвольно выбраны для создания штаммов современных вакцин (рис. 2).

Таким образом, можно заключить, что реконструкция геномов древних вирусов оспы с использованием технологий широкомасштабного геномного секвенирования существенно расширила наши представления об эволюции вируса натуральной оспы. Полученные новые данные о взаимосвязях между вирусом натуральной оспы человека и другими ортопоксвирусами, в том числе и вымершими древними штаммами вирусов человека и животных, изменили пред-

ставления об эволюционных взаимосвязях среди ортопоксвирусов (OPV) и улучшили понимание эволюционной истории натуральной оспы. Однако ещё остаются вопросы, связанные с происхождением вируса натуральной оспы, например, каким образом VARV эволюционировал в патоген, специфичный для человека, на которые должны ответить дальнейшие исследования.

## БЛИЖАЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Длительная совместная эволюция человека и возбудителей инфекционных заболеваний привела к тому, что генетическая структура человеческих популяций изменялась под воздействием инфекционных агентов. Подобные изменения зачастую сопровождались отбором генетических вариантов в локусах, связанных с устойчивостью к конкретным инфекционным агентам, что уже было отмечено в первых работах, посвящённых одновременному анализу 50 и более образцов дДНК [119, 120]. Ожидается, что проведение исследований с использова-

нием ранее неизученных древних образцов позволит выявить схожие эволюционные изменения в человеческих популяциях в ответ на воздействие инфекционных агентов.

Отдельный интерес представляют собой одномоментные коллективные захоронения, поскольку возможной причиной таких захоронений в некоторых случаях являлись вспышки инфекционных заболеваний. Метагеномный анализ ДНК из таких образцов потенциально может выявить патоген, ставший причиной смерти.

Параллельно с увеличением технических возможностей секвенирования развиваются и биоинформатические подходы. Большинство аналитических методов основано на сравнении с известными референсными последовательностями современных прокариот, которых на текущий момент получено почти 200 000 [121]. Тем не менее даже такое количество референсных последовательностей может быть проанализировано в течение нескольких часов и даже минут [122, 123]. Следует учитывать, однако, что геномные последовательности древних образцов могут иметь большую дивергентность по сравнению с современными образцами, которая дополнительно отягощается химическими модификациями ДНК. Тем не менее эти методы успешно применяются и для анализа древних метагеномов [124]. Однако как для современных, так и для древних метагеномов могут применяться методы сборки *de novo* [125, 126] без использования референсных баз данных, что позволяет получить более точную последовательность генома. Кроме того, регулярно проводятся новые исследования: на сегодняшний день опубликовано уже более тысячи древних метагеномов [127]. Это позволит в будущем производить более широкий систематический анализ, а не только точечные исследования отдельных образцов.

Необходимо отметить основные технические сложности в исследованиях, связанных с палеогенетикой, которые предстоит решить в ближайшем будущем. Как правило, археологические образцы представлены останками в виде костей и зубов, однако многие известные патогены присутствуют в других тканях, которые не сохраняются с течением времени. На сегодняшний день есть успешные работы по выделению ДНК древних патогенов из мумифицированных тканей и исторических образцов, но они представляют собой единичные случаи. Ещё одним препятствием для получения полного генома древнего патогена является малое количество самого патогена в археологическом материале, что возможно решить путём увеличения числа «прочтений» при секвенировании. Так же, как

отмечалось выше, важной проблемой для правильной интерпретации результатов секвенирования является сходство патогенных форм бактерий и непатогенных форм, представленных в почве в большом количестве. Одним из путей решения этой проблемы может являться анализ почвы и седиментов из коллективных захоронений. Работы, опубликованные за последние два года в области генетических исследований древних седиментов, демонстрируют их большой потенциал. Во-первых, в пробах из седиментов может содержаться ДНК, совпадающая с ДНК останков скелета [128], а также патогенов, населявших внутренние органы [67]. Во-вторых, появляется возможность анализировать ДНК окружающей среды исследуемого периода [129].

Молекулы РНК деградируют ещё быстрее, чем ДНК, тем самым накладывая ограничения на исследования эволюции патогенов с РНК-геномами (вирус гриппа, вирус кори, ВИЧ и вирус желтой лихорадки). Тем не менее недавние исследования показывают, что в благоприятных условиях РНК может сохраняться в течение тысячелетий [130, 131]. Секвенирование геномов древних РНК-вирусов кори и чумы крупного рогатого скота [132] является значимым событием, которое позволит нам лучше понять историю возникновения многих других патогенов на основе РНК. Интересно также, что фиксация формалином, губительная для ДНК, по-видимому, не оказывает такого влияния на РНК, а, наоборот, сохраняет её, как было показано в случае успешной реконструкции ВИЧ из архивных тканей [133].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, древняя ДНК является ценным материалом для углубления нашего понимания того, когда возникли и как распространялись и эволюционировали многие патогены. Мы можем видеть, что благодаря использованию молекулярно-генетических методов палеоэпидемиология развивается быстрыми темпами, а результаты новых работ зачастую опровергают старые гипотезы или находят подтверждения тем сценариям, которые считались маловероятными на основании классических подходов. Наши нынешние успехи были немыслимы ещё несколько десятилетий назад, и можно предположить, что дальнейший научный прогресс позволит получить ещё больше информации о происхождении и разнообразии древних патогенов.

