

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *Yersinia pestis* КАВКАЗСКОГО ПОДВИДА ИЗ ОЧАГОВ КАВКАЗА И ЗАКАВКАЗЬЯ ПО ДАННЫМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2019 г. К. А. Никифоров^{1, *, **}, Ж. В. Альхова¹, Л. М. Куклева¹, Е. А. Нарышкина¹,
Е. Г. Оглодин¹, Г. А. Ерошенко¹, В. В. Кутырев¹

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”, Саратов, 410005 Россия

*e-mail: rusrap1@microbe.ru

**e-mail: nikiforov666666@mail.ru

Поступила в редакцию 24.04.2018 г.

После доработки 05.07.2018 г.

Принята к публикации 22.08.2018 г.

Нами исследована популяционная структура штаммов *Yersinia pestis* кавказского подвида из природных очагов чумы, расположенных на Кавказе и в Закавказье. По данным полногеномного SNP анализа двадцати восьми штаммов кавказского подвида, семь из которых секвенированы нами, и с учетом 1625 выявленных коровых SNPs определено наличие нескольких филогенетических линий и популяций *Yersinia pestis* ssp. *caucasica*, соответствующих географическому распространению штаммов. Штаммы *Y. pestis* кавказского подвида включают три отдельных кластера, первый из которых представлен штаммами из Восточно-Кавказского высокогорного очага чумы. В их геноме выявлено 80 уникальных SNPs, что свидетельствует об их наибольшей древности и о давней дивергенции этой ветви от общего ствола эволюции кавказских штаммов. Геномы штаммов двух других кластеров также отличаются большим количеством индивидуальных SNPs — 32 и 36 соответственно. Один из них включает штаммы из Присеванского горного, Зангезуро-Карабахского горного и Приараксинского низкогорного очагов с выделением в пределах кластера трех отдельных субкластеров: присеванского (IIa), зангезуро-карабахского (IIb) и зангезуро-карабахско-приараксинского (IIc). Еще один, третий кластер кавказского подвида состоит из штаммов северо-западной части Кавказского нагорья (Гюмрийский и Джавахетско-Ахалкалакский очаги). С помощью ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов и полногеномного секвенирования доказана принадлежность двух клинических штаммов *Y. pestis* к кавказскому подвиду, что подтверждает способность этого подвида вызывать чуму у людей.

Ключевые слова: возбудитель чумы, кавказский подвид, полногеномное секвенирование, филогения, природные очаги.

DOI: 10.1134/S0016675819040076

Бактерия *Yersinia pestis* — возбудитель особо опасной природно-очаговой инфекции, очаги которой встречаются на многих континентах. В Российской Федерации и других странах СНГ расположено 45 природных очагов, которые часто напоминают о себе проявлением эпизоотической и эпидемической активности. Так, в 2013 г. в Республике Кыргызстан произошел случай заражения чумой человека с летальным исходом [1]. В 2014 и 2016 гг. в Горно-Алтайском высокогорном очаге в Республике Алтай зарегистрированы случаи заражения чумой человека [2]. Заболевания чумой отмечают и в сопредельных с Россией государствах — Монголии, Китае. Помимо важного практического значения изучение возбудителя чумы представляет и значительный фундаментальный интерес, поскольку *Y. pestis* является

примером быстрой эволюции высоковирулентной бактерии, которая произошла от почвенной бактерии *Y. pseudotuberculosis* в основном благодаря приобретению двух плазмид патогенности (pFra и pPst) и потери части хромосомных генов [3, 4]. По широко распространенной среди исследователей чумы в России и других странах СНГ подвидовой классификации штаммы *Y. pestis* делят на пять подвидов — основной и четыре неосновных, включающих кавказский, алтайский, гиссарский и улегейский. Штаммы основного подвида высоковирулентны и эпидемически значимы, штаммы неосновных подвидов избирательно вирулентны, в основном для мелких мышевидных грызунов. Неосновные подвиды дивергировали от общего ствола эволюции *Y. pestis*, обозначаемого как “0”, на ранних этапах (до отхождения ветвей “1”,

“2”, “3” и “4” основного подвида) и поэтому их по филогенетической номенклатуре обозначают как 0.РЕ [5]. Недавно на основе полученных данных по полногеномному секвенированию штаммов *Y. pestis* из очагов России и стран СНГ нами было предложено усовершенствование подвидовой классификации возбудителя чумы, отражающее современную популяционную структуру вида. В составе вида *Y. pestis* выделено семь подвидов: основной, кавказский, тибетский, ангольский, центрально-азиатский, цинхайский, улегейский [6].

