

УДК 616.981.51

Б.К. КУРМАНОВ<sup>1</sup>, Б.Б. АТШАБАР<sup>1</sup>, Г.Е. САРИЕВА<sup>3</sup>, А.А. АБДИРАСИЛОВА<sup>1</sup>, З.Ж. АБДЕЛ<sup>1</sup>,  
Ш. БАХТЫБЕККЫЗЫ<sup>1</sup>, А.С. ЖУНУСОВА<sup>1</sup>, Н.К. МУКАШЕВ<sup>1</sup>, Н.П. КАБЫШЕВА<sup>1</sup>, А.К. КАСЕНОВА<sup>1</sup>,  
Л.Е. НЕКРАСОВА<sup>1</sup>, Э.Ж. БЕГИМБАЕВА<sup>1</sup>, С.Т. АБДИКАРИМОВ<sup>2</sup>, А.К. ЖАПАРОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева,  
Комитет по защите прав потребителей, МНЭ РК, г. Алматы, Казахстан,

<sup>2</sup>Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций МЗ КР, г. Бишкек, Кыргызстан,

<sup>3</sup>Иссык-Кульский государственный университет им. Тыныстанова, г. Каракол, Кыргызстан

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ СРЕДНЕАЗИАТСКОГО ПУСТЫННОГО И ТЯНЬ-ШАНСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ОЧАГОВ ЧУМЫ



Курманов Б.К.

Штаммы чумного микроба в Казахстане имеют довольно широкий диапазон вариаций биохимических признаков. Большинство они относятся к биовару *Mediaevalis* (пустынные и степные очаги), однако встречаются и штаммы, относящиеся к биоварам *Antiqua* и *Microtus* (горные очаги). Несмотря на то, что биохимический анализ является стандартным методом типирования бактерий, он имеет свои недостатки. Для получения более точной картины филогенетического родства казахстанских штаммов чумного микроба актуальным является проведение молекулярно-генетических исследований.

**Цель исследования.** Проведение генетического анализа штаммов (изолятов) *Y.pestis* из двух природных очагов чумы с разными экологическими условиями: Среднеазиатского пустынного и Тянь-Шанского высокогорного.

**Материал и методы.** 42 изолята чумного микроба, выделенные на территории Среднеазиатского пустынного (Северо-Приаральский, Приаральско-Каракумский и Арыскумско-Дарьялыктакырский автономные очаги) и Тянь-Шанского высокогорного (Сарыджазский автономный мезоочаг) природных очагов, штаммы *Y.pseudotuberculosis* 2841 и 433 и вакцинный штамм *Y.pestis* EV-76.

Исследование проводилось путем амплификации 24 наиболее вариабельных VNTR локусов с последующей детекцией результатов методом горизонтального гель-электрофореза. Филогенетический анализ проводился с помощью программы PAUP 4.0 по алгоритму UPGMA.

**Результаты и обсуждение.** Получены данные о размерах всех 24 целевых VNTR локусов исследуемых изолятов, составлена бинарная матрица и проведен филогенетический анализ. Полученное филогенетическое древо показало, что исследуемые изоляты чумного микроба принадлежат к трем биоварам: *Antiqua*, *Mediaevalis* и *Microtus*. При этом, к биовару *Mediaevalis* были отнесены все изоляты, выделенные в Среднеазиатском пустынном очаге чумы, а также два изолята из Сарыджазского автономного очага. К биовару *Antiqua* отнесены 19 из 22 изолятов, выделенных на территории Сарыджазского автономного очага чумы, а к биовару *Microtus* (группа пестоидов) был отнесен изолят SZ-4, который по структуре своих VNTR локусов был близок древним представителям чумного микроба: *Y. pestis* Angola, *Y. pestis* 3771 и *Y. pestis* *Pestoides* F.

**Выводы.** С помощью VNTR анализа выявлено, что в условиях горного климата Сарыджазского очага, в популяциях сурков и мышевидных грызунов, циркулируют в основном штаммы древних ветвей чумного микроба: биоваров *Antiqua* и *Microtus*. В условиях пустынного климата Среднеазиатского природного очага, в популяциях разных видов песчанок, циркулируют, в основном, представители биовара *Mediaevalis*.

**Ключевые слова:** чума, *Yersinia pestis*, природные очаги чумы, генотипирование, мультилокусный VNTR анализ, филогенетическое древо.

**Ч**ума – особо опасная природно-очаговая карантинная инфекция, характеризующаяся чрезвычайно высокой заразностью и летальностью. В истории человечества известны, по меньшей мере, три пандемии чумы, унесшие сотни миллионов человеческих жизней. Считается, что родиной чумы является регион, захватывающий территории Монголии, Китая, Индии, России и Центральной Азии [1, 2, 3]. Именно здесь находятся наиболее древние крупные и активные очаги этой инфекции.

Возбудителем чумы является грамтрицательная бактерия *Yersinia pestis* (чумная палочка). Род *Yersinia* относится к семейству Enterobacteriaceae и включает 14 видов, три из которых являются патогенными для человека: *Y.pestis* (возбудитель чумы), *Y.pseudotuberculosis* (возбудитель псевдотуберкулеза) и *Y.enterocolitica* (возбудитель кишечного иерсиниоза). В природе чумная палочка сохраняется в популяциях своих основных хозяев – грызунов (песчанок, сурков, сусликов, полевок и т.д.) и переносится блохами [4, 5, 6].

