

ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *Yersinia pestis*
УЛЕГЕЙСКОГО ПОДВИДА

© 2020 г. К. А. Никифоров¹, *, **, Л. М. Куклева¹, Ж. В. Альхова¹, Е. А. Нарышкина¹,
Н. П. Гусева¹, Г. А. Ерошенко¹, Е. Г. Токмакова², С. В. Балахонов², В. В. Кутырев¹

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

²Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, 664047 Россия

*e-mail: Nikiforov666666@mail.ru

**e-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила в редакцию 02.07.2019 г.

После доработки 12.08.2019 г.

Принята к публикации 03.10.2019 г.

Исследована популяционная структура штаммов *Y. pestis* улегейского подвида (генетическая ветвь 0.PE5), эндемичного для природных очагов чумы Монголии и обладающего низким эпидемическим потенциалом в сравнении со штаммами основного подвида чумы. Согласно данным полногеномного SNP анализа 12 штаммов *Y. pestis* улегейского подвида, выделенных на территории Монголии, с учетом 1581 выявленных коровых SNPs установлено наличие двух основных генетических кластеров, соответствующих географическому распространению штаммов. Первый кластер, названный 0.PE5/1, включает штаммы из аймаков Умнеговь, Уверхангай и Говь-Алтай, расположенных на юге Монголии. Второй кластер 0.PE5/2 состоит из двух субкластеров: 0.PE5/2-1, включающий штаммы из аймаков Баян-Улгий и Ховд, и 0.PE5/2-2, представленный только штаммами из аймака Баян-Улгий. Для выяснения возможных причин избирательной вирулентности штаммов улегейского подвида проведен анализ нуклеотидных последовательностей 79 основных генов факторов патогенности, а также других участков генома. Найдены специфические мутации в генах: *irp1*, входящем в состав острова высокой патогенности хромосомной области пигментации, и *uscQ*, участвующем в регуляции синтеза белка LcrV и белков внешней мембраны (Yops), ассоциируемых с вирулентностью возбудителя чумы.

Ключевые слова: возбудитель чумы, популяционная структура, филогения, улегейский подвид, Монголия.

DOI: 10.31857/S0016675820060077

Чума – зооантропонозная особо опасная инфекция, природные очаги которой расположены в различных ландшафтно-географических зонах степей, полупустынь, пустынь и гор. На территории Российской Федерации (РФ), стран СНГ и ближнего зарубежья находятся 45 природных очагов чумы [1].

Штаммы возбудителя чумы отличаются по вирулентности, внутривидовой принадлежности и географическому распространению. Штаммы основного подвида являются высоковирулентными и обладают высоким эпидемическим потенциалом; штаммы неосновных подвида имеют низкий эпидемический потенциал и избирательную вирулентность, вызывая эпизоотии среди мышевидных грызунов и зайцеобразных. Ранее нами предложена усовершенствованная внутривидовая классификация возбудителя чумы с выделением семи подвида: основной, *ssp. pestis*; тибет-

ский, *ssp. tibetica* (Китай); кавказский, *ssp. caucasica* (РФ, Кавказ); ангольский, *ssp. angolica* (Ангола); центральноазиатский, *ssp. central asiatica* (Россия, Китай, Кыргызстан, Таджикистан); цинхайский, *ssp. qinghaica* (Китай); улегейский, *ssp. ulegeica* (Монголия) [2, 3]. Известны случаи заболевания чумой человека, вызванные штаммами кавказского, тибетского и цинхайского подвида [4].

Во многих пограничных с Россией государствах часто регистрируют случаи заболевания чумой человека, что в условиях активных экономических, культурных и туристических связей может привести к завозу чумы в РФ [5]. Протяженность границы трансграничных очагов чумы России и Монголии составляет 585 км. Энзоотические по чуме территории в Монголии выявлены в 137 сомонах 17 аймаков и занимают около 30% площади страны, что составляет 443 тыс. кв. км [6, 7]. В разные годы в литературе сообщалось о выделении в

Монголии от 6 до 12 природных очагов чумы различного типа и степени автономности [8–10].

В настоящее время в Монголии выделяют 12 очагов чумы, два из которых (Сайлюгемский и Хойт-Хэрленский (Северо-Керуленский)) являются трансграничными с РФ, семь (Хархира-Тургенский, Хан-Хухэйский, Сонгино-Тудэвский, Булнайский (Тэлмэн-Соготынский), Тэсийн-Шарагольский, Хурхинский, Зун-Хэнтэйский) занимают приграничные территории [7]. Во многих из них протекают активные эпизоотические процессы [11]. В мае 2019 г. в Монголии зарегистрированы два случая заражения чумой человека с летальным исходом, которые произошли в аймаке Баян-Улгий, расположенном на границе с РФ (<http://www.promedmail.org/index.php>).

