

МИКРОБИОЛОГИЯ/MICROBIOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63>

ИНТЕГРАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ПУСТЫННЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН (2024): ФЕНОТИП, ГЕНОТИП, ВИРУЛЕНТНОСТЬ

Научная статья

Мусагалиева Р.С.¹, Абдел З.Ж.², Жумадилова З.Б.³, Айкимбаев А.М.⁴, Абдирасилова А.А.⁵, Исаева С.Б.⁶, Исламов Р.А.⁷, Байтурсын Б.⁸, Абделиев Б.З.⁹, Бегимбаева Э.Ж.¹⁰, Далибаев Ж.С.¹¹, Отебай Д.¹², Курманов Ж.Б.¹³, Даурбаев А.¹⁴, Асимкулов Е.А.¹⁵, Шаки Н.Н.^{16,*}

¹ ORCID : 0000-0002-6838-2338;

² ORCID : 0000-0002-2738-6818;

⁴ ORCID : 0000-0003-1020-5790;

⁵ ORCID : 0000-0001-7308-2113;

⁷ ORCID : 0000-0002-0630-0296;

⁸ ORCID : 0000-0002-9278-4353;

⁹ ORCID : 0000-0002-4184-6227;

¹⁰ ORCID : 0000-0003-3662-5806;

¹¹ ORCID : 0000-0002-6567-2225;

¹² ORCID : 0000-0003-3940-7978;

¹⁴ ORCID : 0009-0006-4213-7496;

¹⁵ ORCID : 0009-0002-9663-5125;

¹⁶ ORCID : 0000-0002-5644-2882;

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16 Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева, Алматы, Казахстан

¹³ Актыбинская противочумная станция, Алматы, Казахстан

¹⁴ Жамбылская противочумная станция, Тараз, Казахстан

¹⁵ Талдыкорганская противочумная станция, Талдыкорган, Казахстан

* Корреспондирующий автор (nurbol.shakiy[at]gmail.com)

Аннотация

Целью исследования явилось комплексное изучение изолятов *Yersinia pestis*, выделенных в 2024 году из пустынных природных очагов чумы Центрально-Азиатского региона Казахстана. Оценены фенотипические, генотипические и вирулентные характеристики 35 штаммов. Проведен анализ роста на питательных средах, пигментообразования, кальций-зависимости, чувствительности к антибиотикам и факторов вирулентности. С использованием метода MLVA и ПЦР установлены филогенетические связи между изолятами. Выявлено, что все изученные штаммы относятся к биовару *Mediaevalis* (ветвь 2.MED1), за исключением единичных изолятов с отсутствием гена *pst*. Вирулентность определена на моделях мышей, большинство штаммов показали высокую патогенность. Полученные данные расширяют представления о популяционной структуре чумного микробы и эпидемиологических рисках в Казахстане.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, чума, фенотип, генотип, вирулентность.

INTEGRAL RESEARCH OF *YERSINIA PESTIS* ISOLATES FROM DESERT NATURAL PLAGUE FOCUSES IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN (2024): PHENOTYPE, GENOTYPE, VIRULENCE

Research article

Mussagalieva R.S.¹, Abdel Z.Z.², Zhumadilova Z.B.³, Aikimbaev A.M.⁴, Abdirasilova A.A.⁵, Issaeva S.B.⁶, Islamov R.A.⁷, Baitursin B.⁸, Abdeliyev B.Z.⁹, Begimbaeva E.Z.¹⁰, Dalibaev Z.S.¹¹, Otebai D.¹², Kurmanov Z.B.¹³, Daurbaev A.¹⁴, Asimkulov Y.A.¹⁵, Shaki N.N.^{16,*}

¹ ORCID : 0000-0002-6838-2338;

² ORCID : 0000-0002-2738-6818;

⁴ ORCID : 0000-0003-1020-5790;

⁵ ORCID : 0000-0001-7308-2113;

⁷ ORCID : 0000-0002-0630-0296;

⁸ ORCID : 0000-0002-9278-4353;

⁹ ORCID : 0000-0002-4184-6227;

¹⁰ ORCID : 0000-0003-3662-5806;

¹¹ ORCID : 0000-0002-6567-2225;

¹² ORCID : 0000-0003-3940-7978;

¹⁴ ORCID : 0009-0006-4213-7496;

¹⁵ ORCID : 0009-0002-9663-5125;

¹⁶ ORCID : 0000-0002-5644-2882;

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16 National Scientific Center of Especially Dangerous Infections named after M. Aikimbayev, Almaty, Kazakhstan

¹³ Aktobe anti-plague station, Almaty, Kazakhstan

¹⁴ Zhambyl anti-plague station, Taraz, Kazakhstan

¹⁵Taldykorgan anti-plague station, Taldykorgan, Kazakhstan

* Corresponding author (nurbol.shakiy[at]gmail.com)

Abstract

The aim of the study was to comprehensively examine *Yersinia pestis* isolates obtained in 2024 from desert natural foci of plague in the Central Asian region of Kazakhstan. The phenotypic, genotypic and virulence characteristics of 35 strains were evaluated. Growth on nutrient media, pigment production, calcium dependence, antibiotic sensitivity and virulence factors were analysed. Phylogenetic relationships between isolates were established using MLVA and PCR. It was found that all the strains studied belong to the *Mediaevalis* biovar (branch 2.MED1), except for a few isolates lacking the *pst* gene. Virulence was determined in mouse models, with most strains showing high pathogenicity. The obtained data expand our understanding of the population structure of the plague microbe and epidemiological risks in Kazakhstan.

Keywords: *Yersinia pestis*, plague, phenotype, genotype, virulence.

Введение

Чума, вызываемая *Yersinia pestis*, остаётся одной из наиболее опасных природно-очаговых зоонозных инфекций, обладающих высоким эпидемиологическим и биотеррористическим потенциалом [1], [2]. В международных медико-санитарных правилах (2005 г.) чума включена в список инфекционных болезней, способных вызывать чрезвычайные ситуации общественного здравоохранения, имеющие международное значение. Несмотря на достижения в области эпиднадзора и развития молекулярно-генетических методов диагностики, исследование биологических и генетических свойств циркулирующих штаммов чумного микроба остаётся важной задачей [3], [4].

В настоящее время эпидемиологическая ситуация по чуме в мире остается напряженной [5], причём без тенденции к снижению. Эпидемиологические проявления чумы в 2014–2024 гг. зарегистрированы на территории 10 государств. Общее число случаев заболевания составило 5514, из них летальных — 605 (показатель летальности — 11,1%) [6], [7], [8]. Наиболее сложная эпидемиологическая ситуация за указанный период складывалась в Республике Мадагаскар 3457 (373) и Демократической Республике Конго 1352 (76), которые составляют 87,2% от всех зарегистрированных случаев [9], [10].

На территории Казахстана различные типы природных очагов чумы (пустынный, степной, высокогорный и смешанный) занимают 1083,9 тыс. кв. км, что составляет около 40% территории, в том числе трансграничные высокогорные очаги чумы (Киргизия, Монголия, Китай, Россия), где в прошлом неоднократно имели место вспышки заболевания чумой среди населения [11], [12], [13], [14]. Регистрация последних случаев заболеваний людей чумной инфекцией в Казахстане было в 2003 г. [11], однако ежегодные регистрации эпизоотий диких животных представляют биологическую угрозу [15], [16], [17].

На территории Казахстана располагается несколько активных пустынных очагов чумы, требующих регулярного эпизоотологического мониторинга [2], [18]. В последние годы особое внимание уделяется работам отечественных исследователей, которые внесли значительный вклад в изучение природных очагов, картирование ареалов, определение эпидемиологических рисков и генетическую характеристику изолятов *Y. pestis* [19], [20], [21], [22].

Фенотипическая характеристика штаммов циркулирующих в природных очагах чумы Казахстана, включающая анализ морфологии, роста на питательных средах, лизиса фагами, в том числе способности продукции факторов вирулентности, позволяет оценивать их эпизоотологическое и эпидемиологическое значение для совершенствования профилактических и противоэпидемических мероприятий [23], [24].

Среди молекулярно-генетических подходов особое место занимает метод мультилокусного вариабельного анализа тандемных повторов (MLVA), который успешно применяется для типирования и анализа филогенетических связей между штаммами чумного микроба. С использованием этого метода в ряде работ была установлена внутривидовая структура *Y. pestis*, циркулирующей в Казахстане, а также её связи с глобальными генетическими линиями. Использование программного обеспечения PAUP и FigTree, а также алгоритма UPGMA, обеспечивает наглядную визуализацию эволюционных отношений между штаммами [19], [25], [26].

Настоящее исследование направлено на выделение, фенотипирование и генотипирование штаммов *Y. pestis*, полученных в рамках эпизоотологического мониторинга в 17 пустынных природных очагах Казахстана. Полученные результаты позволяют расширить представления о структуре популяции чумного микроба и оценить её эпидемиологическое значение.

Методы и принципы исследования

2.1. Фенотипические свойства

Для изучения фенотипических свойств штаммов чумного микроба использованы бактериологический, серологический и молекулярно-генетические методы исследования. Определение фенотипических свойств произведены по следующим тестам: морфология, лизис фагов, пестициногенность, характер роста на питательных средах, тесты с фенилаланином, метионином, треонином; ферментация глицерина, отношение к глюкозе, манниту, мальтозе, арабинозе, сахарозе и лактозе [27], [28]. Таксономическое положение всех штаммов были идентифицированы на аппарате Biomerieux Vitek 2 Compact 30 Microbiology Analyzer. USA» (табл. 1). Биохимические показатели *Yersinia pestis* штаммов чумы отработанные на аппарате VITEK 2 Systems: 2024.07.01. Вероятность 96,0%. Достоверность: отличная идентификация. Карта GN 00001B1B42DB.

Таблица 1 - Биохимические характеристики 75 штаммов *Yersinia pestis*, исследованных с использованием системы VITEK 2DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.1>

Test Results	Biochemical Tests
Positive	PyrA, BGAL, dGLU, OFF, BGLU, dMNE, ProA, TyrA, CMT, O129R
Negative	APPA, ADO, IARL, dCEL, H ₂ S, BNAG, AGLTp, GGT, Dmal, BXYL, BAlap, LIP, PLE, URE, dSOR, SAC, dTAG, dTRE, CIT, MNT, 5KG, ILATk, AGLU, SUCT, NAGA, AGAL, PHOS, GlyA, ODC, LDC, IHISa, GGAA, IMLTa, ILATA
Indeterminate	dMAN (+), ELLM (-)

Примечание: по состоянию на 2024.07.01

В качестве референтных образцов были использованы штаммы: *Yersinia pestis* EV, *Y. pseudotuberculosis* 2841.

2.2. Генотипические свойства

Идентификация штаммов проводилась с помощью метода полимеразной цепной реакции с применением ПЦР тест-систем разных производителей: «*Plague qPCR*», Казахстан и АмплиСенс, Россия. Для экстракции ДНК чумного микробы был использован набор «РИБО-преп» Кат. № K2-9-Et-100, Россия.

Филогенетический анализ проводился с помощью программы PAUP 4.0 (paup.csit.fsu.edu). Для иерархической кластеризации был использован алгоритм UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean — метод невзвешенного попарного среднего). Окончательное оформление филогенетического дерева проводилась на графическом редакторе FigTree v.1.4.4 (tree.bio.ed.ac.uk).