**Контакты:** Курманов Бержан Коразович, PhD, снс референс-лаборатории Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева, КЗПП МНЭ РК, г. Алматы. Тел. + 7 701 726 4328, e-mail: berzhan@bk.ru

**Contacts:** Berzhan Kurmanov, PhD, Senior researcher of reference laboratory of Aikimbayev's Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Committee on Consumer Protection of Ministry of National Economy of the Republic of Kazakhstan, Almaty c., Phone + 7 701 726 4328. e-mail- berzhan@bk.ru

подавляющее большинство ученых сходится в том, что *Yersinia pestis* произошла от одного из штаммов *Y. pseudotuberculosis* серогруппы O1b. Показано, что бактериальные хромосомы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* схожи по своему строению более чем на 90% [7] и в основном отличаются по составу и строению плазмид. Типичный геном *Y. pestis* представлен кольцевой хромосомой размером около 4,6 млн. п.н. и тремя основными плазидами, в большей части определяющими высокую вирулентность чумного микроба: pCD1, pFra и pPst, имеющими размер около 70, 110 и 9,6 тыс. п.н., соответственно [8, 9].

В 1951 г. R. Devignat [10] предложил подразделять штаммы *Y. pestis* по способности к ферментации глицерола (*gly*) и арабинозы (*ara*), а также к редукции нитратов (*nit*), на три классических биовара: *Antiqua* (*gly*<sup>+</sup>, *ara*<sup>+</sup>, *nit*<sup>+</sup>), *Mediaevalis* (*gly*<sup>+</sup>, *ara*<sup>+</sup>, *nit*<sup>+</sup>) и *Orientalis* (*gly*<sup>-</sup>, *ara*<sup>+</sup>, *nit*<sup>+</sup>). Позднее был предложен четвертый атипичный биовар – *Microtus* (*gly*<sup>+</sup>, *ara*<sup>-</sup>, *nit*<sup>-</sup>), включающий штаммы, выделенные от полевков (*Microtus brandti* и *Microtus fuscus*) и являющиеся авирулентными для человека [11].

В Казахстане очаги чумы занимают около 39% территории и располагаются в различных экологических зонах: пустынных, полупустынных, степных, низкогорных, высокогорных и т.д. В связи с этим различаются и виды основных носителей в каждом очаге, что в свою очередь оказывает влияние на фенотип и генотип штаммов возбудителя чумы. Штаммы чумного микроба в Казахстане имеют довольно широкий диапазон вариаций биохимических признаков. Большинство относятся к биовару *Mediaevalis* (пустынные и степные очаги), однако встречаются и штаммы, относящиеся к биоварам *Antiqua* и *Microtus* (горные очаги). Основным носителем возбудителя чумы в большинстве пустынных очагов является большая песчанка (*Rhombomys*

*opimus*), а также другие виды песчанок. В горных очагах основным носителем является серый сурик (*Marmota baibacina*) и мышевидные грызуны.

Несмотря на то, что биохимический анализ является стандартным и достаточно точным методом типирования бактерий, тем не менее он имеет свои недостатки, и достоверность результатов зависит от многих факторов. В связи с этим в мировой практике применяются дополнительные методы типирования, основанные на молекулярно-генетических принципах.

Цель данного исследования – проведение генетического анализа штаммов (изолятов) *Y. pestis* из двух очагов чумы с разными экологическими условиями: Среднеазиатского пустынного (Северо-Приаральский, Приаральско-Каракумский и Арыкумско-Дарьялыктакырский автономные очаги) и Тянь-Шанского высокогорного (Сарыджазский автономный очаг).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Изоляты.** Для исследования были отобраны 42 изолята чумного микроба, выделенные на территории Казахстана и Кыргызстана. 20 изолятов были выделены на территории трех автономных очагов Среднеазиатского пустынного очага чумы Казахстана: Северо-Приаральского (9 изолятов), Приаральско-Каракумского (7 изолятов) и Арыкумско-Дарьялыктакырского (4 изолята). 22 изолята были выделены на территории трансграничного Сарыджазского автономного очага, входящего в состав Тянь-Шанского высокогорного очага чумы: 16 изолятов – на территории Казахстана и 6 изолятов – на территории Кыргызстана. На рисунке 1 приведено географическое расположение указанных очагов чумы. Также в работе были использованы штаммы *Y. pseudotuberculosis* 2841 и 433 и вакцинный штамм *Y. pestis* EV-76. Все вы-



Рисунок 1 – Расположение очагов чумы, где были выделены исследуемые штаммы чумного микроба

Таблица 1 – Информация о штаммах, использованных в работе

Кодировка	Описание
Pt IP32953, Pt ATCC 6904, Pt PB1/+	Фрагменты локусов штаммов <i>Y.pseudotuberculosis</i> (NCBI)
Pt 2841, Pt 433	Фрагменты локусов штаммов <i>Y.pseudotuberculosis</i> (МЖК КНЦКЗИ)
Yp 3770, Yp Angola	Фрагменты локусов штаммов эволюционно древних штаммов <i>Y.pestis</i> (NCBI)
Yp EV	Фрагменты локусов вакцинного штамма <i>Y. pestis</i> EV-76 (МЖК КНЦКЗИ)
Pestoides F	Фрагменты локусов референтного штамма, биовар <i>Microtus/Antiqua</i>
Nepal516	Фрагменты локусов референтного штамма, биовар <i>Antiqua</i>
KIM10	Фрагменты локусов референтного штамма, биовар <i>Mediaevalis</i>
CO92	Фрагменты локусов референтного штамма, биовар <i>Orientalis</i>
SZ (16 изолятов)	Изоляты из Сарыджазского автономного очага (Казахстан)
NP (9 изолятов)	Изоляты из Северно-Приаральского автономного очага (Казахстан)
PK (7 изолятов)	Изоляты из Приаральско-Каракумского автономного очага (Казахстан)
AD (4 изолята)	Изоляты из Арыкумско-Дарьялыктакырского автономного очага (Казахстан)
KG (6 изолятов)	Изоляты из Сарыджазского автономного очага (Кыргызстан)

