

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

Кафедра биохимии и биофизики

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ
YERSINIA PESTIS ИЗ ОЧАГОВ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОГО ПРИКАСПИЯ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2-го курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Коврижникова Александра Викторовича

Научный руководитель:

профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

07.06.24

Научный консультант:

с.н.с. ФКУН Российский противочумный институт «Микроб»

Роспотребнадзора, канд. биол. наук



А. Н. Балыкова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

07.06.24

Введение. Объявленная Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) десятилетняя стратегия по надзору за патогенами, обладающими пандемическим и эпидемическим потенциалом, ставит новые цели в изучении патогенов, выводя актуальность проблемы инфекционных заболеваний на новый уровень. Вместе со стремительным развитием антибиотикотерапии для лечения различных бактериальных инфекций, происходит эволюция патогенов, все чаще встречаются случаи полирезистентности бактерий. Одним из опаснейших инфекционных заболеваний бактериальной этиологии является чума.

Чума — зоонозное, природно-очаговое заболевание, возбудителем которого является *Yersinia pestis* – грамотрицательная бактерия, являющаяся факультативным внутриклеточным паразитом. Возбудитель чумы являлся этиологическим агентом трех подтверждённых крупнейших исторических пандемий, оказавших значительное влияние на человечество и унесших суммарно около 200 миллионов жизней. Принято считать, что первая пандемия чумы началась со вспышки Юстиниановой чумы, длившейся с 541 по 543 годы и охватившей всю территорию Римской империи. Вторая пандемия чумы – «Черная смерть» – пришлась на период с 1346 по 1353 годы и охватывала территории Азии, Европы и Северной Африки. Последняя, третья, пандемия чумы началась в 1855 году в провинции Юньнань в Китае и, считается, что ее отголоски регистрировали до 1959 года.

В начале XX века наиболее напряженная эпидемическая обстановка отмечалась в природных очагах Северного (Волго-Уральский степной и Волго-Уральский песчаный очаги чумы) и Северо-Западного Прикаспия (Прикаспийский Северо-Западный степной и Прикаспийский песчаный очаги чумы). Несмотря на то, что большая часть территорий очагов Северного и Северо-Восточного Прикаспия располагается на территории Казахстана, существует опасность завоза чумы из эпизоотически активных очагов за счет тесных экономических, туристических и культурных связей. Также имеются не полные данные относительно популяционной структуры высоковирулентного средневекового биовара – возбудителя чумы в ряде очагов Северо-Восточного

Прикаспия. Определение генотипов и выяснение родственных связей может повысить эффективность молекулярно-генетической идентификации штаммов средневекового биовара и помочь составить целостную картину его микроэволюции и пространственно-временной циркуляции в этом регионе.

В связи со всем вышесказанным, целью настоящей работы было установление популяционной структуры штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы Северо-Восточного Прикаспия методами SNP и MLVA-типирования для детализации молекулярно-генетической паспортизации этого региона и повышения эффективности молекулярно-эпидемиологического мониторинга очагов чумы.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определить популяционную структуру *Y. pestis* средневекового биовара в очагах Северо-Восточного Прикаспия по данным полногеномного секвенирования.

2. Провести SNP/MLVA-генотипирование штаммов средневекового биовара из Северо-Восточного Прикаспия. Определить распространение основных MLVA- и SNP-генотипов средневекового биовара на этих природно-очаговых территориях.

3. Разработать программу для оптимизации и автоматизации поиска VNTR-локусов.

Структура и объем работы. Магистерская работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение), заключение, выводов, списка используемых источников. Список используемых источников включает 75 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 63 страницах машинописного текста.

Основное содержание работы. В обзоре литературы магистерской работы описаны современные эпидемиологические проявления чумы в мире, особенности структурной организации генома *Y. pestis*, популяционная структура, эволюция и таксономия возбудителя чумы, сделан обзор молекулярно-генетических технологий исследования *Y. pestis*, а также описаны

генетические особенности штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из Северо-Восточного Прикаспия. В разделе, посвященном материалам и методам исследования, представлена информация об объектах исследования и методах, использованных в ходе выполнения экспериментов.