Для некоторых неосновных подвидов зарегистрированы случаи заражения чумой человека [7]. В том числе известны случаи чумы, вызванные кавказским подвидом *Y. pestis* ssp. *caucasica*, соответствующим по современной филогенетической номенклатуре ветви 0.РЕ2 [8, 9]. Кавказский подвид — одна из наиболее древних ветвей эволюции *Y. pestis*, по ряду признаков близкая предшественнику, *Y. pseudotuberculosis* [5–7]. Штаммы кавказского подвида сохранили способность к ферментации диагностически значимых субстратов — рамнозы, мелибиозы, арабинозы, глицерина, а также к редукции нитратов. Отличительным генетическим признаком кавказских штаммов является отсутствие плазмиды пестициногенности pPst (синонимы pPla, pPCP1), кодирующей видовой бактериоцин — пестицин и фактор патогенности — активатор плазминогена. В то же время в их геноме присутствуют две другие резидентные для *Y. pestis* плазмиды — кальцийзависимости (pCad) и синтеза фракции I (pFra).

Штаммы кавказского подвида встречаются только в очагах Кавказа и Закавказья, расположенных на территории России, Армении, Азербайджана и Грузии, и не встречаются в других регионах мира. Они циркулируют в Восточно-Кавказском высокогорном (39), Ленинканском горном (04), Присеванском горном (05), Зангезуро-Карабахском горном (06), Приараксинском низкогорном (07) очагах чумы (рис. 1). Сообщалось о случае выделения штамма кавказского подвида в Терско-Сунженском низкогорном очаге [10]. Ранее проведенный молекулярно-генетический анализ штаммов *Y. pestis* кавказского подвида с помощью методов MLVA25-, CRISPR- и SNP-типирования выявил наличие трех независимых филогенетических групп этих штаммов, соответствующих природным очагам чумы — 39, 04 и группе очагов 05–07. Однако только метод SNP-типирования позволил выделить из группы штаммов, выделенных в очагах 05–07, отдельную ветвь изолятов из очага 05. Отдельную и наиболее древнюю филогенетическую группу составили штаммы из Восточно-Кавказского высокогорного очага в России, для которых была выявлена большая генетическая гетерогенность [11, 12].

Штаммы кавказского подвида распространены в различных природных биоценозах низкогорного, горного и высокогорного типов. Носителями кавказских штаммов являются полевки — *Microtus arvalis*, *Microtus socialis*, *Microtus majori*, *Chionomys gud* и их блохи *Xenopsylla conformis*, *Nosopsyllus iranensis*, *Stenoponia tripectinata* [10]. В Приараксинском низкогорном одновременно циркулируют штаммы кавказского и основного подвидов. Поскольку штаммы этих двух подвидов отличаются по вирулентности и эпидемической значимости, нами был разработан способ их дифференциации с применением современных молекулярно-генетических методов [13].

Цель нашей работы заключалась в изучении современной популяционной структуры кавказского подвида возбудителя чумы и определении географических регионов распространения штаммов отдельных филогенетических линий и популяций в очагах Кавказа и Закавказья с учетом данных проведенного нами полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis* ssp. *caucasica*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы Y. pestis, культивирование, выделение ДНК. Штаммы *Y. pestis*, использованные в этой работе, получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ “Микроб”. Штаммы выращивали на LB-агаре и в LB-бульоне (рН 7.2) при 28°C в течение 24–48 ч. Анализ культурально-морфологических и дифференциально-диагностических признаков проводили в соответствии со стандартными методами лабораторной диагностики чумы [14]. ДНК штаммов выделяли с помощью набора PureLink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen производства Thermo Fisher Scientific.

Проведение ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Дифференциацию штаммов *Y. pestis* основного и кавказского подвида выполняли методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Реакцию проводили в одной ПЦР смеси в амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Условия проведения ПЦР-РВ были следующими: 1 цикл 95°C 10 мин; 40 циклов: 95°C 15 с, 57°C 40 с, 72°C 15 с. На этапе отжига праймеров проводили учет флуоресценции, уровень порога равнялся 0.05, пороговое значение Ct — менее 30.