Таблица 2 – VNTR локусы и праймеры, использованные для генотипирования штаммов *Y.pestis*

VNTR локус	Размер повтора	Праймеры	
		прямой	обратный
yp0120ms01	18	CTAAGCACAAATTGTTATGCTGAACC	TACTGAATCTGCTTCATTGTTCAAA
yp1290ms04	17	CGCTGTTGAAGTTTTAGTGTAAGAA	AAATGTAACCTGCCAAACGCTG
yp2769ms06	60	AATTTTGCTCCCCAAATAGCAT	TTTTCCCCATTAGCGAAATAAGTA
yp2916ms07	10	ATACCGCTACGATCAGCCTCTAT	ATTTAATATTGATTTGGGACTTGC
yp1335ms46	7	CAGGTTTTACGTTATTTTCTGAAGG	CAGCATGAAGTATGACGGGTATATTA
yp4280ms62	9	TTAGTCTTGATTAAGCTGCGTTTT	ACGGAAGACAACCTTATTATTGATG
yp1580ms70	9	AAACCAACGGTTCATATTGAATAAA	CTTCTCCGCTATTTTCCTACAGA
yp1935ms05	17	CCTCAGTTCATTGTGTA AAAATCTCA	GTATTAGCGAGATCACAGATGAGC
yp3057ms09	18	CGTTACCCTTGTTGCCAATAGT	ACGCAGAACATGCTTACCTTTTAT
yp0559ms15	15	TTGACCAAGTGTA AAAAGGCATAAAT	AAACTATCGCCAGCCATTTTAGTA
yp1814ms20	15	ACAACCTCAGTTTGCCCTTG	GTAAGAGCGCAATGATCGTACT
yp1895ms21	18	GCTTAAAGCAGATTGATACTCACG	CTGCATGTTACCGGTTTCAG
yp4042ms35	15	CTGTTACCGGTCAAAGTGATATT	AGGCTCTCCTTATCATTTTGGTC
yp4425ms38	16	GTGAGGTATAGCTAAACGGTGATGT	CGCCGTAGATTATTTGTCACTTTAT
yp0581ms40	17	GCAATCATTCACCTAACCATATCTC	GTGCAATAGGCGTTGTTGTGTA
yp0718ms41	17	GAAGAAAGCCAGCTAATCTGATG	TAATGAATAGCAACGACAACCAATA
yp1018ms44	7	CAATTCCAACAGCTATTAATGCAA	GAATTTTCATAACACGTTCTTCCTG
yp1108ms45	12	GCATCGGAGACTGGGTAAAC	TTTCTGAGGATTTATCGGTGTGAT
yp2058ms51	18	GGTTTTTACCGATATAAATCCTGAG	GACCAAGAAGTTAAGTTGCTTATCG
yp2612ms54	22	GTCCACCATTTTCATACTGTCACCT	GCTCTTTGTTTCGATTTTATTGAATG
yp3060ms56	16	AACCGACTGACTCACTTTATATTGG	TTCTTTCCATTACTCAGCCTGTT
yp1118ms69	16	GACGTTGCAACTGCAAAAATAAG	ACTTGTTGTGAAGACCATCACTCT
yp1925ms71	14	GCTACTCGAATATGAGTTAGCCAAA	ATTGCCATATTGGATGCTAAAATAA
yp3236ms73	18	AATACCCTGTGGGTGATAATGAAC	ATCGATTTAGGTACCACCAATTCA
yp3245ms74	15	CCCCGACTTATATCAAGCACTG	AACTGACGATCTTTTCACTGAGTT

шеуказанные штаммы были получены из коллекции Музея Живых Культур Казахского Научного Центра Карантинных и Зоонозных Инфекций (МЖК КНЦКЗИ).

В качестве референтных образцов использованы фрагменты локусов четырех хорошо изученных штаммов

*Y. pestis*, представляющих основные биовары чумного микроба: *Pestoides F* (биовар *Microtus/Antiqua*), *Nepal516* (биовар *Antiqua*), *KIM10+* (биовар *Mediaevalis*) и *CO92* (биовар *Orientalis*). Данные фрагменты были искусственно синтезированы на основе информации, представленной в

базе данных GenBank NCBI. При филогенетическом анализе для сравнения были использованы данные по некоторым другим штаммам, полученные из GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). В частности, были использованы данные о структуре исследуемых VNTR локусов трех штаммов *Y.pseudotuberculosis*: IP32953 (CP009712.1), ATCC 6904 (CP008943.1) и PBI/+ (CP001048.1), а также двух эволюционно древних штаммов *Y.pestis*: 3770 (CP006751.1) и Angola (CP009935.1).

Кодировка перечисленных штаммов приведена в таблице 1.

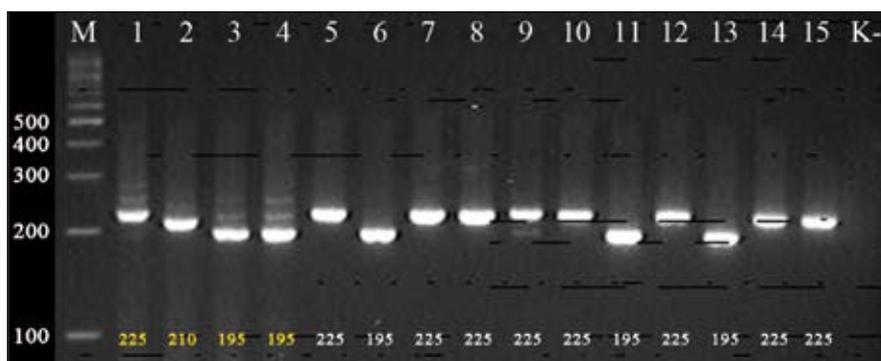
**Выделение ДНК.** Лизаты исследуемых штаммов *Y.pestis* и *Y.pseudotuberculosis* подвергались температурному воздействию (100°C) в течение 20 минут. Это позволяло не только инактивировать патогены, но и разрушить клеточные стенки бактерий. Далее взвеси центрифугировались в течение 2 минут при 12 000 об/мин. Супернатант, содержащий ДНК, отбирался и использовался для проведения ПЦР.