Выделение ДНК. Взвеси исследуемых штаммов *Y. pestis* подвергались температурному воздействию (100 °C) в течение 10 минут. Далее взвеси центрифугировались 2 минуты при 12 000 об/мин. Супернатант использовался для выделения ДНК. Экстракция ДНК проводили с помощью набора для выделения ДНК: «Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК «АмплиПрайм РИБО-преп, Россия»». В промаркированные пробирки внесли по 300 мкл раствора для лизиса, затем в пробирки с лизирующим раствором используя наконечники с аэрозольным фильтром вносили по 100 мкл убитых взвесей штаммов чумного микробы. Содержимое пробирок тщательно перемешали на вортексе, процентрифугировали в течение 5 секунд для осаждения капель и подогрели при 65 °C в течение 5 минут. Затем добавили в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешали на вортексе, процентрифугировали в течение 5 минут при 13 тыс об/мин. После этого, осторожно, не задевая осадок, с помощью отдельного наконечника отобрали надосадочную жидкость. В пробирку с осадком добавили по 500 мкл раствора для отмычки 3, осторожно промыли осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз, процентрифугировали при 13 тыс об/мин в течение 2 минут, затем, осторожно, не захватывая осадок, отобрали надосадочную жидкость с помощью отдельного наконечника. Добавили в пробирки с осадком по 200 мкл раствора для отмычки 4, осторожно промыли осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз, процентрифугировали при 13 тыс об/мин в течение 2 минут, также осторожно, не захватывая осадок, отобрали и отбросили надосадочную жидкость с помощью отдельного наконечника. Затем поместили пробирки с осадком в термостат при температуре 65 °C на 5 минут для подсушивания осадка, для этого крышки пробирок оставили открытыми. Добавили в пробирки по 90 мкл РНК-буфера. Перемешали на вортексе. Поместили в термостат при 65 °C на 5 минут, периодически встраивая на вортексе. Процентрифугировали при 13 тыс об/мин в течение 1 минуты и отобрали надосадочную жидкость, которая содержит очищенную ДНК и переносили в заранее промаркированные пробирки. Проведена амплификация VNTR локусов и анализ методом гель-электрофореза.

Для генетического анализа области пигментации *Y. pestis* были использованы праймеры *ripA-m3-f/ ripA-m3-r*, кодирующий 4-гидроксибутират кофермента А трансферазы. Генотипирование исследуемых изолятов проводилось на основе структуры VNTR локусов методом мультилокусного VNTR анализа (Multiple Loci VNTR Analysis, MLVA). Штаммы изучены методом MLVA по 18 VNTR локусам. При этом вначале проводился анализ по 7 наиболее вариабельным VNTR локусам (MLVA-7), а затем — по 11 локусам (MLVA-18). В качестве референтных образцов были использованы штаммы *Y. pseudotuberculosis* 2841 и ДНК четырех изученных штаммов *Y. pestis*, представляющих основные биовары чумного микробы: *Pestoides F* (биовар *Microtus/Antiqua*), *Nepal516* (биовар *Antiqua*), *KIM10+* (биовар *Mediaevalis*) и *CO92* (биовар *Orientalis*). При филогенетическом анализе использовались данные GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Идентификация штаммов проводилась с помощью метода полимеразной цепной реакции с применением ПЦР тест-систем разных производителей: «*Plague qPCR*», Казахстан и АмплиСенс, Россия. Филогенетический анализ проводился с помощью программы PAUP 4.0 (paup.csit.fsu.edu). Для иерархической кластеризации был использован алгоритм UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean — метод невзвешенного попарного среднего). Окончательное оформление филогенетического дерева проводилось на графическом редакторе FigTree v.1.4.4 (tree.bio.ed.ac.uk) [29], [30], [31], [32].

2.3. Лабораторные животные

Вирулентность штаммов чумы, как правило, изучается на лабораторных мышах, реже на морских свинках [27], [28]. В исследовании использовали самцов мышей линий BALB/c и C57BL/6, возрастом 2–3 месяца и массой 22 г, ±

10% которые содержались в индивидуально вентилируемых клетках (ИВК) с НЕРА-фильтром (Allentown, USA) на сертифицированных автоклавируемых кормах и подстите SSNIFF (Spezialdaten GmbH, Германия). Температура окружающей среды составляла ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), влажность ($50 \pm 10\%$) и циклом день/ночь (10:14). Вода и корм *ad libitum*. Животных взвешивали с помощью весов Adventurer RV 1502 (Ohaus, Китай).

2.4. Заражение мышей

Мышей заражали инокулятом *Y. pestis* в объеме 0,5 мл приготовленного на 0,9% стерильном физиологическом растворе хлористого натрия внутрибрюшинным способом. Количество клеток бактерий определяли по оптическому отраслевому стандарту мутности (ОСО) 10 ЕД. Заражающие дозы были 10^2 и 10^3 клеток *Y. pestis* на животное.

2.5. Биологическая безопасность

Все работы проводили в сертифицированных по ISO 35001 лабораториях ABSL3 в Центральной Референтной Лаборатории. Работы проводились в шкафу биологической безопасности SG404, класс II, тип A2 (Baker, США).

2.6. Биоэтика

Протокол исследований был утвержден Институциональным комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных ННЦООИ, № 3, 30.05.24.

2.7. Изучение чувствительности и резистентности к антибактериальным препаратам

В скрининг чувствительности и резистентности к антибактериальным препаратам (АБП) включены штаммы *Y. pestis* (n=35), изолированные от диких животных в 2024 г. из территории трех природных очагов чумы Казахстана. Были использованы АБП в дисках (n=72) и стрипах (n=50) по основным группам (n=25). Использованы стандартные диско-диффузионный метод и «Е-тест» для определения чувствительности, для выявления генов резистентности БЛРС фенотипический метод [33], [34], [35] и для скрининга генов резистентности к гликопептидам и бета-лактамазам ПЦР реального времени [36], [37]. Также использованы контрольные эталонные штаммы: *Y. pestis* EV НИИЭГ, *Y. pseudotuberculosis* R-2841, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 372, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 377, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70060. Штаммы культивировали на агар Мюллера-Хинтона (pH $7,3 \pm 0,2$) и агаре Хоттингера (pH $7,2 \pm 0,1$), при температуре 28-37 °C.

При определении чувствительности возбудителя чумы к АБП использовали суспензию микробных клеток из суточной агаровой культуры в 0,85% изотоническом растворе хлорида натрия, стандартизированную по отраслевому стандарту мутности по Mcfarland standart set (R092-1NO LOT0000633797; 2026-02. HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Maharashtra, INDIA) в двух показателях R092A и R092B. Через 10-15 мин накладывают диски, посевы инкубировали при 28°C. Предварительный учет проводили через 24 ч, окончательный — через 48 ч. В качестве контроля использовали эталонные штаммы и чашки со стерильными дисками. Диаметры зон задержки роста культуры вокруг дисков, измеряли с точностью до 1 мм специальной линейкой-лекало фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия.

Для определения генов вирулентности в ПЦР РВ выделение ДНК проводилось с помощью коммерческого набора «РеалБест УниМаг» серии С-8883, срок годности 22.07.2025 г., производства «Вектор БЕСТ», Россия и набор «РИБО-преп» Кат. № К2-9-Et-100, Россия, для роботизированной системы выделения ДНК/РНК. В поисках детерминанта антибиотикорезистентности в геномах лизатов использовался набор реагентов для выявления генов резистентности к гликопептидным и бета-лактамным антибиотикам у бактерий *van A\B* (ванкомицину, тейкопланину); *tem A* (метициллину, оксациллину); *tem, ctx-M-1, shv* (пенициллином и цефалоспоринам); *oxa-40-like, oxa-48-like, oxa-23-like, oxa-51-like, imp, kpc, ges, ndm, vim* (карбапенемам) фирмы «BacResista GLA Real-Time PCR Detection Kit» (DNA-Technology LLC, Moscow, Russia).

Основные результаты

3.1. Изучение фенотипических свойств *Yersinia pestis*

Микробиологический мониторинг свойств штаммов чумного микробы, изолированных в природных очагах Казахстана — актуальная часть эпидемического мониторинга. Следует учитывать и разную вирулентность и, следовательно, эпидемическую значимость штаммов в мониторинге природных очагов и уточнении ареалов распространения штаммов *Yersinia pestis*.

Всего было изучено 35 штаммов изолированных в пустынных природных очагов чумы Казахстана в 2024 году, в том числе от носителей было исследовано 20 штаммов (19 — от больших песчанок и 1 — от полуденной песчанки и от переносчиков исследовано 15 штаммов: *Xenopsylla gerbilli* — 6 экз., *Coptopsylla lamellifer* — 1 экз., *X. skrjabini* — 4 экз., *Neopsylla laeviceps* — 4 экз.). Сведения об изученных штаммах чумного микробы представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Сведения о изученных штаммах чумного микробы, изолированных в пустынных природных очагах чумы Казахстана в 2024 г

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.2>

Очаги чумы	Выделено штаммов от носителей	Выделено штаммов от переносчиков				
		<i>Xenopsylla gerbilli</i>	<i>Coptopsylla lamellifer</i>	<i>Xenopsylla skrjabini</i>	<i>Neopsylla laeviceps</i>	Всего
Северо-Приаральский	Большая песчанка 14 Полуденная песчанка 1		1	4	2	22
Илийский межгорный	Большая песчанка 4	6			2	12

Очаги чумы	Выделено штаммов от носителей	Выделено штаммов от переносчиков				
		<i>Xenopsylla gerbilli</i>	<i>Coptopsylla lamellifer</i>	<i>Xenopsylla skrjabini</i>	<i>Neopsylla laeviceps</i>	Всего
Прибалхашский	Большая песчанка 1					1
Итого	20	6	1	4	4	35

На рисунке 1 представлено выделение штаммов чумного микроба (*Yersinia pestis*) в разрезе областей Республики Казахстан: 20 – в Актюбинской, 12 – в Жетысуской, 2 – в Кызылординской и 1 – в Алматинской областях



Рисунок 1 - Распределение выделенных штаммов *Y. pestis* PK
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.3>

3.2. Изучение фенотипических свойств *Y. pestis*

В результате изучения культур чумного микроба установлено, что большинство выделенных штаммов являются типичными представителями для Центрально-Азиатского пустынного очага чумы: имеют типичную морфологию, лизируются чумным Покровской, псевдотуберкулезным, Л-413 «С» бактериофагами; пестициногенны и не чувствительны к пестицину I, растут при 28°C на синтетической питательной среде с цистеином, фенилаланином, метионином, треонином; ферментируют глицерин, глюкозу, манит, мальтозу, арабинозу, не разлагают сахарозу и лактозу. Все штаммы состоят из клеток, зависимых от ионов кальция при 37° С (*Ca*– клеток 75-100%); для всех штаммов не была характерна реакция денитрификации. Все штаммы отнесены к средневековому биовару возбудителя чумы.

Однако часть штаммов отличались от типичных по некоторым свойствам. Пять штаммов из Илийского межгорного очага имели сниженное количество FI.

