

На правах рукописи

ЯРЫГИНА МАРИНА БОРИСОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА *YERSINIA PESTIS*
В ТРАНСГРАНИЧНОМ САЙЛЮГЕМСКОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ ЧУМЫ**

1.5.11 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Иркутск – 2023

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: **Балахонов Сергей Владимирович**
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты: **Дентовская Светлана Владимировна**, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории микробиологии чумы Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Троценко Ольга Евгеньевна, доктор медицинских наук, директор Федерального бюджетного учреждения науки Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «__» _____ 2023 г. в _____ на заседании диссертационного совета 64.1.006.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://microbe.ru/disser/> Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46).

Автореферат разослан «...» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 64.1.006.01
доктор медицинских наук

Бугоркова Светлана Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности проблемы

Чума в современном мире, несмотря на успехи медицины в диагностике, лечении и профилактике этой болезни, остается одной из социально значимых инфекций. За последние 10 лет в мире зарегистрировано 5836 случаев чумы у людей. Наибольшее число заболевших за этот период наблюдалось в Республике Мадагаскар в 2017 г. – 2417, из них летальных – 229. В 2022 г. эпидемические проявления чумы официально зарегистрированы на территории трех государств, при этом общее число случаев заболевания составило 620, из них 12 закончились летальным исходом. Вместе с тем, в горных очагах, где носителями инфекции являются различные виды сурков, этот показатель может быть значительно выше. Проведение профилактических, а также карантинных и противоэпидемических мероприятий при чуме связано со значительными экономическими и временными затратами [Butler, 2009; Piarroux et al, 2013; Попова и др., 2017; Popova et al, 2018; Andrianaivoarimanana et al., 2019; Campbell et al, 2019; Попов и др., 2021, 2022]. Существование природных очагов чумы на обширных территориях является основной причиной возможности эпидемических осложнений; как правило, этому предшествует активизация эпизоотического процесса среди носителей возбудителя. Кроме того, остается постоянная угроза завоза чумы в Россию из соседних стран (Монголия, Китай, Киргизия, Казахстан), на территории которых расположены активные природные очаги, и в настоящее время периодически регистрируют заболеваемость людей [Адьяасурен и др., 2010, 2014; Wang et. al., 2018]. В Российской Федерации существует 11 природных очагов чумы [Кутырев и др., 2014а; Балахонов и др., 2014; Попова и др., 2018], из которых Горно-Алтайский высокогорный природный очаг в настоящее время является наиболее активным [Балахонов и др., 2014; Корзун и др., 2017].

Сайлюгемский природный очаг чумы расположен на территории России и Монголии. Северная (российская) часть очага по номенклатуре природных очагов чумы Российской Федерации носит название Горно-Алтайский высокогорный природный очаг чумы. Южная (монгольская) часть находится в Северо-Западной Монголии. В очаге циркулирует чумной микроб двух вариантов: центральноазиатского подвида алтайского биовара (*Yersinia pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*) филогенетической ветви 0.PE4a (классификация *Y. pestis* приводится по [Kutyrev et al., 2018; Попов и др., 2020], ранее использовали наименование *Y. pestis* ssp. *altaica* [Тимофеева, 1972]), и основного подвида (*Y. pestis* ssp. *pestis*) античного биовара филогенетической ветви 4.ANT.

Возбудитель чумы центральноазиатского подвида алтайского биовара в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге выделен в 1961 г. [Балабкин и др., 1962]. Основным носителем *Y. pestis* ssp. *pestis* является монгольская пищуха. На долю этого зверька и его эктопаразитов приходится более 80 % изолированных культур чумного микроба [Балахонов и др., 2014]. С 2012 г. в очаге циркулирует *Y. pestis* ssp. *pestis*, основным носителем которого является серый сурок [Балахонов и др., 2013; Корзун и др., 2017].

В монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы культура чумного микроба алтайского биовара впервые получена в 1953 г. [Некипелов, 1959]. С 1958 по 1990 годы проводились регулярные эпизоотологи-

ческие обследования данной части очага, и за этот период изолировано около 500 штаммов возбудителя [Логачев и др., 1978; Сотникова и др., 1980; Батсух и др., 1988; Балахонов и др., 2022]. В 2017 г. в этой части очага установлена циркуляция эпидемически значимого варианта возбудителя чумы основного подвида [Корзун и др., 2018].

С начала обнаружения первых эпизоотических проявлений и по настоящее время эпизоотии различной интенсивности в Сайлюгемском природном очаге регистрируют ежегодно. Широкое распространение в поселениях серого сурка *Y. pestis* ssp. *pestis* привело к обострению эпидемиологической ситуации на территории России в 2014-2016 гг., на территории Монголии в 2019 г. [Балахонов и др., 2022].

Совместная циркуляция двух вариантов возбудителя чумы (*Y. pestis* ssp. *pestis* и *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*), широкая распространенность за короткое время чумного микроба основного подвида в трансграничном Сайлюгемском природном очаге, его высокая вирулентность и эпидемическая значимость, а также недостаточность информации по популяционной структуре *Y. pestis* в данном природном очаге вызывают необходимость дальнейшего углубленного изучения этого аспекта с применением современных молекулярно-генетических методов, в частности пространственно-временной трансформации генотипической структуры *Y. pestis* на современном этапе развития очага.

Цель работы – изучить генетическое разнообразие и динамику пространственно-временной генотипической структуры *Y. pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы методом MLVA25-типирования.

Задачи исследования:

1. Провести анализ изменения генотипической структуры возбудителя чумы *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* в российской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы с использованием метода MLVA25-типирования.

2. Оценить частоту встречаемости аллелей наиболее вариабельных VNTR локусов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* в Уландрыкским, Тархатинским и Курайским мезоочагами российской части Сайлюгемского природного очага чумы.

3. Изучить генотипическую структуру *Y. pestis* ssp. *pestis* в российской и монгольской частях Сайлюгемского природного очага чумы с помощью MLVA25 анализа.

4. Провести сравнительную оценку частоты встречаемости tandemных повторов в вариабельных VNTR локусах *Y. pestis* ssp. *pestis* в пространственных группах штаммов в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы.

Научная новизна. По результатам MLVA25-типирования 330 штаммов установлены основные особенности современной пространственной структуры *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* в российской части Сайлюгемского природного очага чумы. Показано, что в трех мезоочагах (Уландрыкском, Тархатинском, Курайском), расположенных в границах отдельных популяций монгольской пищухи, циркулируют относительно независимые совокупности чумного микроба центральноазиатского подвида алтайского биовара. Установлено, что MLVA25-структура этого варианта возбудителя в

Уландрыкском и Курайском мезоочагах характеризуется постоянством во времени, а в Тархатинском мезоочаге наблюдаются выраженные ее изменения.

В трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы циркуляция *Y. pestis* ssp. *pestis* выявлена в российской части с 2012 г., в монгольской – с 2017 г. Данный подвид чумного микроба за этот период распространился практически по всей территории очага, при этом не обнаружено выраженного генетического разнообразия по MLVA25, при его оценке методами UPGMA и MST. Новыми являются данные, полученные при анализе частоты встречаемости числа tandemных повторов по трем вариабельным локусам у штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, которые показывают значимые различия между изученными выборками.

Получены новые данные о генетической изменчивости 25 VNTR локусов: у *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* наблюдается значительное разнообразие по шести локусам (*yp2916ms07*, *yp1814ms20*, *yp0581ms40*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*, *yp1925ms71*), у *Y. pestis* ssp. *pestis* – по трем (*yp2769ms06*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*). Установлено, что локус *yp4280ms62* является ключевым для пространственной дифференциации *Y. pestis* внутри трансграничного Сайлюгемского природного очага.

Теоретическая и практическая значимость. Показана пространственная неоднородность *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*, связанная с субвидовой хорологической структурой монгольской пищухи. С помощью MLVA25 метода подтверждено, что распространение этого варианта возбудителя в Юго-Восточном Алтае произошло из Уландрыкского мезоочага сначала в Тархатинский, а затем в Курайский. Результаты MLVA25-типирования *Y. pestis* ssp. *pestis* демонстрируют низкую генотипическую изменчивость локусов в пространственных группах, на основании этого сформулирована гипотеза, что возбудитель чумы основного подвида в очаге циркулирует относительно недавно. Полученные данные дают обоснование комплексного использования филогенетических, эпизоотолого-эпидемиологических подходов для определения закономерностей циркуляции чумного микроба и способствуют оптимизации системы эпидемиологического надзора за чумой в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы.

На основе выполненных исследований подготовлены и внедрены в работу методические документы: МР 4.2.0090-14 «Использование методов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (рибопринтинг, электрофорез в пульсирующем поле) для идентификации возбудителей I-II групп патогенности», утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 13.05.2014, федеральный уровень; МР «Эпизоотологическое обследование Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы», одобрены Ученым советом ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора 06.02.2017, протокол № 2 и утверждены заместителем директора института, учрежденческий уровень; МР «Обеззараживание биологического материала, полученного от млекопитающих, добытых на территории сибирских природных очагов чумы», одобрены Ученым советом ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора 27.09.2020, протокол № 6 и утверждены директором института,

учрежденческий уровень; база данных «Штаммы возбудителя чумы, изолированные в Горно-Алтайском природном очаге» (Свидетельство о ГР № 2018621221); «Учебно-методическое пособие к практическим занятиям по лабораторной диагностике чумы: для врачей-бактериологов (биологов) и преподавателей» (Иркутск, 2022).