Ранее нами и зарубежными авторами проведено исследование штаммов *Y. pestis* из очагов Монголии по их фенотипическим свойствам с установлением внутривидовой принадлежности, а также отнесением их к основным филогенетическим ветвям [12–14]. В результате этих исследований на территории Монголии отмечена циркуляция штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара линий 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT, а также штаммов неосновных подвигов: улегейского (0.PE5) и центральноазиатского (0.PE4).

Штаммы улегейского подвида эндемичны для Монголии. Улегейский подвид наиболее эволюционно молодой среди неосновных подвигов. Однако в отличие от основного подвида штаммы улегейского подвида, как правило, не являются вирулентными для людей, вызывая лишь эпизоотии среди мышевидных грызунов и мелких зайцеобразных. Они не обладают высоким эпидемическим потенциалом.

Вирулентность *Y. pestis* — это полидетерминантный признак, зависящий от наличия факторов патогенности, кодируемых генами хромосомной и плазмидной локализации [15, 16]. В геноме *Y. pestis* находится хромосомная область пигментации, содержащая остров высокой патогенности НР1 с генами сидерофор-зависимой системы потребления железа. При потере острова высокой патогенности НР1 штаммы чумы становятся авирулентными [17].

Гены, кодирующие факторы патогенности возбудителя чумы, расположены на трех резидентных плаزمидах: родоспецифической рCad и двух видоспецифических рFra и рPst [18, 19].

Плаزمид рCad несет в своем составе гены, кодирующие систему секреции третьего типа (СС3Т). СС3Т вместе с островом высокой патогенности НР1 является обязательным фактором вирулентности *Y. pestis* [20, 21]. Одним из основных компонентов СС3Т является эффекторный белок LcrV, кодируемый геном *lcrV*, принимающий участие в

секреции эффекторных белков *Y. pestis* в клетки млекопитающих.

По данным литературы детальный молекулярно-генетический и филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* улегейского подвида не проводился. Также неизвестны причины отсутствия случаев чумы у людей, вызванных штаммами улегейского подвида.

Цель настоящей работы — молекулярно-генетический и филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* улегейского подвида, а также поиск возможных генетических мутаций, вызвавших отсутствие способности этих штаммов вызывать заболевание у людей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы, изучение культурально-морфологических и биохимических свойств, выделение ДНК

Все штаммы, использованные в настоящей работе, получены из государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ “Микроб”. Культивирование штаммов осуществляли в соответствии с общепринятыми методами [22].

Выделение ДНК выполняли с использованием наборов “PureLink Genomic DNA Mini Kit” (Invitrogen, США).

Полногеномное секвенирование, поиск SNPs, филогенетический анализ, построение дендрограмм

Полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* проводили в системе Ion PGM (Life technologies, США). Обработку данных секвенирования и сборку генома *de novo* осуществляли с использованием программ Ion Torrent Suite software 4.2 и Newbler gsAssembler 2.6. Последовательности ридов собирали в геномы, покрытие которых по геному референсного штамма CO92 (NCBI GenBank ID NC_003143.1) составляло не менее 94% с 48-кратным прочтением. Штаммы *Y. pestis* И-2422, И-3068, И-3193, И-3196, И-3269 депонированы в базу данных NCBI GenBank (табл. 1).

Филогенетический анализ и построение дендрограммы проводили на основании выявленных коровых SNPs (единичных нуклеотидных полиморфизмов) в полногеномных последовательностях исследуемых штаммов. Поиск маркерных SNPs осуществляли с использованием программы Wombac 2.0 на базе операционной системы BioLinux 8.0. Построение филогенетического дерева с применением алгоритма Maximum Likelihood выполняли в программе PhyML 3.1. Визуализацию полученных результатов проводили с помощью программы FigTree 1.4.3.

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

Штамм <i>Y. pestis</i>	Филогенетическая ветвь [2]	Номер доступа нуклеотидной последовательности в NCBI GenBank
620024	0.PE7	NZ_ADPM00000000.1
Pestoides F	0.PE2	NC_009381.1
Pestoides A	0.PE4a	NZ_ACNT00000000.1
91001	0.PE4m	NC_005810.1
KIM10	2.MED1	NC_004088.1
Nepal516	2.ANT	NC_008149.1
CO92	1.ORI1	NC_003143.1
MGJZ3	3.ANT	ADSW01
MGJZ12	4.ANT	ADSV01
SCPM_O_B_6212	0.PE5	PVLX01
SCPM_O_B_6213	0.PE5	LIZD01
SCPM_O_B_6218	0.PE5	PVLY01
SCPM_O_B_6301	0.PE5	PVLIW01
SCPM_O_B_6706	0.PE5	LIYO01
SCPM_O_DNA_15	0.PE5	PVLZ01
SCPM_O_DNA_17	0.PE5	PVMB01
И-2422*	0.PE5	QANK01
И-3196*	0.PE5	VIDY01
И-3068*	0.PE5	VHPW01
И-3193*	0.PE5	VIDX01
И-3269*	0.PE5	VIDZ01

* Сиквенсы, полученные и депонированные авторами настоящей работы.