Пандемия COVID-19 заставила ученых всего мира задуматься об истоках и причинах возникновения новых опасных инфекционных заболе-

ваний, а также о поиске механизмов возможного перехода вирусных патогенов от вида к виду, в частности зоонозных вирусов к человеку. В свете этого одним из перспективных направлений в исследовании геномов древних патогенов является поиск и выделение ДНК и РНК палеовирусов и бактерий, сохранившихся в мягких тканях животных времен палеолита, найденных в Арктике на территории России, а также в образцах почв из районов многолетней мерзлоты. Их изучение поможет лучше понять эволюционные процессы формирования вирусов, исследовать молекулярные и эволюционные механизмы адаптации животных к вирусным и бактериаль-

ным патогенам, а также оценить влияние эпидемий на генетическую структуру популяций человека и животных.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России, системный номер 075-10-2020-116 (грант № 13.1902.21.0023).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zink, A. R., Reischl, U., Wolf, H., and Nerlich, A. G. (2002) Molecular analysis of ancient microbial infections, *FEMS Microbiol. Lett.*, **213**, 141-147, doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11298.x.
- Buikstra, J. E., and Roberts, C. (2012) *The Global History of Paleopathology: Pioneers and Prospects*, Oxford Univ. Press.
- Arriaza, B. T., Salo, W., Aufderheide, A. C., and Holcomb, T. A. (1995) Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: Molecular and skeletal evidence, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **98**, 37-45, doi: 10.1002/ajpa.1330980104.
- Drancourt, M., Aboudharam, G., Signoli, M., Dutour, O., and Raoult, D. (1998) Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12637-12640, doi: 10.1073/pnas.95.21.12637.
- Pääbo S. (1989) Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1939-1943, doi: 10.1073/pnas.86.6.1939.
- Briggs, A. W., Stenzel, U., Johnson, P. L., Green, R. E., Kelso, J., et al. (2007) Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14616-14621, doi: 10.1073/pnas.0704665104.
- Warinner, C., Herbig, A., Mann, A., Fellows Yates, J. A., Weiß, C. L., et al. (2017) A Robust framework for microbial archaeology, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **18**, 321-356, doi: 10.1146/annurev-genom-091416-035526.
- Latham, K. E., and Miller, J. J. (2018) DNA recovery and analysis from skeletal material in modern forensic contexts, *Forensic Sci. Res.*, **4**, 51-59, doi: 10.1080/20961790.2018.1515594.
- Müller, R., Roberts, C. A., and Brown, T. A. (2016) Complications in the study of ancient tuberculosis: presence of environmental bacteria in human archaeological remains, *J. Archaeol. Sci.*, **68**, 5-11, doi: 10.1016/j.jas.2016.03.002.
- Gilbert, M., Cuccui, J., White, W., Lynnerup, N., Titball, R. W., et al. (2004) Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims, *Microbiology (Reading)*, **150**, 341-354, doi: 10.1099/mic.0.26594-0.
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., and Knight, R. (2014) The Earth microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biol.*, **12**, 69, doi: 10.1186/s12915-014-0069-1.
- Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome, *Nature*, **486**, 207-214, doi: 10.1038/nature11234.
- Murray, D. C., Haile, J., Dortch, J., White, N. E., Haouchar, D., et al. (2013) Scrapheap challenge: a novel bulk-bone metabarcoding method to investigate ancient DNA in faunal assemblages, *Sci. Rep.*, **3**, 3371, doi: 10.1038/srep03371.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Methods*, **7**, 335-336, doi: 10.1038/nmeth.f.303.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., et al. (2009) Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7537-7541, doi: 10.1128/AEM.01541-09.
- Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O., et al. (2012) Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes, *Nat. Methods*, **9**, 811-814, doi: 10.1038/nmeth.2066.
- Truong, D. T., Franzosa, E. A., Tickle, T. L., Scholz, M., Weingart, G., et al. (2015) MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling, *Nat. Methods*, **12**, 902-903, doi: 10.1038/nmeth.3589.
- Nayfach, S., Rodriguez-Mueller, B., Garud, N., and Pollard, K. S. (2016) An integrated metagenomics pipeline for strain profiling reveals novel patterns of bacterial transmission and biogeography, *Genome Res.*, **26**, 1612-1625, doi: 10.1101/gr.201863.115.
- Darling, A. E., Jospin, G., Lowe, E., Matsen, F. A., Bik, H. M., et al. (2014) PhyloSift: phylogenetic analysis of genomes and metagenomes, *PeerJ*, **2**, e243, doi: 10.7717/peerj.243.
- Wood, D. E., and Salzberg, S. L. (2014) Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments, *Genome Biol.*, **15**, R46, doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r46.
- Ounit, R., Wanamaker, S., Close, T. J., and Lonardi, S. (2015) CLARK: Fast and accurate classification of metagenomic and genomic sequences using discriminative k-mers, *BMC Genomics*, **16**, 236, doi: 10.1186/s12864-015-1419-2.
- Ounit, R., and Lonardi, S. (2016) Higher classification sensitivity of short metagenomic reads with CLARK-S, *Bioinformatics*, **32**, 3823-3825, doi: 10.1093/bioinformatics/btw542.
- Vågene, Å. J., Herbig, A., Campana, M. G., Robles García, N. M., Warinner, C., et al. (2018) Salmonella enterica genomes from victims of a major sixteenth-century epidemic in Mexico, *Nat. Ecol. Evol.*, **2**, 520-528, doi: 10.1038/s41559-017-0446-6.



