

М. Е. Платонов, В. В. Евсеева, С. В. Денцовская, А. П. Анисимов

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ *YERSINIA PESTIS*

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

Особое внимание в обзоре уделено воспроизводимым в различных лабораториях методам генотипирования *Y. pestis*, позволяющим дифференцировать отдельные бактериальные изоляты на внутривидовые группы, соответствующие подвидам, биоварам и природным очагам. Предлагается вариант внутривидовой классификации *Y. pestis*, соответствующий правилам Международного кодекса номенклатуры бактерий.

Ключевые слова: молекулярное типирование *Y. pestis*

Чума – особо опасное инфекционное природно-очаговое заболевание, характеризующееся различными путями передачи возбудителя. Возбудитель чумы *Yersinia pestis* был впервые выделен и описан А. Yersin в 1894 г. в Гонконге во время начала третьей пандемии чумы [105]. В 1897 г. М. Ogata [82], а затем в 1898 г. Р. Simond [92] показали, что в популяциях крыс чума передается через укусы блох. Два других патогенных для человека представителя рода *Yersinia* – *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* вызывают заболевания с поражением желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся длительным выделением патогенов с фекальными массами в окружающую среду и последующим алиментарным заражением новых хозяев [42, 44]. Одним из них – *Y. pseudotuberculosis* – принято считать прародителем *Y. pestis*. Дивергенция этих бактерий произошла 15 000–20 000 лет назад [35, 36]. Образование нового вида и последующая внутривидовая изменчивость привели к формированию широкого спектра внутривидовых групп *Y. pestis* (биоваров, подвидов, экотипов, протеиноваров, плазмидоваров, генотипов и т. д.), отличающихся по спектру чувствительных к ним млекопитающих и вирулентности [38, 47, 74, 109]. В природных очагах, расположенных в Евразии, Африке и Америке, возбудитель инфекции циркулирует в популяциях более 200 видов грызунов и зайцеобразных, а передача осуществляется не менее чем 120 видами блох [38, 52, 84, 96]. Использование возбудителем широкого круга хозяев и переносчиков обеспечивает возможность для селекции генетического разнообразия в геномах штаммов *Y. pestis*, циркулирующих в экосистемах природных очагов чумы, не связанных между собой географически. Наибольшее внутривидовое многообразие возбудителя чумы выявлено в наиболее древних евроазиатских природных очагах инфекции, для которых характерно разнообразие грызунов – основных (энзотичных) хозяев *Y. pestis* [1, 2, 4, 27, 28, 33, 38, 47, 52, 80, 108–110]. Относительная молодость возбудителя чумы в сочетании с приуроченностью определенных внутривидовых популяций к конкретным природным очагам является предпосылкой оценки адекватности методов молекулярного типирования для изучения филогенеза *Y. pestis* и проведения эпидемиологических расследований.

Современное состояние проблемы таксономии возбудителя чумы

Первооткрыватель возбудителя чумы А. Yersin [105], присвоил этому микроорганизму видовое название *Bacterium pestis*. В последующем для наименования микроорганизма использовали различные синонимы: "*Bacterium pestis*" [73], "*Bacillus pestis*" [73] Migula, 1900, "*Pasteurella pestis*" [73] Bergey и соавт., 1923, nom. cons, *Pestisella pestis*, *Pasteurella pestis*, *Bacterium pestis*, *Bacillus pestis*, "*Pestisella pestis*" [73] Dorofeev, 1947, *Yersinia pseudotuberculosis* subsp. *pestis*, *Yersinia pestis* [73] van Loghem, 1944 (Approved Lists 1980), *Yersinia pseudotuberculosis* subsp. *pestis* [73] Bercovier и соавт. 1981 (<http://mousecyc.jax.org/META/NEW-IMAGE?type=ORGANISM&object=TAX-632&detail-level=2>). В настоящее время принято таксономическое название *Yersinia pestis* [73] van Loghem 1944 (http://zipcodezoo.com/Key/Bacteria/Yersinia_Genus.asp), в котором по предложению J. Van Loghem [103] название рода *Yersinia* соответствует фамилии первооткрывателя возбудителя чумы [73, 93, 94, 103]. В настоящее время род *Yersinia* семейства Enterobacteriaceae включает 17 видов [62, 81]. Типовой вид рода *Yersinia* – *Y. pestis* [5]. Типовой штамм рода – *Y. pestis* ATCC 19428 = CIP 80.26 = NCTC 5923 [65].