У чумного микроба известны факторы патогенности: *Pgm*⁺ (признак пигментации) — поглощение и накопление экзогенного гемина, как источника железа; *Lcr*⁺ (*VWa*⁺) — проявление «низкого кальциевого ответа», необходимого для оптимальной продукции *V* и *W* антигена и белков внешней мембраны (*YOPs*); *Tox*⁺ — продукция «мышиного токсина»; *Fra*⁺ — продукция капсулного антигена — фракции 1; *Pst*⁺ — сочетанный синтез фибринолизина, коагулазы и пестицина (*Pst*, *Fib*, *Coa*); *Pur*⁺ — способность синтезировать эндогенные пурины; *rH6* антиген; каталаза; ауксотрофность; денитрифицирующая активность; фосфолипаза *D*; гемолитическая активность; липополисахариды; резистентность сыворотки и другие.

Детерминанты патогенности *Y. pestis* подразделяются на обязательные (основные) — расположенные на плазмиде кальцийзависимости *pCad* и *pmt*— области хромосомы *Y. pestis*; и необязательные (второстепенные) — расположены в плазмidaх *pPst* и *pFra* [25], [38].

Изучена способность к пигментообразованию (*Pgm*⁺) на среде с гемином. Известно, что признак пигментации в высокой степени коррелирует с вирулентностью. В популяции вирулентных штаммов *Pgm*⁺ клетки в количественном отношении доминируют. Утрата признака пигментации сопровождается, как правило, резким ослаблением вирулентности. Подавляющее большинство штаммов, выделяемых на территории Центральной Азии и Казахстана, обладает признаком пигментации. Вместе с тем описаны редкие случаи выделения культур, полностью состоящих из *Pgm*[–] клеток к пигментообразованию.

Все изученные штаммы содержали от 67 до 90% *Pgm*⁺ клеток. Способность была изучена на среде с гемином и на конго красном агаре. Были получены сопоставимые результаты.

Признак отношения к кальцию тесно связан с вирулентностью возбудителя чумы. Штаммы содержали от 65 до 80% кальцийзависимых (Ca^{+}) клеток.

В целом, фенотипические свойства штаммов *Y. pestis*, были типичными кроме 5 штаммов из Илийского межгорного очага чумы со сниженным количеством фракции 1 (FI).

Постоянный мониторинг чувствительности к антимикробным агентам штаммов *Y. pestis* важен из-за возможности возникновения генов антибиотикорезистентности в бактериальных плазмidaх [39].

Анализ фенотипической чувствительности *Y. pestis* (n=35) *in vitro* показал высокую чувствительность к группам β -лактамы, тетрациклины, аминогликозиды, амфениколы, гликопептиды, линкозамиды, хинолоны (100,0%), чувствительны к антибиотикам других разных групп (97,5%) и показали низкую активность к *macrolides* (0,0-58,0%), что доказывает неактивность данной группы к «гр-» бактериям, в том числе к роду *Enterobacteriaceae* spp.

Установлены пределы чувствительности и подавляющие концентрации, где были составлены и оптимизированы антибиотикограмма для 35 штаммов *Y. pestis*. Результаты исследования стандартных методов «Диско-диффузный» и «Е-тест» с указанием пределы диапазонов значений минимальной подавляющей концентрации АБП и диаметров зон ингибиции роста. Наиболее активными антибиотиками были группа β -lactam, в том числе цефепим, цефтриаксон и ципрофлоксацин, за ними следовали офлоксацин и ампициллин. Средства, традиционно используемые для лечения чумы (стрептомицин, тетрациклин и хлорамфеникол), были менее активны чем β -лактамы. Слабую активность против всех 75 штаммов показали триметоприм — 15,7 мм (12–22 мм) и рифампицин — 18,2 мм (15–22 мм). Результаты исследования по чувствительности и резистентности были подтверждены стандартным методом «Е-тест», в стрипах с указаниями минимальной ингибирующей концентрации.

Результаты молекулярно-генетических исследований в поисках детерминанта антибиотикорезистентности в геномах для выявления генов резистентности к гликопептидным и бета-лактамным антибиотикам van A\B (ванкомицину, тейкопланину), тес А (метициллину, оксациллину), tem, ctx-M-1, shv (пенициллином и цефалоспоринам), oxa-40-like, oxa-48-like, oxa-23-like, oxa-51-like, imp, kpc, ges, ndm, vim (карбапенемам) подтвердили отсутствие генов у 35 изолятов *Y. pestis*. Выявлены гены van A/B (9,166) детерминанта FAM и tem (34,60) детерминанта CY5 у *E. coli* и соответственно у *P. aeruginosa* 8,954 и 24,85.

Таким образом, результаты исследования продемонстрировало отсутствие у 35 изолятов *Y. pestis* к 72 антибактериальным препаратам по следующим основным группам: бета-лактамазы расширенного спектра — БЛРС (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы), монобактамы, макролиды, тетрациклины, аминогликозиды, амфениколы, гликопептидные, линкозамиды, фторхинолоны и антибиотики разных групп.

3.3. Изучение вирулентных свойств *Yersinia pestis*

Одной из основных характеристик патогенности микроорганизма является вирулентность, которая определяется по значению средней смертельной дозы (LD_{50}) в остром эксперименте. Для расчета LD_{50} используют самые разнообразные подходы, например, метод Рида и Менча, арифметический метод и другие. Высокая вирулентность затрудняет использование этих методов из-за неравномерной шкалы между долей и шагом дозировки. Так, инфекционная доза *Yersinia pestis* экстремально низкая и составляет всего несколько клеток. Некоторые авторы и вовсе отталкиваются от значения LD_{50} для чумы в 500 КОЕ. Однако зависимость вирулентности от свойств микробы, пути заражения, способов приготовления инокулята, иммунного статуса и вида макроорганизма накладывает серьёзные ограничения на использование теста LD_{50} . Также известно, что некоторые инбредные линии мышей проявляют различную чувствительность к *Y. pestis*. Поэтому, мы отказались от расчета LD_{50} , где используется около 20 животных в пользу оценочного метода по следующей схеме оценки вирулентности штаммов *Y. pestis* на мышах (рисунок 2).

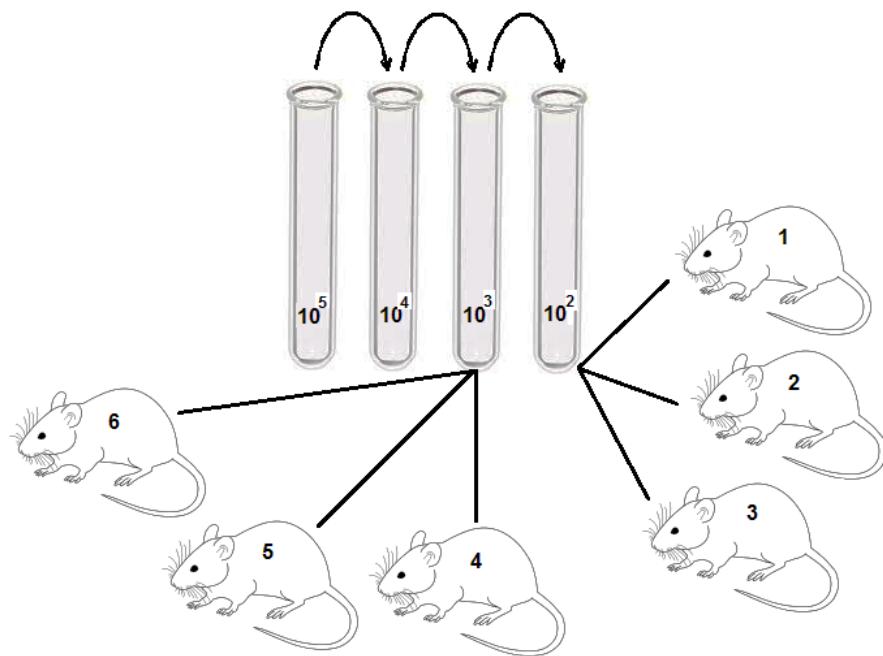


Рисунок 2 - Схема процедуры оценки вирулентности штаммов чумы на мышах
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.4>

В этой процедуре используется всего 6 особей, что также обеспечивает соблюдение принципов 3Rs. В силу высокой вирулентности, ожидается, что смерть животных будет наблюдаться даже при низких дозах, 100 и менее микробных тел. При этом учитывали также время наступления смерти животных, которое хорошо известно для чумы 4–6 день после заражения.

Лабораторные животные. Вирулентность штаммов чумы, как правило, изучается на лабораторных мышах, реже на морских свинках.

В исследовании использовали самцов мышей линий BALB/c и C57BL/6, возрастом 2–3 месяца и массой 22 г, $\pm 10\%$ которые содержались в индивидуально вентилируемых клетках (ИВК) с HEPA-фильтром (Allentown, USA) на сертифицированных автоклавируемых кормах и подстиле SSIFF (Spezialdaten GmbH, Германия). Температура окружающей среды составляла ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), влажность ($50 \pm 10\%$) и циклом день/ночь (10:14). Вода и корм *ad libitum*. Животных взвешивали с помощью весов Adventurer RV 1502 (Ohaus, Китай).

Заражение мышей. Мышей заражали инокулятом *Y. pestis* в объеме 0,5 мл приготовленного на 0,9% стерильном физиологическом растворе хлористого натрия внутрибрюшинным способом. Количество клеток бактерий определяли по оптическому отраслевому стандарту мутности (ОСО) 10 Е.Д. Заражающие дозы были 10^2 и 10^3 клеток *Y. pestis* на животное.

Биологическая безопасность. Все работы проводили в сертифицированных по ISO 35001 лабораториях ABSL3 в Центральной Референтной Лаборатории. Работы проводились в шкафу биологической безопасности SG404, класс II, тип A2 (Baker, США).

Биоэтика. Протокол исследований был утвержден Институциональным комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных ННЦОИ, № 3, 30.05.24.

Результаты. Исследование вирулентности проводили оценочным методом по уровню смертности и средней продолжительности жизни. Высокая вирулентность штаммов *Y. pestis* не позволяет правильно использовать классические методы расчета LD_{50} . Поэтому был применен оценочный способ, который основан на учете смертности мышей от пороговых доз 10^2 и 10^3 микробных клеток. В тех случаях, когда все животные умирают при минимальной дозе, то изучаемый штамм относится к высоковирулентным. Рассчитанная медиана выживаемости мышей линий BALB/c и C57BL/6 для изученных штаммов составила от 3 до 7 дней, что характерно для *Y. pestis* (рисунок 3).