**Мультилокусный VNTR анализ (метод MLVA).** Исследование проводилось по 25 наиболее переменным VNTR локусам (Variable Number Tandem Repeats – переменное число тандемных повторов), приведенным в таблице 2. Информация о структуре VNTR локусов и последовательностях праймеров получена из публикации Le Flèche et al. [12].

Аmplification VNTR локусов проводилась на термоциклере Veriti (Applied Biosystems, США). Программа амплификации состояла из следующих этапов: предварительная денатурация при 96°C в течение 5 мин.; далее следовали 34 цикла, состоящие из стадии денатурации (96°C, 20 сек.), отжига праймеров (60°C, 30 сек.) и элонгации (65°C, 1 мин.); затем проводилась окончательная элонгация при 65°C в течение 5 мин.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации осуществлялось в 2% агарозном геле. Размер продуктов амплификации ДНК исследуемых штаммов чумного микроба определялся исходя из размеров фрагментов маркера молекулярного веса GeneRuler (Thermo Fisher Scientific, США), а также размеров продуктов амплификации ДНК референтных штаммов.

**Филогенетический анализ.** Анализ филогенетических связей исследуемых штаммов проводился с помощью программы PAUP 4.0 (<http://paup.csit.fsu.edu/index.html>). Для



М – маркер молекулярного веса (100 п.н.), 1 – *Y. pestis* KIM10+, 2 – *Y. pestis* Nepal516, 3 – *Y. pestis* Pestoides F, 4 – *Y. pestis* CO92, 5-15 – исследуемые штаммы *Y. pestis*, К – отрицательный контроль (вода). В нижней части рисунка обозначены размеры ампликонов в парах нуклеотидов.

Рисунок 2 – Анализ размера продуктов амплификации ДНК исследуемых штаммов *Y.pestis* на примере VNTR локуса *yr3245ms74*

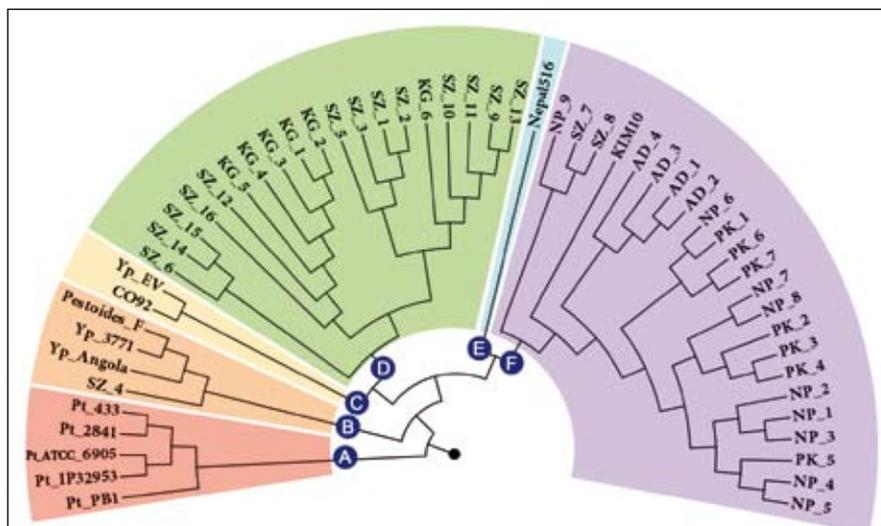


Рисунок 3 – Дендрограмма, отображающая филогенетическую связь исследуемых штаммов

иерархической кластеризации был использован алгоритм UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Окончательное оформление филогенетического древа проводилось на графическом редакторе FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

На основе данных, полученных методом геле-электрофореза для каждого VNTR локуса исследуемых штаммов (рис. 2), была составлена бинарная матрица для последующего филогенетического анализа с помощью программы PAUP 4.0 по алгоритму UPGMA.

Полученное филогенетическое древо, обработанное на графическом редакторе FigTree v.1.4.2, приведено на рисунке 3.

Как видно на дендрограмме, исследуемые штаммы разделились на шесть основных кластеров, обозначенных буквами латинского алфавита. В кластер «А» вошли все