R. Devignat [49] и В. Туманский [32] использовали способность к ферментации глицерина, нитрификации и денитрификации для подразделения *Y. pestis* на 3 внутривидовые группы. По R. Devignat они были названы биоварами *antiqua*, *medievalis* и *orientalis* (см. таблицу), предположительно явившимися причиной трех пандемий: "Юстиниановой чумы", "Черной смерти" и третьей пандемии соответственно. Используя не историческо-географический, а экологический подход, В. Туманский обозначил те же разновидности *Y. pestis* как сурчиную (var. *marmotae*), сусликовую (var. *citelli*) и крысиную (var. *ratti*). В настоящее время классификация R. Devignat широко применяется для внутривидового деления возбудителя чумы, несмотря на существование изолятов *Y. pestis*, которые невозможно отнести ни к одному из трех предложенных биоваров [37, 38]. Следует отметить, что характеристики биоваров нестабильны. Отдельные штаммы могут подвергаться спонтанной фенотипической изменчивости, на основании чего их можно отнести их к другим биоварам [10, 11]. Кроме того, штаммы, идентичные по большинству основных исследованных характеристик, но относящиеся к разным биоварам, могут циркулировать внутри одной популяции грызунов [11, 22, 26, 38].

По мере открытия новых природных очагов чумы в Евразии становилось ясно, что циркулирующие в

них штаммы *Y. pestis* могут отличаться от ранее описанных трех эколого-географических разновидностей по целому ряду дополнительных фенотипических признаков. К дифференцирующим характеристикам для этих внутривидовых групп относятся восстановление нитратов и окисление аммония, ферментация некоторых сахаров (рамноза, арабиноза, мелибиоза, мелецитоза, мальтоза, манноза и трегалоза), пестицин-фибринолизин-плазмокоагулазная активность, потребность в дополнительных факторах роста, чувствительность к пестицину и различная вирулентность для мышей и морских свинок [1, 38, 109]. При этом основным дифференцирующим критерием является вирулентность представителей отдельных филогенетических групп *Y. pestis* для различных хозяев, включая человека [16–18, 21, 30].

И. Мартиневский [17] пришел к выводу, что штаммы, выделенные от обыкновенных полевых в горных местностях Кавказа или от монгольских пищух в Горном Алтае и Забайкалье, представляют собой другой вид, *Y. pestoides*, и включали 3 разновидности: *parvocaucasica*, *altaica* и *transbaicalica*, соответственно. Через 30 лет название *Y. pestoides* было использовано американскими исследователями в качестве названия штаммов, вывезенных из бывшего СССР [37, 66, 80, 88].

Для стандартизации системы классификации штаммов *Y. pestis* совещание специалистов противочумных учреждений Советского Союза (Саратов, 1985) на основе числового анализа 60 фенотипических признаков рекомендовало классифицировать все варианты возбудителя чумы, которые были выделены на территории СССР и Монголии, на подвиды: *pestis* (основной подвид), *altaica*, *caucasica*, *hissarica* и *ulegeica* [1]. В 1998 г. А. Слудский [28] предложил еще одну внутривидовую группу – подвид *talassica*. Последние пять подвидов называют неосновными.

Принятую в 1985 г. классификацию подразделяющую штаммы *Y. pestis* на различные подвиды, в настоящее время используют в работе противочумных учреждений бывшего СССР. В Китае, на территории которого есть природные очаги чумы с циркуляцией штаммов всех трех классических биоваров Devignat, действует своя национальная внутривидовая классификация – различные внутривидовые группы именуются экотипами, а часть "рамнозопозитивных" экотипов относят к новому биовару *microtus* [34, 97, 106, 110]. Более детально с историей этого вопроса можно ознакомиться в обзорных публикациях [1, 38].