Поиск ДНК мишеней, конструирование праймеров, проведение ПЦР, фрагментное секвенирование

Поиск ДНК мишеней – SNPs, маркерных для кластеров штаммов *Y. pestis* улегейского подвида, осуществляли с помощью анализа матрицы коровых SNPs с применением программы Mega 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>). Оценку специфичности найденных SNPs проводили с использованием алгоритма BLAST и полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI GenBank. Расчет праймеров выполняли с помощью программы Vector NTI 10 (<http://www.thermofisher.com>). ПЦР осуществляли в амплификаторе БИС (Кольцово, Россия).

Ампликоны, полученные в ПЦР на матрице ДНК штаммов *Y. pestis*, секвенировали с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500xL (Applied Biosystems, США). Анализ полученных последовательностей выполняли с помощью программы MEGA 6.0 и алгоритма BLAST на

основе нуклеотидных последовательностей из базы данных NCBI GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе проведено комплексное исследование свойств 19 штаммов *Y. pestis* улегейского подвида, выделенных в Монголии, и определены полногеномные нуклеотидные последовательности пяти штаммов этого подвида (табл. 1). Для анализа популяционной структуры улегейского подвида использованы также полногеномные последовательности еще семи штаммов улегейского подвида из базы данных NCBI GenBank [23], а также последовательности девяти штаммов *Y. pestis*, относящихся к другим филогенетическим ветвям возбудителя чумы (табл. 1). Кроме того, определение наличия в геноме SNPs, маркерных для кластеров штаммов улегейского подвида, было проведено еще у семи штаммов улегейского под-

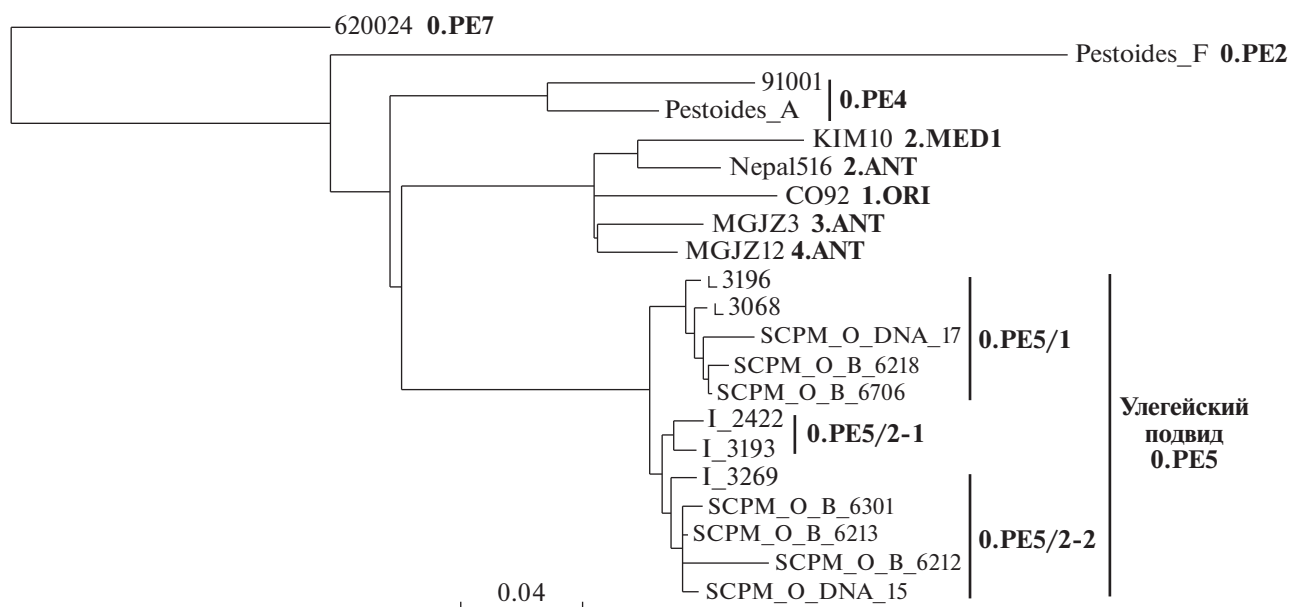


Рис. 1. Дендрограмма, построенная по результатам филогенетического анализа 21 штамма разных филогенетических ветвей с использованием 1581 коровых SNPs. Алгоритм Maximum Likelihood, программа PhyML 3.1, модель HKY85.