штаммы *Y. pseudotuberculosis*, включая казахстанские штаммы 2841 и 433. Кластер «В» представлен древними штаммами чумного микроба: *Y. pestis* Angola и *Y. pestis* 3770. По биохимическим характеристикам эти штаммы могут рассматриваться как представители биовара *Antiqua*, однако, в связи со способностью ферментировать мелибиозу и рамнозу, их относят к группе т.н. пестоидов. Некоторые ученые выделяют эти штаммы в отдельный биовар – *Microtus*. В этот же кластер вошел референтный штамм *Y. pestis* Pestoides F и один из изолятов, выделенных на территории Сарыджазского автономного горного очага чумы (SZ-4). В кластер «С» вошли лишь два контрольных штамма: референтный штамм *Y. pestis* CO92 и вакцинный штамм *Y. pestis* EV-76, относящиеся к биовару *Orientalis*. Обширный кластер «D» представлен целиком изолятами, выделенными на территории трансграничного Сарыджазского автономного горного очага чумы, как с казахстанской, так и с кыргызской стороны. По биохимическим характеристикам все эти изоляты относятся к биовару *Antiqua*. Кластер «Е» отображен одним представителем: референтным штаммом Nepal516. Он также относится к биовару *Antiqua*, но, судя по дендрограмме, филогенетически отдален от казахстанских представителей этого биовара, т.е. изолятов кластера «D». И, наконец, последний обширный кластер – «F» представлен изолятами, выделенными на территории Среднеазиатского пустынного очага чумы (Северо-Приаральский, Приаральско-Каракумский и Арыкумско-Дарьялыктакырский автономные очаги). Так же в него вошли два изолята из Сарыджазского автономного горного очага (SZ-1701 и SZ-1710). По биохимическим характеристикам все они относятся к биовару *Mediaevalis*, что также подтверждается присутствием в этом кластере референтного штамма KIM10, являющегося типичным представителем биовара *Mediaevalis*.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Согласно публикации Cui и др [13], наиболее древние штаммы чумного микроба относятся к ветви 0.PE7 (рис. 4А) и встречающиеся только в центральном Китае. Штаммы *Y. pestis*, относящиеся к более поздним ветвям, предположительно, попадали в соседние регионы по т.н. «Шелковому» и «Чайному» торговым путям (рис. 4 В).

Исходя из данной концепции, на территорию нынешнего Казахстана штаммы чумного микроба попадали по северному маршруту Шелкового пути (обозначен красным пунктирным прямоугольником на рис. 4 В). Согласно Cui и др. [13] этим путем могли попасть штаммы, относящиеся к ветвям 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3 и 2.MED1.

Если наложить маршруты Великого Шелкового пути на ранее приводимую карту очагов чумы (рис. 1), можно представить гипотетический путь чумного микроба по территории Казахстана и Кыргызстана (рис. 5). Как видно из рисунка, маршруты торговых караванов пересекают некоторые из ныне существующих очагов чумы Казахстана и Кыргызстана. Вероятно, на этих участках и началось заражение грызунов штаммами чумного микроба, завезенными торговыми караванами, двигавшимися по Шелковому пути.

Эти штаммы закреплялись в наиболее предпочтительных для них экологических зонах. Так, штаммы биовара *Antiqua* (0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3) могли найти удобную экологическую нишу в условиях горного Тянь-Шаня, используя в качестве основного хозяина серого сурка (*Marmota baibacina*). В то же время в условиях пустыни преимущество могли получить штаммы биовара *Mediaevalis* (2.MED1), которые и освоили эту экологическую нишу, паразитируя на большой песчанке (*Rhombomys opimus*) и других видах песчанок.

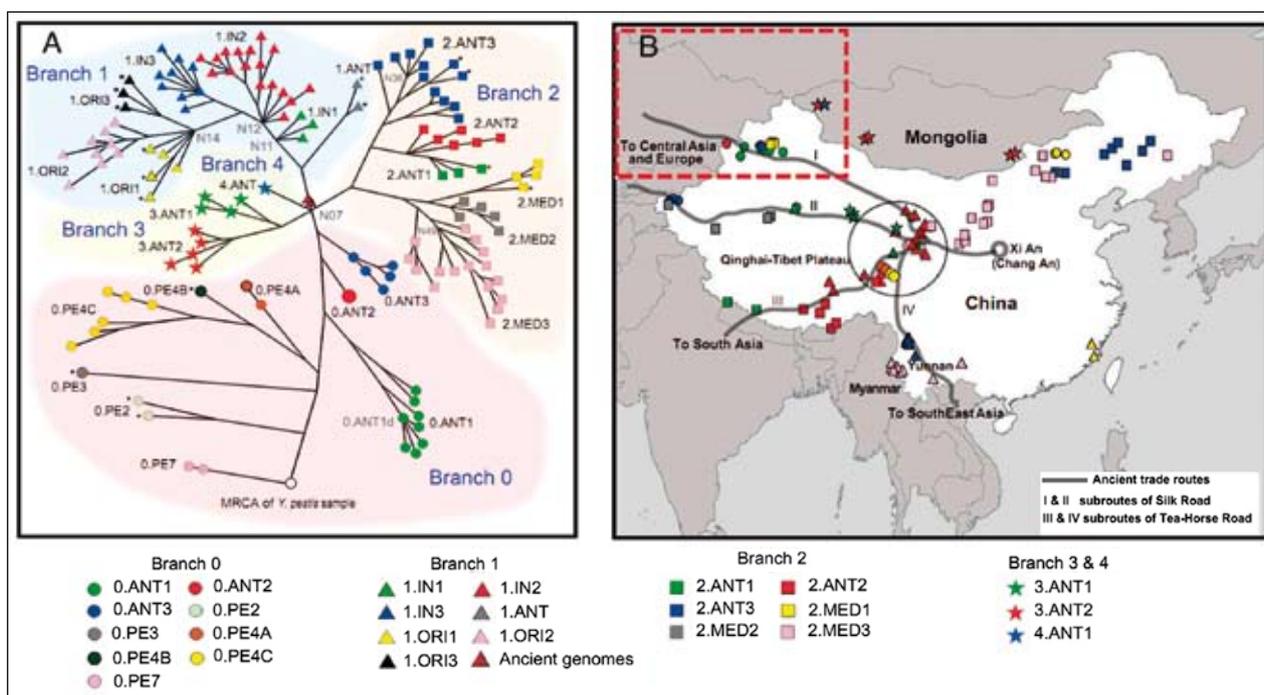


Рисунок 4 – Древо филогенетического родства (А) и пути распространения (В) штаммов чумного микроба (рисунок из публикации Cui и др. [13])



Рисунок 5 – Пересечение исследуемых очагов чумы маршрутами Великого Шелкового пути

Подтверждением этому может служить тот факт, что большинство из исследованных нами изолятов из Сарыджазского очага чумы были отнесены к биовару *Antiqua*, тогда как все изоляты, выделенные на территории Среднеазиатского пустынного очага чумы, – к биовару *Mediaevalis*. Лишь два изолята из Сарыджазского очага Казахстана (SZ-7 и SZ-8) были отнесены к биовару *Mediaevalis*, а один изолят (SZ-4) – к так называемым «пестоидам» – наиболее древним представителям чумного микроба.

