

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 579.842.23:579.253].083.1:577.2.08

М. Е. Платонов¹, В. В. Евсеева¹, Т. Э. Светоч¹, Д. В. Ефременко², И. В. Кузнецова²,
С. В. Дентовская¹, А. Н. Куличенко², А. П. Анисимов¹

ФИЛОГЕОГРАФИЯ ПОЛЕВОЧЬИХ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ КАВКАЗА И ЗАКАВКАЗЬЯ

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk; ²ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

С помощью молекулярного типирования проведен сравнительный анализ 57 штаммов *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica*. Полученные результаты свидетельствуют о наличии в составе этого биовара трех независимых филогенетических групп и указывают на целесообразность выделения Ленинканского горного мезоочага из состава Закавказского высокогорного в самостоятельный очаг, а также включения части Приараксинского низкогорного очага в статусе мезоочага наряду с Присеванским горным и Зангезуро-Карабахским горным мезоочагами в состав Закавказского высокогорного очага чумы. Показано, что штаммы, циркулирующие в Восточно-Кавказском высокогорном очаге чумы, являются наиболее древней ветвью биовара *caucasica*, а возможно, и всего филогенетического дерева *Y. pestis*.

Ключевые слова: MLVA25-типирование, CRISPR-типирование, VNTR, *lcrV*, *aspA*, *Yersinia pestis*, филогеография

Природные очаги чумы полевого типа Закавказский высокогорный (включающий мезоочаги Ленинканский горный (04), Присеванский горный (05) и Зангезуро-Карабахский горный (06)) и Восточно-Кавказский высокогорный (39) были открыты в 1958 г. и 1977 г. соответственно. Особенности фенотипов циркулирующих там полевоых штаммов *Y. pestis* позволили выделить их в подвид *caucasica*. Кроме того, аналогичные штаммы чумного микроба выделяют на территории Приараксинского низкогорного очага песчаночного типа (07), граничащего с Закавказским высокогорным [4]. Относительно недавно китайские, французские и российские ученые [3, 12] предложили объединить штаммы *Y. pestis* неосновных подвидов (*altaica*, *caucasica*, *hissarica*, *ulegeica*, *talassica*, *xilingolensis*, *qinghaiensis* и *angola*) в составе нового подвида *microtus*, придав им статус биоваров. Предложенную терминологию уже используют в работах немецких, монгольских и французских исследователей [11]. В рамках настоящей работы мы будем применять этот вариант внутривидовой классификации возбудителя чумы.

В основу фенотипических методов дифференциации возбудителя чумы положены способность ферментировать различные субстраты, питательные потребности и вирулентность для различных видов животных. Хотя фенотипические методы и позволяют различать подвиды и биовары *Y. pestis*, с их помощью невозможно проводить типирование на уровне штаммов. К тому же нестабильность проявления фенотипических признаков, их зависимость от условий эксперимента, а также наличие атипичных штаммов существенно затрудняют интерпретацию результатов [1]. В связи с этим в последнее время решающую роль в типировании чумного микроба играют молекулярно-биологические методы [13]. С помощью специальных компьютерных программ ре-

зультаты генотипирования штаммов одного вида можно представить в виде филогенетического древа, причем кластеры близких генотипов у многих видов имеют четкую географическую локализацию [8]. Ранее мы использовали VNTR-типирование по 25 локусам (MLVA25) для изучения многообразия штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы на территории Китая с привлечением незначительного количества штаммов, циркулирующих в природных очагах СНГ [12]. Биовар *caucasica* был представлен в цитируемой работе всего лишь 7 штаммами из Закавказского высокогорного очага.

В настоящей публикации описано MLVA25-типирование набора из 57 штаммов *Y. pestis*, выделенных в природных очагах полевого типа Кавказа и Закавказья. Кроме того, проведено CRISPR-типирование исследованных штаммов, определены нуклеотидные последовательности генов *aspA* и *lcrV*, а также оценено географическое распределение выявленных филогенетических групп и предложено деление энзоотических территорий на очаги в соответствии с филогеографическими данными.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали 57 штаммов *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica*: 14 штаммов из Ленинканского горного, 7 - из Присеванского горного, 9 - из Зангезуро-Карабахского горного, 9 - из Приараксинского низкогорного и 18 - из Восточно-Кавказского высокогорного очагов чумы, а также 2 штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* bv. *mediaevalis* из Приараксинского низкогорного очага чумы. Штаммы были выделены в 1958-1996 гг. Бактерии выращивали на агаре Хоттингера с добавлением 1 % гемолизированной крови в течение 48 ч при температуре 28 °С. Геномную ДНК выделяли в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.1794-03 "Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности".

