

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ ШТАММОВ ВОЗ-
БУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ИЗ ОЧАГОВ СЕВЕРНОГО ПРИАРАЛЬЯ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2-го курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Карапетяна Левона Александровича

Научный руководитель:


профессор, д.б.н.


30.05.2022

С.А. Коннова

Научный консультант:


с.н.с., д.б.н.


30.05.2022

Г.А. Ерошенко

Зав. кафедрой биохимии и биофизики:

профессор, д.б.н.


30.05.2022

С.А. Коннова

Саратов 2022

Введение. Чума – особо опасная природно-очаговая инфекция, представляющая серьезную угрозу для населения, особенно в странах с очагами чумы. Ежегодно случаи заражения чумой регистрируются в государствах Центральной Азии, Северной Америки, Африки и на острове Мадагаскар. В Российской Федерации, других странах СНГ и ближнего зарубежья существует 45 природных очагов чумы, многие из которых до сих пор проявляют эпизоотическую и эпидемическую активность. Штаммы *Y. pestis* из разных очагов чумы различаются по вирулентности и эпидемиологической значимости, что необходимо учитывать при обследовании очагов. Наиболее распространены штаммы средневекового биовара, которые циркулируют в 7 из 11 очагов Российской Федерации и в большинстве очагов стран СНГ.

Поскольку средневековые штаммы распространены в основном в странах СНГ и ближнего зарубежья, иностранные публикации не дают полного представления о структуре возбудителя чумы средневекового биовара на сегодняшний день. В связи с высокой вирулентностью и эпидемической значимостью штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, их широким распространением на территории Северо-Приаралья, высокой активностью этих природных очагов и возможностью заноса чумы на территорию Российской Федерации очевидна актуальность, теоретическая и практическая значимость исследования этих штаммов с использованием современных молекулярно-генетических методов. Для типирования штаммов чумы исторически использовались фенотипический анализ, серотипирование, фаговое типирование и определение плазмидного состава. Недостатками этих методов являются длительность и зависимость выраженности признаков от условий существования и выращивания штаммов. Позже на основе анализа геномов штаммов начались поиски и разработка новых методов обнаружения, идентификации и молекулярного типирования. К числу наиболее эффективных и высокоразрешающих методов молекулярной идентификации относится метод мультилокусного анализа переменного числа тандемных повторов – MLVA (от

англ. Multiple Locus VNTR analysis) и полиморфизм единичных нуклеотидов (single nucleotide polymorphism, SNP).

Цель исследования: комплексная характеристика свойств штаммов из Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского очагов чумы.

Задачи исследования:

1. Изучение биохимических свойств штаммов *Y. pestis* из Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского пустынных очагов чумы. Выявление принадлежности к подвидам, биоварам возбудителя чумы на основе биохимических особенностей штаммов и методом ПЦР в реальном времени.
2. Определение MLVA25 генотипов штаммов *Y. pestis* из очагов Северного Приаралья. Установление популяционной структуры возбудителя по данным MLVA25 анализа филогенетического родства штаммов из этих очагов. Составление базы данных MLVA25 генотипов из очагов чумы Северного Приаралья.
3. Проведение филогенетического анализа возбудителя чумы из Северного Приаралья по данным полногеномного SNP типирования (single nucleotide polymorphism). Определение родственных связей штаммов Северного Приаралья со штаммами из других природных очагов чумы. Оценка эффективности использованных методов для молекулярного типирования *Y. pestis* из Северного Приаралья.

Структура работы. Работа состоит из введения, основной части, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 83 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: полное описание природных очагов чумы Северного Приаралья – Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского пустынных очагов, Северо-Приаральский пустынный очаг, Приаральско-Каракумский пустынный очаг, Общая характеристика штаммов вида *Y. pestis*, Методы молекулярного типирования возбудителя чумы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты и обсуждение. Биохимический анализ свойств штаммов *Y. pestis*

На начальном этапе штаммы *Y. pestis*, использованные в исследовании, выращивали на агаре LB или жидкой среде LB (pH 7,2) при 28 °C или 37 °C в течение 24-48 часов. Отобранные штаммы *Y. pestis*, были исследованы по их биохимической активности на среде Гисса для анализа способности к редукции нитратов, ферментации глицерина и рамнозы, полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика биохимических свойств штаммов *Y. pestis* использованных в работе