Научные и практически значимые материалы исследований внедрены в практику научно-исследовательской работы ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора при проведении эпидемиологического надзора за чумой, включены в лекционные курсы при подготовке кадров учреждений Роспотребнадзора и других ведомств по программам дополнительного профессионального образования при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установлено генетическое разнообразие штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* из трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы по шести вариабельным локусам (*yp2916ms07*, *yp1814ms20*, *yp0581ms40*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*, *yp1925ms71*).

2. В Уландрыкском, Тархатинском и Курайском мезоочагах российской части трансграничного Сайлюгемского природного очага распространен возбудитель чумы алтайского биовара центральноазиатского подвида, обладающий своим VNTR-профилем при филогенетическом анализе, выполненном методами UPGMA и MST. Частота встречаемости аллелей по шести вариабельным локусам в этих мезоочагах существенно различается.

3. У штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, изолированных в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы, отсутствует выраженная географическая структурированность при филогенетическом анализе, выполненном методами UPGMA и MST. Сравнение частоты встречаемости аллелей в трех изменчивых локусах (*yp2769ms06*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*) показывает четкую пространственную дифференциацию между штаммами, полученными на монгольской и российской территориях очага.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования. Работа выполнена в рамках четырех тем НИР ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора «Природная очаговость чумы в Сибири: структурированность компонентов и динамика эпизоотического процесса» 2011-2015 гг. (001-1-11, № гос. регистрации 01201068219); «Структурно-функциональные особенности природной очаговости чумы в Сибири и обеспечение эпидемиологического благополучия населения» 2016-2020 гг. (001-1-16, № гос. регистрации АААА-А16-116042710047-5); «Изучение современного состояния трансграничных с Россией природных очагов чумы Монголии для обеспечения эпидемиологического благополучия населения» 2020-2022 гг. (003-1-20, № гос. регистрации АААА-А20-1200204900-1); «Совершенствование системы эпидемиологического надзора за чумой в сибирских природных очагах в условиях активизации их эпизоотической активности» 2021-2025 гг. (001-1-21, № гос. регистрации АААА-А21-121011190040-6).

Работа выполнена в ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Диссертантом были сформулированы цель работы, задачи исследования, положения, выносимые на защиту. Автором лично подобрана и проанализирована литература, проведено планирование и проведение исследований, статистическая обработка данных, анализ, обобщение результатов и подготовка публикаций. Автор принимал непосредственное участие в эпизоотологическом мониторинге Сайлюгемского природного очага чумы в 2012-2021 гг.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов работы подтверждается достаточным объемом собранного материала, выполнением исследований с помощью современных методов и технологий, статистическим анализом полученных данных.

Материалы, изложенные в диссертации, представлены и обсуждены на научно-практических конференциях, конгрессах, съездах: «Основные проблемы охраны окружающей среды и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Сибирском федеральном округе, перспективы их решения» (Горно-Алтайск, 2013); «Вклад государств-участников Содружества Независимых Государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях» (Саратов, 2014); «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, 2016); «Биоразнообразие, проблемы экологии Горного Алтая и сопредельных регионов: настоящее, прошлое, будущее» (Горно-Алтайск, 2016); «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях» (Санкт-Петербург, 2016); «V Национальный конгресса бактериологов» (Москва, 2016); «XI съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП)» (Москва, 2017); «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017); «Молекулярная диагностика» (Москва, 2017); «Current issues on zoonotic diseases» (Ulaanbaatar, 2017); «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (Москва, 2017); «V Национальный конгресс бактериологов» (Москва, 2019); Current issues on zoonotic diseases: 23rd International Scientific Conference (Ulaanbaatar, 2019); XV Межгосударственная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (Иркутск, 2021); «Актуальные проблемы зоонозных инфекций, посвященные 90-й годовщине Национального центра зоонозных инфекций (NCZD)» (Монголия, 2021); Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022 (Москва, 2022); XVI Межгосударственная научно-практическая конференция по вопросам санитарной охраны территории и снижения риска распространения чумы (Санкт-Петербург, 2022); Материалы международного симпозиума «*Yersinia* 14» (Санкт-Петербург, 2022); VII Национальный конгресс бактериологов (Санкт-Петербург, 2022); «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Сибири и Дальнего Востока» (Иркутск, 2022).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 27 работ, в том числе 11 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных материалов кандидатских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, одной главы обзора литературы, четырёх глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературных источников. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 таблицами и 17 рисунками. Список литературных источников содержит 199 наименований, в том числе 68 – на английском языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. В этой главе представлен анализ отечественных и зарубежных публикаций по природной очаговости чумы, исследованию популяционной структуры возбудителя чумы современными молекулярно-генетическими методами. Дана характеристика трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы, описаны эпидемические проявления в нем.

Материалы и методы. Использованы данные отчетной документации ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора с 1961 по 2021 год. Основные методы исследования *Y. pestis*: микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические и биоинформационные. Работа выполнена на 490 штаммах *Y. pestis*, изолированных на российской и монгольской территориях Сайлюгемского природного очага чумы при проведении эпизоотологического обследования. Из них 160 *Y. pestis* ssp. *pestis*, выделенных в 2012-2019 гг. и 330 *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* – 1961-2015 гг. Все работы с возбудителем чумы осуществляли в соответствии с действующими нормативно-методическими документами [СанПин 3.3686-21]. Культивирование штаммов проводили при 28 ± 1 °C или 37 ± 1 °C 24-48 часов на плотных и жидких питательных средах. Определение ферментативной активности, признака пигментации, зависимости роста штаммов *Y. pestis* от ионов кальция проводили согласно практическому руководству «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» [Онищенко, Кутырев, 2013]. Антибиотикочувствительность изучали согласно МУК 4.2.2495-09. Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.), согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1987 г.), Федеральному закону о защите животных от жестокого обращения от 01.01.1997 г. и приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. Расчет LD₅₀ выполняли по Ашмарину [1962]. Определение плазмидного профиля штаммов *Y. pestis* проводили согласно Т. Kieser [1984] в нашей модификации [Методические рекомендации по определению плазмидного состава патогенных штаммов бактерий семейства Enterobacteriaceae, Иркутск, 2018 г.]. Получение геномной ДНК *Y. pestis* осуществляли модифицированным нами методом J. Marmur [1961]. Организацию работ при использовании метода ПЦР осуществляли согласно требованиям действующих методических указаний [МУ 1.3. 2569-09]. Амплификацию выполняли с применением ДНК-амплификатора GeneAmp 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Размер полученных ампликонов определяли методом капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABIPrism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США; Hitachi, Япония) путем сравнения с маркером молекулярного веса

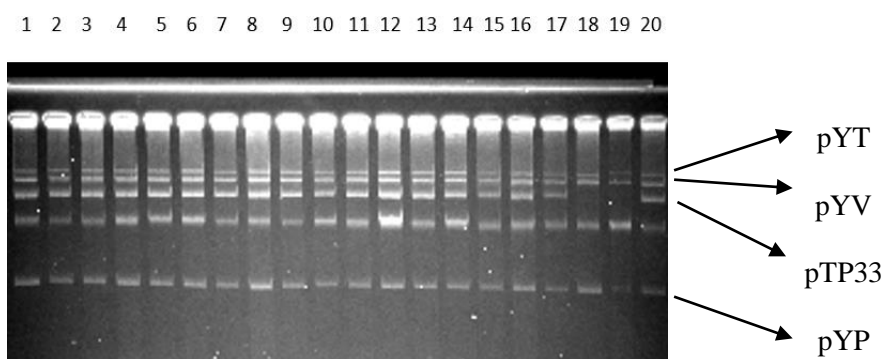
GeneScan™ 500 LIZ™ SizeStandard. Обработку результатов исследований проводили стандартными методами вариационной статистики. Использовали критерий согласия хи-квадрат (χ^2) [Закс, 1976].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Фенотипическая характеристика и плазмидный профиль штаммов *Y. pestis* из Сайлюгемского природного очага чумы

При эпизоотологическом обследовании Сайлюгемского природного очага чумы в 2012-2022 гг. изолировано 367 штаммов чумного микроба, из них 73 – *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* и 294 – *Y. pestis* ssp. *pestis*, в том числе выделенных от людей. Фенотипические свойства изучены у 299 штаммов.

В результате микробиологической идентификации штаммов *Y. pestis* установлено, что все они на агаре Хоттингера растут в виде колоний R-формы, бугристые, возвышающиеся в центре, с плоским прозрачным фестончатым краем. В бульоне Хоттингера – агглютинативный рост, в виде хлопьевидного осадка на дне, бульон оставался прозрачным. В течение первых суток ферментируют глицерин, мальтозу, маннит, глюкозу; восстанавливают нитраты в нитриты; неподвижные. *Y. pestis* ssp. *pestis* расщепляет арабинозу, не ферментирует рамнозу, в отличие от *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*, который не утилизирует арабинозу, окисляет рамнозу. На среде Джексона и Берроуза с геминном у возбудителя чумы основного подвида вырастали только пигментированные колонии, у центральноазиатского подвида отмечался рост как пигментированных, так и не пигментированных колоний. Штаммы лизируются бактериофагами: чумным Покровской, чумным Л-413, псевдотуберкулезным. Анализ плазмидного профиля изученных штаммов показан на рисунке 1.