Используемая в практической работе внутривидовая таксономия чумного микроба, наиболее полно описанная в публикации Y. Li и соавт. [74], не соответствует правилам Международного кодекса номенклатуры бактерий (МКНБ). Так, в состав основного подвида *Y. pestis* входят 4 биовара: *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *intermedium*, а все неосновные подвиды: *altaica*, *angola*, *caucasica*, *hissarica*, *qinghaiensis*, *talassica*, *ulegeica* и *xilingolensis*, напротив, включены в состав одного биовара – *microtus*. Для при-

ведения внутривидовой таксономии чумного микроба в соответствии с правилами МКНБ необходимо переименование биовара *microtus* в подвид, а входящих в него филогенетических групп – в биовары, тем более что эта новая внутривидовая классификация уже используется в работах исследователей из Германии, Монголии и Франции [64]. В качестве типового штамма подвида *microtus* можно предложить штамм *bv. caucasica* – *Pestoides* F (номера доступа в GenBank: хромосома – NC_009381.1, плазмиды CD – NC_009377 и MT – NC_009378). В данной публикации мы будем пользоваться этой новой классификацией (см. таблицу, рисунок).

Использование молекулярно-генетических подходов для типирования *Y. pestis*

Относительно недавнее возникновение *Y. pestis* [36] объясняет низкую степень внутривидового разнообразия и затрудняет быструю и надежную фенотипическую дифференциацию отдельных штаммов патогена, необходимую не только для целей молекулярной эпидемиологии, но и для лучшего понимания механизмов возникновения возбудителя и распространения чумы. Зависимость фенотипа от степени экспрессии отдельных генов при различающихся условиях культивирования [87] затрудняет сравнительный анализ получаемых результатов. Особенности строения липополисахарида *Y. pestis* [67] не позволяют проводить серо- и фаготипирование, широко применяемые для других грамотрицательных бактерий [90]. Предложенный Г. Ян и соавт. [34] метод сравнения электрофоретических профилей белков позволил разделить 80 изученных штаммов из России и Китая на 8 протеиноваров, соответствующих подвидам, однако он достаточно трудоемок.

Все методы генотипирования основаны на анализе фрагментов нуклеиновых кислот, различающихся у близкородственных штаммов. Внедрение в практику здравоохранения методов гено- и геномотипирования обеспечивает получение воспроизводимых данных, позволяющих не только различать внутривидовые группы, но и отдельные штаммы *Y. pestis* и даже линии штаммов, поддерживаемые в различных лабораториях [23]. В предыдущих обзорных публикациях

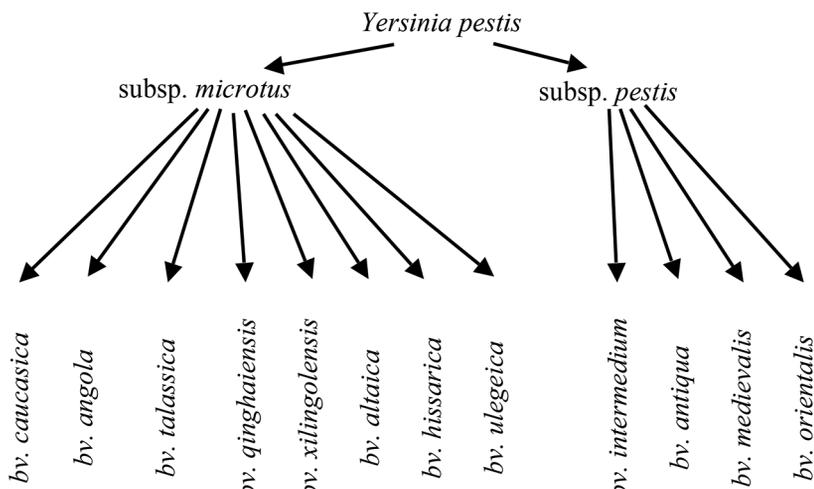


Рис. 1. Предлагаемая внутривидовая таксономия *Y. pestis*.

[15, 25, 29, 31, 33, 41, 76], касающихся генотипирования возбудителя чумы, основное внимание было уделено описанию дискриминирующей способности методов молекулярного типирования чумного микроба исходя из методик, используемых для выявления генетических различий (электрофорез, ПЦР, ДНК-гибридизация и т. д.). В настоящей работе рассмотрена дискриминирующая способность методов молекулярного типирования *Y. pestis* исходя из применяемых для этого мишеней (плазмиды, IS-элементы, полный геном и т. д.).

Классические методы генотипирования

Определение плазмидных профилей. На основании наличия и разницы в размерах трех классических (pPst, pLcr и pFra), а также криптических плазмид удастся различать не менее 20 плазмидоваров *Y. pestis*. Один из них включает практически все штаммы биовара *orientalis*, другие характерны для определенных природных очагов, а некоторые плазмидовары представлены единичными уникальными штаммами [2, 9, 33, 38].

