

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

Кафедра биохимии и биофизики

**БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ
ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ПРИБАЛХАШЬЯ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2-го курса 241 группы

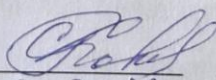
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Сидорина Александра Сергеевича

Научный руководитель:

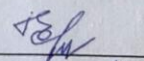
профессор, д.б.н.


30.05.22г.

С.А. Коннова

Научный консультант:

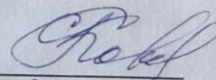
с.н.с., д.б.н.


30.05.22г.

Г.А. Ерошенко

Зав. кафедрой биохимии и биофизики:

профессор, д.б.н.


30.05.22г.

С.А. Коннова

Саратов 2022

ВВЕДЕНИЕ. Чума – особо опасная природно-очаговая инфекция, представляющая серьезную угрозу для населения, особенно для стран, на территории которых расположены природные очаги чумы. В Российской Федерации, других странах СНГ и ближнего зарубежья находятся 45 природных очагов чумы, во многих из которых постоянно регистрируют эпизоотическую активность. Штаммы *Y. pestis* из разных очагов чумы различаются по вирулентности и эпидемической значимости, что необходимо учитывать при мониторинге очагов. В некоторых природных очагах одновременно циркулируют штаммы чумы разных подвидов и с различной вирулентностью, что требует разработки эффективных методов дифференциации и установления ареалов распространения разных подвидов и биоваров возбудителя чумы.

Согласно зарубежной классификации штаммы основного подвида делят на три биовара - античный, средневековый и восточный. Штаммы античного и средневекового биоваров циркулируют в очагах чумы в России и других странах СНГ. Наиболее распространены штаммы средневекового биовара, циркулирующие в 7 из 11 очагов Российской Федерации и в большинстве очагов стран СНГ.

На сегодняшний день очаги Прибалхашья характеризуются постоянной эпизоотологической активностью, ранее на этой территории неоднократно регистрировали вспышки и случаи заболевания чумой человека. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов возбудителя чумы из очагов Прибалхашья в Казахстане, сопредельных очагов стран Центральной Азии и Китая необходима для разработки эффективных методов дифференциации штаммов чумного микроба по географическому региону происхождения и установлению путей заноса инфекции.

В настоящее время назрела необходимость включения в паспортные характеристики природных очагов свойства, распространенных в них штаммов *Y. pestis*. Опасность заражения чумой человека на очаговых территориях и ее эпидемического распространения зависит от вирулентности и эпидемической

значимости, циркулирующих там штаммов чумного микроба. Свойства распространенных в очагах Прибалхашья штаммов исследованы недостаточно. Традиционно их относили к песчаночьему варианту возбудителя чумы без учета используемой подвидовой классификации возбудителя чумы.

Решение проблемы дифференциации штаммов средневекового биовара от других биоваров и подвидов, а также внутрибиоварная дифференциация важны с практической точки зрения, поскольку штаммы *Y. pestis* разных подвидов и биоваров значительно отличаются по вирулентности и о эпидемической значимости. Эти данные необходимы для проведения молекулярной диагностики и исследований вспышек чумы или единичных случаев заболевания, а также для повышения эффективности эпидемиологического мониторинга очагов.

Цель исследования: определение биохимических и генетических особенностей штаммов возбудителя чумы из природных очагов Прибалхашья.

Задачи исследования:

1. Выявление биохимических особенностей штаммов из Прибалхашского, Муонкумского и Таукумского пустынных очагов чумы.
2. Установление подвидовой/биоварной принадлежности штаммов *Yersinia pestis* из этих очагов чумы методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).
3. Анализ изменчивости генома популяций *Y. pestis* из очагов Прибалхашья по 25 локусам варибельных tandemных повторов. Определение MLVA25 генотипов штаммов из этих очагов. Построение дендрограммы родственных связей по данным мультилокусного VNTR-анализа штаммов *Y. pestis* из очагов Прибалхашья.
4. Конструирование и анализ филогенетического дерева штаммов *Y. pestis* из очагов чумы Прибалхашья по данным полногеномного SNP анализа.