вида. Все изученные штаммы улегейского подвида обладали типичными дифференциальными биохимическими свойствами: они не редуцировали нитраты, но ферментировали рамнозу, арабинозу, глицерин, что соответствовало данным литературы [24].

Ранее было показано, что штаммы улегейского подвида несут в составе своего генома специфическую мутацию — делецию 88 пн в межгенной области *YPO1452–YPO1453*. На эту область нами были рассчитаны праймеры и зонд и подобраны условия проведения ПЦР в режиме реального времени [25].

Для подтверждения принадлежности использованных штаммов *Y. pestis* к улегейскому подвиду они были изучены на наличие этой маркерной мутации методом ПЦР в режиме реального времени. У всех изученных штаммов было детектировано наличие делеции, что подтвердило их принадлежность к улегейскому подвиду.

Популяционная структура штаммов *Y. pestis* улегейского подвида

Для определения популяционной структуры штаммов улегейского подвида проведен полногеномный SNP анализ корового генома и найден 1581 полиморфный нуклеотид, на основании которого осуществлено построение дендрограммы Maximum Likelihood (рис. 1). Как видно из дендрограммы, штаммы улегейского подвида, выделенные в разные годы, образовали два кластера, которые обозначены нами как 0.PE5/1 и 0.PE5/2.

Кластер 0.PE5/1 представлен штаммами, выделенными на территории аймаков Умнеговь, Уверхангай и Говь-Алтай юга Монголии в период 1973–1986 гг. Кластер 0.PE5/2 в свою очередь состоит из двух субкластеров 0.PE5/2-1 и 0.PE5/2-2 (рис. 1). Первый субкластер представлен штаммами, выделенными на территории аймаков Баян-Улгий и Ховд в период 1974–1986 гг.; второй субкластер состоит из штаммов, полученных в аймаке Баян-Улгий в период 1972–1990 гг. Таким образом, кластер 0.PE5/2 включает штаммы с территории западных аймаков Монголии, при этом в аймаке Баян-Улгий циркулируют штаммы двух подкластеров 0.PE5/2-1 и 0.PE5/2-2 (рис. 2).

Был проведен поиск SNPs, специфичных для отдельных эволюционных ветвей улегейского подвида. Поиск осуществляли для выяснения филогеографических закономерностей разделения штаммов с помощью определения этих маркерных SNPs у штаммов улегейского подвида, находящихся в государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ “Микроб”.

В результате проведенного анализа для штаммов кластера 0.PE5/1 были отобраны три маркерных SNPs. Первая мутация (замена T→A), названная 0.PE5/1₁, расположена в гене *ligB* в позиции 54674 по геному штамма CO92 (GenBank ID NC_003143.1). Вторая маркерная замена нуклеотида (T→G), названная 0.PE5/1₂, находится в гене *suзG* в позиции 172494; третья специфическая мутация 0.PE5/1₃ (A→C) расположена в гене *glgA* в позиции 4425839 (табл. 2).