Полногеномное секвенирование, поиск SNPs, филогенетический анализ, построение дендрограмм. Получение полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* осуществляли с использованием системы Ion PGM (Life technologies, США). Обработку данных и проведение

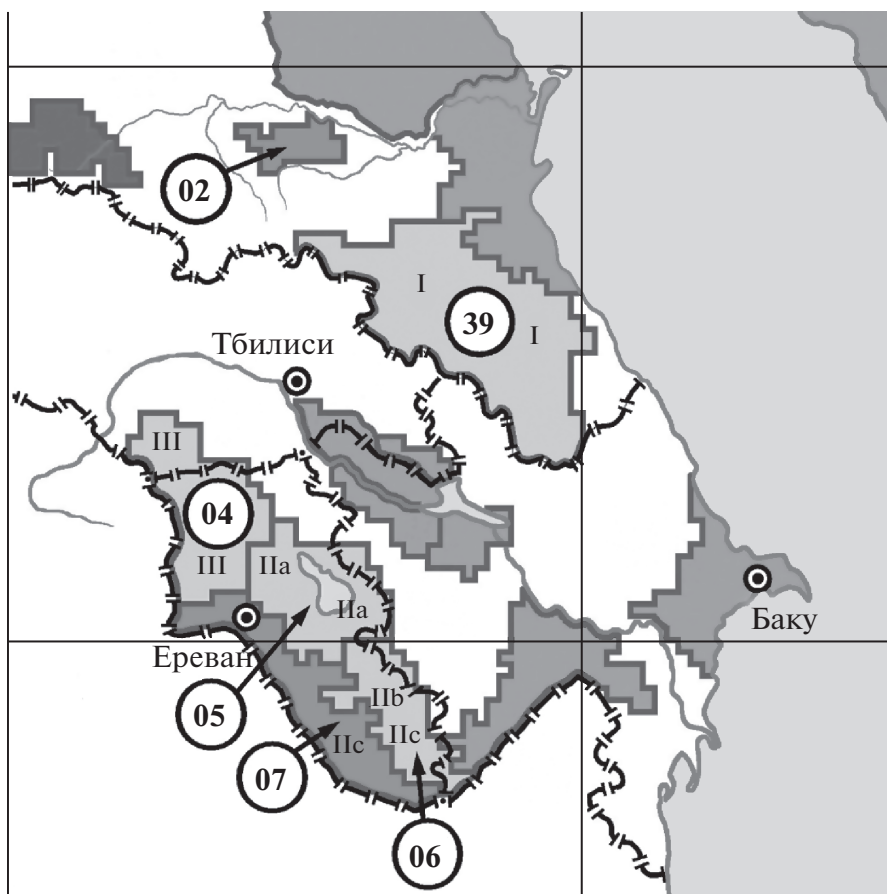


Рис. 1. Распространение штаммов *Yersinia pestis* кавказского подвида в очагах чумы Кавказа и Закавказья: Ленинканский горный (04), Присеванский горный (05), Зангезуро-Карабахский горный (06), Приараксинский низкогорный (07), Восточно-Кавказский высокогорный (39) очаги. В скобках приведены номера очагов по принятой в России и других странах СНГ классификации природных очагов чумы. Римскими цифрами (I, IIa, IIb, IIc, III) указано распространение штаммов кавказского подвида различных филогенетических линий в очагах.

сборки геномов *de novo* выполняли с помощью программы Ion Torrent Suit software package 3.4.2 и Newbler gsAssembler 2.6. Полученные последовательности ридов собирали в геномы, покрытие которых по геному референсного штамма CO92 (номер доступа в GenBank NC_003143.1) составило около 98.84% с 60-кратным прочтением. Средняя длина собранного генома составила 4.64 Мпн.

Полногеномный SNP-анализ и поиск маркерных SNPs проводили с помощью программы Wombac 2.0. Дендрограмму с применением алгоритма Maximum Likelihood строили, используя программу PhyML 3.1 на основе модели HKY85. Дендрограммы визуализировали, применяя программу FigTree 1.4.3. Бутстреп-анализ проводили, используя 500 случайных выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе нами проведено полногеномное секвенирование семи штаммов *Y. pestis* ssp. *caucasica*

из очагов Кавказа и Закавказья (табл. 1, отмечены звездочкой). Для анализа популяционной структуры кавказского подвида использованы полногеномные последовательности еще 21 штамма кавказского подвида из базы данных NCBI GenBank, а также последовательности девяти штаммов *Y. pestis*, относящихся к другим филогенетическим ветвям возбудителя чумы [15, 16].

Филогенетическое исследование кавказского подвида выполняли методом полногеномного SNP-анализа на основе выявления коровых SNPs в последовательностях взятых в работу штаммов. Всего выявлено 1625 коровых SNPs, с учетом которых на основе алгоритма Maximum Likelihood построена дендрограмма штаммов кавказского подвида (рис. 2).