24. Weyrich, L. S., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Llamas, B., et al. (2017) Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus, *Nature*, **544**, 357-361, doi: 10.1038/nature21674.
25. DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., et al. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 5069-5072, doi: 10.1128/AEM.03006-05.
26. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., et al. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nat. Methods*, **13**, 581-583, doi: 10.1038/nmeth.3869.
27. Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., et al. (2017) Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns, *mSystems*, **2**, e00191-16, doi: 10.1128/mSystems.00191-16.
28. Velsko, I. M., Frantz, L. A. F., Herbig, A., Larson, G., and Warinner, C. (2018) Selection of appropriate metagenome taxonomic classifiers for ancient microbiome research, *mSystems*, **3**, e00080-18, doi: 10.1128/mSystems.00080-18.
29. Ziesemer, K. A., Mann, A. E., Sankaranarayanan, K., Schroeder, H., Ozga, A. T., et al. (2015) Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification, *Sci. Rep.*, **5**, 16498, doi: 10.1038/srep16498.
30. Yuan, C., Lei, J., Cole, J., and Sun, Y. (2015) Reconstructing 16S rRNA genes in metagenomic data, *Bioinformatics*, **31**, i35-i43, doi: 10.1093/bioinformatics/btv231.
31. Hübner, R., Key, F. M., Warinner, C., Bos, K. I., Krause, J., et al. (2019) HOPS: Automated detection and authentication of pathogen DNA in archaeological remains, *Genome Biol.*, **20**, 280, doi: 10.1186/s13059-019-1903-0.
32. Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P. L., and Orlando, L. (2013) mapDamage2.0: Fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters, *Bioinformatics*, **29**, 1682-1684, doi: 10.1093/bioinformatics/btt193.
33. Schuenemann, V. J., Singh, P., Mendum, T. A., Krause-Kyora, B., Jäger, G., et al. (2013) Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*, *Science*, **341**, 179-183, doi: 10.1126/science.1238286.
34. Warinner, C., Rodrigues, J. F., Vyas, R., Trachsel, C., Shved, N., et al. (2014) Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity, *Nat. Genet.*, **46**, 336-344, doi: 10.1038/ng.2906.
35. Wagner, D. M., Klunk, J., Harbeck, M., Devault, A., Waglechner, N., et al. (2014) *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541-543 AD: A genomic analysis, *Lancet Infect. Dis.*, **14**, 319-326, doi: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
36. Skinsnes O. K. (1973) Notes from the history of leprosy. I. Interpretive chronology of leprosy concept and practice, *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, **41**, 220-233.
37. Ortner, D. J., and Putschar, W. G. J. (1985) *Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*, Washington DC: Smithsonian Institution Press.
38. Donoghue, H. D., Gladykowska-Rzeczycka, J., Marcsik, A., Holton, J., and Spigelman, M. (2002) *Mycobacterium leprae* in archaeological samples, in *The Past and Present of Leprosy. Archaeological, Historical, Palaeopathological and Clinical Approaches* (Roberts, Ch. A., Lewis, M., and Manchester, K., eds.) BAR International Series 1054, Bradford, pp. 271-286.
39. Buzhilova, A. (2002) In *The Past and Present of Leprosy. Archaeological, Historical, Palaeopathological and Clinical Approaches* (Roberts, Ch. A., Lewis, M., and Manchester, K., eds.) BAR International Series 1054, Oxford, Archaeopress, pp. 123-133.
40. Manchester, K. (1984) Tuberculosis and leprosy in antiquity: an interpretation, *Med. Hist.*, **28**, 162-173, doi: 10.1017/S0025727300035705.
41. Lechat, M. F. (1999) The paleopathology of leprosy: an overview, *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, **67**, 460-470.
42. Brothwell, D. R., Powers, R., and Hirst, S. M. (2000) In *Cannington Cemetery: Excavations 1962-3 of Prehistoric, Roman, post-Roman and Later Features at Cannington Park Quarry, Near Bridgewater, Somerset*, London: Britannia Monograph Series No. 17, Society for the Promotion of Roman Studies, pp. 195-256.
43. Blondiaux, J., Dürr, J., Khouchaf, L., and Eisenberg, L. E. (2002) In *The Past and Present of Leprosy. Archaeological, Historical, Palaeopathological and Clinical Approaches* (Roberts, Ch. A., Lewis, M., and Manchester, K., eds.) BAR International Series 1054, Oxford, Archaeopress.
44. Козак А. Д. (2002) К вопросу о существовании проказы в древнем Киеве, *OPUS: междисциплинарные исследования в археологии*, Изд-во ИА РАН, Москва, вып. 1-2.
45. Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppée, J. Y., et al. (2005) On the origin of leprosy, *Science*, **308**, 1040-1042, doi: 10.1126/science/1109759.
46. Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., et al. (2009) Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*, *Nat. Genet.*, **41**, 1282-1289, doi: 10.1038/ng.477.
47. Schuenemann, V. J., Avanzi, C., Krause-Kyora, B., Seitz, A., Herbig, A., et al. (2018) Ancient genomes reveal a high diversity of *Mycobacterium leprae* in medieval Europe, *PLoS Pathog.*, **14**, 1-17, doi: 10.1371/journal.ppat.1006997.
48. Fotakis, A. K., Denham, S. D., Mackie, M., Orbegozo, M. I., Mylopotamitaki, D., et al. (2020) Multi-omic detection of *Mycobacterium leprae* in archaeological human dental calculus, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **375**, 1812, doi: 10.1098/rstb.2019.0584.
49. Mendum, T. A., Schuenemann, V. J., Roffey, S., Taylor, G. M., Wu, H., et al. (2014) *Mycobacterium leprae* genomes from a British medieval leprosy hospital: Towards understanding an ancient epidemic, *BMC Genomics*, **15**, 270, doi: 10.1186/1471-2164-15-270.
50. Neukamm, J., Pfrengle, S., Molak, M., Seitz, A., Francken, M., et al. (2020) 2000-year-old pathogen genomes reconstructed from metagenomic analysis of Egyptian mummified individuals, *BMC Biol.*, **18**, 108, doi: 10.1186/s12915-020-00839-8.
51. Robbins, G., Tripathy, V. M., Misra, V. N., Mohanty, R. K., Shinde, V. S., et al. (2009) Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.), *PLoS One*, **4**, e5669, doi: 10.1371/journal.pone.0005669.
52. Blevins, K. E., Crane, A. E., Lum, C., Furuta, K., Fox, K., et al. (2020) Evolutionary history of *Mycobacterium leprae* in the Pacific Islands, *Philos. Trans. R. Soc. B*, **378**, 20190582, doi: 10.1098/rstb.2019.0582.
53. Stone, A. C., Lewis, C. M. Jr., and Schuenemann, V. J. (2020) Insights into health and disease from ancient biomolecules, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **375**, doi: 10.1098/rstb.2019.0568.
54. Krause-Kyora, B., Nutsua, M., Boehme, L., Pierini, F., Pedersen, D. D., et al. (2018) Ancient DNA study reveals HLA susceptibility locus for leprosy in medieval Europeans, *Nat. Commun.*, **9**, 1569, doi: 10.1038/s41467-018-03857-x.
55. Schipper, R. F., Schreuder, G. M., D'Amato, J., and Oudshoorn, M. (1996) HLA gene and haplotype frequencies in Dutch blood donors, *Tissue Antigens*, **48**, 562-574, doi: 10.1111/j.1399-0039.1996.tb02670.x.
56. Müller, C. R., Ehninger, G., and Goldmann, S. F. (2003) Gene and haplotype frequencies for the loci HLA-A,