Относятся ли исследованные штаммы к ветвям 0.ANT1, 0.ANT2, 0.ANT3 и 2.MED1, указанным в публикации Cui и др., будет установлено в дальнейшей работе. Для этого планируется проведение изучения ряда ключевых SNP-локусов методом Melt-MAMA (Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays – анализ мутаций по кривой плавления при мисматч амплификации).

## ВЫВОДЫ

Метод MLVA выявил, что исследуемые изоляты чумного микроба принадлежат к трем биоварам: *Antiqua*, *Mediaevalis* и *Microtus*. При этом к биовару *Mediaevalis* были отнесены все изоляты, выделенные из Среднеазиатского пустынного очага чумы, а также два изолята из Сарыджазского автономного очага. К биовару *Antiqua* отнесены 19 из 22 изолятов, выделенных на территории Сарыджазского автономного очага чумы. К биовару *Microtus* (или группе пестоидов) был отнесен изолят SZ-4, который по структуре своих VNTR локусов был близок древним представителям чумного микроба: *Y. pestis* Angola, *Y. pestis* 3771 и *Y. pestis* Pestoides F. Таким образом, можно сделать заключение, что в условиях горного климата Сарыджазского очага, в

популяциях сурков и мышевидных грызунов, циркулируют в основном штаммы древних ветвей чумного микроба: биоваров *Antiqua* и *Microtus*. В условиях пустынного климата Среднеазиатского природного очага, в популяциях разных видов песчанок, циркулируют, в основном, представители биовара *Mediaevalis*. Принадлежность этих штаммов к конкретным ветвям того или иного биовара, будет установлена в последующей работе авторов.

## Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

## Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Byrne J.P. The Black Death. Westport: Greenwood Press; 2004. pp. 5–7.
- 2 Kausrud K.L., Begon M., Ben Ari T. Modeling the epidemiological history of plague in Central Asia: palaeoclimatic forcing on a disease system over the past millennium // BMC Biol. – 2010. – Vol. 8. – P. 112
- 3 Benedictow O.J. The Black Death, 1346–1353: The Complete History. Woodbridge, Suffolk. – United Kingdom: Boydell Press, 2004. – Vol. XVI. – P. 433
- 4 Carniel E., Hinnebusch B.J. Yersinia: systems biology and control. – Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2012. – P. 246

5 Perry R.D., Fetherston J.D. Yersinia pestis – Etiologic Agent of Plague // *Clin Microbiol Rev.* – 1997. – Vol. 10(1). – P. 35-66

6 Сунцов В.В., Сунцова Н.И. Чума. Происхождение и эволюция эпизоотической системы (экологические, географические и социальные аспекты). – М.: Изд-во КМК, 2006. – 247 с.

7 Bercovier H., Mollaret H.H., Alonso J.M. Intra- and interspecies relatedness of Yersinia pestis by DNA hybridization and its relationship to Yersinia pseudotuberculosis // *Current Microbiology.* –1980. – Vol. 4. – Iss. 4. – P. 225-229

8 Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., et al. Genome sequence of Yersinia pestis, the causative agent of plague // *Nature.* – 2001. – Vol. 413(6855). – P. 523–527

9 Deng W., Burland V., Plunkett G. et al. Genome sequence of Yersinia pestis KIM // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184(16). – P. 4601-4611

10 Devignat R. Varieties de l'espece Pasteurella pestis. Nouvelle hypothese // *Bulletin of WHO.* – 1951. – Vol. 4. – No. 2. – P. 242-263

11 Zhou D., Tong Z., Song Y., et al. Genetics of metabolic variations between Yersinia pestis biovars and the proposal of a new biovar microtus // *J. Bacteriol.* –2004. – Vol. 186(15). – P. 5147-5152

12 Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of Yersinia pestis and Bacillus anthracis // *BMC Microbiol.* – 2001. – No. 1. – P. 2

13 Cui Y., Yu C., Yan Y., et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, Yersinia pestis // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. 577–582

## REFERENCES

1 Byrne JP. The Black Death. Westport: Greenwood Press; 2004. pp. 5–7.

2 Kausrud KL, Begon M, Ben Ari T. Modeling the epidemiological history of plague in Central Asia: palaeoclimatic forcing on a disease system over the past millennium. *BMC Biol.* 2010;8:112

3 Benedictow OJ. The Black Death, 1346–1353: The Complete History. Woodbridge, Suffolk. United Kingdom: Boydell Press; 2004;XVI:433

4 Carniel E, Hinnebusch BJ. Yersinia: systems biology and control. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2012. P. 246

5 Perry RD, Fetherston JD. Yersinia pestis – Etiologic Agent of Plague. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(1):35-66

6 Sunstov VV Sunstova NI. *Chuma. Proishozhdenie i evoliuciya epizooticheskoi sistemy (ekologicheskie, geograficheskie i socialnye aspekty)* [Plague. Origin and evolution of the epizootic system (environmental, geographical and social aspects)]. Moscow: Publishing house of the KMK; 2006. P. 247

7 Bercovier H, Mollaret HH, Alonso JM. Intra- and interspecies relatedness of Yersinia pestis by DNA hybridization and its relationship to Yersinia pseudotuberculosis. *Current Microbiology.* 1980;4(4):225-9