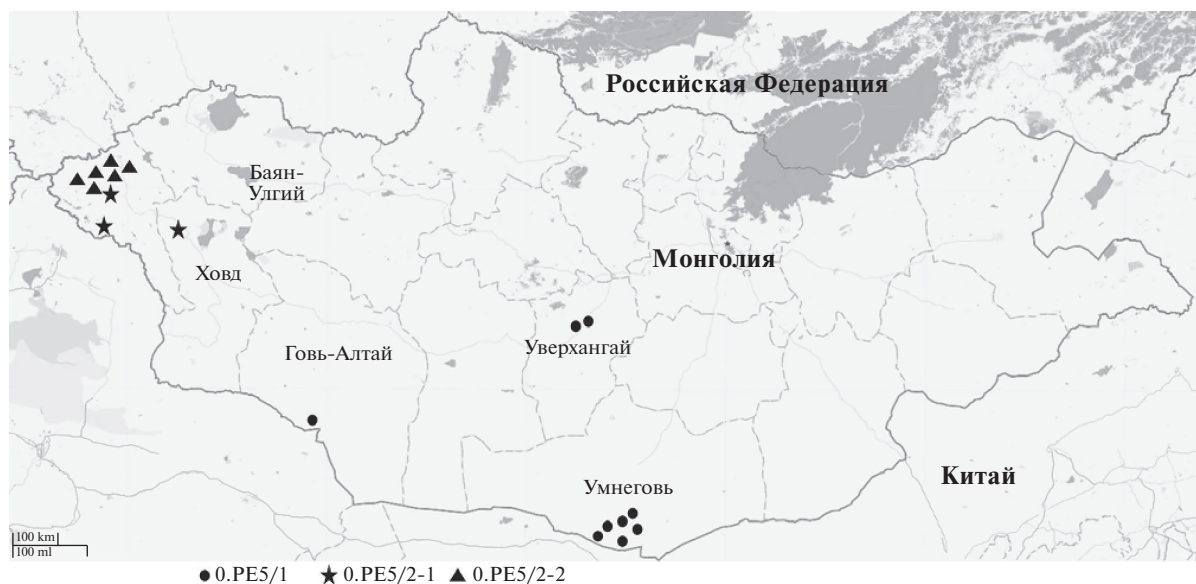


Рис. 2. Распространение штаммов *Y. pestis* улегейского подвида (филогенетическая ветвь 0.PE5) на территории Монголии. Для рисунка использована карта с сайта OpenStreetMap (www.openstreetmap.org/copyright).

Для штаммов субкластера 0.PE5/2-1 выбраны следующие маркерные нуклеотидные замены: первая (С→А) 0.PE5/2-1₁ – в гене *sixA* (позиция 3081204), вторая (G→A) 0.PE5/2-1₂ – в гене *argE* (позиция 4413306).

Для дифференциации штаммов субкластера 0.PE5/2-2 были использованы следующие специфические замены нуклеотидов: первая (Т→G) 0.PE5/2-2₁ – в гене *YPO0344* (позиция 353703), вторая (С→А) 0.PE5/2-2₂ – в гене *YPO2295* (позиция 2580558).

На выбранные локусы были рассчитаны праймеры (табл. 3) для установления принадлежности еще семи штаммов улегейского подвида, для ко-

торых не было проведено полногеномное секвенирование, к субкластерам 0.PE5/1, 0.PE5/2-1, 0.PE5/2-2. На матрице их ДНК получены ампликоны, которые потом были использованы для фрагментного секвенирования.

В результате показано наличие трех маркерных для ветви 0.PE5/1 нуклеотидных замен у штаммов И-3069 (Увэрхангай, 1982), И-3071 (Умнеговь, 1982), И-3130 (Умнеговь, 1984), И-3131 (Умнеговь, 1984), И-2972 (Умнеговь, 1981). Это означает, что эти пять штаммов тоже входят в состав ветви 0.PE5/1. По сумме полученных данных на основе полногеномного и фрагментного секвенирования в этот кластер улегейского подвида вошли штаммы, выделенные на территории

Таблица 2. Перечень SNPs, специфичных для филогенетических ветвей штаммов *Y. pestis* улегейского подвида

Позиция от начала генома*	Мутация	Ген	Функция гена	Ветви <i>Y. pestis</i> , у которых присутствует мутация
54674	T→A	<i>ligB</i>	НАД-зависимая ДНК-лигаза LigB	0.PE5/1
172494	T→G	<i>cysG</i>	Сирогемсинтаза	0.PE5/1
4425839	A→C	<i>glgA</i>	Гликогенсинтаза	0.PE5/1
3081204	C→A	<i>sixA</i>	Фосфогистидинфосфатаза	0.PE5/2-1
4413306	G→A	<i>argE</i>	Ацетилорнитиндеацетилаза	0.PE5/2-1
353703	T→G	<i>YPO0344</i>	Форматдегидрогеназа H	0.PE5/2-2
2580558	C→A	<i>YPO2295</i>	Нуклеотидаза	0.PE5/2-2

* Указана позиция по геному референсного штамма *Y. pestis* CO92 (NCBI GenBank ID NC_003143.1).

Таблица 3. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название мишени	Штаммы <i>Y. pestis</i> , у которых присутствует мутация	Последовательность праймеров
0.PE5/1 ₁	0.PE5/1	0.PE5/1 ₁ -S – AAATACAGCGAGCCCGTC 0.PE5/1 ₁ -AS – CCGTTCGTCCAAGGGTAAA
0.PE5/1 ₂	0.PE5/1	0.PE5/1 ₂ -S – TGAGTGGTCGCTGGCATA 0.PE5/1 ₂ -AS – TTGCTCGGCTTACAGTGGT
0.PE5/1 ₃	0.PE5/1	0.PE5/1 ₃ -S – CCACAGGGTTCAAAGCGGCT 0.PE5/1 ₃ -AS – AGTTGGTCGTCTTGGGGAGC
0.PE5/2-1 ₁	0.PE5/2-1	0.PE5/2-1 ₁ -S – AGCAGTCAGTGGATATCG 0.PE5/2-1 ₁ -AS – TCTTCTTTCGCCAACGCT
0.PE5/2-1 ₂	0.PE5/2-1	0.PE5/2-1 ₂ -S – AGCTACGCCCTGATTTTCG 0.PE5/2-1 ₂ -AS – CGCTGGATTGTGATAACGCT
0.PE5/2-2 ₁	0.PE5/2-2	0.PE5/2-2 ₁ -S – GAAAAAGTGACCGACAGTGAGG 0.PE5/2-2 ₁ -AS – TGGCTCGGTCTGGATTGGA
0.PE5/2-2 ₂	0.PE5/2-2	0.PE5/2-2 ₂ -S – ATAACGCCTGCAATTCGG 0.PE5/2-2 ₂ -AS – GGGTGTGCTAAGCCTGAT

аймаков Умнеговь, Уверхангай и Говь-Алтай в период с 1973 по 1986 г.