Как видно из дендрограммы, штаммы *Y. pestis* кавказского подвида разделились на три отдельных кластера. Первый, далеко отстоящий кластер, представлен двумя штаммами из Восточно-Кавказского высокогорного очага чумы. Этот

Таблица 1. Штаммы *Y. pestis*, полногеномные последовательности которых использованы в работе

Штамм <i>Y. pestis</i>	Происхождение (очаг), № доступа в GenBank	Подвид, филогенетическая ветвь
835 В.Р.С.*	Ленинаканский, 1958. LY0J00000000	Кавказский, 0.РЕ2
3544 Арм*	Ленинаканский, 1968. LZNH00000000	Кавказский, 0.РЕ2
3551 Арм*	Присеванский, 1979. MBSJ00000000	Кавказский, 0.РЕ2
М-986*	Зангезуро-Карабахский, 1973. LYMO00000000	Кавказский, 0.РЕ2
KM874*	Зангезуро-Карабахский, 1984. LZTG00000000	Кавказский, 0.РЕ2
С-741*	Восточно-Кавказский, 1998. LPTX00000000	Кавказский, 0.РЕ2
1393Г *	1979. PVMU01	Кавказский, 0.РЕ2
Штаммы из NCBI GenBank		
SCPM-O-B-6536	Ленинаканский, NZ_LIZE00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
SCPM-O-B-7761	Ленинаканский, NZ_LIQ00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
SCPM-O-B-6990	Ленинаканский, NZ_LIYU00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
SCPM-O-B-7832	Присеванский, LIZB00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
SCPM-O-B-6540	Присеванский, LIZF00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
SCPM-O-B-6984	Зангезуро-Карабахский, LIYZ00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
SCPM-O-B-6974	Зангезуро-Карабахский, NZ_LIYX00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
SCPM-O-B-6757	Приараксинский, NZ_LIYY00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
SCPM-O-B-6300	Приараксинский, LIZC00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
SCPM-O-B-6904	Восточно-Кавказский, NZ_LIYP00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
14735	Армения, NZ_AYLS00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
1522	Армения, Ширакская обл., NZ_CP006758.1	Кавказский, 0.РЕ2
3067	Грузия, Ниноцминда, NZ_CP006754.1	Кавказский, 0.РЕ2
1670	Грузия, Ниноцминда, NZ_AYLR00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
8787	Грузия, Ниноцминда, NZ_CP006748.1	Кавказский, 0.РЕ2
3770	Грузия, Ниноцминда, NZ_CP006751.1	Кавказский, 0.РЕ2,
G8786	Грузия, NZ_ADSG00000000.1	Кавказский, 0.РЕ2
1412	Грузия, Ниноцминда, NZ_CP006783.1	Кавказский, 0.РЕ2
1413	Грузия, Ниноцминда, NZ_CP006762.1	Кавказский, 0.РЕ2
Pestoides G	NZ_CP010247.1	Кавказский, 0.РЕ2
Pestoides F	NC_009381.1	Кавказский, 0.РЕ2
Pestoides A	NZ_ACNT00000000.1	Алтайский, 0.РЕ4
SCPM-O-B-6304	Гиссарский, NZ_LIYS00000000.1	Гиссарский, 0.РЕ4
CO92	США, NC_003143.1	Основной, 1.ORI
KIM10	Иран/Курдистан, 1968. NC_004088.1	Основной, 2.MED
MGJZ12	Монголия, NZ_ADSV00000000.1	Основной, 4.ANT
MGJZ6	Монголия, NZ_ADSX00000000.1	Основной, 3.ANT
91001	Китай, Внутренняя Монголия, NC_005810.1	Microtus, 0.РЕ4
A-1815	Таласский высокогорный, LPTY00000000.1	Таласский, 0.РЕ4
620024	Китай, Цинхай, NZ_ADPM00000000.1	Тибетский, 0.РЕ7

* Штаммы секвенированы нами.

кластер (I) дивергировал от общего ствола эволюции кавказского подвида раньше двух других кластеров и, по-видимому, достаточно давно. Об этом свидетельствует наличие 80 уникальных SNPs, не встречающихся у других штаммов *Y. pestis*. Один из двух штаммов из этого кластера был секве-

нирован нами. Он выделен в 1998 г. от блох обыкновенной полевки. Сведения по времени происхождения второго штамма (SCPM-O-B-6904) в базе данных GenBank не приводятся. Однако штаммы отличаются друг от друга и содержат в геноме 8 и 1 индивидуальных SNPs соответственно. Эти