1 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-2638 (референтный) Тыва, Монгун-Тайга, 1977 г.; 2 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3664, Монголия, Хундуй; 3 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3642, Монголия, Хар-Жамат; 4 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3648, Монголия, Хар-Жамат; 5 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3667, Монголия, Шар-Булаг; 6 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3639, Монголия, Шар-Булаг; 7 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3633, Монголия, Терсагкан; 8 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3673, Монголия, Бухан-Толгой; 9 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3662, Монголия, Хундуй; 10 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3637, Монголия, Шар-Булаг; 11 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3649, Монголия, Жалпак; 12 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3647, Монголия, Хар-Жамат; 13 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3635, Монголия, Баян-Улга, Терсагкан; 14 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3640, Монголия, Терсагкан; 15 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3671, Монголия, Хар-Жамат; 16 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3659, Монголия, Хагнур; 17 – *Y. pestis* ssp. *pestis* И-3674, Монголия, Бухан-Толгой; 18 – *Y. pestis* EV NIEG 229, Мадагаскар, 1926 г.; 19 – *Y. pestis* ssp. *altaica* 1139 Алтай, Курайский хребет; 20 – *Y. pestis* ssp. *pestis* 1276, Тыва, Кургак-Сай.

Рисунок 1 – Плазмидный анализ штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Сайлюгемского природного очага чумы.

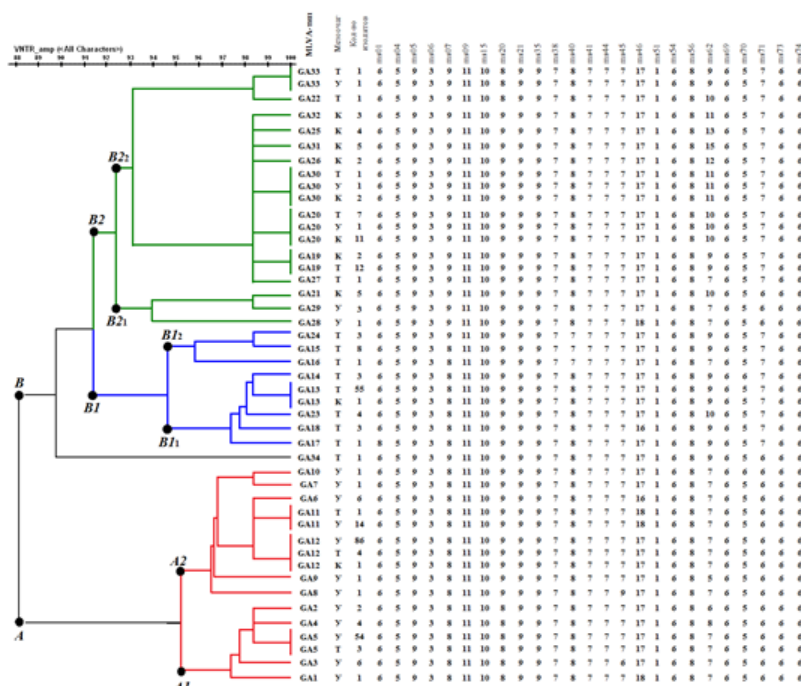
В результате исследования установлено, что штаммы, изолированные в Сайлюгемском природном очаге чумы, относятся к *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* и *Y. pestis* ssp. *pestis* с характерными культурально-морфологическими, биохимическими свойствами, набором основных детерминант вирулентности.

2. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* при MLVA25-типировании

В этом разделе представлены материалы исследования генетического разнообразия и динамики пространственно-временной генотипической структуры 330 штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*, выделенных в 1961-2015 гг., в российской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы при MLVA25-типировании.

На основе кластерного анализа 25 VNTR локусов, штаммы *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* дифференцированы на 34 MLVA типа, названных GA1-GA34, из них 11 были уникальными (т.е. выявлены только у одного штамма в изученной выборке), 17 небольших по объему VNTR-профилей включали от 2 до 8 штаммов, в состав трех средних вошли 14, 15 и 19 штаммов, три наиболее крупных объединяли 56, 57 и 91 штамм (рисунок 2).

Результаты кластерного анализа показывают, что в исследуемой выборке выделяются два кластера (A и B), примерно сходных по количеству входящих в них штаммов (186 и 144 соответственно) (рисунок 2). Кластер A включает в себя два больших подкластера (A1 и A2). В A1 вошли 70 штаммов, из них 67 изолированы в Уландрыкском мезоочаге и 3 в Тархатинском. Подкластер A2 включает 116 штаммов, из которых 110 выделены в Уландрыкском мезоочаге, 5 – в Тархатинском, 1 – в Курайском.



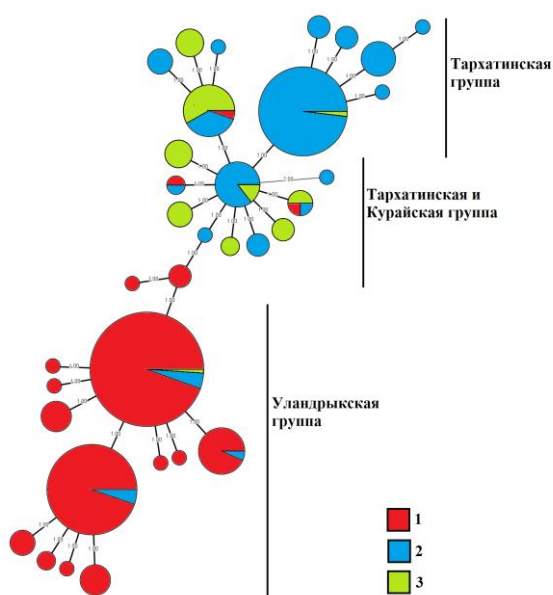
Буквами обозначены мезоочаги, в которых изолированы штаммы: У – Уландрыкский, Т – Тархатинский, К – Курайский.

Рисунок 2 – Схема MLVA25 типов, обнаруженных у 330 штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*, изолированных в российской части Сайлюгемского природного очага чумы.

В кластере *B* один штамм, изолированный в Тархатинском мезоочаге, расположен отдельно (генотип GA34). Остальные штаммы образуют два крупных подкластера (*B1* и *B2*). Подкластер *B1* содержит 79 штаммов, 78 из которых выделено в Тархатинском мезоочаге и 1 – в Курайском. Во вторую ветвь *B2*, состоящую из 64 штаммов, попали 7 изолятов из Уландрыковского мезоочага, 23 – из Тархатинского и 34 – из Курайского (рисунок 2).

В подкластеры *A1* и *A2* в основном входят штаммы из Уландрыковского мезоочага, и они составляют суммарно 96,2 % от объема всей выборки с этой территории. Наиболее гомогенный по месту выделения штаммов подкластер *B1* представлен преимущественно штаммами из Тархатинского мезоочага, при этом в него входят 70,1 % изолятов от всех выделенных в нем. Наиболее гетерогенный по составу подкластер *B2* сформирован штаммами, изолированными главным образом в Курайском (94,4 % от общего количества штаммов из этой части очага), а также Тархатинском (20,1 %) мезоочагах. Сравнение распределений штаммов по принадлежности к мезоочагам в четырех основных группах (*A1*, *A2*, *B1*, *B2*) свидетельствует, что оно с высокой достоверностью определяется местом их выделения ($\chi^2 = 397,25$; $df = 6$; $p < 0,001$).

Для дополнительной оценки особенностей MLVA25 генотипической структуры *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* в российской части Сайлюгемского природного очага чумы проведен анализ методом MST (рисунок 3). Очевидно наличие трех оформленных изолированных групп, сформированных в зависимости от места выделения штаммов в пределах очага и соответствующих данным, полученным методом UPGMA. Уландрыковская и Тархатинская группы преимущественно состоят из штаммов, изолированных в соответствующих мезоочагах, между ними расположена группа, в которую вошли штаммы из Курайского и Тархатинского мезоочагов.



Каждый MLVA25-тип представлен кругом, его размер показывает число штаммов. Цвет указывает на штаммы, выделенные в разных мезоочагах: красный – Уландрыковский (1), синий – Тархатинский (2), зеленый – Курайский (3).

Рисунок 3 – Минимальное остовное дерево (MST), построенное на основании данных MLVA25-типирования 330 штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*, изолированных в российской части Сайлюгемского природного очага чумы.

При рассмотрении зависимости выделяющихся отдельных групп изолятов от времени получения штаммов и приуроченности их к отдельным эпизоотическим участкам внутри мезоочагов установлено, что распределение штаммов из Уландрыковского мезоочага в двух ветвях кластера *A* в целом не связано со временем и

участками их выделения. Изоляты в подкластерах A1 и A2 получены во все рассмотренные хронологические периоды, начиная от обнаружения очага в 1961 г. и по настоящее время, и на всех эпизоотических участках (таблица 1, рисунок 2). Такая картина выражена у двух крупных MLVA25 типов – GA5 и GA12, в основном определяющих количественный состав кластера A. Напротив, небольшие по объему MLVA25 типы сформированы штаммами, изолированными в пределах одного эпизоотического участка (GA2, GA3, GA4) или на граничащих между собой участках (GA6) и в близкие годы.