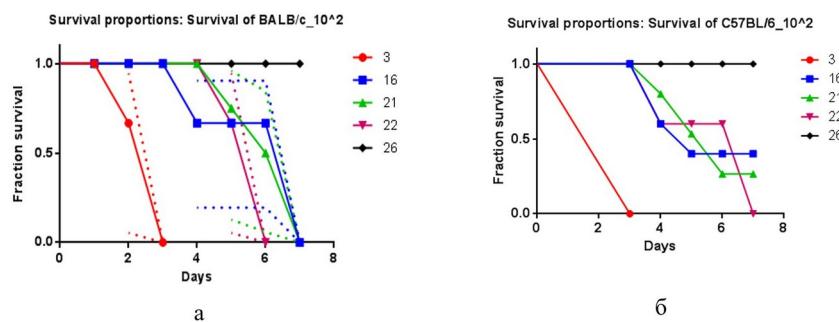


Рисунок 3 - Анализ выживаемости мышей при внутрибрюшинном заражении штаммами *Y. pestis* в дозе 10^2 мк.кл. /мышь:

а – BALB/c; б – C57BL/6
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.5>

Примечание: данные проанализированы методом Каплана-Майера и логранговым критерием

Изученные штаммы, за исключением *Y. pestis* 26 показали высокую вирулентность. При этом штамм *Y. pestis* 3 вызывал более раннюю смерть мышей, как линии BALB/c, так и C57BL/6 ($p=0,001$ и $p=0,003$, соответственно). Разница в чувствительности инбредных линий мышей не выявлено. Мыши, зараженные штаммом *Y. pestis* 26, были эвтаназированы на 7 день. При некропсии инфекционного процесса не выявлено. Посев из легких и селезенки на агар Хоттингера не показал рост *Y. pestis*.

3.4. Изучение генотипических свойств *Yersinia pestis*

Были изучены 35 образцов ДНК штаммов чумного микробы из Илийского межгорного, Прибалхашского и Северо-Приаральского автономных очагов чумы.

Для выявления ДНК чумного микробы были использованы ПЦР тест-система «*Plague qPCR*» ННЦООИ. Выделение ДНК проводили с использованием набора «РИБО-преп» Кат. № К2-9-Ет-100, Россия. Программа амплификации представлена в таблице 2, выявляемые гены представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 - Программа амплификации

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.6>

Шаг	Температура, °C	Время; мин:сек	Количество циклов
Удержание температуры	95	05:00	1
Циклирование 1	95	00:10	5
	60	00:45	
Циклирование 2	95	00:10	40
	60 (Детекция – Green/Yellow/Orange)	00:45	

Примечание: Rotor-Gene; 0,2 мл

Таблица 4 - Гены, выявляемые с помощью набора «*Plague qPCR*»

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.7>

Ген- Мишень	Локализация	Канал для детекции
Ген <i>YPO-2088</i>	Хромосома	<i>Green YPO2088</i>
Ген <i>pst</i>	Плазмида <i>pPCP1</i>	<i>Orange pst</i>
Ген <i>caf1</i>	Плазмида <i>pMT1</i>	<i>Yellow caf1</i>

Среди изучаемых штаммов был выявлен один штамм из Прибалхашского автономного очага с отсутствием значимого гена вирулентности *pst*, который расположен на плазмиде *pPCP1*. Остальные 34 образца ДНК имели все три целевые гена (таблица 5, рисунок 4).

Таблица 5 - Результаты ПЦР исследований штаммов чумного микробы из Илийского межгорного, Прибалхашского и Северо-Приаральского автономных очагов чумы

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.8>

	Набор реагентов «Plague qPCR»			Результат	
	Значение порогового цикла (Ct) ≤ 37				
	(FAM/Green) YPO-2088	(ROX/Orange) pst	(JOE/Yellow) caf1		
<i>Yersinia pestis</i> 01-35	15,57-17,02	11,16-16,79	12,05-17,1	Хромосома + плазмиды <i>pPCP1</i> и <i>pMT1</i>	
<i>Yersinia pestis</i> 26	16,47	0	16,93	Хромосома + плазмиды <i>pMT1</i>	
<i>K-</i>	-	-	-		

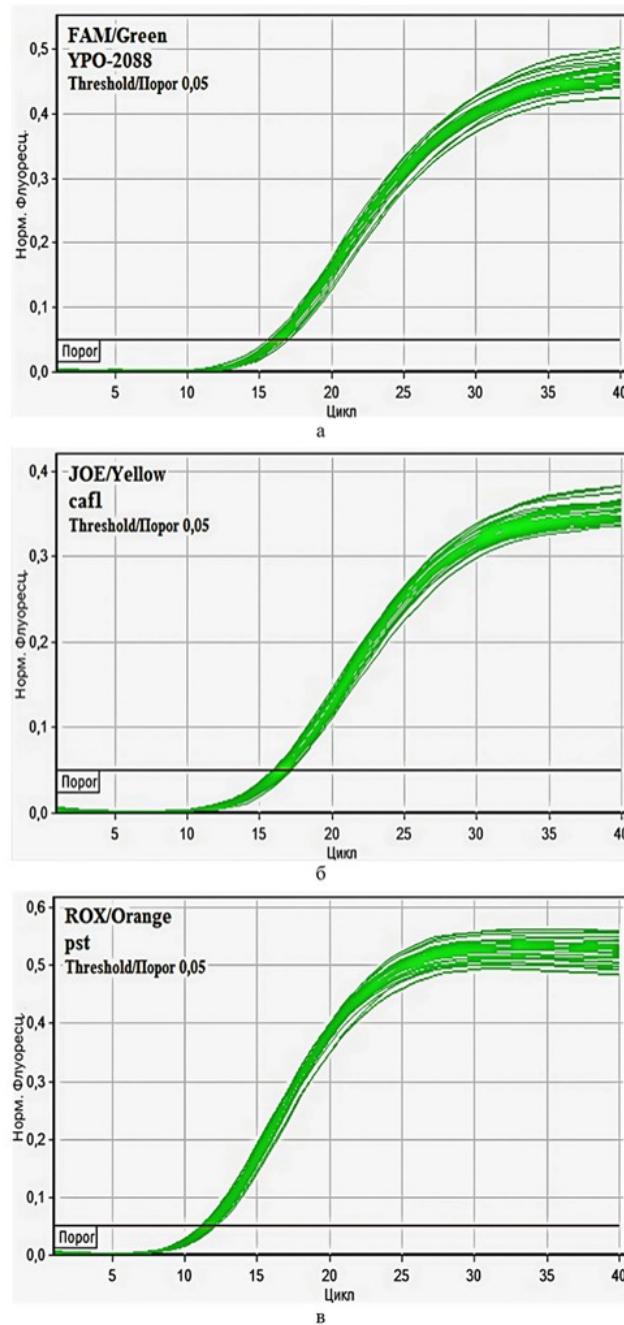


Рисунок 4 - Результаты количественной ПЦР. Кривые флуоресценции и параметры анализа:

а – амплификация фрагмента гена *Yersinia pestis* по каналу FAM/Green (YPO-2088); б – амплификация фрагмента гена, кодирующего F1-капсулный антиген по каналу JOE/Yellow (caf1); в – амплификация фрагмента плазмидного гена *pst*, характерного для вирулентных штаммов *Y. pestis* по каналу ROX/Orange (*pst*)

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.9>

Проведено изучение штаммов с праймерами *ripA-m3-f/* *ripA-m3-r* для анализа области пигментации. Для анализа области пигментации *Yersinia pestis* были использованы праймеры *ripA-m3-f/* *ripA-m3-r*, кодирующий 4-гидроксибутират кофермента А трансферазы. Проведен анализ образцов ДНК штаммов чумного микробы с помощью праймеров к гену области пигментации *ripA* и к гену 16S-М3 и (таблица 6) с одновременной детекцией видоспецифических мишней в геноме *Y. pestis*. Пара праймеров к 16sRNA была использована для подтверждения принадлежности исследуемых штаммов к виду *Y. pestis*.

Таблица 6 - Выявляемые гены области пигментации

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.10>

Праймеры	Размер ампликона, п.н.
16S-M3 – F/R	362
<i>ripA</i> – F/R	207

Анализ проводился путем стандартной ПЦР с учетом результатов реакции методом горизонтального гель-электрофореза. Программа амплификации указана в таблице 7.

Таблица 7 - Программа амплификации

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.11>

Шаг	Температура, °C	Время; мин:сек	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	05:00	1
Денатурация	95	00:40	
Отжиг	58	00:40	40
Элонгация	72	00:40	
Дополнительная элонгация	72	7:00	1
Хранение	4	∞	1

В качестве референтного образца был использован вакциновый штамм *EV*, который считается дефектным по *Pgtm* признаку *Pgtm-*. Тестирование штаммов выявило наличие гена *ripA* у всех изучаемых штаммов чумного микробы. Результаты представлены на рисунке 5 и в таблице 8.

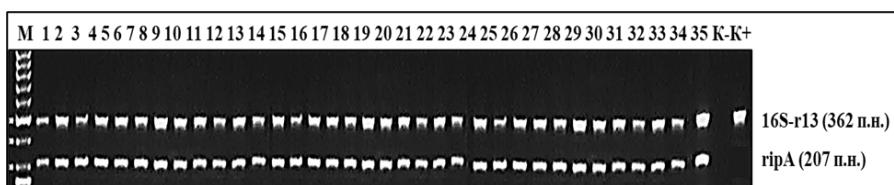


Рисунок 5 - Результаты амплификации фрагментов генов 16S-r13 и ripA изученных 35 штаммов *Yersinia pestis*
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.12>

Таблица 8 - Результаты ПЦР с праймерами 16S-M3 и ripA изученных 35 штаммов *Yersinia pestis*DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.13>

	16S-M3 (362 п.н.)	ripA (207 п.н.)
Маркер	362 п.н.	207 п.н
<i>Y. pestis</i> 01-35	++++	++++
Контроль отрицательный	0	0
Контроль <i>Y. pestis</i> EV	++++	0

Генотипирование исследуемых изолятов проводилось на основе структуры VNTR локусов методом мультилокусного VNTR анализа (Multiple Loci VNTR Analysis, MLVA). Штаммы изучены методом MLVA по 18 VNTR локусам. При этом вначале проводился анализ по 7 наиболее вариабельным VNTR локусам (MLVA-7), а затем — по 11 локусам (MLVA-18). В качестве референтных образцов были использованы штаммы *Y.pseudotuberculosis* 2841 и ДНК четырех хорошо изученных штаммов *Y. pestis*, представляющих основные биовары чумного микробы: *Pestoides F* (биовар *Microtus/Antiqua*), *Nepal516* (биовар *Antiqua*), *KIM10+* (биовар *Mediaevalis*) и *CO92* (биовар *Orientalis*). При филогенетическом анализе, кроме указанных штаммов, для сравнения были использованы данные по некоторым другим штаммам, взятые из GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). В частности, были использованы данные о структуре исследуемых VNTR локусов двух штаммов *Y. pseudotuberculosis*: IP32953 (CP009712.1) и ATCC 6904 (CP008943.1), а также двух эволюционно древних штаммов *Y. pestis*: 3770 (CP006751.1) и *Angola* (CP009935.1).

Программа амплификации, используемая при MLVA-типовании штаммов чумного микробы, представлена в таблице 9.

Таблица 9 - Программа амплификации при MLVA-типировании штаммов *Y.pestis*

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.14>

Этап	Температура, °C	Время, сек	Кол-во циклов
Предварительная денатурация	96	300	1
Денатурация	96	20 сек	
Отжиг праймеров	60	30 сек	34
Элонгация	65	60	
Финальная элонгация	65	300	1
Хранение	4	-	1

Данная работа была рассчитана на изучение филогенетических особенностей исследуемых штаммов по 24 наиболее вариабельным VNTR локусам. Было проведено изучение по 18 локусам из 24. Исследованные локусы и праймеры для их генотипирования приведены на рисунке 6. Информация о структуре VNTR локусов, последовательностях праймеров, условиях проведения ПЦР и электрофоретического анализа продуктов амплификации получена из базы международного генбанка.