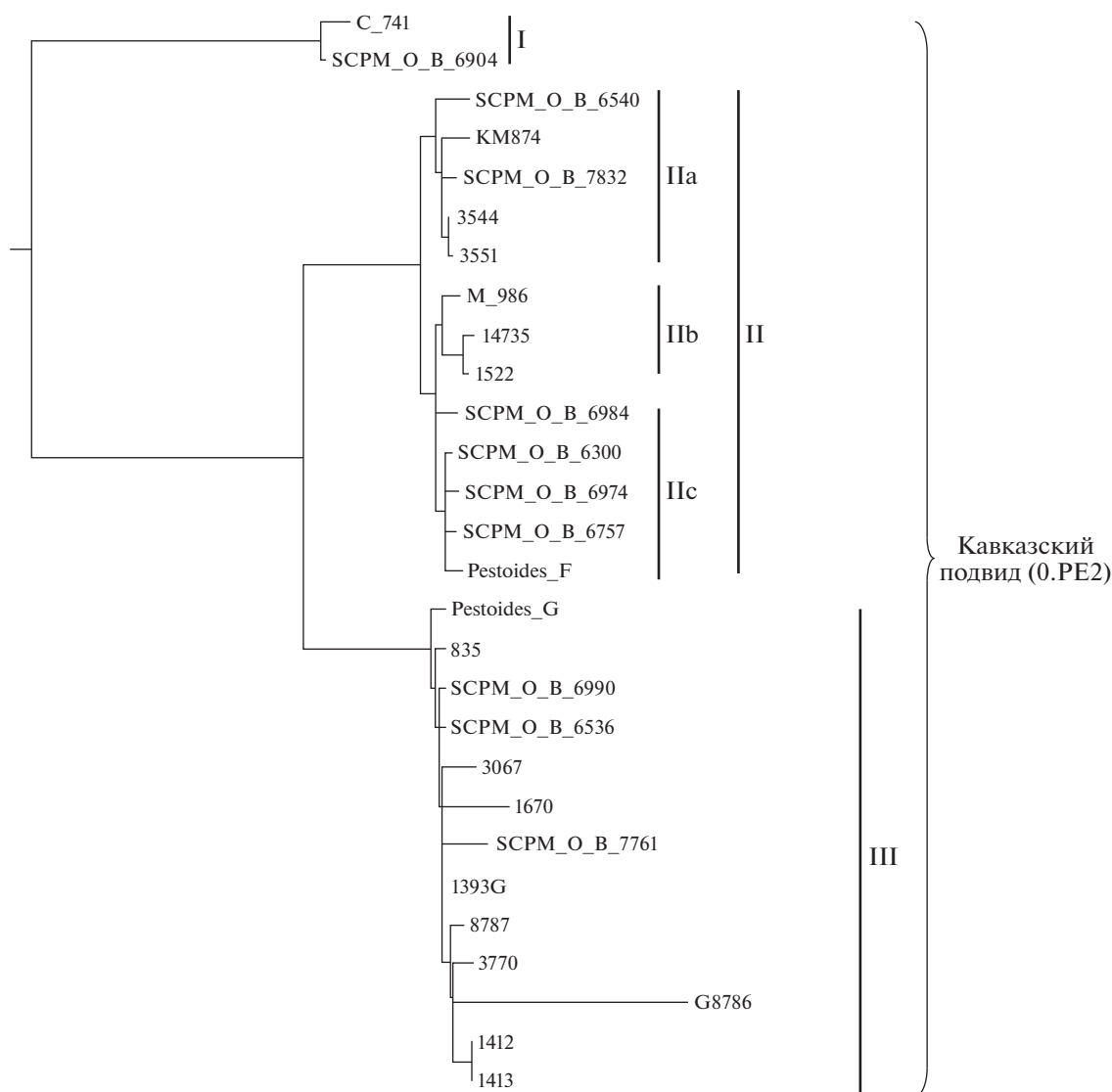


Рис. 2. Филогения *Y. pestis* кавказского подвида из природных очагов Кавказа и Закавказья по данным полногеномного SNP-анализа штаммов разных филогенетических ветвей с учетом 1625 выявленных SNPs (программа PhyML 3.1, алгоритм Maximum Likelihood). На дендрограмме представлен фрагмент филогенетического дерева, включающий только штаммы кавказского подвида.

данные свидетельствуют о гетерогенности популяции штаммов кавказского подвида в Восточно-Кавказском высокогорном очаге, о чем сообщали ранее другие исследователи [11, 12].

Два других кластера (II и III) имеют 74 общих SNPs, но отличаются друг от друга также большим количеством индивидуальных SNPs. Все штаммы II кластера содержат в геноме 32 общих SNPs, однако далее их ветвь четко разделяется на два отдельных субкластера, в которых штаммы группируются по филогеографической принадлежности. В первый подкластер (IIa) входят секвенированные нами штаммы KM874 (Зангезуро-Карабахский горный, 1984), 3544 Арм (Ленинаканский горный, 1968), 3551 Арм (Присеванский горный,