Таблица 1 – Характеристика MLVA25-типов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* в Горно-Алтайском природном очаге чумы по месту и времени изоляции штаммов

MLVA25-тип	Мезоочаг (число штаммов)	Участок	Год выделения
GA1	У (1)	Стационар и Большой Кочкор-Бас	1992
GA2	У (2)	Большие и Малые Сары-Гобо	2001, 2004
GA3	У (6)	Середина р. Уландрык	2000, 2003
GA4	У (4)	Низовье р. Уландрык	1990, 2000, 2003
GA5	У (54), Т (3)	Низовье р. Уландрык, Середина р. Уландрык, Вершина р. Уландрык, Стационар и Большой Кочкор-Бас, Большие и Малые Сары-Гобо, Кызыл-Капчал, Низовье р. Тархата, Сербисту	1965, 1970-1973, 1975, 1976, 1978-1982, 1984-1987, 1992-1994, 2003, 2006, 2007
GA6	У (6)	Большие и Малые Сары-Гобо, Низовье р. Уландрык, Середина р. Большие Шибеты	1998, 2001, 2003
GA7	У (1)	Стационар и Большой Кочкор-Бас	1982
GA8	У (1)	Стационар и Большой Кочкор-Бас	1970
GA9	У (1)	Низовье р. Уландрык	1965
GA10	У (1)	Кызыл-Капчал	1981
GA11	У (14), Т (1)	Стационар и Большой Кочкор-Бас, Большие и Малые Сары-Гобо, Низовье р. Уландрык, Кок-Озёк	1990-1992, 1995, 2002, 2003, 2006, 2007
GA12	У (86), Т (4), К (1)	Низовье р. Уландрык, Середина р. Уландрык, Вершина р. Уландрык, Стационар и Большой Кочкор-Бас, Большие и Малые Сары-Гобо, Кызыл-Капчал, Середина р. Большие Шибеты, Сербисту, Правый берег р. Чаган-Бургазы, Восточная часть Курайского хребта	1961-1970, 1974-1982, 1985, 1986, 1988-1990, 1995, 1998-2003, 2006
GA13	Т (55), К (1)	Низовье р. Тархата, Кок-Озёк, Сербисту, Середина р. Ирбисту, Середина р. Елангаш, Середина р. Чаган-Узун, Восточная часть Курайского хребта	1990, 2002, 2003, 2005, 2006, 2007
GA14	Т (3)	Сербисту	2007
GA15	Т (8)	Сербисту, Середина р. Ирбисту	2003, 2006, 2014
GA16	Т (1)	Середина р. Ирбисту	2006
GA17	Т (1)	Сербисту	2006
GA18	Т (3)	Середина р. Чаган-Узун	2003
GA19	Т (12), К (2)	Урочища Оюм, Шибе, Низовье р. Тархата, Правый берег р. Чаган-Бургазы, Сербисту, Восточная часть Курайского хребта, Центральная часть Курайского хребта	1972, 1973, 1975, 1979, 2000, 2002, 2003, 2005

GA20	У (1), Т (7), К (11)	Кызыл-Капчал, Правый берег р. Чаган-Бургазы, Урочища Оюм, Шибе, Восточная часть Курайского хребта, Центральная часть Курайского хребта	1972, 1973, 1975-1977, 1979, 1999, 2000, 2006
GA21	К (5)	Центральная часть Курайского хребта	2006
GA22	Т (1)	Сербисту	1973
GA23	Т (4)	Сербисту, Середина р. Ирбисту	2006
GA24	Т (3)	Правый берег р. Чаган-Бургазы, Середина р. Ирбисту	2005, 2007
GA25	К (4)	Центральная часть Курайского хребта	2006, 2007
GA26	К (2)	Восточная часть Курайского хребта, Центральная часть Курайского хребта	2002, 2004
GA27	Т (1)	Урочища Оюм, Шибе	1977
GA28	У (1)	Стационар и Большой Кочкор-Бас	2007
GA29	У (3)	Низовье р. Уландрык, Стационар и Большой Кочкор-Бас	1964, 1994, 2006
GA30	У (1), Т (1), К (2)	Кызыл-Капчал, Правый берег р. Чаган-Бургазы, Восточная часть Курайского хребта	1976, 2002, 2007
GA31	К (5)	Восточная часть Курайского хребта	2002, 2003
GA32	К (3)	Центральная часть Курайского хребта	2015
GA33	У (1), Т (1)	Стационар и Большой Кочкор-Бас, Правый берег р. Чаган-Бургазы	1975, 1976
GA34	Т (1)	Сербисту	1973

В подкластере *B1* штаммы из Тархатинского мезоочага образуют две ветви *B1₁* (5 MLVA25 типов) и *B1₂* (3 MLVA25 типа). В первую из них вошли 67 штаммов, полученных в 1990-2007 гг. на большинстве эпизоотических участков этой части очага, во вторую – 12 изолятов, выделенных в 2003-2014 гг. на трех участках (таблица 1, рисунок 2).

Самая разнородная совокупность штаммов по месту выделения – подкластер *B2*; в нем сформированы две обособленные группы – *B2₁* и *B2₂*. В группе *B2₁* два MLVA25 типа (GA28 и GA29) представлены 4 штаммами из Уландрыкского мезоочага, весьма разнородными по времени выделения (таблица 1). Еще в один MLVA25 тип (GA21) попали 5 штаммов из Курайского мезоочага. В ветвь *B2₂*, образованную 10 MLVA25 типами входят 29 штаммов из Курайского мезоочага, полученные с 1999 (год обнаружения мезоочага) по 2015 г. на большей части его территории, и три штамма из Уландрыкского мезоочага. Кроме того, в ее составе 23 штамма из Тархатинского мезоочага, из них 20 выделены с 1972 (год обнаружения мезоочага) по 1979 г. на 4 из 6 известных к этому времени эпизоотических участках данной части очага и только три получены в 2002, 2003 и 2005 гг. В кластере *B*, также, как и в кластере *A*, большинство небольших по объему MLVA25 типов сформированы штаммами, изолированными в один или близкие годы в пределах одного (GA14, GA18, GA21, GA25, GA31, GA32) или двух расположенных рядом (GA15, GA23, GA26) эпизоотических участков. Но проявляются и исключения из этой закономерности: тип GA24 выявлен на двух разделенных большим расстоянием участках, GA29 – на граничащих между собой участках, но через большие промежутки времени – в течение 42 лет, GA30 обнаружен в трех мезоочагах с большим разрывом во времени (таблица 1). Крупный (GA13) и средние (GA19, GA20) по объему MLVA25 типы представлены штаммами, изолирован-

ными на многих эпизоотических участках и в разных мезоочагах за большие промежутки времени.

В результате исследования установлено, что MLVA25-структура чумного микроба в Уландрыкском и Курайском мезоочагах характеризуется стабильностью во времени; существенные изменения не обнаруживаются с начала их выявления в 1961 и 1999 гг. соответственно. В Тархатинском мезоочаге, известном с 1972 г., наблюдаются кардинальные изменения MLVA25-структуры. Здесь с начала 1990-х гг. произошло массовое распространение MLVA25-типов, до этого периода встречавшихся с небольшой частотой, и элиминация таковых, абсолютно доминирующих до 1980 г. Наиболее вероятно, что смена доминирующих генотипов обусловлена эффектом «бутылочного горлышка», произошедшим в результате резкого снижения эпизоотической активности очага в середине 1980-х годов.

Частота встречаемости аллелей в переменных VNTR локусах у Y. pestis ssp. central asiatica bv. altaica

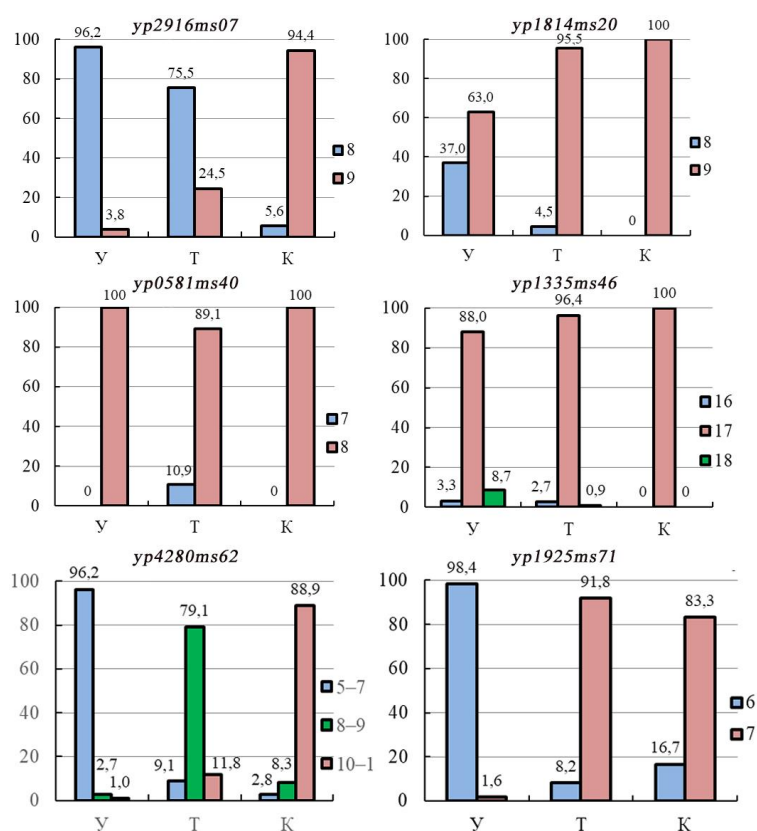
Для более глубокого представления об особенностях MLVA25 генотипической структуры чумного микроба алтайского биовара, циркулирующего на территории каждого из трех мезоочагов, рассмотрены различия по частоте встречаемости аллелей в шести наиболее переменных в выборке VNTR локусах.