- HLA-B, and HLA-DR based on over 13,000 German blood donors, *Hum. Immunol.*, **64**, 137-151, doi: 10.1016/s0198-8859(02)00706-1.
57. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E. S., et al. (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study, *N. Engl. J. Med.*, **357**, 851-862, doi: 10.1056/NEJMoa073493.
  58. Gregersen, J. W., Kranc, K. R., Ke, X., Svendsen, P., Madsen, L. S., et al. (2006) Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis, *Nature*, **443**, 574-577, doi: 10.1038/nature05133.
  59. Fischer, A., Grunewald, J., Spagnolo, P., Nebel, A., Schreiber, S., et al. (2014) Genetics of sarcoidosis, *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, **35**, 296-306, doi: 10.1055/s-0034-1376860.
  60. Hu, X., Deutsch, A. J., Lenz, T. L., Onengut-Gumuscu, S., Han, B., et al. (2015) Additive and interaction effects at three amino acid positions in HLA-DQ and HLA-DR molecules drive type 1 diabetes risk, *Nat. Genet.*, **47**, 898-905, doi: 10.1038/ng.3353.
  61. Karlsson, E. K., Kwiatkowski, D. P., and Sabeti, P. C. (2014) Natural selection and infectious disease in human populations, *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 379-393, doi: 10.1038/nrg3734.
  62. Domínguez-Andrés, J., Kuijpers, Y., Bakker, O. B., Jaeger, M., Xu, C. J., et al. (2021) Evolution of cytokine production capacity in ancient and modern European populations, *Elife*, **10**, e64971, doi: 10.7554/eLife.64971.
  63. Kerner, G., Patin, E., and Quintana-Murci, L. (2021) New insights into human immunity from ancient genomics, *Curr. Opin. Immunol.*, **72**, 116-125, doi: 10.1016/j.coi.2021.04.006.
  64. Faruque, S. M., Albert, M. J., and Mekalanos, J. J. (1998) Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1301-1314, doi: 10.1128/MMBR.62.4.1301-1314.1998.
  65. Piret, J., and Boivin, G. (2021) Pandemics throughout history, *Front. Microbiol.*, **11**, 631736, doi: 10.3389/fmicb.2020.631736.
  66. Devault, A. M., Golding, G. B., Waglechner, N., Enk, J. M., Kuch, M., et al. (2014) Second-pandemic strain of *Vibrio cholerae* from the Philadelphia cholera outbreak of 1849, *N. Engl. J. Med.*, **370**, 334-340, doi: 10.1056/NEJMoa1308663.
  67. Ramirez, D. A., Saka, H. A., and Nores, R. (2021) Detection of *Vibrio cholerae* aDNA in human burials from the fifth cholera pandemic in Argentina (1886-1887 AD), *Int. J. Paleopathol.*, **32**, 74-79, doi: 10.1016/j.ijpp.2020.12.004.
  68. Gagneux, S. (2018) Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**, 202-213, doi: 10.1038/nrmicro.2018.8.
  69. Menardo, F., Duchene, S., Brites, D., and Gagneux, S. (2019) The molecular clock of *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS Pathol.*, **15**, e1008067, doi: 10.1371/journal.ppat.1008067.
  70. Bos, K. I., Harkins, K. M., Herbig, A., Coscolla, M., Weber, N., et al. (2014) Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis, *Nature*, **514**, 494-497, doi: 10.1038/nature13591.
  71. Kay, G. L., Sergeant, M. J., Zhou, Z., Chan, J. Z., Millard, A., et al. (2015) Eighteenth-century genomes show that mixed infections were common at time of peak tuberculosis in Europe, *Nat. Commun.*, **6**, 6717, doi: 10.1038/ncomms7717.
  72. Sabin, S., Herbig, A., Vågene, Å. J., Ahlström, T., Bozovic, G., et al. (2020) A seventeenth-century *Mycobacterium tuberculosis* genome supports a Neolithic emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Genome Biol.*, **21**, 201, doi: 10.1186/s13059-020-02112-1.
  73. Silva-Pereira, T. T., Ikuta, C. Y., Zimpel, C. K., Camargo, N., de Souza Filho, A. F., et al. (2019) Genome sequencing of *Mycobacterium pinnipedii* strains: genetic characterization and evidence of superinfection in a South American sea lion (*Otaria flavescens*), *BMC Genomics*, **20**, 1030, doi: 10.1186/s12864-019-6407-5.
  74. McDonald, S. K., Matisoo-Smith, E. A., Buckley, H. R., Walter, R. K., Aung, H. L., et al. (2020) "TB or not TB": the conundrum of pre-European contact tuberculosis in the Pacific, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **375**, doi: 10.1098/rstb.2019.0583.
  75. Abel, L., Fellay, J., Haas, D. W., Schurr, E., Srikrishna, G., et al. (2018) Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: Present knowledge and future perspectives, *Lancet Infect. Dis.*, **18**, e64-e75, doi: 10.1016/S1473-3099(17)30623-0.
  76. Kerner, G., Laval, G., Patin, E., Boisson-Dupuis, S., Abel, L., et al. (2021). Human ancient DNA analyses reveal the high burden of tuberculosis in Europeans over the last 2,000 years, *Am. J. Hum. Genet.*, **108**, 517-524, doi: 10.1016/j.ajhg.2021.02.009.
  77. Gogarten, J. F., Dux, A., Schuenemann, V. J., Nowak, K., Boesch, C., et al. (2016) Tools for opening new chapters in the book of *Treponema pallidum* evolutionary history, *Clin. Microbiol. Infect.*, **22**, 916-921, doi: 10.1016/j.cmi.2016.07.027.
  78. Hackett, C. J. (1963) On the origin of the human treponematoses (pinta, yaws, endemic syphilis and venereal syphilis), *Bull. World Health Organ.*, **29**, 7-41.
  79. Rothschild, B. M. (2005) History of syphilis, *Clin. Infect. Dis.*, **40**, 1454-1463, doi: 10.1086/429626.
  80. Majander, K., Pfrengle, S., Kocher, A., Neukamm, J., du Plessis, L., et al. (2020) Ancient bacterial genomes reveal a high diversity of *Treponema pallidum* strains in early modern Europe, *Curr. Biol.*, **30**, 3788-3803, doi: 10.1016/j.cub.2020.07.058.
  81. Kolman, C. J., Centurion-Lara, A., Lukehart, S. A., Owsley, D. W., and Tuross, N. (1999) Identification of *Treponema pallidum* subspecies pallidum in a 200-year-old skeletal specimen, *J. Infect. Dis.*, **180**, 2060-2063, doi: 10.1086/315151.
  82. Von Hunnius, T. E., Yang, D., Eng, B., Wayne, J. S., and Saunders, S. R. (2007) Digging deeper into the limits of ancient DNA research on syphilis, *J. Archaeol. Sci.*, **34**, 2091-2100, doi: 10.1016/j.jas.2007.02.007.
  83. Bouwman, A. S., and Brown, T. A. (2005) The limits of biomolecular palaeopathology: ancient DNA cannot be used to study venereal syphilis, *J. Archaeol. Sci.*, **32**, 703-713, doi: 10.1016/j.jas.2004.11.014.
  84. Arora, N., Schuenemann, V. J., Jäger, G., Peltzer, A., Seitz, A., et al. (2016) Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster, *Nat. Microbiol.*, **2**, 16245, doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.245.
  85. Schuenemann, V. J., Lankapalli, A. K., Barquera, R., Nelson, E. A., Iraíz Hernández, D., et al. (2018) Historic *Treponema pallidum* genomes from Colonial Mexico retrieved from archaeological remains, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **12**, e0006447, doi: 10.1371/journal.pntd.0006447.
  86. Guedes, L., Dias, O., Neto, J., Ribeiro da Silva, L. D. P., Mendonça de Souza, S. M. F., et al. (2018) First paleogenetic evidence of probable syphilis and treponematoses cases in the Brazilian Colonial Period, *Biomed Res. Int.*, **8304129**, doi: 10.1155/2018/8304129.
  87. Meffray, A., Perrin, M., Richier, A., Schmitt, A., Ardagna, Y., et al. (2019) Molecular detection of *Treponema pallidum* subspecies pallidum in 150-year-old

