

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

Кафедра биохимии и биофизики

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ  
ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ИЗ ОЧАГОВ ВОСТОЧНОГО ПРИКАСПИЯ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Шевченко Константина Сергеевича

Научный руководитель:

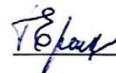
зав. кафедрой биохимии и биофизики,

профессор, док. биол. наук

 С. А. Коннова

Научный консультант:

с. н. с. док. биол. наук

 Г. А. Ерошенко

Заведующий кафедрой:

профессор, док. биол. наук

  
30.05.24 С. А. Коннова

Саратов 2024

**Введение.** Чума — одно из наиболее опасных бактериальных инфекционных заболеваний, летальность при котором достигает 30-50%. Чума эндемична для стран Азии (Монголия, Китай, Индия), Африки (Танзания, Демократическая Республика Конго, Уганда, Мадагаскар), Америки (Боливия, США, Перу), а также для Российской Федерации и других стран СНГ (Казахстан, Туркменистан, Киргизия, Таджикистан, Армения, Азербайджан), на территории которых имеются природные очаги, многие из которых являются активнoдействующими. Из них особого эпидемиологического надзора требуют те очаги, в которых циркулируют вирулентные и эпидимически значимые штаммы, относящиеся к основному подвиду. Именно они и встречаются в большинстве природных очагов России и сопредельных с ней стран ближнего зарубежья. Данные очаги локализованы на территории Прикаспия, Кавказа, Сибири и Центральной Азии.

На данный момент из-за потепления климата и уменьшения уровня Каспийского моря природные очаги Прикаспия находятся в неактивном состоянии. При этом на сопредельной с ними территории Казахстана в Прибалхашье и Северном Приаралье отмечается постоянная активность природных очагов чумы. Установлено что, на их территории распространены штаммы чумного микроба средневекового биовара, явившихся этиологическими агентами вспышек чумы в XX веке в Центральной Азии, Китая, Казахстана, Туркменистана и России.

Активные социокультурные и экономические связи с Республикой Казахстан, а также наличие протяженной границы природных очагов создают предпосылки для заноса эпидимически опасных штаммов возбудителя чумы на территорию России и других сопредельных государств. Поэтому за состоянием природных очагов на территории стран СНГ необходимо проводить постоянный эпидемиологический контроль, для которого в связи с широким развитием молекулярно-генетических технологий теперь применяется молекулярно-генетические технологии, такие как

высокопроизводительное секвенирование с последующим анализом полученных геномных данных. Для чумного микроба наиболее популярными методами молекулярно-генетического анализа являются метод мультилокусного анализа переменного числа tandemных повторов – MLVA (от англ. Multiple Locus VNTR analysis) и полногеномный анализ полиморфизмов единичных нуклеотидов (Single Nucleotide Polymorphism, SNP).

Из очаговой территории Прикаспия значительный интерес имеет его восточная часть. На это есть несколько причин:

1) Площадь территории занимаемой природными очагами чумы в Восточном Прикаспии составляет порядка 600000 км<sup>2</sup>;

2) На территории Устюртского пустынного очага практически ежегодно начиная с 1958 года выявляются локальные эпизоотии чумы;

3) Существует вероятность заноса высоковирулентных штаммов *Y. pestis* средневекового биовара в РФ из сопредельных очагов чумы Восточного Прикаспия, что требует получения данных по комплексной характеристике штаммов из этих очагов.

**Объект исследования:** полногеномные последовательности 52 штаммов *Y. pestis*, изолированных в природных очагах чумы на территории Восточного Прикаспия.

Для реализации цели исследования были поставлены и решались следующие задачи:

1) Провести MLVA типирование штаммов *Y. pestis* из очагов чумы Восточного Прикаспия (Каракумского, Мангышлакского, Устюртского и Копетдагского пустынных очагов чумы) с оценкой полиморфизма 25 VNTR-локусов переменных tandemных повторов и определением MLVA25-генотипов;

2) Исследовать популяционную структуру и филогению штаммов *Y. pestis* из Восточного Прикаспия на основе данных полногеномного SNP анализа.