Исследования выполнялись с использованием современных методов, обычно используемых для решения поставленных задач. Было проведено культивирование микроорганизмов в оптимальных для роста условиях.

Охарактеризованы биохимические особенности бактерий. Для проверки зависимости роста штаммов возбудителя чумы от присутствия в среде ионов кальция использовали среду Хигучи-Смита. Изучение зависимости роста от питательных потребностей проводили с использованием минимальной синтетической среды, предложенной R. Brubaker с некоторыми модификациями. Определение плазмидного профиля проводили в соответствии с рекомендациями С. Kado. Выделение ДНК и проведение ПЦР осуществляли согласно требованиям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Полногеномный SNP анализ осуществляли с помощью набора программ: Wombac 2.0, PhyML 3.1, FigTree 1.4.4. Получение локусов для проведения мультилокусного VNTR анализа использовали олигонуклеотидные последовательности праймеров, опубликованные Le Fleche и рассчитанные нами. Для анализа MLVA25 и построения дендрограмм использовали набор программ: MEGA7, Bionumerics 7.6, TRF.

Структура магистерской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 83 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: описание природных очагов чумы Прибалхашья – Мойынкумского, Таукумского и Прибалхашского пустынных очагов; общая характеристика свойств штаммов *Y. pestis*; методы молекулярного типирования возбудителя чумы.

Основное содержание работы. В работе использован 21 штамм *Y. pestis*, выделенный в природных очагах Прибалхашья – Мойынкумском, Таукумском и Прибалхашском. На первом этапе исследования основной задачей был отбор штаммов с типичными свойствами и получение их полногеномных и фрагментных последовательностей для использования в качестве референсов во время всего анализа. Селекцию штаммов проводили по следующему принципу. Штаммы должны иметь типичные культуральные и морфологические

характеристики *Y. pestis*, проявлять биохимическую активность, свойственную штаммам данного региона. В результате было отобрано 10 штаммов с типичными для песчаночьего варианта основного подвида свойствами (таблица 1).

Определение подвидовой/биоварной принадлежности штаммов *Y. pestis* из очагов чумы проводили методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. Дифференциацию штаммов *Y. pestis* выявляли по наличию характерной для подвида/биовара делеции.

Отобранные штаммы *Y. pestis*, были исследованы по их биохимической активности (таблица 1).

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

Биохимические свойства Штаммы	Ферментация рамнозы	Ферментация глицерина	Денитрификация
А-1753	—	+	—
М-1120	—	+	—
КМ806	—	+	—
139	—	+	—
141	—	+	—
133	—	+	—
А-1760	—	+	—
505	—	+	—
40	—	+	—
А-1778	—	+	—
EV (контроль)	—	—	+
1146 (контроль)	+	+	+
1836 (контроль)	—	+	+
4 (контроль)	—	+	—

Примечание: — отсутствие активности; + наличие активности

Таким образом, изученные нами штаммы, *Y. pestis*, выделенные на территории Мойынкумского, Таукумского и Прибалхашского природных очагов чумы, по комплексу биохимических признаков (редукция нитратов, ферментация глицерина и рамнозы) принадлежат к средневековому биовару, что совпадает с результатами ПЦР анализа.

Помимо изучения биохимических характеристик была проведена оценка питательных потребностей исследуемых штаммов. Установлено, что на среде с минимальном агаром рост отсутствовал у всех штаммов кроме *Y. pseudotuberculosis*. Также все проявляли зависимость в росте от 4-х аминокислот: цистеин, фенилаланин, треонин, метионин. Изоляты из Мойынкумского района не нуждались в аргинине и лейцине, в то время как Таукумские проявили слабую зависимость от лейцина. Большинство штаммов из Прибалхашского природного очага чумы также не нуждались в аргинине и лейцине за исключением штамма 133.

По признаку пигментации 8 из 10 штаммов имели устойчивый Pgm+ признак, т. е. популяция которых постоянно содержала более 80% пигментированных красных колоний на среде с конго красным. Штаммы 139 и 141 состояли, в основном, из слабопигментированных (розовых) колоний, количество которых не превышало 50%.