МЛВА локусы	Размер	Праймеры	
		Прямой	Обратный
yp0120ms01	18	CTAAGCACAATTGTTATGCTGAACC	TACTGAATCTGCTTCATTGTTCAAA
yp1290ms04	17	CGCTGTTGAAGTTTAGTGAAGAA	AAATGTAACCTGCCAACCGTG
yp2769ms06	60	AATTITGCTCCCCAAATAGCAT	TTTCCCCATTAGCGAAATAAGTA
yp2916ms07	10	ATACCGCTACGATCAGCTCTAT	ATTTAATATTGATTTGGGACTTGC
yp1335ms46	7	CAGGTTTACGTTATTCTGAAGG	CAGCATGAAGTATGACGGGTATATTA
yp4280ms62	9	TTAGTCTGATTAAGCTGCGTTT	ACGGAAGACAACCTTATTATTGATG
yp1580ms70	9	AAACCAACGGTTCATATTGAATAAA	CTTCTCCGCTATTTCTACAGA
yp1935ms05	17	CCTCAGITCATTGTTAAAATCTCA	GTATTAGCGAGATCACAGATGAGC
yp3057ms09	18	CGTTACCCCTGTTGCCAATAGT	ACGCAGAACATGCTTACCTTTAT
yp0559ms15	15	TTGACCAAGTGTAAAGGCATAAAAT	AAACTATCGCCAGCCATTAGTA
yp1814ms20	15	ACAACCTCAGTTGCCCTTG	GTAAAGAGCGCAATGATCGTACT
yp1895ms21	18	GCTTAAAGCAGATTGAACTCACG	CTGCATGTTACCGGTTCA
yp4042ms35	15	CTGTTACCGTCAAAGTGGATATT	AGGCTCTCTTATCATTTGGTC
yp4425ms38	16	GTGAGGTATAGCTAAACGGTGATGT	CGCCGTAGATTATTTGTCACTTTAT
yp0581ms40	17	GCAATCATTACCTAACCATATCTC	GTGCAATAGGCGTTGTTGTGA
yp0718ms41	17	GAAGAAAGCCAGCTAATCTGATG	TAATGAATAGCAACGACAACCAATA
yp1018ms44	7	CAATTCCAACAGCTATTAAATGCAA	GAATTTCATAACACGTTCTTCCTG
yp1108ms45	12	GCATCGGAGACTGGTAAAC	TTTCTGAGGATTATCGGTGTGAT

Рисунок 6 - VNTR локусы, использованные для генотипирования штаммов *Y. Pestis*
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.15>

Амплификация проводилась на стандартных термоциклярах для классической ПЦР. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводилось в 2% агарозном геле. Размер продуктов амплификации ДНК исследуемых штаммов чумного микроба определялся исходя из размеров фрагментов маркера молекулярного веса, а также из размеров продуктов амплификации ДНК референтных штаммов.

3.5. Филогенетический анализ

Анализ филогенетических связей исследуемых штаммов проводился с помощью программы PAUP 4.0. Составлялась бинарная матрица, где 1 — означало наличие признака, а 0 — отсутствие. Для иерархической кластеризации был использован алгоритм UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Оптимизация полученного филогенетического дерева проводилась на графическом редакторе FigTree v.1.4.4.

На основе данных, полученных методом гель-электрофореза для каждого из 18 VNTR локусов исследуемых штаммов составлена таблица размеров продуктов амплификации (рисунок 7) и матрица для филогенетического анализа с помощью программы PAUP 4.0 (рисунок 8).

Strains	VNTR loci																	
	01	04	06	07	46	62	70	05	09	15	20	21	35	38	40	41	44	45
Pstbc IP32953	192	145	1088	144	266	330	155	206	790	237	283	314	189	281	230	217	233	124
Pstbc ATCC 6904	192	145	786	144	0	285	155	206	592	221	238	260	219	281	247	217	233	126
Pstbc 2841	174	213	0	154	252	240	128	206	790	237	253	314	189	249	214	217	199	125
<i>Y. pestis</i> 3770	210	179	547	174	246	285	119	308	196	221	238	296	219	233	231	200	233	0
<i>Y. pestis</i> Angola	210	162	362	134	259	276	137	189	574	221	238	260	0	217	214	217	233	0
EV 76	228	230	606	184	252	240	146	291	682	237	253	278	204	233	214	217	233	161
KIM10	192	196	305	164	378	276	146	274	502	237	238	278	219	201	231	183	254	149
Nepal516	192	196	185	174	259	222	137	291	520	237	238	278	219	233	248	183	233	161
<i>Pestoides</i> F	210	179	487	194	245	294	119	291	196	221	238	296	219	233	248	200	233	0
CO92	228	230	606	184	252	240	146	291	682	237	253	278	204	233	214	217	233	161
KZ-IM-001	210	213	305	184	287	321	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-002	210	213	305	184	287	312	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-SP-001	210	196	305	174	266	285	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-002	210	196	305	174	266	276	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-003	210	196	305	174	266	285	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-004	210	196	305	174	266	294	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-005	210	196	305	174	266	294	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-006	210	196	305	174	266	294	146	274	502	237	238	278	219	201	231	183	216	149
KZ-SP-007	210	196	305	174	273	276	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-008	210	196	305	174	273	276	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-009	210	196	305	174	266	294	164	274	520	237	238	278	204	201	231	217	233	149
KZ-SP-010	210	196	305	174	266	285	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-011	210	196	305	174	266	276	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-012	210	196	305	174	266	285	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-013	210	196	305	174	266	294	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-IM-003	210	213	305	184	287	294	155	274	484	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-004	210	213	305	184	287	321	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-005	210	213	305	184	287	312	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-006	210	213	305	184	287	294	155	274	484	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-007	210	213	305	184	287	321	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-008	210	213	305	184	287	321	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-009	210	213	305	184	287	312	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-010	210	213	305	184	287	312	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-011	210	213	305	184	287	294	155	274	484	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-IM-012	210	213	305	184	287	294	155	274	484	237	238	278	219	201	231	183	254	149
KZ-PB-001	192	179	305	184	266	267	146	274	700	237	253	278	219	233	231	217	233	0
KZ-SP-014	210	196	305	174	266	294	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-015	210	196	305	174	266	294	146	274	502	237	238	278	219	201	231	183	216	149
KZ-SP-016	210	196	305	174	273	276	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-017	210	196	305	174	273	276	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-018	210	196	305	174	266	294	164	274	520	237	238	278	204	201	231	217	233	149
KZ-SP-019	210	196	305	174	266	285	155	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-020	210	196	305	174	266	294	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-021	210	213	305	174	287	276	173	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149
KZ-SP-022	210	196	305	174	266	294	164	274	502	237	238	278	219	201	231	183	233	149

Рисунок 7 - Размеры продуктов амплификации ДНК исследуемых 35 штаммов *Y. pestis*
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.16>

Рисунок 8 - Матрица для проведения филогенетического анализа исследуемых 35 штаммов *Y. pestis*
 DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.162.63.17>

Филогенетическое дерево, созданное программой PAUP 4.0 и обработанное на графическом редакторе FigTree v.1.4.2, приведено на рисунке 9.

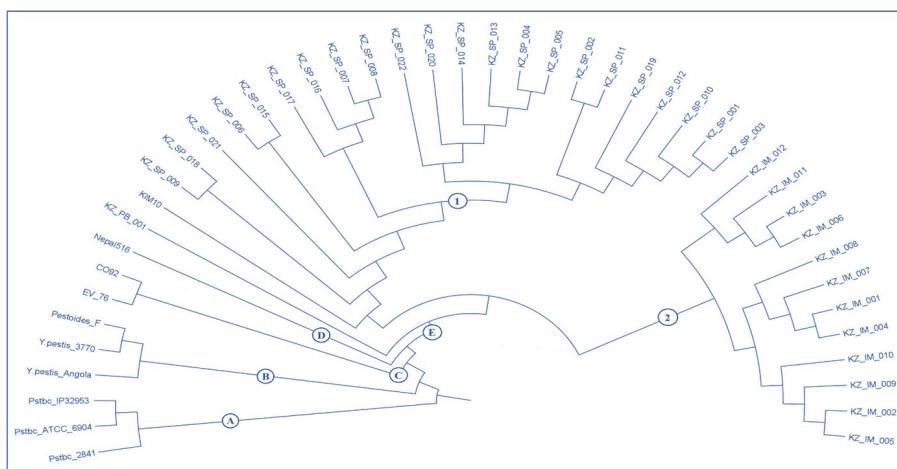


Рисунок 9 - Филогенетическое дерево родства изученных 35 штаммов *Y. pestis*, построенное на основе анализа 18 VNTR локусов

Для построения филогенетического дерева были взяты предварительные результаты молекулярного типирования методом MLVA. Изучены нуклеотидные последовательности 35-ти штаммов *Y. pestis* по 18 VNTR локусам из 24 вариабельных локусов. В построении дерева были также использованы нуклеотидные последовательности штаммов из других регионов мира, депонированные в NCBI GenBank. Полученное филогенетическое дерево показало разделение изученных штаммов на пять основных кластера. В кластер «А» вошли штаммы *Y. pseudotuberculosis*, включая казахстанский штамм 2841. Кластер «В» представлен древними штаммами чумного микробы: *Y. pestis Angola* и *Y. pestis* 3770. В этот же кластер вошел референтный штамм *Y. pestis Pestoides F*. В кластер «С» вошли два контрольных штамма: референтный штамм *Y. pestis* CO92 и вакцинный штамм *Y. pestis* EV-76, относящиеся к биовару *Orientalis*. Кластер «Д» отображен одним представителем *Antiqua*: референтным штаммом Nepal516. Обширный кластер — «Е» представлен изолятами, выделенными на территории Центральноазиатского пустынного очага чумы (Северо-Приаральский, Илийский межгорный и Прибалхашский автономные очаги). Присутствие в этом кластере референтного штамма KIM10, являющегося типичным представителем биовара *Mediaevalis* подтверждает, что все

штаммы из кластера «Е» относятся к биовару *Mediaevalis*, 2. MED1. Штаммы ветви 2. MED1 разделены на две отдельные филогенетические группы. Первая группа представлена политомией, состоящей как из одиночных штаммов, так и из кластеров штаммов, объединенных по месту их выделения. Вторая филогенетическая группа объединяет три кластера штаммов, выделенных в Илийском межгорном автономном очаге чумы. Составленная филогенетика указывает на то, что в Центрально-Азиатском очаге чумы существует стабильная популяция *Y. pestis* биовара *Mediaevalis*, 2. MED1.

Обсуждение

В настоящем исследовании проведено комплексное изучение 35 штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в 2024 году из пустынных природных очагов Республики Казахстан. Полученные результаты дополняют современные данные о циркуляции возбудителя чумы в Центральной Азии [24], [25], [40]. Выявленная фенотипическая и генотипическая изменчивость соответствует ранее опубликованным данным, подтверждающим сложную структуру чумных очагов Казахстана [12], [19], [23].