1979), а также два штамма, SCPM-O-B-6540 и SCPM-O-B-7832, из базы GenBank, выделенные в Присеванском горном очаге (рис. 2). Штаммы этого подкластера составляют отдельную линию эволюции кавказского подвида. Принадлежность штаммов из подкластера к трем разным очагам не противоречит их принадлежности к одной линии эволюции, поскольку все три очага являются мезоочагами, входящими в состав Закавказского высокогорного очага, расположенного в горах Малого Кавказа. Закавказский высокогорный очаг занимает зону центральной, северо-западной и юго-восточной частей Закавказского нагорья, территориально расположенных в Армении, Грузии и Азербайджане [10]. Преобладание в

этом подкластере штаммов из Присеванского очага (три из пяти штаммов), а также отсутствие присеванских штаммов в других кластерах свидетельствуют о преимущественном распространении штаммов этой филогенетической линии на территории Присеванского горного очага и в пограничных с ним районах Ленинанканского и Зангезуро-Карабахского очагов. Распространение штаммов подкластера IIa не только на территории Присеванского горного очага, но в пограничных с ним районах других мезоочагов Закавказского высокогорного очага выявлено нами впервые в отличие от данных других исследователей [11].

Второй подкластер в составе II кластера включает еще две линии эволюции кавказских штаммов. В первую линию (IIb) входит секвенированный штамм M-986 из Зангезуро-Карабахского горного очага и еще два штамма (14735 и 1522 из GenBank), выделенные в Армении. Эта линия имеет два уникальных SNPs, в то время как у второй линии (IIc) в геноме присутствуют шесть индивидуальных SNPs (рис. 2). Ко второй линии относятся штаммы из Зангезуро-Карабахского (SCPM-O-B-6984, SCPM-O-B-6974) и Приараксинского очагов (SCPM-O-B-6300, SCPM-O-B-6757), расположенных в Армении и Азербайджане. То, что на территории этих двух очагов циркулируют штаммы, относящиеся к одной филогенетической линии, также не удивительно, поскольку оба очага расположены рядом друг с другом и имеют протяженную общую границу. К этой же линии принадлежит штамм Pestoides F из GenBank, что позволяет предположить происхождение штамма с этой же территории.

Таким образом, в Закавказском высокогорном очаге и прилегающем Приараксинском низкогорном очаге циркулируют штаммы трех отдельных филогенетических линий, которые условно можно обозначить как присеванская (субкластер IIa), зангезуро-карабахская (IIb) и зангезуро-карабахско-приараксинская (IIc), кластеризующихся по филогеографическому принципу. Большое генетическое разнообразие штаммов кавказского подвида в Закавказском высокогорном очаге по сравнению с данными предшествующих исследований и наличие нового субкластера штаммов IIb нам удалось установить благодаря увеличению числа включенных в филогенетический анализ штаммов из этого очага, в том числе и секвенированных нами в рамках этого исследования.

В составе кавказского подвида отдельно расположен третий кластер штаммов (III), который имеет 36 уникальных SNPs. В основании кластера лежат штаммы, выделенные в Ленинанканском горном очаге чумы, включая клинический штамм 835 "В.Р.С.", выделенный в 1958 г., а также штаммы SCPM-O-B-6990 и SCPM-O-B-6536. Как сле-

дует из дендрограммы, последовательная смена генотипов штаммов из Ленинанканского очага привела в дальнейшем к формированию грузинской ветви кавказских штаммов, включающей штаммы 3067, 1670, 8787, 3770, 1393G, G8786, 1412, 1413. В соответствии с последними изменениями в классификации очагов Ленинанканский очаг получил обозначение Гюмрийский (Армения), который составляет одно целое с Джавахетско-Ахалкалакским очагом, расположенным в Грузии [17]. В эту же грузинскую ветвь вошел секвенированный нами штамм *Y. pestis* 1393G, происхождение которого точно не известно. В целом к кластеру III относятся штаммы кавказского подвида из северо-западной части Закавказского нагорья.

Таким образом, популяционная структура кавказского подвида включает несколько отдельных популяций. Безусловно, отдельную популяцию и независимую ветвь эволюции кавказских штаммов составляют штаммы из Восточно-Кавказского высокогорного очага. Эта ветвь рано дивергировала от общего ствола эволюции кавказского подвида. В геномах восточно-кавказских штаммов содержится значительное число уникальных SNPs, отделяющих эту ветвь от других кавказских штаммов.

Другая крупная ветвь эволюции кавказских штаммов (кластер II) включает три отличающиеся популяции, относящиеся к трем филогенетическим линиям. Линия IIa включает преимущественно штаммы из Присеванского горного очага, линия IIb — преимущественно штаммы из Зангезуро-Карабахского очага. Третья линия IIc включает штаммы из двух юго-восточных очагов — Зангезуро-Карабахского горного и Приараксинского низкогорного. Еще одно отдельное направление эволюции (кластер III) представлено штаммами из северо-западной части Кавказского нагорья (Ленинанканский очаг — современные Гюмрийский и Джавахетско-Ахалкалакский очаги).