Объектом исследования были штаммы *Y. pestis*, выделенные на территории Северо-Восточного Прикаспия в разные периоды эпизоотической активности с 1912 по 2002 год: Волго-Уральском степном (15, ВУСПО), Волго-Уральском песчаном (16, ВУППО), Урало-Уильском степном (17, УУСПО), Урало-Эмбенском пустынном (18, УЭППО), Предустюртском пустынным (19, ПППО). Штаммы были получены от носителей и переносчиков. Штаммы *Y. pestis* культивировали на среде LB (агар или бульон, pH 7,2) при 28 °C в течение 48 часов. В рамках данного исследования изучен 101 штамм *Y. pestis*. Все штаммы были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий при ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* проводилось в соответствии с методическими указаниями 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Для высокопроизводительного секвенирования ДНК штаммов *Y. pestis* выделяли с помощью набора PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США) по инструкции производителя.

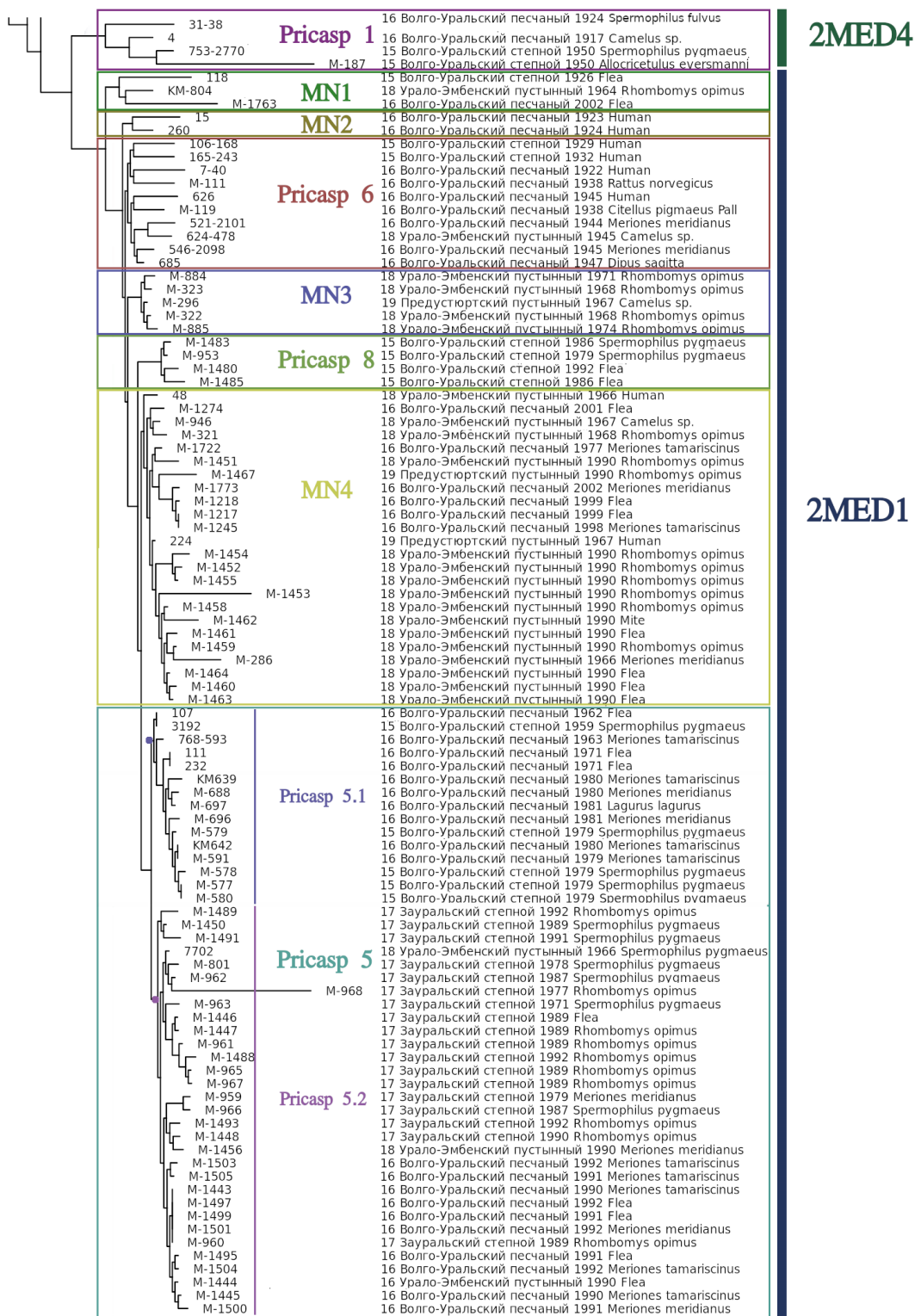
Высокопроизводительное секвенирование штаммов *Y. pestis* проводили по технологии Ion Torrent в системе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США). Для первичной подготовки библиотеки фрагментов использовались наборы Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit and Ion Xpress™ Barcode Adapter 1–96 Kit. Для автоматической подготовки матрицы использовались Ion Chef System, а также Ion 510™ & 520™ & Ion 530™ Chip Kit. Контроль качества полученных прочтений проводили в программе FastQC v0.11.9.