Большинство изученных штаммов демонстрировали типичные признаки биовара *Mediaevalis*: ферментировали глицерин, глюкозу, мальтозу и арабинозу, проявляли кальций-зависимый рост при 37°C, а также были устойчивы к действию бактериофагов, характерных для данного биовара [41]. Вместе с тем обнаружены отдельные штаммы, у которых отмечено сниженное содержание антигена FI (фракция 1). Такие отклонения могут быть связаны с экологическими особенностями природных очагов и микроэволюционными процессами, протекающими в популяции возбудителя [42], [43].

Генетическое типирование методом мультилокусного анализа вариабельных тандемных повторов (MLVA) подтвердило преобладание генотипов ветви 2.MED1 биовара *Mediaevalis*, ранее неоднократно выявленных в природных очагах Казахстана и сопредельных странах [44]. Филогенетическое дерево, построенное по 18 VNTR-локусам, продемонстрировало чёткое разделение изученных штаммов на несколько кластеров, соответствующих отдельным природным очагам. Это подтверждает предположения о наличии устойчивых локальных популяций и возможных путях миграции грызунов-резервуаров на территории Центральной Азии [45].

Особое внимание заслуживает обнаружение одного штамма без плазмидного гена *pst* (pPCP1), кодирующего пестицин, фибринолизин и коагулазу. Потеря данного гена может быть связана с ослаблением вирулентности штамма, что было подтверждено экспериментальными данными. Подобные генетические потери ранее были описаны в литературе и связаны с процессами адаптации и эволюции чумного микробы в природных очагах [46].

Испытания на лабораторных животных (мыши линий BALB/c и C57BL/6) подтвердили высокую вирулентность большинства исследованных штаммов. Гибель животных при низких заражающих дозах (10^2 и 10^3 КОЕ) в сроки 3–7 дней свидетельствует о значительной эпидемической опасности циркулирующих штаммов [40], [47]. Отсутствие значимых различий между линиями лабораторных животных также указывает на высокую стабильность фенотипа вирулентности исследованных штаммов *Y. pestis*.

Полученные данные подтверждают необходимость постоянного мониторинга природных очагов чумы с применением современных молекулярно-генетических методов (MLVA, SNP-типирование, WGS), что позволяет эффективно отслеживать эпидемиологическую ситуацию и своевременно выявлять возможные изменения в структуре популяции возбудителя [48], [49].

Таким образом, комплексный подход к изучению циркулирующих штаммов *Y. pestis* предоставляет важную информацию для оценки эпидемиологической опасности и разработки эффективных профилактических мероприятий в природных очагах Республики Казахстан.

Заключение

В настоящем исследовании реализован интегральный подход к изучению штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в 2024 году из пустынных природных очагов Республики Казахстан. Проведённое комплексное исследование фенотипических, генотипических и вирулентных характеристик позволило получить глубокие знания о текущем состоянии и особенностях популяционной структуры возбудителя чумы в Центрально-Азиатском регионе. Результаты скрининга к АБП показали отсутствие у 35 изолятов *Y. pestis* к 72 антибактериальным препаратам по следующим основным группам: бета-лактамазы расширенного спектра — БЛРС (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы), монобактамы, макролиды, тетрациклины, аминогликозиды, амфениколы, гликопептидные, линкозамиды, фторхинолоны и антибиотики разных групп. Результаты генотипирования подтвердили, что большинство циркулирующих штаммов относятся к биовару *Mediaevalis* (ветвь 2.MED1) и демонстрируют типичные фенотипические и молекулярно-генетические характеристики. Генотипическое типирование методом MLVA подтвердило высокую стабильность популяционной структуры *Y. pestis*.

Таким образом, проведённое комплексное исследование расширяет существующие представления о популяционной структуре *Yersinia pestis* и подчёркивает необходимость продолжения регулярного эпизоотологического и молекулярно-генетического мониторинга природных очагов Казахстана. Дальнейшие исследования, включая применение новых технологий (WGS, CRISPR-типирование), могут дать ещё более детальное понимание механизмов эволюции и распространения возбудителя, а также способствовать разработке улучшенных стратегий управления рисками возникновения эпидемических вспышек чумы в Центральной Азии.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы по теме «Изучение генов антибиотикорезистентности возбудителей чумы и холеры, разработка ПЦР-тест-системы», проект ИРН – АР19679355, источник финансирования – Комитет науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

The study was carried out as part of a research project on the topic "Study of antibiotic resistance genes of plague and cholera pathogens, development of a PCR test system", the IRN - AP19679355 project, the source of funding is the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Антропова Л.А. Современные подходы к генотипированию возбудителя чумы *Yersinia pestis* / Л.А. Антропова, А.В. Епишин, Е.А. Сидорова // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — № 4. — С. 58–63.
2. Безуглая Н.Н. Эпидемиологическое значение мониторинга природных очагов чумы / Н.Н. Безуглая, О.В. Головин, А.А. Дьячков А.А. [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2015. — № 1. — С. 30–35.
3. Кузнецова И.А. Использование метода MLVA для типирования штаммов *Yersinia pestis* / И.А. Кузнецова, Н.В. Бурова, И.А. Сахарова // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — № 4. — С. 45–49.
4. Бурова Н.В. Фенотипическая характеристика природных штаммов *Yersinia pestis*, циркулирующих в очагах чумы России / Н.В. Бурова, О.В. Мартыненко, И.Н. Елисеева [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2014. — № 9. — С. 12–17.
5. Попов Н.В. Оценка современной эпидемиологической обстановки в природных очагах чумы мира / Н.В. Попов, И.Г. Карнаухов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 1. — С. 81–88. — DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-81-88.
6. He Z. Distribution and Characteristics of Human Plague Cases and *Yersinia pestis* Isolates from 4 Marmot Plague Foci, China, 1950–2019 / He Z., Wei B. [et al.] // Emerging Infectious Diseases. — 2021. — Vol. 27. — № 10. — P. 2544–2553. — DOI: 10.3201/eid2710.202239.
7. Forecast of Epizootic Activity of Natural Plague Foci in the Russian Federation for the First Half of 2025 / Russian Scientific and Research Anti-Plague Institute “Microbe.” — URL: <https://www.microbe.ru/news/20250130/> (accessed: 05.02.2025).
8. Otgonbayar D. Epidemiological and Clinical Features of Plague Cases Registered in Khovd Province, Mongolia (1993–2022) / D. Otgonbayar, M. Baigalmaa M. [et al.] // Current Issues on Zoonotic Diseases. — Ulaanbaatar, 2023. — Iss. 25. — P. 74–75.
9. Negi S. Plague Outbreak in Madagascar Amidst COVID-19: A Re-emerging Public Health Concern / S. Negi, S. Tripathy [et al.] // Clinical Infection in Practice. — 2023. — Vol. 17. — № 8. — P. 100222. — DOI: 10.1016/j.clinpr.2023.100222.
10. Rakotosamimanana S. Socioenvironmental Determinants as Indicators of Plague Risk in the Central Highlands of Madagascar: Experience of Ambositra and Tsiroanomandidy Districts / S. Rakotosamimanana, F. Taglioni [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases. — 2023. — Vol. 17. — № 9. — Art. e0011538. — DOI: 10.1371/journal.pntd.0011538.
11. Атшабар Б.Б. Паспорт регионов Казахстана по особо опасным инфекциям / Б.Б. Атшабар, Л.А. Бурделов, У.А. Избанова [и др.] // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. — 2015. — № 1 (31). — С. 5–177.
12. Абдел З.Ж. Демаркация границ Центральноазиатского пустынного природного очага чумы Казахстана и мониторинг ареала основного носителя *Rhombomys opimus* / З.Ж. Абдел, Т.К. Ерубаев, Г.Ж. Токмурзиеva [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 2. — С. 71–78. — DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-71-78.
13. Aikimbaev A.M. Epidemic Potential of Natural Plague Foci of Kazakhstan / A.M. Aikimbaev [et al.]. — Almaty: DOIVA Medeusky District of Almaty, 2006. — 153 p.
14. Ривкус Ю.З. Эндемия чумы в пустынях Средней Азии и Казахстана / Ю.З. Ривкус, А.Г. Блюммер. — Воронеж, 2016. — С. 358.
15. Попова А.Ю. Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях / А.Ю. Попова, В.В. Кутырев. — Ижевск: Принт, 2018. — 336 с.
16. Plague // World Health Organization (WHO). — URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/plague> (accessed: 10.02.2025)
17. Yumashev M.M. Geographical Aspects of Epidemics of Natural Plague Foci / Y.Y. Yumashev // Bulletin of Geography. — 2008. — № 4. — P. 62–69.
18. Achtman M. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis* / M. Achtman, K. Zurth, G. Morelli [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. — 1999. — Vol. 96. — № 24. — P. 14043–14048.