- foetal remains, southeastern France, *J. Med. Microbiol.*, **68**, 761-769, doi: 10.1099/jmm.0.000978.
88. Stenseth, N. C., Atshabar, B. B., Begon, M., Belmain, S. R., Bertherat, E., et al. (2008) Plague: Past, present, and future, *PLoS Med.*, **5**, e3, doi: 10.1371/journal.pmed.0050003.
  89. Scott, S., and Duncan, C. J. (2001) *Biology of Plagues: Evidence from Historical Populations*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
  90. Frith, J. (2012) The history of plague – Part 1. The three great pandemics, *J. Mil. Veterans' Health*, **20**, 11-16.
  91. Barbieri, R., Signoli, M., Chev e, D., Costedoat, C., Tzortzis, S., et al. (2020) *Yersinia pestis*: the natural history of Plague, *Clin. Microbiol. Rev.*, **34**, e00044-19, doi: 10.1128/CMR.00044-19.
  92. Кузнецова И. Л., Андреева Т. В., Малярчук А. Б., Куннижева С. С., Тяжелова Т. В., и др. (2021) Геномика древних патогенов на примере чумной палочки (*Yersinia pestis*) в историческом контексте, *Российская археология* (в печати).
  93. Kocher, A., Parac, L., Barquera, R., Key, F. M., Spyrou, M. A., et al. (2021) Ten millennia of hepatitis B virus evolution, *Science*, **374**, 182-188, doi: 10.1126/science.abi5658.
  94. M uhlemann, B., Jones, T.C., Damgaard, P. B., Allentoft, M. E., Shevna, I., et al. (2018) Ancient hepatitis B viruses from the Bronze Age to the Medieval period, *Nature*, **557**, 418-423, doi: 10.1038/s41586-018-0097-z.
  95. Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Je ek, Z., and Ladnyi, I. D. (1988) *Smallpox and Its Eradication*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
  96. Hopkins, D. R. (2002) *The Greatest Killer: Smallpox in History*, University of Chicago Press, Chicago, IL.
  97. Massung, R. F., Liu, L. I., Qi, J., Knight, J. C., Yuran, T. E., et al. (1994) Analysis of the complete genome of smallpox *Variola major* virus strain Bangladesh-1975, *Virology*, **201**, 215-240, doi: 10.1006/viro.1994.1288.
  98. Massung, R. F., Loparev, V. N., Knight, J. C., Totmenin, A. V., Chizhikov, V. E., et al. (1996) Terminal region sequence variations in variola virus DNA, *Virology*, **221**, 291-300, doi: 10.1006/viro.1996.0378.
  99. Shchelkunov, S. N., Massung, R. F., and Esposito, J. J. (1995) Comparison of the genome DNA sequences of Bangladesh-1975 and India-1967 variola viruses, *Virus Res.*, **36**, 107-118, doi: 10.1016/0168-1702(94)00113-q.
  100. Shchelkunov, S. N., Totmenin, A. V., Loparev, V. N., Safronov, P. F., Gutorov, V. V., et al. (2000) Alastrim smallpox *Variola minor* virus genome DNA sequences, *Virology*, **266**, 361-386, doi: 10.1006/viro.1999.0086.
  101. Esposito, J. J., Sammons, S. A., Frace, A. M., Osborne, J. D., Olsen-Rasmussen, M., et al. (2006) Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus, *Science*, **313**, 807-812, doi: 10.1126/science.1125134.
  102. Duch ene, S., Holmes, E. C., and Ho, S. Y. (2014) Analyses of evolutionary dynamics in viruses are hindered by a time-dependent bias in rate estimates, *Proc. Biol. Sci.*, **281**, 20140732, doi: 10.1098/rspb.2014.0732.
  103. Senkevich, T. G., Yutin, N., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., and Moss, B. (2021) Ancient gene capture and recent gene loss shape the evolution of orthopoxvirus–host interaction genes, *mBio*, **12**, e0149521, doi: 10.1128/mBio.01495-21.
  104. Shchelkunov, S. N., Safronov, P. F., Totmenin, A. V., Petrov, N. A., Ryazankina, O. I., et al. (1998) The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins, *Virology*, **243**, 432-460, doi: 10.1006/viro.1998.9039.