В целом выявлено значительное генетическое разнообразие штаммов *Y. pestis* ssp. *caucasica*, связанное с древностью этого подвида и разнообразием ландшафтно-географических условий (низкогорные, горные, высокогорные очаги), в которых происходила эволюция штаммов кавказского подвида. Очаги Кавказа и Закавказья являются эндемичной территорией, на которой распространены штаммы кавказского подвида. В других регионах мира штаммы кавказского подвида отсутствуют.

Ранее нами был разработан способ дифференциации штаммов основного и кавказского подвида методом ПЦР-РВ. Были найдены ДНК мишени "45" и "Caucasic (-91)" — участки хромосомы, содержащие у штаммов основного подвида делецию в 45 пн и у штаммов кавказского подвида — делецию в 91 пн соответственно. Этот способ может быть

использован в очагах с одновременной циркуляцией штаммов двух подвидов — *Y. pestis* ssp. *pestis* и *Y. pestis* ssp. *caucasica*. К таким очагам относится Приараксинский низкогорный очаг сопряженно-го типа. Разработанный способ дифференциации кавказского подвида методом ПЦР-РВ может быть использован для проведения эпидемиологического мониторинга в очагах чумы сопряженно-го типа.

Среди исследованных нами штаммов кавказского подвида выявлено два клинических штамма, изолированных от больных с бубонной формой чумы. Это штамм *Y. pestis* 835 “В.Р.С.”, выделенный от больного в Ленинаканском горном очаге в 1958 г., и штамм М-986 от больного из Зангезуро-Карабахского горного очага, 1973 г. С помощью разработанного нами способа дифференциации штаммов основного и кавказского подвида методом ПЦР-РВ с праймерами и зондами на ДНК мишени “45” и “Caucasic (–91)” [13] подтверждена принадлежность этих двух клинических штаммов *Y. pestis* (М-986 и 835 “В.Р.С.”) к кавказскому подвиду. Дальнейший анализ полногеномных последовательностей этих штаммов установил их принадлежность к Зангезуро-Карабахскому и Ленинаканскому кластерам штаммов соответственно.

Нами был осуществлен поиск индивидуальных SNPs, которые могли быть причиной способности этих штаммов вызывать заболевание у людей. Для штамма 835 “В.Р.С.” было найдено три специфических SNPs с координатами (по геному референсного штамма CO92): 4228757 (межгенное пространство *pepQ-fadB*), 4309418 (ген *YPO3840*), 4523124 (ген *uhpA*). Для штамма М-986 выявлены четыре специфических SNPs с координатами: 211007 (ген *slyD*), 288471 (ген *YPO0287*), 445958 (ген *hmsT*), 3739402 (ген *udjJ*). Анализ найденных SNPs показал, что они расположены в генах жизнеобеспечения и в межгенных пространствах и, по-видимому, не оказывают влияния на вирулентность этих клинических штаммов *Y. pestis* кавказского подвида. Скорее всего, развитие инфекционного процесса, вызванное этими штаммами, связано с ослабленным иммунитетом у заболевших людей. Тем не менее полученные результаты подтверждают данные литературы о способности штаммов кавказского подвида вызывать чуму у людей [8, 9].

Таким образом, проведенное нами полногеномное секвенирование семи штаммов *Y. pestis* ssp. *caucasica* с учетом ранее секвенированных геномов из генетической базы данных GenBank позволило выявить наличие новых кластеров штаммов в пределах ранее установленных филогенетических линий [11] штаммов кавказского подвида. Определено географическое распространение штаммов этих филогенетических линий и популяций *Y. pestis* ssp. *caucasica* в природных очагах Кавказа и Закавказья. Впервые проведено полногеномное секвени-