Определение полиморфизма рибосомальных РНК. Последовательности 16S рДНК (рРНК) *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* полностью совпадают [46], и только разница по одному нуклеотиду обнаружена в последовательностях генов 23S рДНК.

Риботипирование. Метод основан на RFLP-типировании фрагментов ДНК, содержащих опероны рРНК. У представителей различных биоваров *Y. pestis* рРНК опероны представлены различным количеством копий. У штаммов *Antiqua* и *Nepal516* (*bv. antiqua*), а также у штамма *KIM* (*bv. medievalis*) имеется 7 копий оперона 16S-23S-5S рРНК [46, 48]. У представителя более "молодого" биовара *orientalis* – штамма *CO92* – 6 копий генов рРНК [59], что свидетельствует об утрате одной копии в ходе микроэволюции. Риботипирование 70 штаммов *Y. pestis* основного подвида выявило 16 риботипов. Два из них (В и О) включали 66% исследованных изолятов, тогда как в остальные 14 входило не более чем по 3 штамма [59]. У 27 "полевочьих" штаммов чумного микроба (по 4–7 штаммов каждого из 5 неосновных биоваров: *caucasica*, *ulegeica*, *altaica*, *hissarica* и *talassica*) с использованием данного метода выявлены всего 2 риботипа, причем 26 штаммов относились к одному риботипу. Риботипы "полевочьих" штаммов *Y. pestis* отличались от таковых у штаммов основного подвида и *Y. pseudotuberculosis* [8].

Оценка профилей фрагментов ДНК с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE). Методика PFGE в сочетании с применением редкощепящих рестриктаз позволяет исследовать особенности строения полного генома путем сравнения RFLP-профилей отдельных штаммов. PFGE хромосомной ДНК *Y. pestis*, обработанной ферментом I-CeuI, обладал дискриминирующей способностью на уровне риботипирования [89]. Проведение исследования с использованием рестриктазы *SpeI* повысило разрешающую способность метода [61, 77]. А. Guiyoule и соавт. [59] показали, что штаммы новых риботипов, выделенные на Мадагаскаре после 1982 г., имеют и *NotI*-пульсотипы, отличающиеся от таковых у ранее выделявшихся в этом регионе штаммов. Методика

PFGE-типирования удобна при проведении эпидемиологических расследований для выявления близкородственных клонов, но малоприменяема для сравнения отдаленно-родственных штаммов, что было продемонстрировано при расследовании заболевания чумой человека в Нью-Мексико [61].

IS-типирование. Чаще всего применяют вариант IS-типирования, при котором фрагмент ДНК IS-элемента используют в качестве зонда для выявления различий в расположении этих мобильных генетических элементов в хромосоме и плаزمиде. Данный подход является одним из вариантов RFLP-типирования. В геномах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* выявлено 4 IS-элемента [3, 45, 83]. *IS100* присутствует в наибольшем количестве копий, а именно 75 копий у штамма *Y. pestis Antiqua* и от 30 до 44 копий у штаммов *CO92*, *KIM*, *Nepal516* и *91001* [46, 49, 83, 95]. *IS1541* представлен в геноме *Y. pestis* 47–67 копиями, *IS285* – 19–25, а *IS1661* – 8–10 копиями. У предка *Y. pestis* – *Y. pseudotuberculosis* – только по 5 копий *IS100* и *IS1541*, 7 – *IS285* и 3 копии – *IS1661* [45]. Значительное количество IS-последовательностей в геноме *Y. pestis* определяет изменчивость профилей RFLP, PFGE-"дактилоскопии" и риботипирования – любых методик генотипирования, основанных на определении относительного расположения отдельных фрагментов хромосомы и плазмид. Так, большинство выявленных перемещений фрагментов ДНК в геноме *Y. pestis KIM* можно объяснить IS-опосредованной рекомбинацией [48].

Типирование 61 изолята *Y. pestis* методом IS-RFLP с использованием в качестве зондов *IS100*, *IS285* и *IS1541* показало удовлетворительные результаты кластеризации штаммов при использовании каждого из IS-элементов индивидуально. Комбинация всех трех наборов повышала разрешающую способность метода до отдельных штаммов и обеспечивала кластеризацию в соответствии с биоварами и природными очагами даже в случае относительно молодого биовара *orientalis* [100].