В локусе *up1814ms20* во всех трех мезоочагах преимущественно обнаруживается 9 тандемных повторов. При этом 8 повторов с относительно высокой частотой наблюдается у уландрыкских и с низкой – у тархатинских штаммов, а у курайских они не встречается (рисунок 4). Между уландрыкскими изолятами и штаммами из двух других мезоочагов проявляются высоко значимые отличия (таблица 2).

Наиболее слабые различия между сравниваемыми выборками наблюдаются по локусам *up0581ms40* и *up1335ms46* (рисунок 4, таблица 2). В первом случае у всех штаммов, выделенных в Уландрыкском и Курайском мезоочагах, имелось 8 повторов и лишь у относительно небольшого количества тархатинских изолятов выявлялось 7 повторов. Во втором случае в изучаемых совокупностях представлены генотипы с 17 тандемными повторами, при этом среди уландрыкских и тархатинских штаммов встречается небольшое количество аллелей в 16 и 18 повторов. Различия между анализируемыми выборками по локусу *up0581ms40* высоко достоверны, по локусу *up1335ms46* штаммы, включенные в выборки Уландрыкский-Курайский и Тархатинский-Курайский мезоочаги, статистически значимо не различаются.

Наиболее рельефные различия между выборками штаммов из трех мезоочагов просматриваются по самому переменному локусу *up4280ms62*. Сравнение распределений частот аллелей выявило высокую степень их неоднородности (таблица 2). В Уландрыкском мезоочаге преимущественно обнаруживаются генотипы с 5-7 повторами, в Тархатинском – с 9 (79,1 %), а в Курайском большая часть штаммов содержит 10-15 повторов (рисунок 4).

Кардинальные отличия проявляются у уландрыкских штаммов от изолятов из двух других мезоочагов по локусу *up1925ms71* (рисунок 4, таблица 2). У первых подавляющее большинство повторов 6, тогда как у курайских и тархатинских штаммов – 7. При этом штаммы, включенные в две последние исследуемые выборки, статистически значимо не различаются.



По оси абсцисс – мезоочаги, по оси ординат – частоты (%).

Рисунок 4 – Частота встречаемости числа tandemных повторов по шести варибельным локусам у штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* из Уландрыкского (У), Тархатинского (Т) и Курайского (К) мезоочагов.

Сравнение частот аллелей по шести локусам, обладающим наибольшей изменчивостью, показало, что по каждому из них отличия между выборками штаммов из разных мезоочагов характеризуются своими индивидуальными особенностями.

Таблица 2 – Результаты оценки различий по критерию согласия между выборками штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* из разных мезоочагов по частоте встречаемости числа tandemных повторов по шести VNTR локусам

Локус	Сравниваемые совокупности	χ^2	<i>df</i>	<i>P</i>
yp2916ms07	У–Т–К	152,77	2	<0,001
	У–Т	28,96	1	<0,001
	У–К	163,14	1	<0,001
	Т–К	103,57	1	<0,001
yp1814ms20	У–Т–К	53,46	2	<0,001
	У–Т	38,75	1	<0,001
	У–К	19,26	1	<0,001
	Т–К	1,91	1	>0,05
yp0581ms40	У–Т–К	24,91	2	<0,001
	У–Т	20,93	1	<0,001
	У–К	–	–	–
	Т–К	4,28	1	<0,05

<i>yp1335ms46</i>	У–Т–К	12,15	4	<0,05
	У–Т	7,81	2	<0,05
	У–К	4,78	2	>0,05
	Т–К	1,34	2	>0,05
<i>yp4280ms62</i>	У–Т–К	458,32	18	<0,001
	У–Т	243,32	6	<0,001
	У–К	194,29	9	<0,001
	Т–К	84,10	7	<0,001
<i>yp1925ms71</i>	У–Т–К	262,77	2	<0,001
	У–Т	244,94	1	<0,001
	У–К	157,64	1	<0,001
	Т–К	2,12	1	>0,05

Изложенные результаты MLVA25-типирования показывают качественную неоднородность изученной совокупности штаммов и выраженную пространственную структурированность *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* в российской части Сайлюгемского природного очага чумы. На его территории выявляются три четко разграниченные группы возбудителя чумы алтайского подвида, обладающие своеобразием генотипических характеристик. Каждая из них распространена в пределах популяции основного носителя – монгольской пищухи (Уландрыкской, Тархатинской, Курайской) и, соответственно, в одноименном мезоочаге.

3. Генотипическая структура *Yersinia pestis* ssp. *pestis* при MLVA25-типировании

Генотипическая структура Y. pestis ssp. *pestis* по MLVA25 в трансграничных и приграничных природных очагах России и Монголии

Проведен анализ генотипической структуры по MLVA25 *Y. pestis*, циркулирующего в трансграничных и приграничных природных очагах России и Монголии. Для исследования взято 37 изолятов чумного микроба основного подвида, из них 22 выделены в Сайлюгемском природном очаге чумы (Россия, Монголия), 3 – в Хуух-Серх-Мунх-Хаирханском (Монголия), 1 – Хархиро-Тургенском (Монголия), 4 – Забайкальском степном (Россия), 7 – Тувинском горном (Россия) (рисунок 5).

Полученные результаты демонстрируют, что штаммы *Y. pestis* ssp. *pestis* делятся на два кластера. Кластер А сформирован исключительно штаммами, изолированными в Забайкальском природном очаге. Кластер В образован двумя ветвями. Первая из них – *VI* – представлена семью изолятами, выделенными в разные годы в Тувинском природном очаге. Вторая ветвь – *VII* – представляет собой однородный комплекс MLVA25-типов штаммов чумного микроба, изолированных как на монгольской, так и на российской частях трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. Между кластерами А и В выявлены различия по двенадцати переменным локусам (*yp0120ms01*, *yp2769ms06*, *yp3057ms09*, *yp0559ms15*, *yp1814ms20*, *yp0581ms40*, *yp0718ms41*, *yp1335ms46*, *yp3060ms56*, *yp4280ms62*, *yp1580ms70*, *yp3245ms74*). Между штаммами, входящими в кластер В, проявляются минимальные различия по семи локусам (*yp2769ms06*, *yp3057ms09*, *yp0559ms15*, *yp1335ms46*, *yp3060ms56*, *yp4280ms62*, *yp1580ms70*).

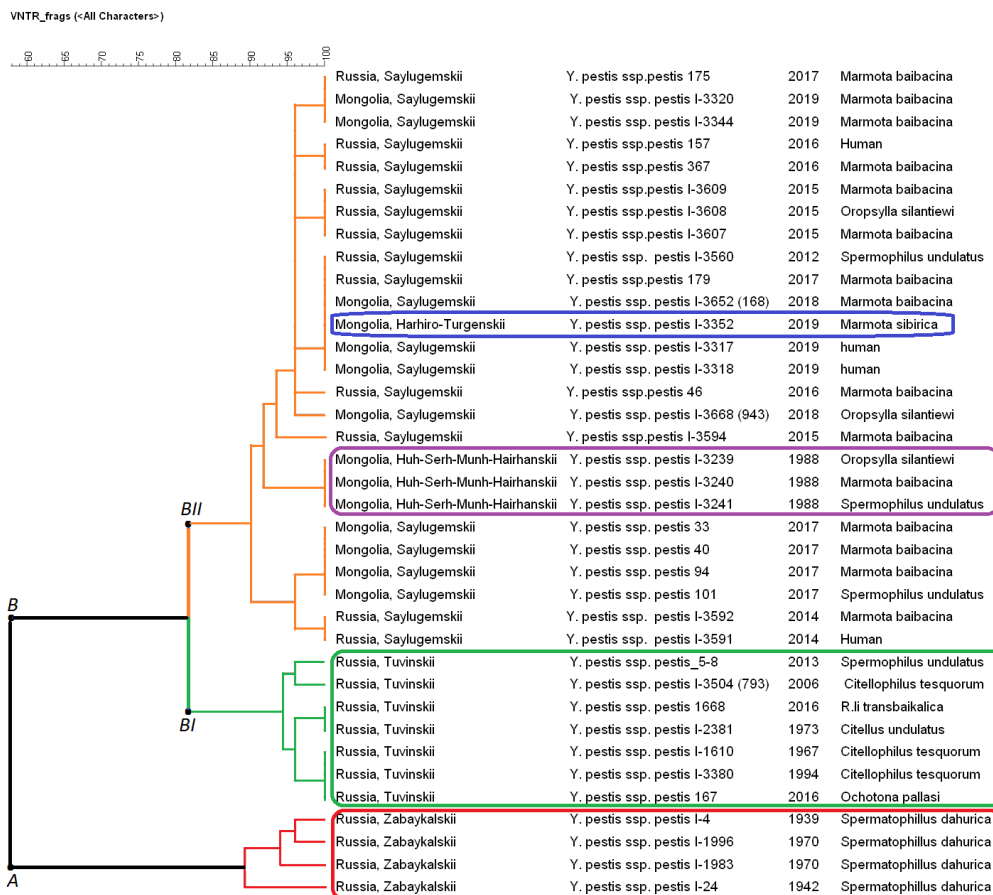


Рисунок 5 – Дендрограмма, иллюстрирующая степень родства штаммов *Y. pestis ssp. pestis*, изолированных в трансграничных и приграничных природных очагах чумы России и Монголии, построенная на основании MLVA25-типирования методом попарного невзвешенного кластерирования с арифметическим усреднением (UPGMA).