19. Abdel Z. Spatial and temporal characterisation of genetic and phenotypic properties of *Yersinia pestis* in Kazakhstan's natural plague foci / Z. Abdel, Z. Zhumadilova, R. Mussagalieva [et al.] // Environmental Analysis Health and Toxicology. — 2025. — Vol. 40. — № 3. — Art. e2025019-0. — DOI: 10.5620/eaht.2025019.
20. Rametov N.M. Mapping plague risk using super species distribution models and forecasts for rodents in the Zhambyl Region, Kazakhstan / N.M. Rametov, M. Steiner, N.A. Bizhanova [et al.] // GeoHealth. — 2023. — Vol. 7. — № 11. — Art. e2023GH000853. — DOI: 10.1029/2023GH000853.
21. Абдель З. Прогнозирование пространственной динамики эпизоотического процесса чумы среди диких животных в пустынных очагах Казахстана за период 2020—2024 гг. на основе ГИС-технологий / З. Абдель, З. Жумадылова, А. Айкимбаев [и др.] // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. — 2025. — № 3. — С. 41–54. — DOI: 10.11134/btp.3.2025.5.
22. Abdel Z. Natural foci of plague in Kazakhstan in the space-time continuum / Z. Abdel, B. Abdeleyev, D. Yessimseit [et al.] // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. — 2023. — Vol. 100. — Art. 102025. — DOI: 10.1016/j.cimid.2023.102025.
23. Айкимбаев А.М. Систематизация показателей и стандартов эпидемиологического и эпизоотологического надзора по чуме для усовершенствования профилактических мероприятий в Республике Казахстан / А.М. Айкимбаев, З.Ж. Абдел, З.Б. Жумадилова [и др.] // Биобезопасность и биотехнология. — 2024. — № 19. — С. 6–30. — DOI: 10.58318/2957-5702-2024-19-6-30.
24. Абдел З.Ж. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов чумного микробы, циркулирующих в песчаных природных очагах чумы Республики Казахстан / З.Ж. Абдел, Т.В. Мека-Меченко, А.А. Абдирасилова [и др.] // Бактериология. — 2020. — Т. 5. — № 3. — С. 25–33. — DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-25-33.
25. Abdirassilova A.A. Whole genome sequencing of *Yersinia pestis* isolates from Central Asian natural plague foci revealed the role of adaptation to different hosts and environmental conditions in shaping specific genotypes / A.A. Abdirassilova, D.T. Yessimseit, A.K. Kassenova [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases. — 2025. — Vol. 19. — № 9. — Art. e0013533. — DOI: 10.1371/journal.pntd.0013533.
26. Abdirassilova A.A. Development of a real-time PCR using fluorescent hybridization probes / A.A. Abdirassilova, Z.Zh. Abdel, B.K. Kurmanov [et al.] // Journal of Research in Medical and Dental Science. — 2020. — Vol. 8. — № 1. — Р. 26–36. — DOI: 10.21608/jrmds.2020.45464.
27. Руководство по профилактике чумы в Среднеазиатском пустынном очаге. — Алма-Ата, 1992. — 143 с.
28. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории государств-участников Содружества Независимых Государств: Методические рекомендации. — Саратов, 2019. — 113 с.
29. Лисицын В.М. Методы молекулярной диагностики чумного микробы / В.М. Лисицын, И.А. Петрова, И.А. Васильева // Лабораторная диагностика. — 2016. — № 4. — С. 52–58.
30. Vogler A.J. Molecular analysis of *Yersinia pestis* strains from natural foci of plague in the United States / A.J. Vogler, J.D. Busch, S. Percy-Fine [et al.] // Emerging Infectious Diseases. — 2002. — Vol. 8. — № 3. — Р. 319–322.
31. Morelli G. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity / G. Morelli, Y. Song, C.J. Mazzoni [et al.] // Nature Genetics. — 2010. — Vol. 42. — Р. 1140–1143.
32. Girard J.M. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population structure on local, regional and global scales / J.M. Girard, D.M. Wagner, A.J. Vogler [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. — 2004. — Vol. 101. — № 22. — Р. 8408–8413.
33. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам: Методические указания. — Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 59 с.
34. Бегимбаева Э.Ж. Методические рекомендации по определению чувствительности возбудителя чумы к антибактериальным препаратам / Э.Ж. Бегимбаева [и др.]. — Алматы: Холдинг Сумая, 2018. — 24 с.
35. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. — Москва: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. — 91 с.
36. Мека-Меченко Т.В. Методические рекомендации по изучению штаммов чумного микробы молекулно-генетическими методами / Т.В. Мека-Меченко Т.В. [и др.]. — Алматы: Издательство LEM, 2011. — 36 с.
37. Абдирасилова А.А. Методические рекомендации по проведению полимеразной цепной реакции реального времени (ПЦР РВ) для выявления ДНК чумного микробы / А.А. Абдирасилова, З.Ж. Абдел. — Алматы: КазБукЭкспорт, 2023. — 37 с.
38. Atshabar B. Populations of the major carrier *Rhombomys opimus*, vectors of *Xenopsylla* fleas and the causative agent *Yersinia pestis* in the Central Asian desert natural focus of plague / B. Atshabar, S.T. Nurtazhin, A. Shevtsov [et al.] // Bulletin of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. — 2021. — Vol. 1. — № 389. — Р. 26–34. — DOI: 10.32014/2021.2518-1467.4.
39. Abdel Z.Zh. Antibiotic susceptibility screening and search for resistance genes in *Yersinia pestis* clinical isolates from plague outbreaks in natural foci of Kazakhstan (1926–2003) / Z.Zh. Abdel, Z.B. Zhumadilova, R.S. Mussagalieva [et al.] // Microbial Drug Resistance. — 2025. — Vol. 31. — № 9. — Р. 287–299. — DOI: 10.1177/10766294251362277.
40. Бурова Н.В. Фенотипическая характеристика природных штаммов *Yersinia pestis*, циркулирующих в очагах чумы России / Н.В. Бурова, О.В. Мартыненко, И.Н. Елисеева [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2014. — № 9. — С. 12–17.
41. Антропова Л.А. Современные подходы к генотипированию возбудителя чумы *Yersinia pestis* / Л.А. Антропова, А.В. Епишин, Е.А. Сидорова // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — № 4. — С. 58–63.

42. Кутырев В.В. Филогения и классификация *Yersinia pestis* на основе SNP-типирования и секвенирования полных геномов / В.В. Кутырев, М.Г. Платонов, В.Л. Мотин // *Frontiers in Microbiology*. — 2018. — Т. 9. — С. 1106. — DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
43. Мека-Меченко Т.В. Генотипические свойства коллекционных штаммов чумного микробы из природных очагов чумы Казахстана / Т.В. Мека-Меченко, У.А. Избанова, З.Ж. Абдел [и др.] // *Acta biomedica scientifca*. — 2022. — № 7 (6). — С. 111–118. — DOI: 10.29413/ABS.2022-7.6.11.
44. Юмашев М.М. Географические аспекты эпидемий природных очагов чумы / М.М. Юмашев // *Bulletin of Geography*. — 2008. — № 4. — С. 62–69.
45. Achtman M. Microevolution and phylogeny of *Yersinia pestis* / M. Achtman [et al.] // *PNAS*. — 1999. — Vol. 96. — № 24. — P. 14043–14048.
46. Vogler A.J. Molecular analysis of natural *Y. pestis* strains / A.J. Vogler [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. — 2002. — Vol. 8. — № 3. — P. 319–322.
47. Demeure C.E. Evolution and virulence of *Yersinia pestis* / C.E. Demeure [et al.] // *Human Genetics*. — 2019. — Vol. 139. — P. 5–17.
48. Лисицын В.М. Методы диагностики *Yersinia pestis* / В.М. Лисицын, И.А. Петрова // *Лабораторная диагностика*. — 2016. — № 4. — С. 52–58.
49. Randriantseheno L.N. In the case of *Y. pestis*: MLVA, SNP, WGS / L.N. Randriantseheno [et al.] // *PLOS Negl Trop Dis.* — 2024. — Vol. 18. — № 6. — DOI: 10.1371/journal.pntd.0012252.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Antropova L.A. Sovremennie podkhodi k genotipirovaniyu vozбудителя чумы *Yersinia pestis* [Modern approaches to genotyping the plague pathogen *Yersinia pestis*] / L.A. Antropova, A.V. Yepishin, Ye.A. Sidorova // *Problemi osobo opasnikh infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. — 2012. — № 4. — P. 58–63. [in Russian]
2. Bezuglaya N.N. Epidemiologicheskoe znachenie monitoringa prirodnikh ochagov chumi [The epidemiological significance of monitoring natural foci of plague] / N.N. Bezuglaya, O.V. Golovin, A.A. Dyachkov A.A. [et al.] // *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. — 2015. — № 1. — P. 30–35. [in Russian]
3. Kuznetsova I.A. Ispolzovanie metoda MLVA dlya tipirovaniya shtammov *Yersinia pestis* [Use of the MLVA method for typing *Yersinia pestis* strains] / I.A. Kuznetsova, N.V. Burova, I.A. Sakharova // *Problemi osobo opasnikh infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. — 2011. — № 4. — P. 45–49. [in Russian]
4. Burova N.V. Fenotipicheskaya kharakteristika prirodnikh shtammov *Yersinia pestis*, tsirkuliruyushchikh v ochagakh chumi Rossii [Phenotypic characterisation of natural strains of *Yersinia pestis* circulating in plague foci in Russia] / N.V. Burova, O.V. Martinenko, I.N. Yeliseeva [et al.] // *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences]. — 2014. — № 9. — P. 12–17. [in Russian]
5. Popov N.V. Otsenka sovremennoi epidemiologicheskoi obstanovki v prirodnikh ochagakh chumi mira [Assessment of the current epidemiological situation in natural foci of plague worldwide] / N.V. Popov, I.G. Karnaughov [et al.] // *Problemi osobo opasnikh infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. — 2019. — № 1. — P. 81–88. — DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-81-88. [in Russian]
6. He Z. Distribution and Characteristics of Human Plague Cases and *Yersinia pestis* Isolates from 4 Marmot Plague Foci, China, 1950–2019 / He Z., Wei B. [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. — 2021. — Vol. 27. — № 10. — P. 2544–2553. — DOI: 10.3201/eid2710.202239.
7. Forecast of Epizootic Activity of Natural Plague Foci in the Russian Federation for the First Half of 2025 / Russian Scientific and Research Anti-Plague Institute “Microbe.” — URL: <https://www.microbe.ru/news/20250130/> (accessed: 05.02.2025).
8. Otgonbayar D. Epidemiological and Clinical Features of Plague Cases Registered in Khovd Province, Mongolia (1993–2022) / D. Otgonbayar, M. Baigalmaa M. [et al.] // *Current Issues on Zoonotic Diseases*. — Ulaanbaatar, 2023. — Iss. 25. — P. 74–75.
9. Negi S. Plague Outbreak in Madagascar Amidst COVID-19: A Re-emerging Public Health Concern / S. Negi, S. Tripathy [et al.] // *Clinical Infection in Practice*. — 2023. — Vol. 17. — № 8. — P. 100222. — DOI: 10.1016/j.clinpr.2023.100222.
10. Rakotosamimanana S. Socioenvironmental Determinants as Indicators of Plague Risk in the Central Highlands of Madagascar: Experience of Ambositra and Tsiroanomandidy Districts / S. Rakotosamimanana, F. Taglioni [et al.] // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. — 2023. — Vol. 17. — № 9. — Art. e0011538. — DOI: 10.1371/journal.pntd.0011538.
11. Atshabar B.B. Pasport regionov Kazakhstana po osobo opasnim infektsiyam [Passport of Kazakhstan regions for particularly dangerous infections] / B.B. Atshabar, L.A. Burdelov, U.A. Izbanova [et al.] // *Karantinnie i zoonoznie infektsii v Kazakhstane* [Quarantine and zoonotic infections in Kazakhstan]. — 2015. — № 1 (31). — P. 5–177. [in Russian]
12. Abdel Z.Zh. Demarkatsiya granits Tsentralnoaziatskogo pustinnogo prirodnogo ochaga chumi Kazakhstana i monitoring areala osnovnogo nositelya Rhombomys opimus [Demarcation of the boundaries of the Central Asian desert natural focus of plague in Kazakhstan and monitoring of the range of the main carrier Rhombomys opimus] / Z.Zh. Abdel, T.K. Yerubaev, G.Zh. Tokmurzieva [et al.] // *Problemi osobo opasnikh infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. — 2021. — № 2. — P. 71–78. — DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-71-78. [in Russian]
13. Aikimbaev A.M. Epidemic Potential of Natural Plague Foci of Kazakhstan / A.M. Aikimbaev [et al.]. — Almaty: DOIVA Medeusky District of Almaty, 2006. — 153 p.
14. Rivkus Yu.Z. Endemiya chumi v pustinyakh Srednei Azii i Kazakhstana [Endemic Plague in the Deserts of Central Asia and Kazakhstan] / Yu.Z. Rivkus, A.G. Blummer. — Voronezh, 2016. — P. 358. [in Russian]