Другой метод IS-типирования предусматривает ПЦР с парой праймеров, один из которых комплементарен последовательности IS-элемента, а второй является сайтспецифичным для фланкирующей IS-последовательности ДНК. V. Motin и соавт. [80] применили этот подход для *IS100*-типирования с использованием сайтспецифичных праймеров из генома штамма *Y. pestis CO92*. У 77 штаммов *Y. pestis* и 2 штаммов – *Y. pseudotuberculosis* было выявлено 16 IS-типов. Как показало применение этой методики, штаммы *Y. pseudotuberculosis* оказались наиболее близкими к "полевочьим" вариантам *Y. pestis*, которые занимали промежуточное положение между предшественником чумного микроба и штаммами *Y. pestis* основного подвида. Неожиданным оказалось то, что некоторые штаммы биоваров *medievalis* и *antiqua* вошли в одну генетическую группу.

Мультилокусное секвенирование (MLST)

MLST (multilocus sequence typing – мультилокусное секвенирование) – один из методов молекулярного типирования, позволяющий оценить вариабельность нуклеотидных последовательностей нескольких генов одновременно [78]. Для MLST-анализа необходимо

проведение точного секвенирования исследуемых генов, что требует использования высококачественных ферментов и двунаправленного секвенирования для верификации полученных результатов, существенно повышающих стоимость исследования. Качественное секвенирование – залог воспроизводимости получаемых данных и возможности электронного обмена результатами между лабораториями.

Гены "домашнего хозяйства" – наиболее удобная мишень для данного метода, так как они не подвержены сильному селективному давлению, которое могло бы привести к быстрому изменению их последовательностей. Тем не менее гены "домашнего хозяйства" характеризуются достаточным разнообразием и могут присутствовать в разных штаммах в виде различающихся аллелей [78]. В Интернете доступны базы данных MLST для целого ряда бактериальных патогенов (www.mlst.net), однако данные о *Y. pestis* отсутствуют.

Типирование 58 штаммов, представляющих все известные виды рода *Yersinia*, с помощью анализа полиморфизма нуклеотидов генов 16S РНК, *glnA*, *gyrB*, *recA* и *hsp60* [68] показало пригодность данного метода для видовой дифференциации возбудителя чумы, но использованный набор генов не обладал достаточной разрешающей способностью при субтипировании штаммов *Y. pestis*.

В серии публикаций описан полиморфизм нуклеотидных последовательностей генов *rha*-локуса [12, 13], *araC* [6, 14], *aspA* [7], *napA* [14, 19], *inv* [20], *glpD* [14] у штаммов *Y. pestis* основного подвида и 5 биоваров (*caucasica*, *ulegeica*, *altaica*, *hissarica* и *talassica*) подвида *microtus* (в различных публикациях представлены данные об исследовании 15–70 штаммов). Диагностически значимый полиморфизм был выявлен в последовательностях генов *rha*-локуса, *aspA* и *nap* [13].

Полиморфизм единичных нуклеотидов (SNP-типирование)

При анализе SNP (single nucleotide polymorphism – полиморфизм единичных нуклеотидов) оценивают вариабельность единичных нуклеотидов определенного локуса бактериального генома. Если замена нуклеотида приводит к замене кодируемой аминокислоты, говорят о несинонимической мутации, а если вновь образовавшийся триплет кодирует прежнюю аминокислоту, – о синонимической. Множество таких замен (особенно синонимических) не влияет на жизнеспособность бактерии и сохраняется в геноме, что позволяет использовать их для оценки микроэволюции близкородственных изолятов, особенно при одновременной оценке полиморфизма нуклеотидов нескольких локусов. В отличие от MLST, при котором оценивают вариабельность достаточно консервативных генов "домашнего хозяйства", при SNP-типировании анализируют локусы генов с высокой степенью полиморфизма [51].

В отличие от MLST, требующего обязательного секвенирования генов-мишеней, для определения полиморфизма единичных нуклеотидов в определенных локусах генома возможно применение целого ряда методик. Помимо традиционного секвенирования или пиросеквенирования применяют масс-

спектрометрию [73], ПЦР в реальном времени с использованием зондов, позволяющих выявлять замены единичных нуклеотидов за счет изменения эффективности гибридизации [102], микроэррей-технологии [107], RFLP-типирование, проточную цитометрию и др. [104].