Для обработки данных и сборки необработанных коротких прочтений генома *de novo* использовали Ion Torrent Suite software package 5.12, Newbler gsAssembler 2.6., Unicycler v0.4.9. Выравнивание полученных прочтений на референсный геном штамма *Y. pestis* CO92 (номер доступа в GenBank NC_003143.1) осуществляли с помощью программного пакета bwa. Средний размер собранных геномов составил 4,5 м.п.н., средняя глубина покрытия полученных геномов – 48х.

Для поиска и анализа маркерных VNTR-локусов применялся ряд биоинформационных программ: MEGA X, Tandem Repeats Finder 4.09, а также для поиска и анализа VNTR-локусов по заданным праймерам использовали авторские скрипты написанные на языке программирования python 3.10 с использованием пакетов biopython 1.80, pandas 1.5.3, matplotlib 3.9, scipy 1.13.1, numpy 1.26.

Для проведения филогенетической реконструкции использовались 101 штаммов *Y. pestis*. Дендрограмма построена методом WG-SNP-анализа на основе 1580 SNPs, обнаруженных в коровом геноме 101 штаммов *Y. pestis* (рисунок 1). Подбор модели нуклеотидных замен проводили с использованием программы jModelTest2, на основании критерия Акаике (AICc) была выбрана модель GTR. Филогенетическая реконструкция осуществлялась с использованием программы FastTree 2.1 алгоритмом Approximately Maximum Likelihood (приближенное максимальное правдоподобие).

По данным молекулярно-генетического анализа и филогенетической реконструкции на анализируемой территории все штаммы относятся к средневековому биовару и представлены двумя филогенетическим ветвями: 2MED1 и 2MED4.



0.05

Рисунок 1 – Филогенетический анализ 101 штамма *Y. pestis*, выделенного в природных очагах чумы Северо-Восточного Прикаспия. Дендрограмма Maximum Likelihood построена на основе выявленных в коровом геноме 1580 SNPs с использованием модели GTR с 1000 bootstrap-подкреплением. SNPs в узлах MN1–MN4 (MN – medieval node) приведены в таблице 1

Таблица 1 – Маркерные SNPs для филогенетических узлов дендрограммы рисунка 1

Узел	Координаты SNP по геному CO92 (AL590842.1)	Замена нуклеотида	Локализация
1	2	3	4
MN1	2498492	T→G	<i>acnA</i>
	3206685	T→C	Межгенное пространство
	3248391	G→A	<i>ail</i>
	4139729	G→A	<i>tssC</i>
MN2	1982740	C→T	<i>YPO_RS09665</i>
	3021641	C→T	<i>YPO_RS14445</i>
	3442617	G→A	<i>copA</i>
	3732919	C→T	Межгенное пространство
	3808002	C→A	<i>cueO</i>
	3962272	G→T	<i>elbB</i>
MN3	463516	G→C	<i>serB</i>
	1399276	G→T	<i>YPO_RS07200</i>
	1947775	A→T	Межгенное пространство
	4560582	G→A	<i>YPO_RS21335</i>
MN4	2958240	C→T	Межгенное пространство
Pricaps 5.2	1939841	G→T	<i>YPO_RS09480</i>
	3460319	G→A	<i>gmd</i>