Структура магистерской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе 70 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: характеристика заболевания – чумы и ее возбудителя; систематика возбудителя чумы; геном и эволюция возбудителя чумы; методы генотипирования чумного микроба и характеристика природных очагов Восточного Прикаспия.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**MLVA25-анализ.** Была написана авторская консольная python-утилита для поиска нуклеотидных последовательностей 25 VNTR-локусов по заданным последовательностям фланкирующих праймеров в полногеномных последовательностях изучаемых штаммов. По его результатам у 52 штаммов выявлено наличие всех искомым локусов за исключением ms09. Далее проанализировали оставшиеся 24 локуса на вариабельность при помощи индекса аллельного полиморфизма  $h$ .

На основе полученных результатов установлено, что среди изученных VNTR-маркеров 14 были абсолютно мономорфны ( $h = 0$ ) и представлены лишь одним аллелем, в каждом из которых число tandemных повторов варьирует в интервале от 4 до 9 в зависимости от маркера. Из оставшихся 10 локусов 6 были более изменчивы ( $h=0,04-0,23$ ) и имели от 2 до 3 вариантов аллелей. Оставшиеся 4 VNTR-маркера обладали очень высокой вариабельностью ( $h=0,6-0,78$ ), но в тоже время друг от друга они значительно отличались числом аллелей (3, 6, 8 или 11).

Далее выявленные VNTR-профили исследуемых штаммов *Y. pestis* отфильтровали по уникальности и получили 24 аллельных сочетаний (MLVA-генотипов), названных EC1-24 (EC – East Caspian). Несмотря на исключение из исследования локуса ms09, результаты, полученные при помощи MLVA25-анализа, были значимы, о чем говорит величина  $HGDI = 0,9$ . Среди выявленных MLVA-генотипов 17 были уникальны, то есть выявлены лишь у единичных штаммов, в то время как оставшиеся 7 объединили от 2 до 15 штаммов чумного микроба.

После для установления ассоциации и уровня ее значимости между MLVA-генотипами и свойствами штаммов, у которых они выявлены, строили соответствующие таблицы сопряженности и проводили их статистический анализ. По его результатам установлено, что в отношении объекта выделения выявлена сильная статистически значимая ассоциация, в то же время в отношении года выделения, места выделения и очаговой принадлежности ассоциация были с очень сильной.

Затем для установления родства между изучаемыми штаммами проводили иерархический кластерный анализ с использованием в качестве метрики для построения матрицы расстояний категориальный коэффициент и метод UPGMA для группировки данных. По результатам проведенного анализа получено неукорененное ультраметрическое дерево, отражающее родственные связи штаммов чумного микроба, выделенных в природных очагах Восточного Прикаспия. На нем можно выделить 8 четко обособленных кластеров, объединяющих штаммы в соответствии с территориальным и временным происхождением, а также очаговой принадлежностью.

**SNP-анализ.** Для изучения популяционной структуры возбудителя чумы на территории Восточного Прикаспия для каждого исследуемого штамма при помощи программы snippy v. 4.6 составляли профили коровых SNPs и на их основе строили филогенетическое дерево.

На его основе установлено, что все исследуемые штаммы относят к каспийской и центральноазиатской подветвям филогенетической ветви 2MED1.

В состав каспийской подветви 2MED1 вошел 21 штамм чумного микроба, 12 из которых были изолированы на территории Каракумского природного очага в период с 1949 по 1970 год, а 9 оставшихся приходились на Устюртский, Мангышлакский и Копетдагский очаги (4, 3 и 2 штамма, соответственно). Данная подветвь имеет сложную внутреннюю структуру и включает в себя два филогенетических узла с субкластерами разного порядка. В ее начало легли 3 наиболее старых штамма, выделенные в 1926, 1927 и 1949

годах, которые, по-видимому, являются непосредственными потомками штаммов из Северного Прикаспия первой половины XX века.

От них в дальнейшем отделяется субкластер 1 (филогенетический узел III), образованный 4 штаммами, преимущественно изолированными на территории Казахской ССР в период с 1962 по 1978 год. Штаммы данной группы, по-видимому, являются представителями штаммов *Y. pestis* каспийской ветви первой половины XX века, закрепившейся и сохранившейся здесь во время межэпизоотического периода в середине прошлого века.