15. Popova A.Yu. Obespechenie epidemiologicheskogo blagopoluchiya v prirodnikh ochagakh chumi na territorii stran SNG i Mongoli v sovremenikh usloviyakh [Ensuring epidemiological well-being in natural plague foci in the CIS countries and Mongolia under current conditions] / A.Yu. Popova, V.V. Kutirev. — Izhevsk: Print, 2018. — 336 p. [in Russian]
16. Plague // World Health Organization (WHO). — URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/plague> [accessed: 10.02.2025]
17. Yumashev M.M. Geographical Aspects of Epidemics of Natural Plague Foci / Y.Y. Yumashev // Bulletin of Geography. — 2008. — № 4. — P. 62–69.
18. Achtman M. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis* / M. Achtman, K. Zurth, G. Morelli [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. — 1999. — Vol. 96. — № 24. — P. 14043–14048.
19. Abdel Z. Spatial and temporal characterisation of genetic and phenotypic properties of *Yersinia pestis* in Kazakhstan's natural plague foci / Z. Abdel, Z. Zhumadilova, R. Mussagalieva [et al.] // Environmental Analysis Health and Toxicology. — 2025. — Vol. 40. — № 3. — Art. e2025019-0. — DOI: 10.5620/eaht.2025019.
20. Rametov N.M. Mapping plague risk using super species distribution models and forecasts for rodents in the Zhambyl Region, Kazakhstan / N.M. Rametov, M. Steiner, N.A. Bizhanova [et al.] // GeoHealth. — 2023. — Vol. 7. — № 11. — Art. e2023GH000853. — DOI: 10.1029/2023GH000853.
21. Abdel Z. Prognozirovaniye prostranstvennoi dinamiki epizooticheskogo protsessa chumi sredi dikikh zhivotnikh v pustinnikh ochagakh Kazakhstana za period 2020–2024 gg. na osnove GIS-tehnologii [Forecasting the spatial dynamics of the epizootic process of plague among wild animals in desert foci of Kazakhstan for the period 2020–2024 based on GIS technologies] / Z. Abdel, Z. Zhumadilova, A. Aikimbaev [et al.] // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. — 2025. — № 3. — P. 41–54. — DOI: 10.11134/btp.3.2025.5. [in Russian]
22. Abdel Z. Natural foci of plague in Kazakhstan in the space-time continuum / Z. Abdel, B. Abdelyev, D. Yessimseit [et al.] // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. — 2023. — Vol. 100. — Art. 102025. — DOI: 10.1016/j.cimid.2023.102025.
23. Aikimbaev A.M. Sistematisatsiya pokazatelei i standartov epidemiologicheskogo i epizootologicheskogo nadzora po chume dlya usovershenstvovaniya profilakticheskikh meropriyatiy v Respublike Kazakhstan [Systematisation of indicators and standards for epidemiological and epizootological surveillance of plague to improve preventive measures in the Republic of Kazakhstan] / A.M. Aikimbaev, Z.Zh. Abdel, Z.B. Zhumadilova [et al.] // Biobezopasnost i biotekhnologiya [Biosafety and Biotechnology]. — 2024. — № 19. — P. 6–30. — DOI: 10.58318/2957-5702-2024-19-6-30. [in Russian]
24. Abdel Z.Zh. Biologicheskie svoistva i molekulyarno-geneticheskaya kharakteristika shtammov chumnogo mikroba, tsirkuliruyushchikh v peschanikh prirodnikh ochagakh chumi Respubliki Kazakhstan [Biological properties and molecular genetic characteristics of plague microbe strains circulating in sandy natural foci of plague in the Republic of Kazakhstan] / Z.Zh. Abdel, T.V. Meka-Mechenko, A.A. Abdirasilova [et al.] // Bakteriologiya [Bacteriology]. — 2020. — Vol. 5. — № 3. — P. 25–33. — DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-25-33. [in Russian]
25. Abdirassilova A.A. Whole genome sequencing of *Yersinia pestis* isolates from Central Asian natural plague foci revealed the role of adaptation to different hosts and environmental conditions in shaping specific genotypes / A.A. Abdirassilova, D.T. Yessimseit, A.K. Kassenova [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases. — 2025. — Vol. 19. — № 9. — Art. e0013533. — DOI: 10.1371/journal.pntd.0013533.
26. Abdirassilova A.A. Development of a real-time PCR using fluorescent hybridization probes / A.A. Abdirassilova, Z.Zh. Abdel, B.K. Kurmanov [et al.] // Journal of Research in Medical and Dental Science. — 2020. — Vol. 8. — № 1. — P. 26–36. — DOI: 10.21608/jrmds.2020.45464.
27. Rukovodstvo po profilaktike chumi v Sredneaziatskom pustinnom ochage [Guide to the prevention of plague in the Central Asian desert hotspot]. — Alma-Ata, 1992. — 143 p. [in Russian]
28. Organizatsiya i provedenie epidemiologicheskogo nadzora v prirodnikh ochagakh chumi na territorii gosudarstv-uchastnikov Sodruzhestva Nezavisimikh gosudarstv: Metodicheskie rekomendatsii [Organisation and implementation of epidemiological surveillance in natural plague foci in the territory of the member states of the Commonwealth of Independent States: Methodological recommendations]. — Saratov, 2019. — 113 p. [in Russian]
29. Lisitsin V.M. Metodi molekulyarnoi diagnostiki chumnogo mikroba [Methods of molecular diagnosis of the plague microbe] / V.M. Lisitsin, I.A. Petrova, I.A. Vasileva // Laboratornaya diagnostika [Laboratory Diagnostics]. — 2016. — № 4. — P. 52–58. [in Russian]
30. Vogler A.J. Molecular analysis of *Yersinia pestis* strains from natural foci of plague in the United States / A.J. Vogler, J.D. Busch, S. Percy-Fine [et al.] // Emerging Infectious Diseases. — 2002. — Vol. 8. — № 3. — P. 319–322.
31. Morelli G. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity / G. Morelli, Y. Song, C.J. Mazzoni [et al.] // Nature Genetics. — 2010. — Vol. 42. — P. 1140–1143.
32. Girard J.M. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population structure on local, regional and global scales / J.M. Girard, D.M. Wagner, A.J. Vogler [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. — 2004. — Vol. 101. — № 22. — P. 8408–8413.
33. Opredelenie chuvstvitelnosti vozбудitelei opasnikh bakterialnikh infektsii (chuma, sibirskaya yazva, kholera, tulyaremiya, brutsellyoz, sap, melioidoz) k antibakterialnim preparatam: Metodicheskie ukazaniya [Determination of the sensitivity of pathogens causing dangerous bacterial infections (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis) to antibacterial drugs: Methodological guidelines]. — Moscow: Federal Centre for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2009. — 59 p. [in Russian]
34. Begimbaeva E.Zh. Metodicheskie rekomendatsii po opredeleniyu chuvstvitelnosti vozбудitelya chumi k antibakterialnim preparatam [Methodological recommendations for determining the sensitivity of plague pathogens to antibacterial drugs] / E.Zh. Begimbaeva [et al.]. — Almati: Kholding Sumaya, 2018. — 24 p. [in Russian]

35. Opredelenie chuvstvitelnosti mikroorganizmov k antibakterialnim preparatam: Metodicheskie ukazaniya [Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: Methodological guidelines]. — Moscow: Federal Centre for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of Russia, 2004. — 91 p. [in Russian]
36. Meka-Mechenko T.V. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu shtammov chumnogo mikroba molekulno-geneticheskimi metodami [Methodological recommendations for studying strains of the plague microbe using molecular genetic methods] / T.V. Meka-Mechenko T.V. [et al.]. — Almati: Publishing House LEM, 2011. — 36 p. [in Russian]
37. Abdirasilova A.A. Metodicheskie rekomendatsii po provedeniyu polimeraznoi tseplnoi reaktsii realnogo vremeni (PTsR RV) dlya viyavleniya DNK chumnogo mikroba [Methodological recommendations for conducting real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect plague microbe DNA] / A.A. Abdirasilova, Z.Zh. Abdel. — Almati: KazBukExport, 2023. — 37 p. [in Russian]
38. Atshabar B. Populations of the major carrier Rhombomys opimus, vectors of Xenopsylla fleas and the causative agent Yersinia pestis in the Central Asian desert natural focus of plague / B. Atshabar, S.T. Nurtazhin, A. Shevtsov [et al.] // Bulletin of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. — 2021. — Vol. 1. — № 389. — P. 26–34. — DOI: 10.32014/2021.2518-1467.4.
39. Abdel Z.Zh. Antibiotic susceptibility screening and search for resistance genes in Yersinia pestis clinical isolates from plague outbreaks in natural foci of Kazakhstan (1926–2003) / Z.Zh. Abdel, Z.B. Zhumadilova, R.S. Mussagalieva [et al.] // Microbial Drug Resistance. — 2025. — Vol. 31. — № 9. — P. 287–299. — DOI: 10.1177/10766294251362277.
40. Burova N.V. Fenotipicheskaya kharakteristika prirodnikh shtammov Yersinia pestis, tsirkuliruyushchikh v ochagakh chumi Rossii [Phenotypic characterisation of natural strains of Yersinia pestis circulating in plague foci in Russia] / N.V. Burova, O.V. Martinenko, I.N. Yeliseeva [et al.] // Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences]. — 2014. — № 9. — P. 12–17. [in Russian]
41. Antropova L.A. Sovremennye podkhodi k genotipirovaniyu vozбудителя chumi Yersinia pestis [Modern approaches to genotyping the plague pathogen Yersinia pestis] / L.A. Antropova, A.V. Yepishin, Ye.A. Sidorova // Problemy osobo opasnykh infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. — 2012. — № 4. — P. 58–63. [in Russian]
42. Kutirev V.V. Filogeniya i klassifikatsiya Yersinia pestis na osnove SNP-tipirovaniya i sekvenirovaniya polnikh genomov [Phylogeny and classification of Yersinia pestis based on SNP typing and whole genome sequencing] / V.V. Kutirev, M.G. Platonov, V.L. Motin // Frontiers in Microbiology. — 2018. — Vol. 9. — P. 1106. — DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106. [in Russian]
43. Meka-Mechenko T.V. Genotipicheskie svoistva kollektivnykh shtammov chumnogo mikroba iz prirodnikh ochagov chumi Kazakhstana [Genotypic properties of collection strains of the plague microbe from natural foci of plague in Kazakhstan] / T.V. Meka-Mechenko, U.A. Izbanova, Z.Zh. Abdel [et al.] // Acta biomedica scientifca. — 2022. — № 7 (6). — P. 111–118. — DOI: 10.29413/ABS.2022-7.6.11. [in Russian]
44. Yumashev M.M. Geograficheskie aspekty epidemii prirodnikh ochagov chumi [Geographical aspects of epidemics in natural plague foci] / M.M. Yumashev // Bulletin of Geography. — 2008. — № 4. — P. 62–69. [in Russian]
45. Achtman M. Microevolution and phylogeny of Yersinia pestis / M. Achtman [et al.] // PNAS. — 1999. — Vol. 96. — № 24. — P. 14043–14048.
46. Vogler A.J. Molecular analysis of natural Y. pestis strains / A.J. Vogler [et al.] // Emerging Infectious Diseases. — 2002. — Vol. 8. — № 3. — P. 319–322.
47. Demeure C.E. Evolution and virulence of Yersinia pestis / C.E. Demeure [et al.] // Human Genetics. — 2019. — Vol. 139. — P. 5–17.
48. Lisitsin V.M. Metodi diagnostiki Yersinia pestis [Methods for diagnosing Yersinia pestis] / V.M. Lisitsin, I.A. Petrova // Laboratornaya diagnostika [Laboratory Diagnostics]. — 2016. — № 4. — P. 52–58. [in Russian]
49. Randriantseheno L.N. In the case of Y. pestis: MLVA, SNP, WGS / L.N. Randriantseheno [et al.] // PLOS Negl Trop Dis. — 2024. — Vol. 18. — № 6. — DOI: 10.1371/journal.pntd.0012252.