По данным SNP-анализа определены 8 кластеров, один, относящийся к ветви 2MED4, и 7 кластеров ветви 2MED1. Некоторые кластеры относятся к охарактеризованным ранее генотипам, для кластеров, не относящихся к описанным в литературе генотипам, определены характерные SNPs,

представленные в таблице 1. Проведенный филогенетический анализ 101 штамма *Y. pestis* позволил определить популяционную структуру штаммов возбудителя чумы средневекового биовара, полученных в XX – начале XXI вв. в Северо-Восточном Прикаспии, а также проследить направления распространения данных штаммов и, предположительно, выявить занос штаммов штаммами между граничащими очагами. Следует отметить, что эволюция чумного микроба в XX - начале XXI вв. не сопровождалась значительными изменениями генома, а отличия различных филогрупп заключались в нескольких точечных мутациях, которые не привели к появлению новых фенотипических свойств.

Для оптимизации процесса поиска VNTR-локусов по заданным праймерам была разработана программа FragmentFinder (рисунок 2). Для разработки программы использовали язык программирования python3 (3.10.6) с использованием сторонних библиотек: Biopython 1.80, openpyxl 3.0.10, pandas 1.5.3.

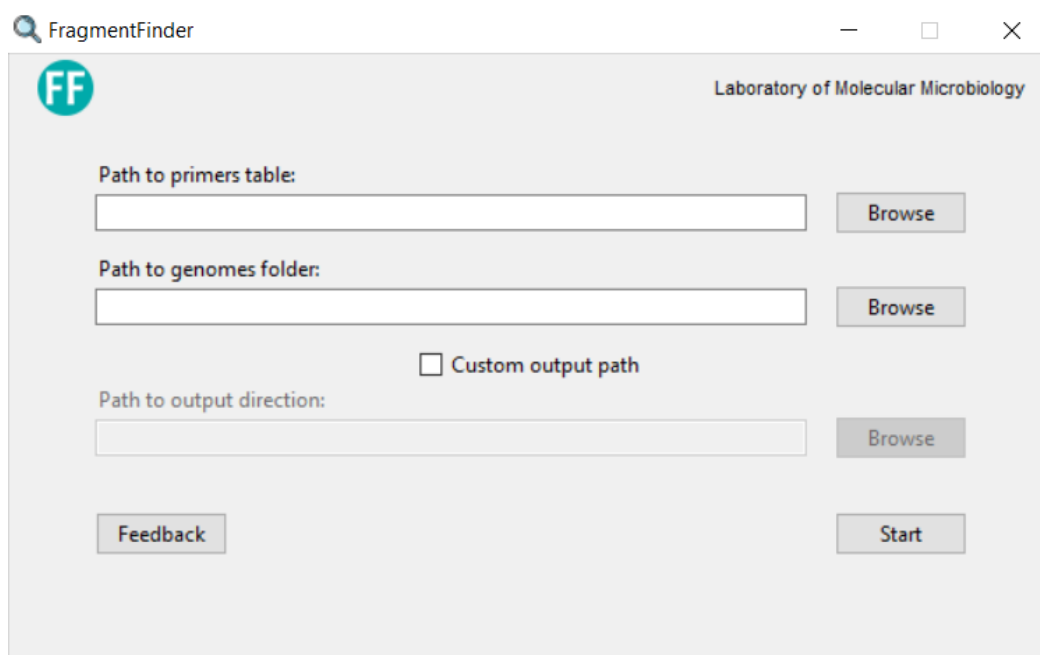


Рисунок 2 – Интерфейс программы FragmentFinder

FragmentFinder считывает из таблицы праймеры, ищет их по очереди в каждом геноме: сначала ищется «правый» праймер, если он находится, то осуществляется поиск перевернутой комплементарной цепи «левого» праймера если он тоже находится, то найденный фрагмент вырезается (найденный

фрагмент включает оба праймера). Если «правый» праймер не был найден, то строится комплементарная ему цепь, переворачивается и осуществляется её поиск. Если данный участок найден, то осуществляется поиск «левого» праймера и, в случае успеха, найденный фрагмент вырезается.