Таким образом, выявлены определенные генетические различия между возбудителем чумы основного подвида, циркулирующим в разных очагах чумы на приграничной территории России и Монголии. При этом штаммы *Y. pestis ssp. pestis*, изолированные в Сайлюгемском очаге входят в одну группу.

MLVA25 структура Y. pestis ssp. pestis, циркулирующего в Сайлюгемском природном очаге чумы

Работа выполнена на 160 штаммах *Y. pestis ssp. pestis*, выделенных в Сайлюгемском природном очаге чумы при проведении эпизоотологического обследования в 2012-2022 гг. и эпидемиологического расследования эпидемических случаев в 2014-2016, 2019 годах, что составляет 58,6 % от их общего количества за этот период.

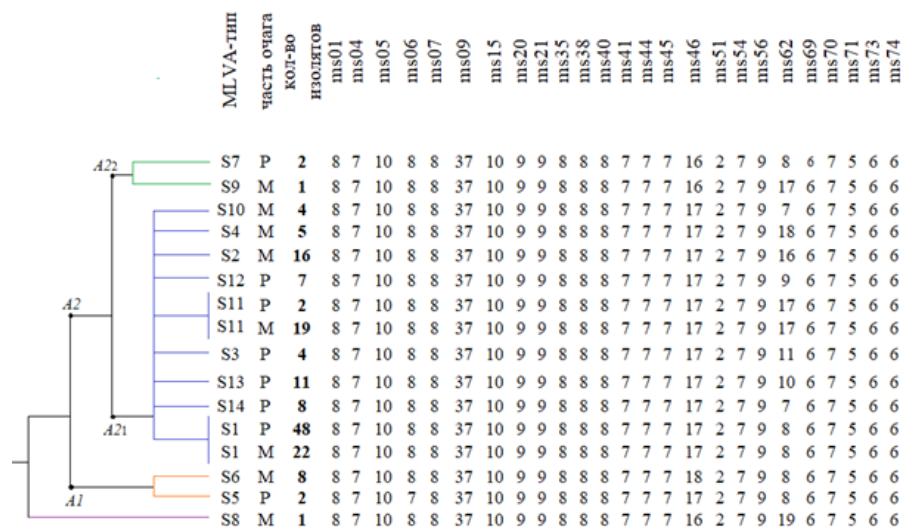
В монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага за исследуемый период выделено 129 штаммов чумного микроба, в российской – 165, из них MLVA-типирование проведено у 76 из монгольской (58,9 % от всех выделенных в нем) и 84 (50,9 %) – из российской частей. Учитывая особенности пространственного распространения серого сурка и географической приуроченности изолированных штаммов, для анализа пространственной структуры *Y. pestis ssp. pestis* условно выделили семь пространственных групп чумного микроба ос-

новного подвида на территории Сайлюгемского природного очага чумы, из них четыре в российской части очага – Уландрыкская, Тархатинская, Талдуайрская, Джазаторская и три в монгольской – Кок-Сайская, Цаган-Нурская и Ойгорская.

На основе кластерного анализа 25 VNTR локусов штаммы *Y. pestis* ssp. *pestis* дифференцированы на 14 MLVA типов. Они названы S1-S14 (рисунки 6, 7). Из них два уникальные (S8 и S9) (т.е. обнаруживались только у одного штамма в изученной выборке), восемь небольших по объему типов объединяют от 2 до 8 штаммов (S3, S4, S5, S6, S7, S10, S12, S14), в состав трех средних входят 11 (S13), 16 (S2) и 21 (S11) штамм, один крупный (S1) включал 70 штаммов.

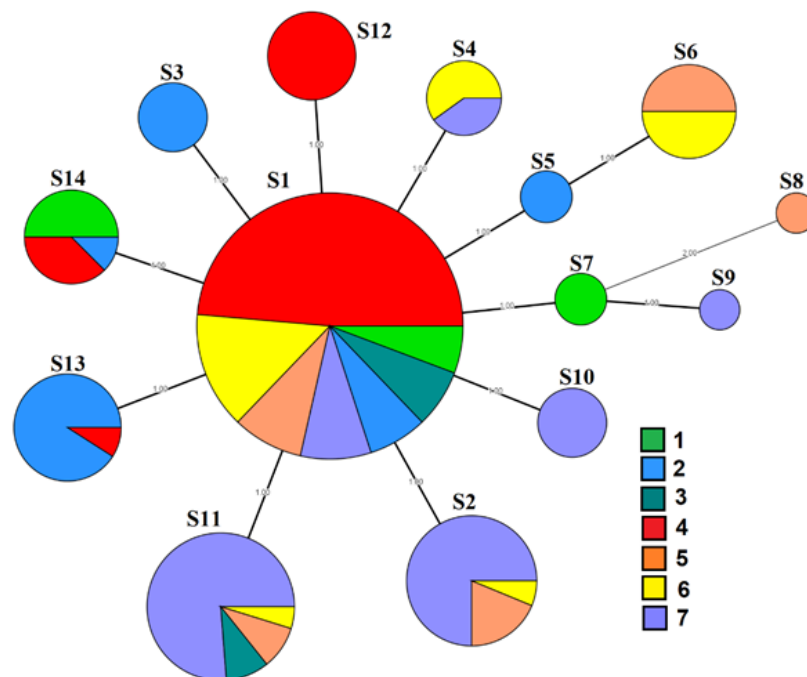
Штамм *Y. pestis* ssp. *pestis*_150 (генотип S8), изолированный в 2019 г. в монгольской части очага, расположен отдельно, тогда как остальные 159 – образуют один кластер А (рисунок 6, 7). Кластер А включает в себя два подкластера (A1 и A2). В A1 вошли 10 штаммов возбудителя чумы основного подвида, из них два (S5) изолированы в российской части очага (Тархатинская группа) в 2014 г., выделенные от человека и серого сурка при эпидемиологическом расследовании эпидслучая, и 8 (S6) – в монгольской (по четыре из Цаган-Нуурской и Кок-Сайской групп) при эпизоотологическом обследовании в 2017 г. (рисунки 6, 7). Подкластер A2 состоит из двух ветвей: A2₁ – включает 146 штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, из них 66 выделены на территории Монголии (2018, 2019 гг.) и 80 – в России (2012, 2015-2018 гг.); A2₂ – включает три изолята чумного микроба, причем один из них имеет свой уникальный генотип S9, выделенный в Ойгорской группе монгольской части Сайлюгемского очага в 2019 г. Генотип S7, включает штаммы, изолированные в 2015 г. в Талдуайрской группе российской части очага.

Ветвь A2₁ включает в себя девять генотипов, в том числе два самых крупных по составу генотипа – S1 и S11. Генотип S1 содержит 70 штаммов, из них 48 выделены в российской части очага (в 70 % случаях от основного носителя) и 22 – в монгольской части, включая два штамма, изолированные от людей в 2019 г. Этот генотип наиболее гетерогенный по составу, так как содержит штаммы из всех семи пространственных групп, при этом наибольшее их количество изолировано в российской части – в Уландрыкской группе (48,6 %), в монгольской – в Цаган-Нуурской группе (14,3 %).



Буквами обозначены части очага, в которых изолированы штаммы: P – российская часть, M – монгольская часть.

Рисунок 6 – Схема MLVA25 типов, обнаруженных у 160 штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, изолированных в Сайлюгемском природном очаге чумы.



Каждый MLVA25-тип представлен кругом (S1-S14), его размер показывает число штаммов. Цвет указывает на штаммы, выделенные в разных пространственных группах, 1-4 – российская часть очага: 1 – Талдуайская, 2 – Тархатинская, 3 – Джазаторская, 4 – Уландрыкская; 5-7 – монгольская часть очага: 5 – Кок-Сайская, 6 – Цаган-Нуурская, 7 – Ойгорская группировки.

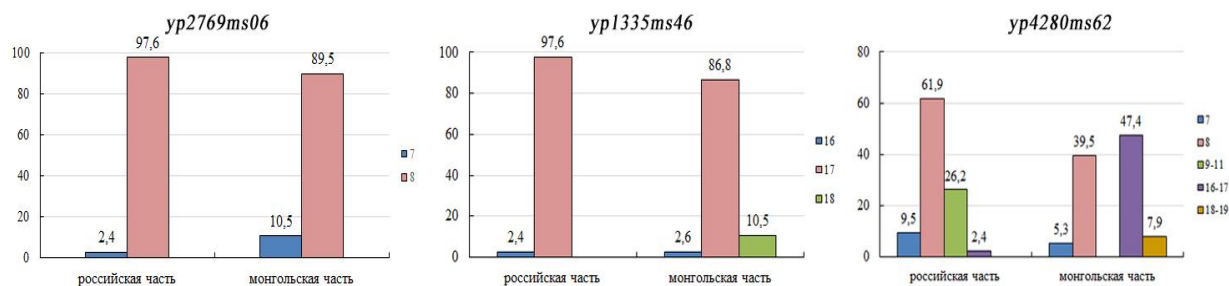
Рисунок 7 – Минимальное остовное дерево (MST), построенное на основании данных MLVA25-типирования 160 штаммов *Y. pestis ssp. pestis*, изолированных в Сайлюгемском природном очаге чумы.