8 Parkhill J, Wren BW, Thomson NR. et al. Genome sequence of Yersinia pestis, the causative agent of plague. *Nature.* 2001;413(6855):523-7

9 Deng W, Burland V, Plunkett G. et al. Genome sequence

of Yersinia pestis KIM. *J. Bacteriol.* 2002;184(16):4601-11

10 Devignat R. Varieties de l'espece Pasteurella pestis. Nouvelle hypothese. *Bulletin of WHO.* 1951;4(2):242-63

11 Zhou D, Tong Z, Song Y. et al. Genetics of metabolic variations between Yersinia pestis biovars and the proposal of a new biovar microtus. *J. Bacteriol.* 2004;186(15):5147-52

12 Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of Yersinia pestis and Bacillus anthracis. *BMC Microbiol.* 2001;1:2

13 Cui Y, Yu C, Yan Y et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, Yersinia pestis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:577-82

## ТҰЖЫРЫМ

**Б.К. ҚҰРМАНОВ<sup>1</sup>, Б.Б. АТШАБАР, Г.Е. САРИЕВА<sup>3</sup>, А.А. ӘБДІРӘСІЛОВА<sup>1</sup>, З.Ж. ӘБДЕЛ<sup>1</sup>, Ш. БАХТЫБЕКҚЫЗЫ<sup>1</sup>, А.С. ЖҮНІСОВА<sup>1</sup>, Н.К. МҰҚАШЕВ<sup>1</sup>, Н.П. ҚАБЫШЕВА<sup>1</sup>, А.К. ҚАСЕНОВА<sup>1</sup>, Л.Е. НЕКРАСОВА<sup>1</sup>, Э.Ж. БЕГІМБАЕВА<sup>1</sup>, С.Т. ӘБДІКӘРІМОВ<sup>2</sup>, А.К. ЖАПАРОВА<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>М. Айқымбаев атындағы Қазақ карантиндік және зооноздық инфекциялар ғылыми орталығы, Тұтынушылардың құқықтарын қорғау комитеті, ҚР ҰЭМ, Алматы қ., Қазақстан,

<sup>2</sup>Карантиндік және аса қауіпті инфекциялардың Республикалық орталығы, ҚР ДСМ, -Бішкек қ., Қырғызстан,

<sup>3</sup>Тыныстанов атындағы Ыстықкөл мемлекеттік университеті, ҚР БҒМ, Қарақол қ., Қырғызстан

## ОРТАЛЫҚ АЗИЯЛЫҚ ШӨЛДІ ЖӘНЕ ТЯНЬ-ШАНЬДЫ ЖОҒАРЫ ТАУЛЫ ОБА ОШАҚТАРЫНАН YERSINIA PESTIS ШТАММДАРЫН ГЕНОТИПТЕУ

Қазақстанда оба микробтарының штамдары биохимиялық белгілерінің вариациясы бойынша өте кең ауқымы бар. Олардың басым бөлігі *Mediaevalis* биоварына (шөлді және далалы ошақтары) жатады, сонымен қатар бар *Antiqua* және *Microtus* биоварларына (таулы ошақтар) жататын штамдар да кездеседі. Биохимиялық талдау бактерияларды типтеуінің стандартты әдісі болғанына қарамастан, оның да өзінің кемшіліктері бар. Оба микробының қазақстандық штамдарының филогенетикалық туыстығының неғұрлым нақты бейнесін алу үшін, молекулалық-генетикалық зерттеулер жүргізу өзекті болып табылады. Осы зерттеудің мақсаты әр түрлі экологиялық жағдайларындағы екі, яғни Орталық Азиялық шөлді және Тянь-Шаньды жоғары таулы табиғи оба ошақтарындағы *Y.pestis* штамдарының (изоляцияларының) генетикалық талдауын жүргізу болып табылды.

**Зерттеу мақсаты.** Екі әр түрлі экологиялық жағдайдағы, яғни Орталық Азиялық шөлді және Тянь-Шаньды жоғары таулы табиғи оба ошақтарындағы *Y.pestis* штамдарының (изоляцияларының) генетикалық талдауын жүргізу болып табылды.

**Материал және әдістері.** Орталық Азиялық шөлді (Солтүстік Арал манды, Арал манды Қарақұм және Арысқұмды-Дариялықтақырлы автономды ошақтары) және Тянь-Шаньды жоғары таулы (Сарыжаз автономды мезоошақ) табиғи ошақтарының аумағында бөлінген оба қоздырғышының 42 изоляттары, *Y.pseudotuberculosis* 2841 және 433 штамдары және вакцина *Y.pestis* EV-76 штаммы. Зерттеу 24 ең айналымы VNT-локустары бойынша амплификациялау және ары қарай нәтижелерді келденен гель-электрофорез әдісімен анықтау бойынша жүргізілді. Филогенетикалық талдау UPGMA алгоритмі бойынша PAUP 4.0 бағдарламасын қолдану арқылы жүзеге асырылды.

**Нәтижелері және талқылауы.** Зерттелген изоляттардың барлық 24 арнаулы VNT-локустарының мөлшерлері жайлы мәліметтер алынды, екілік матрица құрастырылды және филогенетикалық талдау жүргізілді. Алынған филогенетикалық

ағаш зерттелген оба қоздырғышының изоляттары үш биоварға, яғни *Antiqua*, *Mediaevalis* және *Microtus* жататындығын көрсетті. Сонымен қатар, *Mediaevalis* биоварына Орталық Азиялық шөлді оба ошағынан оқшауланған барлық изоляттары және Сарыжаз автономды ошағынан екі изолят жатқызылды. *Antiqua* биоварына Сарыжаз автономды оба ошағы аумағынан бөлінген 22 изоляттың 19 жатқызылды, ал *Microtus* биоварына (немесе пестоид тобына), өзінің VNTR локустарының құрылымы бойынша ежелгі оба микробының өкілдеріне, яғни *Y. pestis Angola*, *Y. pestis 3771* және *Y. pestis Pestoides F* жақын болған SZ-4 изоляты жатқызылды.