Молекулярное типирование. Последовательности праймеров, условия проведения полимеразно-цепной реакции (ПЦР), учет результатов MLVA25-типирования [12], CRISPR-типирования [10], а также секвенирование генов *lcrV* [7] и *aspA* [9] детально описаны ранее. Опубликованные полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis* Pestoides F и *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 (номера доступны в GenBank/EMBL/DBJ: AF167309 и NC_006153.2 соответственно) использовали для молекулярного типирования *in silico*.

Анализ результатов. Полученные результаты вносили в базу данных программы Bionumerics 5.1. Для построения дендрограмм применяли метод Neighbor-Joining с категорическим коэффициентом (в качестве корневого вида использовали штамм *Y. pseudotuberculosis* IP32953). Наименования и номера природных очагов чумы указаны в соответствии с [4, 6].

Результаты и обсуждение

Исследованные нами с помощью MLVA25-типирования штаммы *Y. pestis* bv. *caucasica*, выделенные в Кавказском регионе, формировали единый генетический кластер (см. рисунок), сохраняющий свою автономность и на дендрограмме, которая включает данные о MLVA25-типах более 600 изолятов, относящихся к различным внутривидовым группам чумного микроба [3]. Увеличение количества изолятов из природных очагов чумы 04-07 с 7, описанных в нашей предыдущей публикации [12], до 39 и включение в исследование 18 штаммов из очага 39 позволили выявить в составе кластера bv. *caucasica* три независимые ветви (клональные кластеры - clonal clusters): cc39, cc4 и cc5-7) (см. рисунок), соответствующие природным очагам 39 (Дагестан), 04 (Армения и Грузия) и группе очагов 05-07 (Азербайджан и Армения). Распределение штаммов по клональным кластерам и входящих в их состав подкластерам не зависело от времени выделения культур *Y. pestis* в природных очагах. Все изоляты из очагов 04 и 39 вошли только в состав соответствующих автономных и относительно гомогенных клональных кластеров cc4 (популяция 0.PE2b, по данным Morelli G. и соавт. [14]) и cc39 (SNP-типирование штаммов этой группы пока никто не проводил), что может свидетельствовать о стабилизации биоценологических связей между популяциями теплокровных животных, переносчиков и возбудителей-паразитов и отсутствии заноса на эти территории штаммов *Y. pestis* из других природных очагов чумы. Клональный кластер cc5-7 (популяция 0.PE2a, по данным Morelli G. и соавт. [14]) более гетерогенен - в его состав вошли изоляты из двух мезоочагов 05 и 06 (в составе Закавказского высокогорного природного очага чумы) и прилегающей территории очага 07. Вероятно, во время вспышек численности теплокровных носителей из очагов 05, 06 и 07 их экологические ниши перекрываются, и тогда происходит занос штаммов на соседние территории.

Для проверки достоверности кластеризации и субтипирования изучаемых изолятов в составе кластера методом MLVA25 использовали оценку полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов *aspA* и *lcrV*.

Известно, что в отличие от *Y. pseudotuberculosis* для аминокислотной последовательности аспартазы штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* характерна замена Val363 → Leu363 (GTG → TTG), а для 7 исследованных ранее штаммов *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* из неуказанных в публикациях природных очагов - Val363 → Ser363 (GTG → TCG) [2, 9]. Проведенное нами секвенирование гена *aspA* из 56 изолятов, выделенных во всех природных очагах, где циркулируют штаммы биовара *caucasica*, и анализ нуклеотидной последовательности гена *aspA* из штамма Pestoides F, подтвердили наличие замены GTG → TCG и позволило предположить, что она произошла до момента выделения *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* в самостоятельный генетический кластер, так как свойственна всем трем филогенетическим группам в составе указанного биовара.