  105. M uhlemann, B., Vinner, L., Margaryan, A., Wilhelmson, H., de la Fuente Castro, C., et al. (2020) Diverse variola virus (smallpox) strains were widespread in northern Europe in the Viking Age, *Science*, **369**, eaaw8977, doi: 10.1126/science.aaw8977.
  106. Shchelkunov, S. N. (2012) Orthopoxvirus genes that mediate disease virulence and host tropism, *Adv. Virol.*, **2012**, 524743, doi: 10.1155/2012/524743.
  107. Pajer, P., Dresler, J., Kabickova, H., P isa, L., Aganov, P., et al. (2017) Characterization of two historic smallpox specimens from a Czech Museum, *Viruses*, **9**, 200, doi: 10.3390/v9080200.
  108. Duggan, A. T., Perdomo, M. F., Piombino-Mascoli, D., Marciniak, S., Poinar, D., et al. (2016) 17th century *Variola virus* reveals the recent history of smallpox, *Curr. Biol.*, **26**, 3407-3412, doi: 10.1016/j.cub.2016.10.061.
  109. Biagini, P., Th eves, C., Balaesque, P., G eraut, A., Cannet, C., et al. (2012) *Variola virus* in a 300-year-old Siberian mummy, *N. Engl. J. Med.*, **367**, 2057-2059, doi: 10.1056/NEJMc1208124.
  110. Ferrari, G., Neukamm, J., Baalsrud, H. T., Breidenstein, A. M., Ravinet, M., et al. (2020) *Variola virus* genome sequenced from an eighteenth-century museum specimen supports the recent origin of smallpox, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **375**, doi: 10.1098/rstb.2019.0572.
  111. Hopkins, D. R. (1983) *Princes and Peasants: Smallpox in History*, Univ. of Chicago Press, Chicago and London.
  112. Kochneva, G., Kolosova, I., Maksyutova, T., Ryabchikova, E., and Shchelkunov, S. (2005) Effects of deletions of kelch-like genes on cowpox virus biological properties, *Arch. Virol.*, **150**, 1857-1870, doi: 10.1007/s00705-005-0530-0.
  113. Hendrickson, R. C., Wang, C., Hatcher, E. L., and Lefkowitz, E. J. (2010) Orthopoxvirus genome evolution: the role of gene loss, *Viruses*, **2**, 1933-1967, doi: 10.3390/v2091933.
  114. Jenner, E. (1798) *An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae: A Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of Cow Pox*, London: Printed for the author by Samson Low, No. 7, Berwick Street, Soho.
  115. Tulman, E. R., Delhon, G., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., et al. (2006) Genome of horsepox virus, *J. Virol.*, **80**, 9244-9258, doi: 10.1128/JVI.00945-06.
  116. Duggan, A. T., Klunk, J., Porter, A. F., Dhody, A. N., Hicks, R., et al. (2020) The origins and genomic diversity of American Civil War Era smallpox vaccine strains, *Genome Biol.*, **21**, 175, doi: /10.1186/s13059-020-02079-z.
  117. Schrick, L., Tausch, S. H., Dabrowski, P. W., Damaso, C. R., Esparza, J., et al. (2017) An early American smallpox vaccine based on horsepox, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 1491-1492, doi: 10.1056/NEJMc1707600.
  118. Qin, L., Favis, N., Famulski, J., and Evans, D. H. (2015) Evolution of and evolutionary relationships between extant vaccinia virus strains, *J. Virol.*, **89**, 1809-1824, doi: 10.1128/JVI.02797-14.
  119. Mathieson, I., Lazaridis, I., Rohland, N., Mallick, S., Patterson, N., et al. (2015) Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians, *Nature*, **528**, 499-503, doi: 10.1038/nature16152.
  120. Lindo, J., Huerta-S anchez, E., Nakagome, S., Rasmussen, M., Petzelt, B., et al. (2016) A time transect of exomes from a Native American population before and after European contact, *Nat. Commun.*, **7**, 13175, doi: 10.1038/ncomms13175.
  121. Li, W., O'Neill, K. R., Haft, D. H., DiCuccio, M., Chetvernin, V., et al. (2021) RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with pro-