Два SNPs, маркерных для субкластера 0.PE5/2-1 (в позициях 3081204 и 4413306), найдены у штамма *Y. pestis* И-2962, выделенного на территории аймака Баян-Улгий в 1977 г. Таким образом, согласно полученным данным полногеномного и фрагментного секвенирования субкластер 0.PE5/2-1 включает штаммы, выделенные на территории аймаков Баян-Улгий и Ховд в период с 1974 по 1986 г.

Маркерные для подкластера 0.PE5/2-2 SNPs – 0.PE5/2-2₁ и 0.PE5/2-2₂ с координатами 353703 и 2580558, соответственно, выявлены в геноме штамма И-3215, выделенного на территории аймака Баян-Улгий в 1987 г. В результате подкластер 0.PE5/2-2 объединяет штаммы, выделенные на территории аймака Баян-Улгий в период с 1972 по 1987 г.

Основываясь на данных полногеномного секвенирования 12 штаммов и фрагментного секвенирования семи штаммов улегейского подвида возбудителя чумы и на установленной популяционной структуре этих штаммов можно сделать заключение о циркуляции на территории Монголии двух основных генетических ветвей улегейского подвида: первая ветвь, 0.PE5/1, состоит из штаммов, выделенных на территории южных аймаков Монголии – Умнеговь, Уверхангай и Говь-

Алтай в период 1973–1986 гг.; вторая ветвь, 0.PE5/2, состоит из двух подветвей: 0.PE5/2-1 включает штаммы 1977–1990 гг. из двух расположенных рядом западных аймаков Баян-Улгий (юго-восточные сомоны аймака, граничащие с аймаком Ховд с востока и с территорией Китая с юга) и Ховд; 0.PE5/2-2 состоит только из штаммов из аймака Баян-Улгий (северные и западные сомоны аймака, расположенные вблизи границы с РФ), выделенных в 1972–1987 гг. Таким образом, штаммы улегейского подвида можно разделить по географическому принципу на “южную” ветвь 0.PE5/1 и “западную” ветвь 0.PE5/2. На территории аймака Баян-Улгий отмечена циркуляция штаммов двух подкластеров ветви 0.PE5/2: штаммы подкластера 0.PE5/2-1 занимают его юго-восточные сомоны, а штаммы подкластера 0.PE5/2-2 – северные и западные сомоны.

*Анализ генов факторов патогенности у штаммов *Y. pestis* улегейского подвида*

Нами выполнен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей основных генов факторов патогенности у штаммов улегейского подвида и штаммов *Y. pestis* других филогенетических линий. Всего исследовано 79 генов, входящих в хромосомную область пигментации, плазмиду pCad, кодирующую систему секреции третьего типа, плазмиду pFra, кодирующую, в частности, кап-

сульный антиген и мышинный токсин, плазмиду pPst, кодирующую синтез плазминогена и пестицина [16]. В большинстве генов не было найдено мутаций, являющихся возможными причинами избирательной вирулентности улегейского подвида. Исключение составили два гена *irp1* и *uscQ*.

При анализе нуклеотидной последовательности гена *irp1*, входящего в состав острова высокой патогенности хромосомной области пигментации, у всех штаммов улегейского подвида обнаружена нуклеотидная замена С→А в позиции 7869 от начала гена согласно геному штамма CO92. Однако данная мутация является синонимичной и не приводит к изменению кодируемой аминокислоты. По-видимому, эта мутация не является причиной авирулентности штаммов улегейского подвида для людей.

При анализе структуры генов ССЗТ обнаружена специфическая мутация в гене *uscQ*, кодирующем белок YscQ (Q – белок-переносчик белков внешней мембраны). Было установлено наличие в этом гене специфической мутации – замены Т→А в позиции 296 от начала гена, приводящей к замене аминокислоты лейцин на глутамин. Продукт гена *uscQ* принимает участие в регуляции синтеза белка LcrV и белков внешней мембраны (Yops) ССЗТ, которая является обязательным фактором патогенности возбудителя чумы [26, 27]. Возможно, что эта замена может быть одной из причин авирулентности штаммов улегейского подвида. Для подтверждения или опровержения этого требуются дальнейшие исследования.