При изучении плазмидного состава 10 штаммов возбудителя чумы из природных очагов чумы Прибалхашья установлено, что подавляющее большинство из них (60%) содержали три типичные для возбудителя чумы плазмиды – pFra, pCad и pPst. Исключение составили штаммы А-1753, М-1120, 505, 139, у которых отсутствовала плазида пестициногенности. Плазида pFra присутствовала у всех штаммов, pCad отсутствовала только у контрольного штамма КМ227.

Все 10 штаммов проявили признак роста на магниевом-оксалатном агаре при 28 °С, в том числе положительный контроль EV. Таким образом у исследованных штаммов была выявлена зависимость от ионов кальция, детерминируемая плазмидой pCad, и подтверждено ее наличие.

У изолятов А-1753, М-1120, 505, 139 отсутствовала плазида пестициногенности. Торможение роста индикаторного штамма вокруг большинства исследованных штаммов подтверждало отсутствие плазмиды pPst.

Для анализа популяционной структуры штаммов *Y. pestis*, распространенных на территории Юго-Востока Республики Казахстан, были

использованы полногеномные и фрагментные последовательности ДНК из Мойынкумского, Таукумского и Прибалхашского природного очага чумы, секвенированные на базе РосНИПЧИ «Микроб».

Исследованные штаммы возбудителя чумы разделились на семнадцать MLVA25-генотипов (рисунок 1). Проведен подсчет количества tandemных повторов по 25 локусам VNTR (программа TRF). Все 25 локусов VNTR, рассмотренных в настоящем MLVA25 анализе, могут быть амплифицированы с помощью ПЦР.

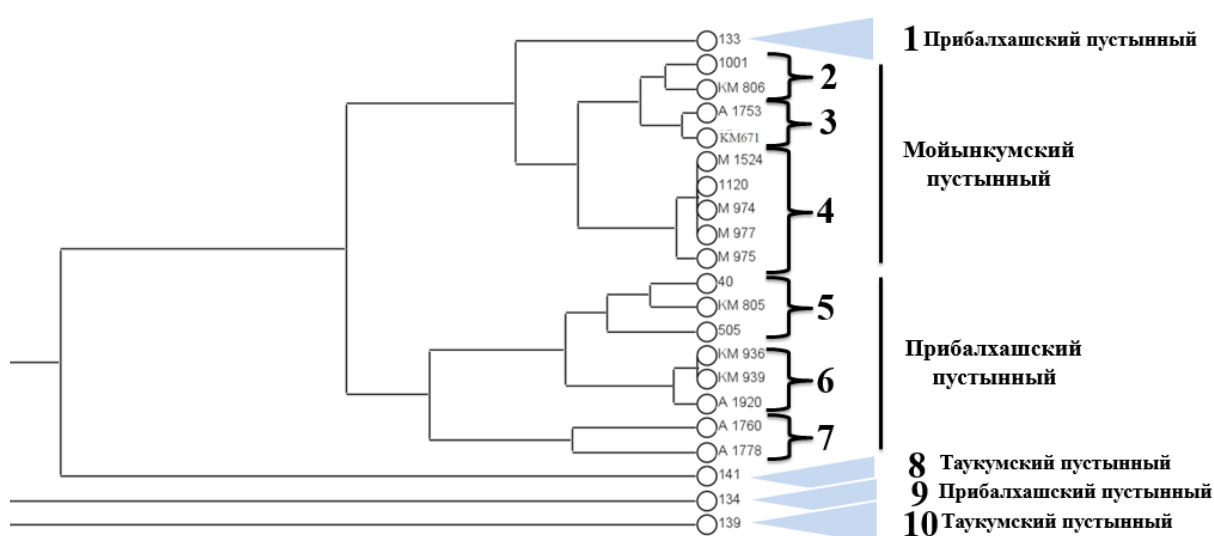


Рисунок 1 - Дендрограмма MLVA 25-генотипов штаммов *Y. pestis*, выделенных из очагов Прибалхашья