рование двух клинических штаммов кавказского подвида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джанпарова А.К., Абдикаримов С.Т., Ерошенко Г.А. и др. Оценка эффективности молекулярной диагностики *Yersinia pestis* в полевом материале из Сарыджазского очага в Кыргызстане // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. Вып. 4. С. 23–26. <http://dx.doi.org/10.21055/0370-1069-2017-4-23-26>.
2. Попова А.Ю., Кутырев В.В., Балахонов С.В. и др. Координация мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. Вып. 4. С. 5–10. <http://dx.doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-120-127>.
3. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague // Clin. Microbiol. Rev. 1997. V. 10. P. 35–66.
4. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W. et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through wholegenome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 13826–13831. doi 10.1073/pnas.0404012101
5. Achtman M., Morelli G., Zhu P. et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 17837–17842. doi 10.1073/pnas.0408026101
6. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L. et al. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 1106. doi 10.3389/fmicb.2018.01106
7. Cui Y., Yu C., Yan Y. et al. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 577–582. doi 10.1073/pnas.1205750110
8. Ефременко В.И., Грижебовский Г.М., Суворова А.Е. и др. О заболевании чумой людей на Кавказе // Организация эпиднадзора при чуме и меры ее профилактики. Алма-Ата, 1992. С. 18–21.
9. Оваспян О.В., Шехикян М.Т. Случай заболевания бубонной чумой в высокогорном природном очаге Армении // Эпидемиология, микробиология и иммунология бактериальных и вирусных инфекций. Ростов-на-Дону, 1989. С. 193–195.
10. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Федоров Ю.М. и др. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири / Под ред. Онищенко Г.Г., Кутырева В.В. М.: Медицина, 2004. 192 с.
11. Кисличкина А.А., Соломенцев В.И., Благодатских С.А. и др. В полевочьих природных очагах чумы на Кавказе циркулируют три генетически различные линии штаммов *Yersinia pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* (O. PE2) // Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2017. № 35(4). С. 140–144. doi 10.18821/0208-0613-2017-35-4-140-144
12. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Светоч Т.Э. и др. Филогеография полевочьих штаммов *Yersinia pestis* из

- природных очагов Кавказа и Закавказья // Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2012. № 3. С. 18–21.
13. Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М. и др. Подвидовая дифференциация штаммов *Yersinia pestis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. 2017. № 2. С. 22–27.
 14. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. Онищенко Г.Г. и Кутырева В.В. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ЗАО “Шико”, 2013. 560 с.
 15. Kislichkina A.A., Bogun A.G., Kadnikova L.A. et al. Nineteen whole-genome assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus*, including representatives of biovars caucasica, talassica, hissarica, altaica, xilingolensis, and uleigeica // Genome Announc. 2015. № 3(6). pii: e01342-15. doi 10.1128/genomeA.01342-15
 16. Zhgenti E., Johnson S.L., Davenport K.W. et al. Genome assemblies for 11 *Yersinia pestis* strains isolated in the Caucasus region // Genome Announc. 2015. № 3(5). pii: e01030-15. doi 10.1128/genomeA.01030-15
 17. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 г.) / Под ред. Кутырева В.В. и Поповой А.Ю. Саратов: ООО “Амирит”, 2016. 248 с.

Phylogenetic Analysis of *Yersinia pestis* Strains Belonging to Caucasian Subspecies from the Foci of Caucasus and Trans-Caucasus Region according to the Data from Whole-Genome Sequencing

K. A. Nikiforov^{a,*,**}, Zh. V. Al'khova^a, L. M. Kukleva^a, E. A. Naryshkina^a,
E. G. Oglodin^a, G. A. Eroshenko^a, and V. V. Kutyrev^a

^aRussian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, 410005 Russia

*e-mail: rusrapi@microbe.ru

**e-mail: nikiforov666666@mail.ru

We have studied the population structure of *Yersinia pestis* strains ssp. *caucasica*, from natural plague foci situated in Caucasus and Trans-Caucasus regions. According to the data obtained from whole-genome SNP analysis of 28 ssp. *caucasica* strains, 7 out of which were sequenced with our own efforts, and taking into account 1625 identified core SNPs, existence of several genetic lines and populations of *Yersinia pestis* ssp. *caucasica* has been established. These lines and populations coincide with geographical distribution of the strains. *Yersinia pestis* ssp. *caucasica* comprise three separate clusters, the first one of which is represented by strains from East-Caucasian high-mountain plague focus. Their genome contains 80 unique SNPs, which testify to the greatest antiquity and early divergence of this branch from a common stem of Caucasian strains' evolution. The genomes of strains from two other clusters also differ in a great number of individual SNPs, 32 and 36, respectively. One of them includes the strains from Prisevansky mountain, Zangezuro-Karabakhsky mountain, and Preraksinsky low-mountain foci with the allocation of three separate sub-clusters within the cluster: prisevansky (IIa), zangezuro-karabakhsky (IIb) and zangezuro-karabakhsko-preraksinsky (IIc). The last and the third cluster of the caucasian subspecies comprises strains from north-western part of Caucasian Plateau (Gyumriisky and Dzhavakhetsko-Akhalkalaksy foci). Using PCR with hybridization-fluorescent registration of results and whole genome sequencing, appurtenance of two clinical *Y. pestis* strains to ssp. *caucasica* has been proved, which confirms the ability of this subspecies to cause plague in humans.

Keywords: *Yersinia pestis*, main subspecies, non-main subspecies, *caucasica* subspecies, plague foci, phylogenetic branch.