Штаммы \ Свойство	Ферментация рамнозы	Ферментация глицерина	Денитрификация	Кальций-зависимость	Признак пигментации
A-1763	–	+	–	+	Гетерогенность
580	–	+	–	+	+
KM938	–	+	–	+	+
241	–	+	–	+	+
615	–	+	–	+	–
932	–	+	–	+	Гетерогенность
600	–	+	–	+	+
1252	–	+	–	+	–
4635	–	+	–	+	+
929	–	+	–	+	Гетерогенность
EV (контроль)	–	–	+	+	–
1146 (контроль)	+	+	+	N/A	N/A
1836 (контроль)	–	+	+	N/A	N/A
KM218 (контроль)	N/A	N/A	N/A	–	N/A
10 (контроль)	N/A	N/A	N/A	N/A	+
4 (контроль)	–	+	–	N/A	N/A

Примечание: – отсутствие активности; + наличие активности; N/A отсутствие данных

Геном возбудителя чумы включает три плазмиды pCad, pFra и pPst. Большая половина представленных штаммов (58 %), такие как A-1763, 1252, 600, 929, 241, 932, содержали все три типичные для возбудителя чумы плазмиды – pFra (синтез капсульного антигена и мышинового токсина), pCad (синтез V-антигена, белков YOPs) и pPst (синтез пестицина и активатора плазми-

ногена). Исключение составили штаммы 615, 4635, KM938, 580, у которых отсутствовала плазида пестициногенности.

Учет результатов на определение признака пигментации проводили по наличию 100% выросших пигментированных колоний (красных, розовых). Исследуемые штаммы в большей мере показали характерные для средневекового биовара результаты. В исследовании есть штаммы (А-1763, 932, 929) у которых были гетерогенные колонии, однако процент пигментируемой поверхности колонии составлял от 50%.

Так же мы проверяли зависимость роста от присутствия ионов Ca^{2+} у исследуемых штаммов. Через 48 часов инкубации при температуре 37°C Ca^- колоний обнаружено не было, исключение составил штамм 580. Далее культивирование осуществляли при температуре 28°C в течение суток, после чего был замечен рост Ca^+ колоний у всех остальных исследуемых штаммов. К видоспецифическому бактериоцину *Y. pestis* относят пестицин. Он угнетает рост бактерий того же вида, а также возбудителя псевдотуберкулеза (*Y. pseudotuberculosis*). У проверенных штаммов не было замечено торможения роста, однако штамм 615 небольшую активность проявил. Проведена оценка зависимости по питательным потребностям. Для исследования использовали набор чашек, одна из которых содержала 6 аминокислот: цистеин, фенилаланин, треонин, метионин, аргинин, лейцин, а в других исключали по одной аминокислоте.

Определение подвидовой/биоварной принадлежности штаммов *Y. pestis* из очагов чумы методом ПЦР в режиме реального времени

Дифференциацию штаммов *Y. pestis* на основной/неосновные подвиды проводили с использованием характерной для данного подвида делеции размером 89 п.н. в гене *ilvN*. Амплификацию фрагментов указанных генов осуществляли в режиме реального времени с помощью специфических праймеров и зонда RT89, комплементарных области делеции. В качестве контроля выбран штамм 6499 кавказского подвида (неосновной подвид). Флуоресцентный сигнал проявлялся только у контрольного штамма 6499 кавказского

подвида, в то время как у всех 10 исследованных штаммов из очагов Северного Приаралья он отсутствовал, что подтверждает принадлежность исследованных штаммов к основному подвиду возбудителя чумы.

Определение биоварной принадлежности штаммов *Y. pestis* осуществляли с использованием специфической для средневекового биовара делеции в 24 п.н. в межгенном пространстве с помощью специфических праймеров и зонда MED24, комплементарных соответствующей области делеции. Отсутствие кривых сигнала флуоресценции у исследованных штаммов на графике говорит о принадлежности исследуемых штаммов к основному подвиду средневекового биовара.