Под цифрами 1, 8, 9 и 10 обозначены единичные изоляты, выделенные из трех очагов. Штаммы 133 и 134 выделены в одной семье, с разницей в 2 недели в Джаркентском районе в 1929 г. Разница в 12 VNTR локусах послужила причиной их отнесения к крайним ветвям относительно друг друга, что говорит о больших генетических различиях между ними. Пролегающие на территории Прибалхашского очага чумы торговые пути из Китая в Центральную Азию могли привести к заносу новых штаммов чумы на территорию Казахстана. Таким образом, заболевания людей разными штаммами *Y. pestis* 133 и 134 и, как следствие, различия в положении на дендрограмме могут быть связаны с разным происхождением этих штаммов.

Номерами 8 и 10 обозначены два штамма – 139 и 141 выделенные в Таукумском природном очаге чумы. Разница в пяти локусах не позволила им войти в общий кластер с другими штаммами. Отнесение их к разным ветвям обусловлено разницей в количестве повторов двух аллелей ms01 и ms07.

Другие исследованные штаммы поделились на две большие группы, в соответствии с принадлежностью к Мойынкумскому и Прибалхашскому природным очагам. Первая группа из Мойынкумского очага чумы включает три кластера №2-№4 и шесть MLVA25-генотипов. Кластер 2 представлен двумя штаммами: 1001 и KM806, выделенные в Мойынкумском районе Жамбылской области Казахстана. Гомология по повторам VNTR составляет 92%. Кластер №3 на дендрограмме включает два штамма А-1753 и KM671, выделенные в Казахской ССР в Муюнкумском очаге. Гомология составляет 92%.

Следующий кластер №4 на дендрограмме представлен двумя MLVA-генотипами. Первый включает 4 штамма: М-1524, М-1120, М-977 и М-974, другой только один штамм М-975. Все пять изолятов имеют генетическое сходство по VNTR повторам, за исключением локусов ms01 и ms62 у штамма М-975. Разница в ms01 и ms62 локусах послужила причиной вынесения штамма *Y. pestis* М-975 в отдельный MLVA25-генотип.

Вторая группа на дендрограмме представлена 8 штаммами из Прибалхашского пустынного очага и делится на три кластера №5-№7. Кластер №5 включает три штамма выделенные от большой песчанки в разные годы: штаммы 40 и KM805 отошли в отдельный подкластер на дереве (процент гомологии 88%), штамм 505 составил отдельный подкластер на дендрограмме из-за наличия разницы по четырем локусам VNTR повторов: ms46, ms56, ms62, ms70.

Кластер №6 состоит из трех штаммов *Y. pestis*, выделенные в конце 80-х годов в Казахской ССР. Сюда вошли штаммы *Y. pestis* KM936, KM939, А-1920. KM936 и KM939 образуют один MLVA-генотип (гомология 100%), в то время как штамм А-1920 лег отдельной ветвью из-за разницы в локусе ms56. Еще

один кластер – №7 на дендрограмме представлен двумя штаммами из Прибалхашского очага: A-1778 и A-1760. Гомология 100%.

Таким образом, высокая частота мутаций в VNTR областях позволяет выделить генетически однородные линии. Среди всех локусов VNTR количество аллелей, входящих в один локус, варьировало от 1 до 8. VNTR локус ms62 был высоко полиморфным и выявил восемь аллелей у штаммов из очагов Прибалхашья. VNTR-локус ms46 имел шесть вариантов, ms70 – четыре варианта. В локусах VNTR ms56 и ms07 обнаружены три аллеля. Двумя вариантами представлены локусы ms01, ms04, ms06, ms20, ms38, ms41, ms45 ms73 и ms74. Все остальные участки имели идентичное число повторов, равное одному, и соответственно, были представлены лишь 1 вариантом аллеля.

В коровой области штаммов было идентифицировано 1164 полиморфных SNPs, которые были применены для конструирования дендрограммы исследуемых штаммов *Y. pestis* (рисунок 2). Построенная дендрограмма отражает популяционную структуру *Y. pestis* на территории природных очагов Прибалхашья.