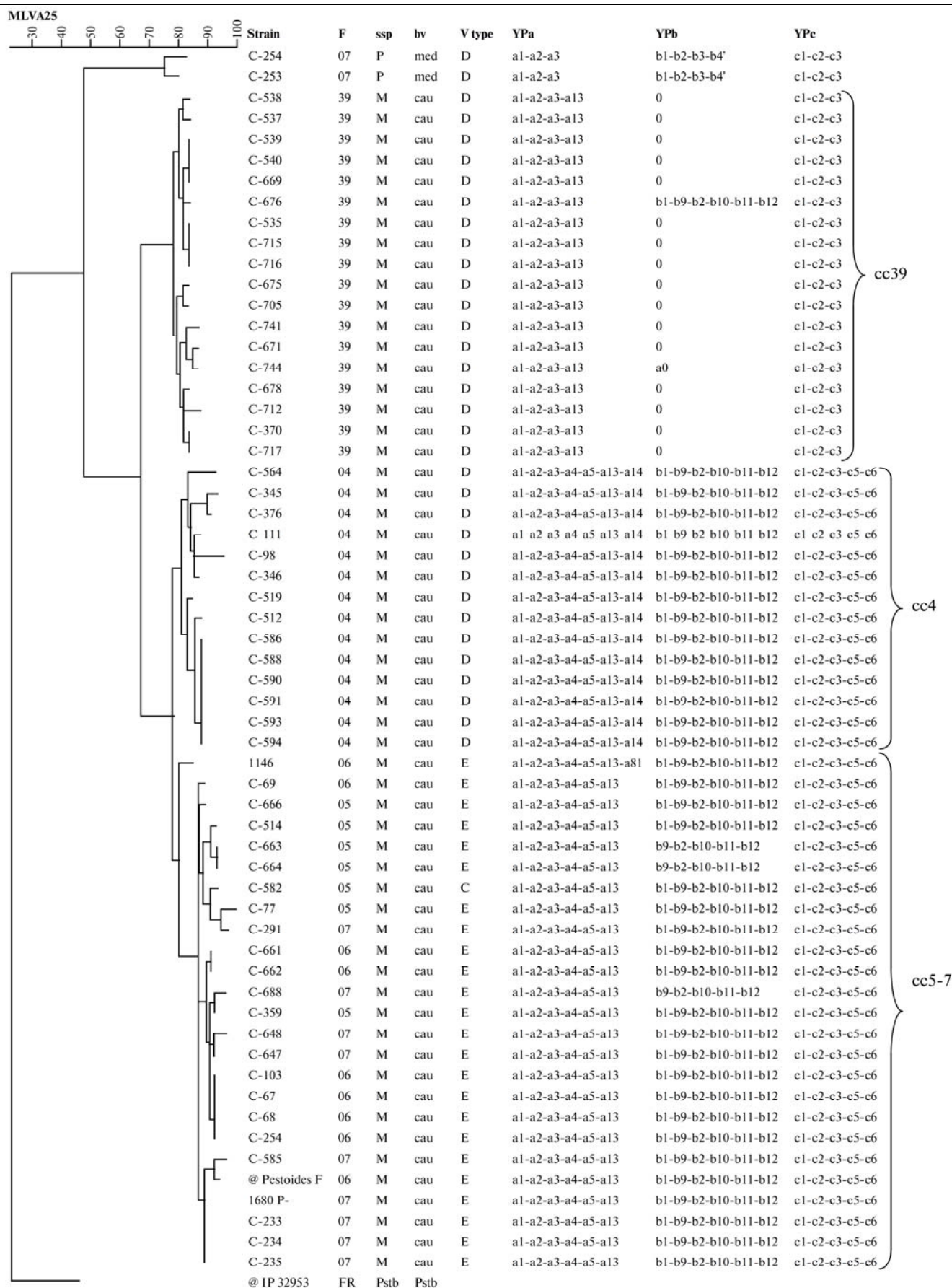
Известно, что для полевоочных штаммов характерен полиморфизм аминокислотной последовательности V антигена [7]. Проведенное нами секвенирование гена *lcrV* из 18 штаммов, выделенных в очаге 39, и 14 штаммов из очага 04 показало, что все исследованные представители этих филогенетических групп синтеза-

руют V антиген типа D (Lys18, Lys72, Cys273 и Ser324-Gly325-Lys326), характерный для штаммов основного подвида (см. рисунок). В то же время у 38 из 39 исследованных штаммов из группы очагов 05-07 выявлен тип E аминокислотной последовательности V антигена (Lys18, Lys72, Cys273 и Arg324), а у одного, C-582, - тип C (Asn18, Arg72, Ser273 и Arg324). Принимая во внимание тот факт, что V антиген D типа наиболее близок по аминокислотной последовательности к аналогичному белку своего прародителя, *Y. pseudotuberculosis*, а общее отличие от классического типа D для типов E и C, замена трех C-концевых аминокислот (Ser324-Gly325-Lys326) на одну (Arg324), является результатом вызванной двумя прямыми повторами (ATGACACG) делеции 3'-конца гена *lcrV* протяженностью 16 пар нуклеотидных оснований [5, 15], можно предположить, что наиболее молодой ветвью биовара *caucasica* является филогенетическая группа, общая для Присеванского горного (05), Зангезуро-Карабахского горного (06) и среднегорной степной части Приараксинского низкогорного (07) природного очага чумы, а наиболее древней - популяция штаммов, циркулирующих в Восточно-Кавказском высокогорном очаге (39), и дивергировавшая, по данным MLVA25-типирования, от клональных кластеров cc4 и cc5-7 до момента разделения последних.