Генотип S11 состоит из 21 штамма. Следует отметить, что 19 выделены в трех пространственных группах монгольской части очага в 2018-2019 гг.: из Ойгорской группы 76,2 % от общего количества штаммов этого генотипа, Кок-Сайской – 9,5 % и Цаган-Нуурской – 4,8 %. Из российской части (Джазаторская группа) вошли только два штамма (9,5 %). Генотипы S2, S4 и S10 включают штаммы, полученные в монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. При этом в генотипах S2 и S10 наибольшее количество штаммов из Ойгорской группы (75 и 100 % соответственно), S4 – из Цаган-Нуурской (60 %). Генотипы S3, S12-S14 содержат штаммы, выделенные в российской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. Следует отметить, что генотип S3 содержит четыре штамма, выделенные от человека и серого сурка при расследовании эпидемического случая в 2016 г. В генотип S12 вошли восемь штаммов из Уландрыкской группы, S13 – 10 штаммов, из которых 9 изолированы в Тархатинской группе, S14 – включает пять штаммов из Талдуайской и три из Уландрыкской групп.

Таким образом, показано, что в целом наблюдается низкая изменчивость по VNTR локусам и выделяется однородный комплекс MLVA25-типов штаммов чумного микроба, и наглядно демонстрирует отсутствие выраженной географической структурированности штаммов по их пространственным группам. Очевидно, что у проанализированных штаммов выявлена незначительная вариабельность геномов чумного микроба на территории очага при MLVA25-типировании, что соответствует данным, полученным методами UPGMA, MST.

Анализ частот аллелей в изменчивых локусах штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, изолированных в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы

Сравнение частоты встречаемости аллелей в трех изменчивых локусах у штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*, выделенных в российской и монгольской частях трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы показало, что наиболее слабые различия между сравниваемыми выборками наблюдаются по локусу *yp2769ms06* (рисунок 8). Тем не менее различия между ними статистически значимы ($\chi^2 = 4,5$; $df = 1$; $p < 0,05$).



По оси ординат – частоты (%).

Рисунок 8 – Частота встречаемости числа tandemных повторов по трем варибельным локусам у штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* из Сайлюгемского природного очага чумы.

В локусе *yp1335ms46* в обеих частях Сайлюгемского природного очага чумы преимущественно обнаруживаются 17 tandemных повторов. При этом 18 повторов выявлены только на монгольской части, на российской – они не встречаются (рисунок 6). Различия между анализируемыми выборками достоверны ($\chi^2 = 12,9$; $df = 2$; $p < 0,01$).

Ярко выражена неоднородность выборок из двух частей природного очага чумы по локусу *yp4280ms62*. На российской территории очага абсолютно преобладают 8 повторов (61,9 %). На монгольской части природного очага чумы – 16-17 повторов. Следует отметить, что 18-19 повторы выявляются только на монгольской части Сайлюгемского очага, а на российской они не встречаются. Наоборот, 9-11 повторы, обнаруживаются только на российской части очага (рисунок 6). Различия между штаммами из российской и монгольской частей очага высоко достоверны ($\chi^2 = 65,7$; $df = 4$; $p < 0,001$).

Сравнение частот аллелей по трем изменчивым локусам, показывает, что по каждому из них отличия между выборками штаммов из разных частей Сайлюгемского природного очага чумы характеризуются своими индивидуальными особенностями.

Подчеркнем, что локус *yp4280ms62* является основным для пространственной дифференциации *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* и *Y. pestis* ssp. *pestis* внутри Сайлюгемского природного очага при MLVA25-типировании.

Материалы собственных исследований были широко освещены в открытой печати и представлены в монографии «Трансграничный Сайлюгемский природный очаг чумы».

ВЫВОДЫ

1. По данным MLVA25 типирования 330 штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*, выделенных в российской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы в 1961-2019 гг., дифференцированы на 34 MLVA типа. Установлено, что в трех мезоочагах (Уландрыкском, Тархатинском, Курайском) распространены относительно независимые совокупности возбудителя чумы данного подвида, обладающие своеобразной генотипической структурой.

2. Обнаружено, что MLVA25-структура чумного микроба центральноазиатского подвида алтайского биовара в Тархатинском мезоочаге характеризуется существенными изменениями во времени, тогда как в Уландрыкском и Курайском она обладает выраженной стабильностью.

3. Показано, что у *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* из 25 VNTR локусов, по шести (*yp2916ms07*, *yp1814ms20*, *yp0581ms40*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*, *yp1925ms71*) наблюдается значительное разнообразие. По этим локусам выявлены различия между выборками штаммов из трех мезоочагов (Уландрыкского, Тархатинского, Курайского) российской части Сайлюгемского природного очага чумы.

4. С помощью MLVA25 анализа 160 изолятов *Y. pestis* ssp. *pestis*, выделенных в российской и монгольской частях трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы в 2012-2022 гг., дифференцированы на 14 MLVA типов. Установлено, что 12 из них состоят из штаммов, изолированных либо в российской части очага, либо в монгольской и только два – из обеих частей очага. В целом наблюдается низкая изменчивость по VNTR локусам и отсутствует выраженная географическая структурированность при филогенетическом анализе, выполненном методами UPGMA и MST.

5. Выявлено три переменных VNTR локуса (*yp2769ms06*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*) у *Y. pestis* ssp. *pestis*, частота встречаемости аллелей которых указывает на наличие генотипической неоднородности чумного микроба и четкую пространственную дифференциацию между выборками штаммов из российской и монгольской частей Сайлюгемского природного очага.

6. Установлено, что локус *yp4280ms62* является ключевым для пространственной дифференциации *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* и *Y. pestis* ssp. *pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Балахонов, С.В. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты [Текст] / С.В. Балахонов, А.Ю. Попова, А.И. Мищенко, Е.П. Михайлов, Е.Б. Ежлова, Ю.В. Демина, А.В. Денисов, Е.Н. Рождественский, Г.Х. Базарова, Л.В. Щучинов, И.В. Зарубин, Ж.Е. Семёнова, Н.М. Маденова, Д.К. Дюсенбаев, **М.Б. Ярыгина**, Е.В. Чипанин, С.А. Косилко, А.К. Носков, В.М. Корзун // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2016. – Вып. 1. – С. 55–60. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-55-60>

2. Балахонов, С.В. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 2. Микробиологическая и молекуляр-

но-генетическая характеристика изолированных штаммов // Проблемы особо опасных инфекций [Текст] / С.В. Балахонов, **М.Б. Ярыгина**, Е.Н. Рождественский, Г.Х. Базарова, С.А. Витязева, А.С. Остяк, Е.П. Михайлов, А.И. Мищенко, А.В. Денисов, С.А. Косилко, В.М. Корзун. // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2016. – Вып. 4. – С. 51–55. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-51-55>

3. Корзун, В.М. Формирование, развитие и функционирование природного очага чумы в Горном Алтае [Текст] / В.М. Корзун, С.В. Балахонов, Е.В. Чипанин, А.В. Денисов, Е.П. Михайлов, А.И. Мищенко, **М.Б. Ярыгина**, Е.Н. Рождественский, Л.А. Фомина // **Медицинская паразитология и паразитарные болезни**. – 2016. – № 1. – С. 17–25.

4. Корзун, В.М. Интродукция возбудителя чумы основного подвида в поселения серого сурка в Юго-Восточном Алтае [Текст] / В.М. Корзун, С.В. Балахонов, А.В. Денисов, Е.В. Чипанин, С.А. Косилко, Е.Н. Рождественский, Е.П. Михайлов, А.И. Мищенко, Г.Х. Базарова, **М.Б. Ярыгина** // **Медицинская паразитология и паразитарные болезни**. – 2017. – № 4. – С. 20–29.

5. Корзун, В.М. Особенности эпизоотической и эпидемической активности Горно-Алтайского природного очага чумы в 2012-2016 годах [Текст] / В.М. Корзун, С.В. Балахонов, С.А. Косилко, Е.П. Михайлов, А.И. Мищенко, А.В. Денисов, Е.Н. Рождественский, Е.В. Чипанин, Г.Х. Базарова, **М.Б. Ярыгина**, Д.Э. Абибулаев, В.В. Шефер // **Эпидемиология и Вакцинопрофилактика**. – 2017. – № 1 (92). – С. 36–38.

6. Корзун, В.М. Монгольская часть трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы в 2017 г. Сообщение 1. Эпизоотическая ситуация [Текст] В.М. Корзун, С.В. Балахонов, А.В. Денисов, **М.Б. Ярыгина**, Е.Н. Рождественский, Д.Э. Абибулаев, В.В. Шефер, С.А. Косилко, Д. Отгонбаяр, М. Байгалмаа, Л. Оргилбаяр, Ч. Уржих, Н. Тоголдор, А. Махбал, Х. Дауренбек, Н. Цогбадрах, Д. Цэрэнноров, Х. Ганболд // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2018. – Вып. 1. – С. 79–84. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-1-79-84>

7. Косилко, С.А. Монгольская часть трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы в 2017 г. Сообщение 2. Современные эпидемиологические риски [Текст] / С.А. Косилко, С.В. Балахонов, Д. Отгонбаяр, Н. Цогбадрах, **М.Б. Ярыгина**, В.М. Корзун, Д. Цэрэнноров, А.В. Денисов, Е.Н. Рождественский, Ч. Уржих // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2018. – Вып. 2. – С. 62–67. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-62-67>

8. Попова, А.Ю. Организация противоэпидемических и профилактических мероприятий по чуме на территории Кош-Агачского района Республики Алтай и оценка их эффективности [Текст] / А.Ю. Попова, С.В. Балахонов, Л.В. Щучинов, А.Н. Матросов, Е.П. Михайлов, А.И. Мищенко, А.В. Денисов, В.В. Шефер, В.А. Шестаков, Е.Н. Рождественский, Е.В. Чипанин, В.М. Корзун, С.А. Косилко, Т.И. Иннокентьева, **М.Б. Ярыгина**, С.В. Сбитнева, С.Л. Тагызова, Г.С. Архипов, С.А. Щербакова, В.П. Топорков, Е.В. Куклев, А.С. Раздорский, А.А. Кузнецов, А.А. Слудский, Н.В. Попов, Н.М. Ермаков, В.В. Кутырев // **Инфекционные болезни**. – 2018. – Т. 16, № 4. – С. 5–15. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2018-4-5-15>

9. Балахонов, С.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы [Текст] / С.В. Балахонов, **М.Б. Ярыгина**, А.С.