Определение MLVA25 генотипов и анализ полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis*

Для анализа популяционной структуры средневекового биовара основного подвида *Y. pestis* из очагов Северного Приаралья мы использовали полногеномные последовательности 21 штамма, секвенированного на базе РосНИПЧИ «Микроб» и относящегося к филогенетической ветви 2.MED1. На дендрограмме исследованные штаммы разделились на две ветви А и В, в каждую из которых вошли штаммы как из Северо-Приаральского, так и Приаральско-Каракумского пустынных очагов. В ветвь А вошло 10 штаммов из Северо-Приаральского и 5 штаммов из Приаральско-Каракумского очагов. Ветвь А делится на подветви А1 и А1. В подветви 1 штаммы разделились на три кластера. В 1 кластере расположен большой подкластер, в который входят 4 штамма из Северо-Приаральского пустынного очага: 580, 578, 605, 600. В этот же подкластер вошел штаммы 615 из Приаральско-Каракумского пустынного очага. Штамм 615 получен от большой песчанки *Rhombomys opimus*, в тот же период, что и 4 предыдущих клинических штамма, что доказывает циркуляцию этой популяции в природном биоценозе Северо-Приаральских очагов чумы. У штаммов этого подкластера отличия выявлены только в локусе ms62, остальные VNTR локусы были у них идентичны. Отдельно в кластере А1-1 расположен штамм 4635 из Приаральско-

Каракумского очага 1959 г. От других штаммов этого кластера его отделяют различия в VNTR локусах – ms46 и ms62 локусах.

Второй кластер этой подветви A1 состоит из одного штамма *Y. pestis* 586, полученного от человека в 1945 г. в Северо-Приаральском пустынном очаге, однако от других штаммов его отличает ms70 локус VNTR и поэтому штамм имеет уникальный для исследованных штаммов генотип.

Третий кластер этой подветви A1 состоит из двух штаммов 621 и 617 выделенных в 1945 от блох большой песчанки. По источнику и времени выделения, а также по структуре генотипа, эти штаммы очень похожи со штаммами из первого кластера, а именно с 600, 605 и 615. Главное их отличие, это значительная разница в количестве аллелей в ms62 локусе. В составе подветви A1 нами выделено 3 генотипов.

Вторая подветвь ветви A – A2 включает три кластера 6, 7, 8, один из которых – 4 содержит три штамма 927, 928, 929 из Северо-Приаральского пустынного очага. Все три штамма выделены в 1955 г. в одном регионе, что объясняет их принадлежность к одному MLVA25 генотипу. Кластер 5 состоит из двух штаммов KM938 и 550, выделенных уже на территории Приаральско-Каракумского пустынного очага: KM938 и 550. Оба штамма получены в 1966 г., имеют одинаковый MLVA25 генотип. Штаммы, образовавшие 4 и 5 кластеры, имеют значительные отличия в одном из наиболее полиморфных локусов ms46. Кластер 6 подветви A2 состоит из одного штамма из Приаральско-Каракумского пустынного очага 1955 г., полученного от большой песчанки. Этот штамм представляет наиболее удаленный от других штаммов подветви A2 MLVA25 генотип, который отличается в локусах ms35 и ms56 на один аллель.

Ветвь B на дендрограмме делится на две подветви B1 и B2. Ветвь B1 включает кластеры 7 и 8. В кластер 7 входят штаммы *Y. pestis* 244 и 247 из Северо-Приаральского пустынного очага и A-1763 из Приаральско-Каракумского пустынного очага. Они имеют одинаковый MLVA25 генотип и отличаются от других по четырем локусам, таким как ms46, ms56, ms62,

ms70. Кластер 8 состоит из двух штаммов 241 и 246, полученных от человека в 1967 г. в Северо-Приаральском пустынном очаге. Эти два штамма имеют идентичные MLVA25 генотипы и отличаются от других штаммов по локусам ms46, ms56, ms62, ms70. Оба кластера 7 и 8 состоят из близких штаммов, время и место выделения которых одинаковы, за исключением штамма А-1763. Отличия в один повтор выявлены лишь в локусе ms62.

Подветвь В2 состоит из одного кластера 9, в который входит 1 штамм – 732, получен от блох большой песчанки в 1955. Исследуемый штамм отличается по ms46 и ms62 локусам. В целом дендрограмма отражает пространственно-временные закономерности разделения штаммов. Ветвь А содержит штаммы 1945-1966 гг. и делится на 6 MLVA25 генотипов. Ветвь В состоит практически из штаммов 1967-1974 гг. и делится на 3 MLVA25 генотипов. Среди них 3 MLVA25 генотипа состоят из единичных штаммов, остальные генотипы включают от 2 до 5 штаммов.