- tein family model curation, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D1020–D1028, doi: 10.1093/nar/gkaa1105.
122. Pierce, N. T., Irber, L., Reiter, T., Brooks, P., and Brown, C. T. (2019) Large-scale sequence comparisons with sourmash, *F1000Res.*, **8**, 1006, doi: 10.12688/f1000research.19675.1.
  123. Wood, D. E., Lu, J., and Langmead, B. (2019) Improved metagenomic analysis with Kraken 2, *Genome Biol.*, **20**, 257, doi: 10.1186/s13059-019-1891-0.
  124. Cárdenas, Y. O. A., Neuenschwander, S., and Malaspina, A.-S. (2021) Benchmarking metagenomics classifiers on ancient viral DNA: a simulation study, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.04.30.442132.
  125. Wibowo, M. C., Yang, Z., Borry, M., Hübner, A., Huang, K. D., et al. (2021) Reconstruction of ancient microbial genomes from the human gut, *Nature*, **594**, 234–239, doi: 10.1038/s41586-021-03532-0.
  126. Borry, M., Hübner, A., Rohrlach, A. B., and Warinner, C. (2021) PyDamage: automated ancient damage identification and estimation for contigs in ancient DNA *de novo* assembly, *PeerJ*, **9**, e11845, doi: 10.7717/peerj.11845.
  127. Fellows Yates, J. A., Andrades Valtueña, A., Vågene, Å. J., Cribdon, B., Velsko, I. M., et al. (2021) Community-curated and standardised metadata of published ancient metagenomic samples with AncientMetagenomeDir, *Sci. Data*, **8**, 31, doi: 10.1038/s41597-021-00816-y.
  128. Vernot, B., Zavala, E. I., Gómez-Olivencia, A., Jacobs, Z., Slon, V., et al. (2021) Unearthing Neanderthal population history using nuclear and mitochondrial DNA from cave sediments, *Science*, **372**, eabf1667, doi: 10.1126/science.abf1667.
  129. Zavala, E. I., Jacobs, Z., Vernot, B., Shunkov, M. V., Kozlikin, M. B., et al. (2021) Pleistocene sediment DNA reveals hominin and faunal turnovers at Denisova Cave, *Nature*, **595**, 399–403, doi: 10.1038/s41586-021-03675-0.
  130. Ng, T. F., Chen, L. F., Zhou, Y., Shapiro, B., Stiller, M., et al. (2014) Preservation of viral genomes in 700-y-old caribou feces from a subarctic ice patch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 16842–16847, doi: 10.1073/pnas.1410429111.
  131. Smith, O., Dunshea, G., Sinding, M. S., Fedorov, S., Germonpre, M., et al. (2019) Ancient RNA from Late Pleistocene permafrost and historical canids shows tissue-specific transcriptome survival, *PLoS Biol.*, **17**, e3000166, doi: 10.1371/journal.pbio.3000166.
  132. Dux, A., Lequime, S., Patrono, L. V., Vrancken, B., Boral, S., et al. (2020) Measles virus and rinderpest virus divergence dated to the sixth century BCE, *Science*, **368**:1367–1370, doi: 10.1126/science.aba9411.
  133. Gryseels, S., Watts, T. D., Kabongo Mpolesha, J. M., Larsen, B. B., Lemey, P., et al. (2020) A near full-length HIV-1 genome from 1966 recovered from formalin-fixed paraffin-embedded tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 12222–12229, doi: 10.1073/pnas.1913682117.