Таким образом, при анализе 79 генов хромосомной и плазмидной локализации, ассоциированных с факторами патогенности, у штаммов улегейского подвида обнаружена мутация в гене фактора вирулентности *uscQ*, которая может оказывать влияние на вирулентность штаммов этого подвида.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно имеющимся данным литературы исследование штаммов *Y. pestis* из очагов Монголии проводилось только с определением их принадлежности к основным филогенетическим ветвям. При этом филогенетического анализа штаммов улегейского подвида не проводилось.

Таким образом, нами установлена популяционная структура и изучены генетические особенности штаммов *Y. pestis* улегейского подвида на основании исследования 19 штаммов этого подвида.

По данным проведенного полногеномного SNP анализа 12 штаммов *Y. pestis* улегейского подвида с учетом 1581 выявленных коровых SNPs установлено наличие двух основных кластеров,

соответствующих географическому распространению штаммов. Первый кластер, обозначенный как 0.PE5/1, включает в себя штаммы из аймаков Умнеговь, Уверхангай и Говь-Алтай. Второго кластера, 0.PE5/2, состоит из двух ветвей эволюции: 0.PE5/2-1, объединившей штаммы из аймаков Баян-Улгий (его юго-восточные сомоны), Ховд, и 0.PE5/2-2, включающей только штаммы из аймака Баян-Улгий (его северные и западные сомоны). Это означает, что улегейский подвид на территории Монголии представлен двумя основными ветвями эволюции, распространенными в определенных географических регионах. Ветвь 0.PE5/1 циркулирует в центре и на юге страны в аймаках, граничащих с Китаем, в области полупустынь, переходящих южнее в пустыню Гоби и область юго-восточных отрогов Хангайских гор, являющуюся высокогорной степью. Горные территории запада страны, относящиеся к Монгольскому Алтаю, заняты штаммами линии 0.PE5/2, внутри которой в свою очередь выделяются две субветви: 0.PE5/2-1 (южные и восточные части Монгольского Алтая), и 0.PE5/2-2 (западные и северные части Монгольского Алтая).

Штаммы улегейского подвида не вирулентны для людей, не обладают высоким эпидемическим потенциалом и способны вызывать эпизоотии лишь среди мышевидных грызунов и мелких зайцеобразных. Для выяснения молекулярно-генетических причин низкой вирулентности штаммов улегейского подвида проведен анализ нуклеотидных последовательностей 79 генов, кодирующих основные факторы патогенности возбудителя чумы, а также другие участки генома. Найдены специфические мутации в генах *irp1* и *uscQ*. Мутация в гене *uscQ* приводит к изменению кодируемой аминокислоты, и ее значение для проявления авирулентности штаммами улегейского подвида для человека предстоит выяснить в дальнейшем.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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.
2. *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 In-