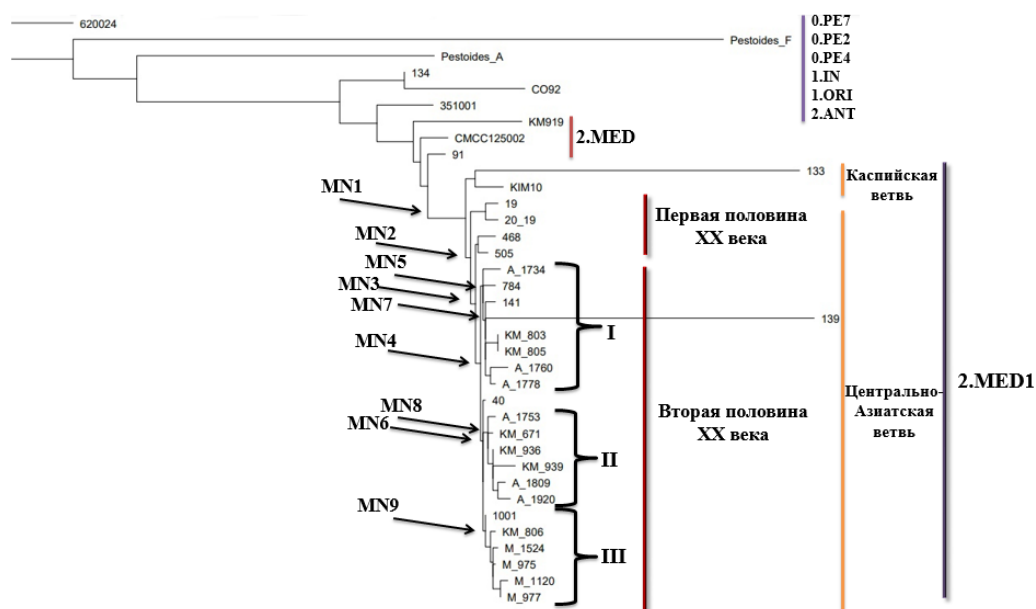


Рисунок 2 – Филогения штаммов *Y. pestis* из очагов Прибалхашья по данным полногеномного SNP анализа 36 штаммов различного происхождения. Метод Maximum Likelihood с моделью замен GTR при помощи программы PhyML 3.1

Ветвь 2.MED1 представлена двумя ветвями: Каспийская и Центральноазиатская. Большая часть исследуемых нами штаммов из очагов Прибалхашья относится ко второй ветви – Центральноазиатской. Штамм 133, выделенный на территории Центральной Азии, на дендрограмме расположен в одном кластере с KIM10, что говорит о его заносе в Прибалхашский природный очаг из Прикаспия.

Самыми ранними штаммами известными в Центральноазиатской ветви (рисунок 2, MN2 – 2 SNPs) являются штаммы 19 и 20, выделенные во время вспышки чумы Ак-Камыш в 1923/1924 г. Вследствие долгой циркуляции произошло их укоренение на территории Прибалхашья и через 10 лет в округе города Жаркент из природы (от большой песчанки) были выделены два штамма 505 и 468 в 1938 и 1939 г. (рисунок 2, MN3 – 2 SNPs). На этом был окончен эпизоотический период первой половины 20-го века в Прибалхашье.

Во второй половине XX века сформировались новая центральноазиатская ветвь линии 2.MED1 (рисунок 2, MN4 – 2.SNPs), которая в свою очередь разделилась на две подветви (MN5 – 1 SNP и MN6 – 1 SNP). Подветвь 1 начала второй половины XX века, отходящая от филогенетического узла MN5 представлена на дендрограмме одним кластером №I и в основании содержит штаммы из Аксайского высокогорного очага в Киргизской Республике (штамм А-1734) и Кызылкумского пустынного очага в Узбекистане (штамм 784), что возможно указывает на происхождение этой подветви в южных очагах чумы Центральной Азии. От нее отходит кластер (MN7 – 1.SNP), включающий преимущественно штаммы из очагов Прибалхашья 1963-1982 гг., которые по-видимому являются потомками штаммов из южных очагов Центральной Азии. Вторая ветвь разделилась на 2 крупных кластера II и III.