Для поиска и анализа VNTR-локусов по данным, полученным методами полногеномного секвенирования, использовали программу FragmentFinder. Количество вариабельных тандемных повторов локусов VNTR определяли с помощью программы для анализа нуклеотидных последовательностей Tandem Repeats Finder. Полученные нуклеотидные последовательности и число повторов VNTR-локусов MLVA25-генотипов анализировали с помощью языка программирования python 3.10 и библиотек numpy 1.26, scipy 1.13. По результатам анализа данных полногеномного секвенирования 101 штамма *Y. pestis* нами определено 54 MLVA25-генотипа (рисунок 3).

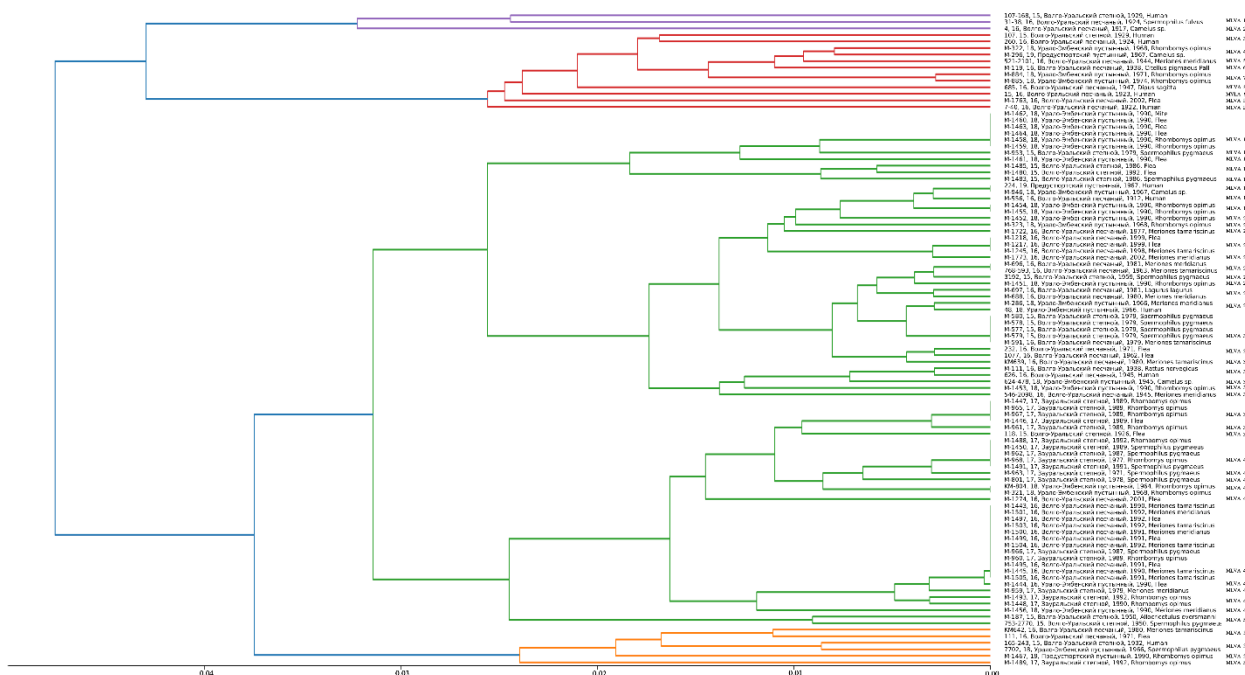


Рисунок 3 – Кладограмма MLVA25 –генотипов, выявленных у 101 штамма с территорий Северо-Восточного Прикаспия. Кладограмма построена методом UPGMA (невзвешенное попарное среднее), в качестве метрики использовалось несходство Брея-Кертиса. Разными цветами отмечены большие кластеры

Также была проведена оценка вариабельности VNTR-локусов. Вариабельными считали локусы, имеющие три и более аллелей (таблица 2).