Далее от этой группы штаммов узел IV отделяет новую ветвь, представляющую собой политомию, само наличие которой говорит о наступлении благоприятных условий для экспансии чумного микроба на данной территории. Штаммы, отделенные узлом IV по-видимому, являются потомками вернувшейся из Северного Приаралья каспийской популяции, что видно по их положению на филогенетическом дереве.

Центрально-азиатская подветвь, отделенная от ветви 2MED1 узлом V, была гомогенной по своему составу и вобрала в себя 31 штамм чумного микроба, изолированный исключительно на территории Каракумского пустынного очага и являющийся потомками штаммов из Прибалхашья.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всего в работе исследовано 52 штамма *Y. pestis* из очагов Восточного Прикаспия. Для поиска и извлечения из последовательностей бактериальных геномов интересующих нас нуклеотидных последовательностей VNTR-локусов использовалась авторская консольная python-утилита и последовательности праймеров, ранее рассчитанные Le Fleche в 2001 году. По результатам поиска во всех полногеномных последовательностях 52 штаммов выявлено наличие всех искомым локусов за исключением ms09, встретившегося лишь у 33 штаммов и по этой причине исключенного из дальнейшего анализа. Далее для установления числа tandemных повторов в идентифицированных нуклеотидных последовательностях использовали программу TRF (Tandem Repeats Finder) v. 4.0. По результатам статистического анализа полученных

данных установлено, что из исследованных VNTR-маркеров 14 были абсолютно мономорфны ( $h=0$ ), 6 обладали небольшой изменчивостью ( $h=0,04-0,23$ ) и 4 отличались высокой вариабельностью ( $h=0,6-0,78$ ).

Далее отсортировав полученные аллельные профили по уникальности, мы установили, что исследуемая выборка штаммов делится на 24 MLVA25-генотипа. Среди них 17 были характерны для единичных штаммов, а оставшиеся 7 объединили от 2 до 15 штаммов чумного микроба. Полученные результаты типирования несмотря на исключение локуса *ms09* из анализа были статистически значимы ( $HGDI = 0,9$ ). Посредством статистического анализа установлено, что выделенные MLVA25-генотипы в отношении объекта выделения имели сильную значимую ассоциацию, в то же время в отношении года выделения, места выделения и очаговой принадлежности ассоциация были значимой и очень сильной. Полученные данные важны для проведения молекулярной идентификации штаммов из природных очагов Восточного Прикаспия и повышения эффективности молекулярно-эпидемиологического мониторинга этой территории.

Методом полногеномного SNP-анализа мы исследовали популяционную структуру возбудителя чумы на территории природных очагов Восточного Прикаспия. Анализ полногеномных последовательностей проводили с помощью программы *snippy v 4.6*, полученные профили коровых однонуклеотидных замен очищали от гомоплазийных SNP, после чего строили филогенетическое дерево и визуализировали его в программах *FastTree* и *FigTree v. 1.4.3*, соответственно.

По результатам проведенного SNP-анализа установлено деление исследованных штаммов *Y. pestis* на две ветви, соответствующие центральноазиатской и каспийской подветвям ветви 2MED1. В их составе выявлено 6 крупных филогенетических узлов, для каждого из которых также были выявлены характерные маркерные SNP, уникальные для этих филогеографических групп. Изучена филогенетическая история природных очагов чумы Восточного Прикаспия, а именно установлено что:

1) На территории Устюртского пустынного очага на протяжении проанализированного временного интервала существовала исключительно каспийская популяция, берущая свое начало от штаммов, существовавших здесь с начала XX века.

2) На территории Мангышлакского пустынного очага выявлено наличие двух каспийских популяций чумного микроба, одна из них является потомками штаммов, существовавших здесь с начала XX века, а другая произошла от штаммов из Северного Приаралья.

3) На территории Копетдагского низкогорного очага в течении изученного периода установлено существование только каспийской популяции, произошедшей от штаммов пришедших из Северного Приаралья.

4) На территории Каракумского пустынного очага существовала каспийская популяция чумного микроба, берущая свое начало от штаммов, существовавших здесь с начала XX века, позже сменившаяся каспийской популяцией из северного Приаралья, которая в свою очередь в середине второй половины XX была заменена центрально-азиатской популяцией из Прибалхашья.