Полногеномный SNP анализ

Для анализа популяционной структуры центральноазиатского подвида *Y. pestis* были использованы полногеномные последовательности 21 штамма секвенированного на базе РосНИПЧИ Микроб, относящегося к филогенетической ветви 2.MED1. В ходе исследования мы построили дендрограмму с выделенными 5 основными филогенетическими узлами, обозначенными как MN1-MN5 (Medieval node). Каждый узел отделяется от других узлов своими уникальными SNPs с образованием отдельных кластеров. Данные по уникальным для каждого кластера SNPs приведены в п 3.2.2 таблице 8.

Узел MN1 отделяет ветку 2.MED1, к которым относятся исследуемые нами штаммы, от эволюционно-предковых штаммов. Для филогенетической ветви MN1 количество SNP составило 7, два из которых SNPs, находящиеся в межгенном пространстве. Гены, в которых произошли замены, участвовали в кодировании нескольких ферментов, таких как: 1-фосфофруктокиназа и тиоредоксинредуктаза, а также в транспортировании АТФ-связывающего белка посредством фосфатных групп. Подветвь дендрограммы, отделяемая узлом

MN2, представлена в основном штаммами из Северного-Приаралья, а также штаммом А-1763 из Приаральско-Каракумского очага, что коррелирует с результатами MLVA25. В данной подветви отличие идет по 11 SNPs, три из которых не находятся в гене. Из дендрограммы видно, что штаммы 244 и 247 отходят непосредственно от ствола подветви и не имеют отличий в количестве SNPs, что совпадает с данными MLVA25 дендрограммы. У штаммов 241 и 246 наблюдаются отличия по трем SNP, хотя на MLVA25 дендрограмме они имеют одинаковый генотип.

M-1299 – центральноазиатская ветка. Данный штамм был взят в выборку, чтобы установить связь Северо-Приаральских и Приаральско-Каракумских штаммов с центральноазиатской ветвью. Поскольку все штаммы из MLVA25 дендрограммы ветви В вошли в центральноазиатскую ветвь SNP дендрограммы, то можно сделать вывод, что ветвь В дендрограммы MLVA25 тоже является центральноазиатской ветвью 2.MED1 средневекового биовара *Y. pestis*.

Следующая ветка (MN3) состоит из двух штаммов из Устюркского очага (85) и из Курдистан Иран (KIM10). Эти штаммы необходимы для того, чтобы установить родство исследуемых штаммов, со штаммами Прикаспийской ветви 2.MED1 средневекового биовара. Все штаммы, лежащие ниже этого кластера на SNP дендрограмме, являются их потомками и также принадлежат к Прикаспийской ветви эволюции 2.MED1. Следующий кластер, отделяемый MN4, составлен штаммами 605, 615, 578, 600 и 580. Эти штаммы были выделены в один год (1945) и преимущественно от людей. У этой подветви выявлено 2 отличных от других SNPs, которые отвечают за BCCT-семейство транспортеров. Все штаммы отходят от ствола подветви отдельными линиями и отличаются большим числом SNPs друг от друга, в то время как на MLVA25 дендрограмме они составляют единый генотип.

Последняя филогенетическая подветвь (филогенетический узел MN5), выделилась на основе трех отличных SNP. Гены, в которых произошли эти замены, в основном отвечают за транспорт белков и регулируют различные