- dependent States // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. № 1106.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01106>
3. Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Носов Н.Ю. и др. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015. № 4. С. 58–64.
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-58-64>
 4. Cui Y., Yu C., Yan Y. et al. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis* // *PNAS.* 2013. V. 110. № 2. P. 577–582.
 5. Попов Н.В., Карнаухов И.Г., Пакскина Н.Д. и др. Оценка современной эпидемиологической обстановки в природных очагах чумы мира. Повышение эффективности эпидемиологического надзора в природных очагах чумы Российской Федерации и прогноз их эпизоотической активности на 2019 г. // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019. № 1. С. 81–88.
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-1-81-88>
 6. Адыасурэн З., Цэрэнноров Д., Отгонбаатар Д. и др. Клинико-эпидемиологические особенности чумы в Монголии // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2010. № 1. С. 30–33.
[https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-1\(103\)-30-33](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-1(103)-30-33)
 7. Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях / Под ред. Поповой А.Ю., Кутырева В.В.: Ижевск: Принт, 2018. 336 с.
 8. Дэмбэрэл Ж. Некоторые особенности чумных очагов Монголии // *Докл. Иркут. противочум. ин-та Сибири и ДВ. Чита,* 1974. № 10. С. 62–63.
 9. Жамба Г., Галбадрах Д., Саран М. и др. К стратегии и тактике изучения природного очага чумы в МНР // *Эпидемиол. и профилактик. особо опасных инф. в МНР и СССР.* Улан-Батор, 1978. С. 8–11.
 10. Некипелов Н.В. Эпизоотология чумы в Монгольской Народной Республике // *Изв. Иркут. гос. науч.-исслед. противочум. ин-та Сибири и ДВ. Иркутск,* 1959. № 22. С. 108–243.
 11. Адыасурэн З., Цэрэнноров Д., Мягмар Ж. и др. Современная ситуация в природных очагах чумы Монголии // *Дальневост. журн. инфекц. патологии.* 2014. № 25. С. 22–25.
 12. Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Одинокоев Г.Н. и др. Анализ разнообразия и определение геновариантов штаммов возбудителя чумы из очагов Монголии // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 3. С. 298–305.
 13. Kiefer D., Dalantai G., Damdindorj T. et al. Phenotypical characterization of Mongolian *Yersinia pestis* strains // *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012. V. 12. № 3. P. 183–188.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0748>
 14. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D. et al. *Yersinia pestis* Lineages in Mongolia // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 2. e30624.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030624>
 15. Подладчиков О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017. № 3. С. 33–40.
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-33-40>
 16. Rasmussen S., Allentoft M.E., Nielsen K. et al. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5000 years ago // *Cell.* 2015. V. 163 № 3. P. 571–582.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.009>
 17. Kutyrev V.V., Filippov A.A., Oparina O.S. et al. Analysis of *Yersinia pestis* chromosomal determinants Pgm+ and Psts associated with virulence // *Microb. Pathog.* 1992. V. 12. P. 177–186.
 18. Попов Ю.А., Проценко О.А., Анисимов П.И. и др. Обнаружение плазмид пестициногенности чумного микроба методом электрофореза в агарозном геле // *Профилактика особо опасных инфекций.* 1980. С. 20–25.
 19. Проценко О.А., Анисимов П.И., Можаров О.Т. и др. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина I, антигена фракция I и экзотоксина “мышинного” токсина // *Генетика.* 1983. Т. 19. № 7. С. 1081–1090.
 20. Skurnic M., Wolf-Watz H. Analysis of the yopA gene encoding the YopI virulence determinants of *Yersinia* spp. // *Mol. Microbiol.* 1989. V. 3. P. 517–529.
 21. Comelis G.R. The *Yersinia* Ysc-Yop “Type III” weaponry // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 3. P. 742–752.
 22. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство // Под ред. акад. РАМН Онищенко Г.Г. и акад. РАМН Кутырева В.В.. М.: ЗАО “Шико”, 2-е изд., перераб. и доп., 2013. 560 с.
 23. Kislichkina A.A., Bogun A.G., Kadnikova L.A. et al. Six WholeGenome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *Microtus* bv. *Ulegeica* (phylogroup O.PE5) strains isolated from Mongolian natural plague foci // *Genome Announc.* 2018. V. 6. № 25.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00536-18>
 24. Тимофеева Л.А. О таксономии чумного микроба // *Проблемы особо опасных инфекций.* 1972. Т. 1(23). С. 15–22.
 25. Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М. и др. Подвидовая дифференциация штаммов *Yersinia pestis* методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол.* 2017. № 2. С. 22–27.
 26. Jackson M.W., Plano G.V. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system // *FEMS Microbiol. Lett.* 2000. V. 186. № 1. P. 85–90.
 27. Fields K.A., Plano G.V., Straley S.C. A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the lcrB region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis* // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. № 3. P. 569–579.

Phylogenetic Analysis of *Yersinia pestis* Strains of Subspecies *ulegeica***К. А. Nikiforov^{a,*,**}, L. М. Kukleva^a, Zh. V. Al'khova^a, E. A. Naryshkina^a, N. P. Guseva^a,
G. A. Eroshenko^a, E. G. Tokmakova^b, S. V. Balakhonov^b, and V. V. Kutyrev^a**^a*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, 410005 Russia*^b*Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, 664047 Russia***e-mail: Nikiforov6666666@mail.ru****e-mail: rusrapi@microbe.ru*

We investigated the population structure of *Y. pestis* strains belonging to subspecies *ulegeica* (genetic branch 0.PE5), which is endemic for plague foci of Mongolia and has low epidemic potential as compared to strains of the main subspecies. According to whole-genome SNP-analysis of 12 *Y. pestis* strains (ssp. *ulegeica*), isolated in the territory of Mongolia, taking into consideration 1581 identified core SNPs, two major genetic clusters have been established. They correlate with geographical distribution of the strains. The first cluster, designated as 0.PE5/1, comprises the strains from Umnegov, Uverkhangai, and Gov-Altai aimaks, situated in the south of Mongolia. The second one, 0.PE5/2, consists of two sub-clusters: 0.PE5/2-1, which includes the strains from Bayan-Ulgi and Khovd aimaks and 0.PE5/2-2 – represented by the strains from Bayan-Ulgi aimak only. In order to determine possible causes of selective virulence in the strains of ssp. *ulegeica*, analysis of nucleotide sequences of 79 basic genes of pathogenicity factors, as well as other genome regions, was carried out. We have traced specific mutations in the following genes: *irpI*, which is part of high pathogenicity island of chromosomal pigmentation region, and *yscQ*, which participates in LcrV protein and outer membrane proteins (Yops) synthesis regulation, the proteins that are associated with the virulence of plague agent.

Keywords: plague agent, population structure, phylogeny, subspecies *ulegeica*, Mongolia.