Наиболее вариабельным локусом для штаммов *Y. pestis* из очагов Северо-Восточного Прикаспия оказался ms46, представленный 13 аллелями. Кроме него, наиболее вариабельными оказались локусы ms9, ms62 и ms70, представленные 5, 11 и 6 аллелями соответственно. В число вариабельных локусов вошли также ms4, ms5, ms6, ms7, ms15, ms21, ms56, ms71 и ms74, представленные от 3 до 4 аллелями. Все остальные локусы (ms1, ms20, ms35, ms38, ms40, ms41, ms44, ms45, ms51, ms54, ms69, ms71) оказались консервативными и во всех изученных штаммах представлены 1 аллелем.

Таблица 2 – Количество аллелей по каждому локусу. Наиболее вариабельные локусы (более 5 аллелей) отмечены красным. Локусы, также вошедшие в число вариабельных (от 3 до 5 аллелей) отмечены желтым

Локус	Аллели
ms1	7
ms4	6, 5, 7
ms5	10, 9, 11
ms6	4, 7, 5
ms7	7, 9
ms9	6, 12, 10, 7, 11
ms15	10, 7, 9
ms20	7
ms21	9, 8, 6
ms35	10
ms38	6
ms40	8
ms41	4
ms44	7
ms45	6
ms46	16, 13, 9, 18, 11, 14, 17, 8, 5, 12, 10, 15, 19
ms51	4
ms54	5
ms56	9, 8, 7
ms62	4, 6, 15, 11, 3, 14, 10, 13, 5, 9, 12
ms69	6
ms70	7, 8, 9, 6, 5, 10
ms71	4, 5, 3
ms73	4
ms74	8, 9, 4, 7

Таким образом, по результатам молекулярно-генетического анализа установлена популяционная структура штаммов *Y. pestis* из очагов Северо-Восточного Прикаспия и установлены VNTR-локусы (ms04, ms05, ms06, ms09, ms15, ms21, ms46, ms56, ms62, ms70, ms71 и ms74), обладающие высокой разрешающей способностью для дифференцирования этих популяций.

Заключение. Чума – одна из самых разрушительных болезней, с которой сталкивалось человечество, и по-прежнему представляет реальную угрозу для

населения и может вызвать чрезвычайную ситуацию в области здравоохранения как отдельных стран, так и в мировом масштабе. Несмотря на достаточно развитую медицину и, применение эффективных антимикробных препаратов, смертность от чумы все еще остается на достаточно высоком уровне. С учетом высокой вирулентности и глобального характера распространения возбудителя чумы, для предотвращения вспышек заболевания требуется постоянный контроль за очагами циркуляции *Y. pestis*.

В рамках данной работы нами проведено изучение 101 штамма *Y. pestis* из очагов чумы Северо-Восточного Прикаспия за период 1912-2002 гг. для установления популяционной структуры возбудителя чумы на этих территориях, уточнения фенотипического и молекулярного-генетического портрета его штаммов и разработки способов их молекулярной идентификации с помощью методов высокопроизводительного секвенирования, SNP-анализа и MLVA-генотипирования.

Выводы:

1. С помощью высокопроизводительного секвенирования и WG-SNP анализа 101 штамма *Y. pestis* определена популяционная структура средневекового биовара в природных очагах чумы Северо-Восточного Прикаспия в период XX – начала XXI вв. Выявлены единичные полиморфизмы, специфичные для штаммов средневекового биовара с исследованных территорий.
2. Определена популяционная структура *Y. pestis* из очагов Северо-Восточного Прикаспия методом MLVA типирования по данным полногеномного секвенирования. Выявлено наличие 54 MVLVA25-генотипов.
3. Разработана удобная и эффективная авторская программа для поиска VNTR-локусов в полногеномной последовательности по заданным праймерам.