## GENOMICS OF ANCIENT PATHOGENS: FIRST ADVANCES AND PROSPECTS

### Review

**A. B. Malyarchuk<sup>1\*</sup>, T. V. Andreeva<sup>1,2</sup>, I. L. Kuznetsova<sup>2,3</sup>, S. S. Kunizheva<sup>2,3</sup>,  
M. S. Protasova<sup>2</sup>, L. I. Uralsky<sup>2,3</sup>, T. V. Tyazhelova<sup>2</sup>, F. E. Gusev<sup>2</sup>,  
A. D. Manakhov<sup>2,3</sup>, and E. I. Rogaev<sup>2,3,4\*</sup>**

<sup>1</sup> Center for Genetics and Genetic Technologies, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: a\_malyarchuk98@mail.ru

<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; e-mail: rogaev@vigg.ru

<sup>3</sup> Center for Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia

<sup>4</sup> Department of Psychiatry, UMass Chan Medical School, Shrewsbury, MA 01545, USA

The development of paleogenomic studies is one of the actual and perspective areas of interdisciplinary research in today's world science. New genomic methods of ancient DNA (aDNA) analysis, such as high-throughput sequencing (NGS) technologies, allow not only to obtain detailed genetic information about historical and prehistoric human populations, but also to study individual microbial and viral pathogens and microbiomes from different ancient and historical sites. Studies of aDNA of pathogens by reconstructing their genomes have so far yielded the complete sequences of ancient pathogens that have played a significant role in the history of the world: *Yersinia pestis* (plague), *Variola virus* (smallpox), *Vibrio cholerae* (cholera), HBV (hepatitis B virus), as well as the equally important endemic human infectious agents – *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Mycobacterium leprae* (leprosy) and *Treponema pallidum* (syphilis). Genomic data from these pathogens complemented information previously obtained by paleopathologists and allowed not only to identify pathogens from past pandemics, but also to recognize pathogen lineages that are now extinct, to refine the chronology of pathogen appearance in human populations, and to reconstruct the evolutionary history of pathogens that are still relevant to public health today. In this review, we describe the state-of-the-art of genomic research of the origins and evolution of many ancient pathogens and viruses and examine the mechanisms of the emergence and spread of ancient infections in the history of mankind.

**Keywords:** human populations, ancient DNA, paleopathology, paleogenomics, pathogen, plague, cholera, leprosy, syphilis, smallpox, tuberculosis