Суммируя полученные на первых этапах исследования результаты, можно отметить, что MLVA25-типирование в сочетании с секвенированием генов *lcrV* и *aspA* позволило выявить в составе кластера bv. *caucasica* три ветви, соответствующие популяциям *Y. pestis*, циркулирующим в природных очагах 39 (Дагестан, наиболее древняя), 04 (Армения и Грузия) и группе очагов 05-07 (Азербайджан и Армения, наиболее молодая). Полученные данные свидетельствуют о том, что мезоочаги 05, 06 и прилегающую к ним часть очага 07 действительно можно рассматривать как единый природный очаг чумы - Закавказский высокогорный, а Ленинканскому горному очагу необходимо предоставить статус самостоятельного, однако для окончательного решения об изменении статуса последнего необходимо верифицировать результаты MLVA25-типирования и определения нуклеотидной последовательности гена *lcrV* другими методами молекулярного типирования (SNP-, CRISPR-типирования и др.).

Корректность деления штаммов bv. *caucasica* на клональные кластеры cc4, cc5-7 и cc39 дополнительно проверяли с помощью CRISPR-типирования, включавшего в анализ более 130 маркеров - спейсеров [10]. Как видно из рисунка, профили спейсеров, характерные для исследованных штаммов, полностью подтвердили кластеризацию, проведенную с помощью MLVA25-типирования. Профили спейсеров локуса YPa позволили выделить 4 клональных кластера: cc4, cc5-7, cc39 и штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* bv. *mediaevalis* из очага чумы 07. Профили спейсеров локуса YPb совпадали только у бактерий из клональных кластеров cc4 и cc5-7. Профили спейсеров локуса YPc обеспечивали разделение всех исследованных штаммов лишь на две группы: клональные кластеры cc4 и cc5-7, *Y. pestis* subsp. *pestis* bv. *mediaevalis* и кластер cc39.

В кластере cc5-7 штамм 1146 стоит особняком. По данным MLVA25-типирования он входит в состав, но не кластеризуется с другими подкластерами группы

NJ-дендрограмма MLVA25-типов штаммов *Y. pestis* bv. *caucasica*.

Strain — название штамма; @ — штамм генотипирован *in silico*; F — номер природного очага; ssp — подвида (P — *pestis*, M — *microtus*); bv — биовар (med - *mediaevalis*, cau - *caucasica*); V type - тип V антигена [6]; YPa (a1-a2-a3 и т. п.), YPb (b1-b2-b3 и т. п.) и YPc (c1-c2-c3 и т. п. - названия (профили спейсеров) локусов CRISPR [10].

сс5-7 и имеет уникальный профиль спейсеров локуса *YpA* (к набору спейсеров a1-a2-a3-a4-a5 добавлен спейсер a81, выявленный к настоящему времени только у данного штамма). Следует отметить, что использованную в нашей работе линию штамма более 30 лет применяли в качестве тест-культуры для выявления продукции пестицина [1, 4, 6], подвергая ее постоянным пересевам на искусственных питательных средах. В то же время остальные исследованные нами штаммы получены из коллекций микроорганизмов противочумных институтов, где они в ходе хранения подвергались минимальному количеству пересевов и, соответственно, наиболее близки к исходным природным изолятам.

Таким образом, результаты использования MLVA25- и CRISPR-типирования в сочетании с оценкой полиморфизма генов *aspA* и *lcrV* свидетельствуют о том, что штаммы *Y. pestis*, циркулирующие в Восточно-Кавказском высокогорном очаге, являются наиболее древней ветвью биовара *caucasica*, а возможно, и всего филогенетического дерева *Y. pestis*. На наш взгляд, полученные результаты являются достаточным основанием для выделения Ленинанканского горного мезоочага из состава Закавказского высокогорного в самостоятельный, а также включения части Приараксинского низкогогорного очага в статусе мезоочага наряду с Присеванским горным и Зангезуро-Карабахским горным мезоочагами в состав Закавказского высокогорного очага.

Работа выполнена по Государственным контрактам № 53-Д от 29.06.2010 г. и № 61-Д от 22.07.2011 г. в рамках Федеральной целевой программы "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2013 годы)" при частичной поддержке гранта РФФИ № 08-04-00405-а.