**Қорытынды.** VNTR талдауы көмегімен Сарыжаз ошағының таулы климат жағдайында, суырлар мен тышқан тәрізді кеміргіштер популяцияларында, негізінен ежелгі бұтақтарындағы оба микробының штаммдары, яғни *Antiqua* және *Microtus* биоварларынан таралатыны анықталды. Орталық Азиялық табиғи ошақтарында шөлді климат жағдайында әртүрлі құмтышқан түрлерінің популяциясында негізінен *Mediaevalis* биоварының өкілдері таралады.

**Негізгі сөздер:** *оба, Yersinia pestis, табиғи оба ошақтары, генотиптеу, мультилокусты VNTR талдауы, филогенетикалық ағаш.*

#### SUMMARY

**B.K. KURMANOV<sup>1</sup>, B.B. ATSHABAR<sup>1</sup>, G.E. SARYEVA<sup>3</sup>,  
A.A. ABDIRASSILOVA<sup>1</sup>, Z.Zh. ABDEL<sup>1</sup>,  
Sh. BAKHTYBEKKYZY<sup>1</sup>, A.S. ZHUNUSSOVA<sup>1</sup>,  
N.K. MUKASHEV<sup>1</sup>, N.P. KABYSHEVA<sup>1</sup>, A.K. KASSENOVA<sup>1</sup>,  
L.E. NEKRASSOVA<sup>1</sup>, E.Zh. BEGIMBAYEVA<sup>1</sup>,  
S.T. ABDYKARIMOV<sup>2</sup>, A.K. ZHAPAROVA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*M. Aikimbayev Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Committee on Consumer Protection, MNE RK, Almaty c., Kazakhstan,*

<sup>2</sup>*Republican Centre for Quarantine and Extremely Dangerous Infections MOH KR, Bishkek c., Kyrgyzstan,*

<sup>3</sup>*Tynystanov's Issyk-Kul State University, MES KR, Karakol c., Kyrgyzstan*

**GENOTYPING OF YERSINIA PESTIS STRAINS FROM THE CENTRAL ASIAN DESERTS AND TIEN SHAN HIGH MOUNTAIN PLAGUE FOCI**

The strains of the plague microbe in Kazakhstan have a fairly wide range of variations of the biochemical characteristics. Most of them belong to biovar *Mediaevalis* (desert and steppe foci), but there are also strains belonging to biovars *Antiqua* and *Microtus* (mountain centers). Biochemical analysis has drawbacks despite the fact that it is a standard method for typing of bacteria. Carrying out molecular genetic studies is actual to obtain a more accurate picture of the phylogenetic relatedness of Kazakhstani strains of plague microbe.

**Objective.** Conducting genetic analysis of *Y.pestis* strains (isolates) of the two foci of plague with different ecological conditions: Central Asian desert and Tien Shan High Mountain foci.

**Material and methods.** 42 isolates of *Yersinia pestis* from Central Asian desert (North Aral Sea region, the Aral Karakum-and-Aryskum Daryalyktakyrsky autonomous foci) and Tien Shan High Mountain plague foci (Sarydzhaz autonomous focus); strains of *Y.pseudotuberculosis* 2841 and 433 and the vaccine strain *Y.pestis* EV-76. The study was conducted on 25 of the most variable VNTR loci (MLVA method). Phylogenetic analysis was performed by using PAUP 4.0 program by UPGMA algorithm.

**Results and discussion.** Data on the size of all 24 targeted VNTR loci of studied isolates was obtained, it was made a binary matrix and performed phylogenetic analysis. According to the phylogenetic tree the studied *Y.pestis* isolates have been shown to belong to three biovars: *Antiqua*, *Mediaevalis* and *Microtus*. All isolates from Central Asian desert focus of plague as well as two isolates from Sarydzhaz autonomous focus were classified as *Mediaevalis* biovar. 19 out of 22 isolates from the territory of Sarydzhaz autonomous plague focus were related to *Antiqua*. SZ-4 isolate which due to the structure of its VNTR loci was close to strains of the ancient plague microbe and belong to *Microtus* biovar (or *Pestoides* group): *Y. pestis* Angola, *Y. pestis 3771* and *Y. pestis Pestoides F*.

**Conclusion.** By using VNTR analysis it was revealed that under the conditions of the mountain climate of Sarydzhaz focus, in the populations of marmots and rodents, the strains of plague microbe of the ancient branches circulate: biovars *Antiqua* and *Microtus*. In the desert climate of Central Asian natural focus, in the populations of different species of gerbils, mainly *Mediaevalis* related strains circulate.

**Key words:** *plague, Yersinia pestis, natural plague foci, genotyping, multilocus VNTR analysis, phylogenetic tree.*

Для ссылки: Курманов Б.К., Атшабар Б.Б., Сариева Г.Е., Абдирасилова А.А., Абдел З.Ж., Бахтыбеккызы Ш., Жунусова А.С., Мукашев Н.К., Кабышева Н.П., Касенова А.К., Некрасова Л.Е., Бегимбаева Э.Ж., Абдикаримов С.Т., Жапарова А.К. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis* из Среднеазиатского пустынного и Тянь-Шанского высокогорного очагов чумы // *Medicine (Almaty)*. – 2016. – No 12 (174). – P. 80-87

Статья принята в печать 22.11.2016 г.

Статья поступила в редакцию 12.12.2016 г.