реакции. Важно подчеркнуть, что все замены были произведены на тирозин. В этой подветви (филогенетический узел MN5) образовалось несколько кластеров, которые полностью соответствуют MLVA25 генотипам на MLVA25 дендрограмме. Такие как 550, KM938 и 927, 928, 929. Так же один SNP-генотип имеют штаммы 927, 928 и 929, которые также имеют и одинаковый MLVA25 генотип. Штаммы 617 и 621 не образовали отдельный кластер как по MLVA25 анализу. Из дендрограммы видно, что количество SNPs у данных штаммов отличается в несколько раз. Штаммы, которые на MLVA анализе расположились отдельно, по SNP дендрограмме они также не расположились в существующие кластеры и не сформировали отдельный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всего в работе исследован 21 штамм возбудителя чумы из Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского пустынных очагов. Олигонуклеотидные последовательности праймеров, ранее рассчитанные Le Fleche [2001]. Были найдены и проанализированы участки варибельных tandemных повторов этих штаммов. Произведен подсчет количества tandemных повторов по 25 локусам и составлена сравнительная таблица. Разработана база данных по MLVA25-генотипам штаммов *Y. pestis* из Северного Приаралья, а также сконструирована дендрограмма по 25 VNTR последовательностям. Исследованные штаммы возбудителя чумы были подразделены на 9 MLVA25 кластеров. Проанализирована популяционная структура этих штаммов. Установлено разделение штаммов *Y. pestis* из Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского пустынных очагов на две MLVA25 ветви, соответствующие известному делению штаммов филогенетической ветви 2.MED1 на прикаспийскую и центральноазиатскую ветви. Штаммы из Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского пустынных очагов вошли как в прикаспийскую, так и в центральноазиатскую ветви 2.MED1. В целом установлено, что метод MLVA25 показал хорошую разрешающую способность в отношении изученных штаммов *Y. pestis*. Высокая частота мутаций делает

этот метод удобным и практичным для анализа штаммов, выделенных во время вспышки чумы или других эпидемических событий.

Полученные данные по популяционной структуре штаммов из Северного Приаралья были подтверждены методом полногеномного SNP анализа. Подтверждено деление этих штаммов на две ветви, соответствующие каспийской и центральноази-атской ветвям 2.MED1 средневекового биовара *Y. pestis*. В составе этих ветвей выявлено 5 основных подветвей с филогенетическими узлами MN1-MN5 (MN– medieval node). Идентифицированы маркерные SNPs, уникальные для этих филогеографических групп штаммов. Определены родственные связи штаммов из очагов Северного Приаралья со штаммами из очагов Прикаспия и Центральной Азии. Проведена оценка эффективности использованных методов для молекулярного типирования *Y. pestis*, в ходе которой выявлена симметричность полученных результатов. Метод SNP типирования обладает большим преимуществом при проведении анализа филогенетических связей штаммов различного происхождения, в то время как метод MLVA25 обладает высоким разрешением для деления близкородственных штаммов и может применяться для проведения молекулярной экспертизы случаев и вспышек чумы.

Полученные данные по SNP и MLVA25 генотипированию *Y. pestis* могут быть использованы для составления молекулярных портретов штаммов возбудителя чумы из Северо-Приаральского, Приаральско-Каракумского и сопредельных очагов чумы Центральной Азии, а также для повышения эффективности молекулярного типирования штаммов, распространенных на этих очаговых территориях.

ВЫВОДЫ

1. По результатам проведенного биохимического анализа установлено, что исследованные штаммы из Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского очагов чумы принадлежат к средневековому биовару основного подвида *Yersinia. pestis*, филогенетической ветви 2.MED1, имеют зависимость роста от аминокислот цистеина, фенилаланина, треонина и метионина.

Методом ПЦР в режиме реального времени подтверждена их принадлежность к средневековому биовару. У трех штаммов отсутствует плазида пестициногенности и способность к образованию пестицина, остальные штаммы содержат все три типичные плазмиды *Y. pestis*.

2 По результатам анализа изменчивости генома в 25 локусах вариабельных тандемных повторов выявлено 9 MLVA-25 генотипов у 21 изученного штамма *Y. pestis* из очагов Северного Приаралья. Проведен подсчет количество тандемных повторов по 25 локусам. В программе Bionumerics 7.6 создана База данных MLVA25 генотипов из из очагов чумы Северного Приаралья. Выявлена близкородственность штаммов *Y. pestis* из Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского пустынных очагов.

3. Проведен филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* из Северного Приаралья по данным полногеномного SNP типирования. В структуре популяции 2.MED1 выявлены прикаспийская и центральноазиатская ветвь эволюции и пять филогенетических групп, включающих штаммы из Северо-Приаральского и Приаральско-Каракумского пустынных очагов различных периодов. Установлена необходимость комплексного исследования методов MLVA25 и SNP типирования для повышения эффективности молекулярной идентификации штаммов *Y. pestis* из очагов чумы Северного Приаралья.