Сведения об авторах:

Платонов Михаил Евгеньевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; e-mail: platonov@obolensk.org.

Евсеева Вера Васильевна — мл. науч. сотр. лаб. микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; e-mail: info@obolensk.org.

Светоч Татьяна Эдуардовна — канд. биол. наук, научн. сотр. лаб. микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; e-mail: info@obolensk.org.

Ефременко Дмитрий Витальевич — канд. мед. наук, зав. лаб. индикации особо опасных инфекций ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: labindic@mail.ru.

Кузнецова Ирина Владимировна — научн. сотр. лаб. индикации особо опасных инфекций ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: labindic@mail.ru.

Дентовская Светлана Владимировна — канд. мед. наук, зав. лаб. микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; e-mail: dentovskaya@obolensk.org.

Куличенко Александр Николаевич — д-р мед. наук, проф., директор ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Анисимов Андрей Павлович — д-р мед. наук, проф., зам. дир. ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; e-mail: anisimov@obolensk.org.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апарин Г. П., Голубинский Е. П. Микробиология чумы: Руководство. - Иркутск, 1989.
2. Ерошенко Г. А., Одинокоев Г. Н., Краснов Я. М. и др. // Пробл. особо опасных инфекций. - 2009. - Вып. 99. - С. 52-54.
3. Платонов М. Е. Молекулярно-генетическое изучение разнообразия и микроразнообразия *Yersinia pestis*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Оболensk, 2010.
4. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири / Под ред. Г. Г. Онищенко, В. В. Кутырева, - М., 2004.
5. Adair D. M., Worsham P. L., Hill K. K. et al. // J. Clin. Microbiol. - 2000. - Vol. 38. - P. 1516-1519.
6. Anisimov A. P., Lindler L. E., Pier G. B. // Clin. Microbiol. Rev. - 2004. - Vol. 17. - P. 434-464.
7. Anisimov A. P., Dentovskaya S. V., Panfertsev E. A. et al. // Infect. Genet. Evol. - 2010. - Vol. 10. - P. 137-145.
8. Avise J. C., Arnold J., Ball R. et al. // Annu. Rev. Ecol. Syst. - 1987. - Vol. 18. - P. 489-522.
9. Bearden S. W., Sexton C., Pare J. et al. // Microbiology. - 2009. - Vol. 155. - P. 198-209.
10. Cui Y., Li Y., George O. et al. // PLoS ONE. - 2008. - Vol. 3. - P. e2652.
11. Kiefer D., Dalantai G., Damdindorj T. et al. // Vector Borne Zoonotic Dis. - 2011. - Oct 24. - doi:10.1089/vbz.2011.0748.
12. Li Y., Cui Y., Hauck Y. et al. // PLoS ONE. - 2009. - Vol. 4. - P. e6000.
13. Lidler L. E. // J. AOAC Int. - 2009. - Vol. 92. - P. 1174-1183.
14. Morelli G., Song Y., Mazzoni C. J. et al. // Nat. Genet. - 2010. - Vol. 42. - P. 1140-1143.
15. Zhou D., Tong Z., Song Y. et al. // J. Bacteriol. - 2004. - Vol. 186. - P. 5147-5152.

Поступила 13.01.12

THE PHYLOGEOGRAPHY OF THE *YERSINIA PESTIS* VOLE STRAINS ISOLATED FROM THE NATURAL FOCI OF CAUCASIAN REGION

M. E. Platonov¹, V. V. Evseeva¹, T. E. Svetoch¹, D. V. Efremenko²,
I. V. Kuznetsova², S. V. Dentovskaya¹, A. N. Kulichenko²,
and A. P. Anisimov¹

¹ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia; ² Federal State Public Health Institute "Stavropol Research Antiplague Institute", Stavropol, Russia

57 *Y. pestis* bv. *caucasica* strains were assayed using molecular typing. The results of this assay indicated the presence within this biovar of the three separate clonal clusters and necessity of detachment of the Leninakan mountain mesofocus (subfocus) from the structure of Transcaucasian-highland focus into self-supporting one, as well as inclusion of a part of the Pre-Araks low-mountain natural plague focus in the capacity of the subfocus along with Pre-Sevan mountain and Zanzegur-Karabakh mountain subfoci into the structure of Transcaucasian-highland focus. It was shown that the strains circulating in the East-Caucasian highland plague focus were the most ancient branch of bv. *caucasica* or even of the entire *Y. pestis* phylogenetic tree.

Key words: MLVA25-typing, CRISPR-typing, VNTR, *lcrV*, *aspA*, *Yersinia pestis*, phylogeography