Кластер II представлен штаммами, выделенными в основном из очагов Прибалхашья в период с 1966 по 1989 г. (MN8 – 2 SNPs). В основании кластера лежат два штамма из Мойынкумского природного очага чумы: А-1753 и КМ671. Далее отходит подветвь штаммов, выделенных в восьмидесятых годах прошлого столетия. Среди них три штамма из Прибалхашского природного

очага чумы: KM936, KM939 и A-1920; и один штамм A-1809 из Таласского природного очага.

Кластер III (MN9 – 1 SNPs) представлен шестью штаммами из Мойынкумского природного очага чумы, выделенными с 1965 по 1993 г. Отдельной ветвью среди этих двух кластеров лежит штамм 40, полученный из Прибалхашского природного очага.

Заключение. Результаты филогенетического анализа, полученные с помощью методов генотипирования MLVA25 и полногеномного SNP анализа, в целом совпадали. Однако метод SNP типирования хорошо воспроизводил долговременную эволюцию штаммов *Y. pestis* средневекового биовара филогенетической ветви 2.MED1 из очагов Прибалхашья, а метод MLVA25 делил штаммы на большое число генотипов ввиду большей скорости мутирования VNTR локусов, что в то же время ограничивает его применение для реконструкции эволюции штаммов чумного микроба. Метод MLVA25 не позволяет проводить эволюционный анализ филогенетических взаимоотношений штаммов *Y. pestis*, но корректно группирует эти штаммы по очагу или времени их происхождения, часто более эффективно, чем метод анализа SNP. Вследствие этого он может быть полезен при эпидемиологическом мониторинге за природными очагами чумы и случаями эпидемиологических осложнений.

Таким образом, изучение штаммов из природных очагов чумы Прибалхашья показало, что практически все они являются типичными штаммами средневекового биовара основного подвида филогенетической ветви 2.MED1. В отношении дифференциальных биохимических признаков они способны ферментировать глицерин, не способны ферментировать рамнозу и редуцировать нитраты. Эти штаммы являются ауксотрофами по аминокислотам: фенилаланину, треонину, метионину, цистеину; не нуждаются в аргинине и лейцине.

1. **Выводы.** По данным проведенного биохимического анализа штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов чумы Прибалхашья –

Мойынкумского, Таукумского и Прибалхашского установлено, что они относятся к средневековому биовару основного подвида, являются ауксотрофами по аминокислотам цистеину, фенилаланину, треонину и метионину. Большинство штаммов содержит три типичные плазмиды *Y. pestis* за исключением четырех штаммов, у которых отсутствует плазида пестициногенности pPst. Методом ПЦР в режиме реального времени подтверждена их принадлежность к средневековому биовару.

2. По результатам анализа изменчивости генома в 25 локусах варибельных tandemных повторов выявлено 17 MLVA-25 генотипов у 21 изученных штаммов *Y. pestis* из очагов Прибалхашья. Наиболее изменчивыми являются локусы ms62, ms46, ms70, ms56 и ms07, копияность которых варьирует от 1 до 8 копий, что обеспечивает эффективное разделение штаммов из очагов Прибалхашья. Выявлена взаимосвязь MLVA25 генотипов с территориями распространения штаммов в природных очагах Прибалхашья.

3. По данным полногеномного SNP анализа установлена принадлежность исследованных штаммов к филогенетической ветви 2.MED1 средневекового биовара. В структуре популяции 2.MED1 из Прибалхашья в XX веке выявлены три филогенетические группы, включающие штаммы первой половины XX из Прибалхашского пустынного очага; штаммы 1951-1982 гг. из Прибалхашского и Таукумского природных очагов и штаммы 1965-1993 гг. преимущественно из Мойынкумского пустынного очага чумы. Выявленные MLVA25 и SNP генотипы *Y. pestis* из очагов Прибалхашья создают основу для филогеографической идентификации штаммов из этих природных очагов.