Гладких, Л.В. Миронова, С.И. Феранчук, Н.О. Бочалгин, Е.Н. Рождественский, С.А. Витязева, Б. Нацагдорж, Д. Цэрэнноров, Н. Цогбадрах, С.А. Косилко, В.М. Корзун // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2019. – № 3. – С. 34–42. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-34-42>

10. **Ярыгина, М.Б.** Генотипическая структура *Yersinia pestis* ssp. *central asiatica* biovar altaica в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы при MLVA25-типировании [Текст] / **М.Б. Ярыгина**, В.М. Корзун, С.В. Балахонов, Е.Н. Рождественский, А.В. Денисов // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2021. Вып. 2. – С. 138-147. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-138-147>

11. **Ярыгина, М.Б.** Пространственная MLVA25-генотипическая структура *Yersinia pestis* ssp. *pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы [Текст] / **М.Б. Ярыгина**, С.А. Витязева, В.М. Корзун, Х. Тунгалаг, Д. Цэрэнноров, С.В. Балахонов // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2022. – Вып. 4. – С. 110–116. – <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-4-110-116>

Монографии и атласы

12. Балахонов, С.В. Горно-Алтайский природный очаг чумы: Ретроспективный анализ, эпизоотологический мониторинг, современное состояние [Текст] / С.В. Балахонов, В.М. Корзун, Е.В. Чипанин, ... **М.Б. Ярыгина**. / под редакцией С.В. Балахонова, В.М. Корзуна. – Новосибирск: Наука-Центр, 2014. – 272 с.

13. Попова, А.Ю. Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях [Текст] / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.С. Зенкевич, ... **М.Б. Ярыгина** и др. / Под редакцией докт. мед. наук, проф. А.Ю. Поповой, акад. РАН, докт. мед. наук, проф. В.В. Кутырева. – Ижевск: изд-во ООО «Принт», 2018. – 336 с.

14. Балахонов, С.В. Сайлюгемский природный очаг чумы [Текст] / С.В. Балахонов, В.М. Корзун, А.В. Денисов, **М.Б. Ярыгина** и др. / под редакцией С.В. Балахонова, В.М. Корзуна. – Новосибирск: Наука, 2022. – 248 с.

15. Попова, А.Ю. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств [Текст] / А.Ю. Попова, В.Ю. Смоленский, Е.Б. Ежлова, ... **М.Б. Ярыгина** и др. / под редакцией докт. мед. наук, проф. А.Ю. Поповой, акад. РАН, докт. мед. наук, проф. В.В. Кутырева. – Калининград: РА Полиграфычъ, 2022. – 348 с.

Прочие публикации

16. Балахонов, С.В. Интеграция новых методов лабораторной диагностики в систему эпидемиологического надзора за чумой [Текст] / С.В. Балахонов, **М.Б. Ярыгина**, Е.Н. Рождественский, Г.Х. Базарова, В.М. Корзун // Инфекция и иммунитет: Матер. II Национального конгресса бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях». – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 238–239.

17. Балахонов, С.В. Молекулярная диагностика в эпидемиологическом надзоре за чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге [Текст] / С.В. Балахонов, В.В. Кутырев, Е.П. Михайлов, **М.Б. Ярыгина**, Е.Н. Рождественский, Г.Х. Базарова, В.М. Корзун, А.С. Остяк, С.А. Витязева // Молекулярная диагностика: Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием (Москва, 2017). – Т. 1. – Тамбов: ООО фирма «Юлис», 2017. – С. 299–300.

18. Балахонов, С.В. Характеристика штаммов чумного микроба, изолированных в монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы в 2018 году [Текст] / Балахонов С.В., Косилко С.А., Отгонбаяр Д., Уржих Ч., Витязева С.А., **Ярыгина М.Б.**, Рождественский Е.Н., Токмакова Е.Г., Корзун В.М. // Материалы V Национального конгресса бактериологов (г. Москва, 16–17 сентября 2019 года). – М.: Изд-во «Династия», 2019. – С. 13.

19. **Ярыгина, М.Б.** Результаты изучения биологических свойств штаммов чумного микроба, изолированных в монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы в 2018-2019 гг. [Текст] / **М.Б. Ярыгина**, С.А. Витязева, С.В. Балахонов, В.М. Корзун, Е.Н. Рождественский, Д. Отгонбаяр, Ч. Уржих, Н. Цогбадрах // Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней: Материалы XV Межгосударственной научно-практической конференции, 5-6 октября 2021 г., Иркутск / под ред. А.Ю. Поповой, С.В. Балахонова. – Иркутск: Издательство ИГУ, 2021. – С. 268-270.

20. Балахонов, С.В. Особенности эпизоотического процесса, вызванного возбудителем чумы основного подвида, в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы [Текст] / С.В. Балахонов, В.М. Корзун, А.В. Денисов, **М.Б. Ярыгина**, Е.Н. Рождественский, Г.Х. Базарова, Н. Цогбадрах, Д. Отгонбаяр, Д. Цэрэнноров, Ч. Уржих // Национальные приоритеты России, 2021. – № 3 (42). – С. 108–111.

21. **Ярыгина, М.Б.** Генотипическая структурированность *Yersinia pestis* ssp. *altaica* в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы [Текст] / **М.Б. Ярыгина**, В.М. Корзун, С.В. Балахонов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2019. – № 37. – С. 86–87.

22. Балахонов, С.В. Молекулярно-генетические методы в системе эпидемиологического надзора за трансграничными природными очагами чумы [Текст] / С.В. Балахонов, С.А. Витязева, **М.Б. Ярыгина**, А.В. Григорьевых, Н.О. Бочалгин, И.С. Федотова // Материалы Конгресса с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2022». 27-28 апреля 2022 г., Москва / под ред.: В.Г. Акимкина, М.Г. Твороговой. – Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. – С. 32-33. <https://doi.org/10.36233/978-5-6045286-9-3>

23. Balakhonov, S.V. The results of the multi-locus analysis variable number of tandem repeats (MLVA25) of *Yersinia pestis* spp. *pestis* strains from Russian and Mongolian transborder foci [Текст] / S.V. Balakhonov, **М.В. Yarygina**, S.A. Vityazeva. Материалы Международного симпозиума «*Yersinia 14*». 26-28 сентября 2022 г., Санкт-Петербург. – Саратов: Амирит, 2022. – С. 17.

24. Grigoryevykh, A.V. The phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* strains isolated on the territory of south Siberia and Mongolia natural plague foci [Текст] / A.V. Grigoryevykh, S.A. Vityazeva, **М.В. Yarygina**, S.V. Balakhonov // Материалы Международного симпозиума «*Yersinia 14*». 26-28 сентября 2022 г., Санкт-Петербург. – Саратов: Амирит, 2022. – С. 35.

25. Балахонов, С.В. Фенотипические особенности штаммов *Yersinia pestis*, изолированных в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы [Текст] / С.В. Балахонов, С.А. Витязева, **М.Б. Ярыгина**, Д. Отгонбаяр, Д. Цэрэнноров //

Материалы VII Национального конгресса бактериологов. 28-30 сентября 2022 г., Санкт-Петербург / под ред. И.А. Дятлова. – Москва: Издательство «Династия», 2022. – Том 7 (№ 3). – С. 18. ISSN 2500-1027.

26. Григорьевых, А.В. Молекулярно-генетический анализ штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на территории трансграничных природных очагов южной Сибири и Монголии [Текст] / А.В. Григорьевых, **М.Б. Ярыгина**, С.А. Витязева, С.В. Балахонов // Сборник материалов региональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Сибири и Дальнего Востока» (15 ноября 2022 г., Иркутск) / под редакцией д-ра мед наук профессора С.В. Балахонова. – Иркутск: Издательство ИГУ, 2022. – с 39-40.

27. **Ярыгина, М.Б.** Генотипическая структура *Yersinia pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы [Текст] / **М.Б. Ярыгина**, С.А. Витязева, С.В. Балахонов // Сборник материалов региональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Сибири и Дальнего Востока» (15 ноября 2022 г., Иркутск) / под редакцией д-ра мед наук профессора С.В. Балахонова. – Иркутск: Издательство ИГУ, 2022. – с 131.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

Бумага офсетная. Формат 60×841 /16. Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Зак. № 100
РИО ИНЦХТ (Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. 29-03-37. E-mail: arleon58@gmail.com)