Известно, что синонимический SNP (synonymous SNP – sSNP) не ведет к изменению структуры белков и является эволюционно нейтральным или практически таковым [91]. Функциональная нейтральность и легкость определения делают sSNP удобной "мишенью" для крупномасштабных молекулярно-популяционных генетических исследований, направленных на определение эволюционной близости бактериальных штаммов, особенно у видов, сохраняющих выраженную клональность, одним из представителей которых и является *Y. pestis* [36]. Более того, sSNP-генотипы удобно анализировать с помощью специальных компьютерных программ, разработанных для популяционно-генетических исследований. В постгеномную эру SNP предоставляют возможность просто и быстро проводить полноценное сравнение многих бактериальных штаммов.

М. Achtman и соавт. [35], принимая за исходный нуклеотид каждого из sSNP его аллель из генома *Y. pseudotuberculosis* IP32953, путем попарных сравнений трех секвенированных геномов штаммов *Y. pestis* (CO92, 91001 и KIM [48, 83, 95]) выявили 76 консервативных sSNP в составе 3250 ортологичных кодирующих последовательностей. Большинство из этих консервативных sSNP специфично именно для внутривидовых групп 1.ORI, 2.MED и 0.PE4, представителями которых являются 3 секвенированных штамма. Можно полагать, что анализ других секвенированных геномов *Y. pestis* может увеличить число пригодных для типирования sSNP и повысить дискриминационную способность метода. Действительно, при сравнительном изучении геномов двух близкородственных штаммов биовара *orientalis*, выделенных в Северной Америке, FV-1 [39] и CA88-4125 [101], с геномом прототипного для этого биовара штамма CO92 [83] было выявлено 23 новых sSNPs. Сравнение же полногеномных последовательностей 17 штаммов *Y. pestis* позволило выявить 933 sSNPs, которые были использованы для типирования 286 изолятов чумного микроба [79]. Проведенный анализ позволил выявить sSNPs, специфичные для определенных географических регионов, и уточнит взаимное расположение некоторых ветвей на дендрограмме: штаммы bv. *caucasica* оказались самими "древними" в составе подвида *microtus*.

CRISPR-анализ

Повторяющиеся элементы CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – кластеризованные короткие палиндромные повторы, разделенные спейсерами) присутствуют в геномах всех изученных к настоящему времени представителей археобактерий и гипертермофильных бактерий, а также некоторых зубактерий в виде одного или нескольких расположенных на хромосоме локусов. Их структура высококонсервативна и включает последовательности прямых повторов (DR) длиной 24–47 п.о., разделенных последовательностями спейсеров, имеющими сопоставимые размеры. Прямые повторы содержат после-

довательности, характерные для участков-мишеней для связывающихся с ДНК белков. Как правило, кластеры DR и спейсеров фланкированы несколькими консервативными генами, ассоциированными с CRISPR (*cas*-гены) [63], которые могут участвовать в рекомбинации и репарации ДНК. CRISPR-локусы, *Cas*-белки и лидерные последовательности (некодирующие последовательности, расположенные на одном из концов CRISPR-локуса и выполняющие функцию промотора) [63] – составные части прокариотической иммунной системы, защищающей от бактериофагов. Для спейсеров CRISPR-локусов характерна внутривидовая дивергенция. Установлено, что последовательности некоторых спейсеров гомологичны их вероятным предшественникам бактериофагам и конъюгативным плазмидам [109]. Показано, что с CRISPR происходит транскрипция, а продукт транскрипции процессируется в набор микро-РНК [98]. Новые спейсеры не синтезируются *de novo*, а копируются с уже существующих последовательностей ДНК. Подавляющее большинство известных к настоящему моменту спейсеров не имеет гомологов в доступных базах данных последовательностей ДНК. Однако в случае выявления гомологии спейсеры чаще всего подобны коротким фрагментам таких мобильных элементов, как фаги. Это наблюдение дало основание заключить, что CRISPR – защитный механизм от "генетической агрессии" [86].

В основе CRISPR-типирования лежит высокая степень внутривидового полиморфизма спейсеров. Впервые разнообразие последовательностей CRISPR-локусов было использовано для молекулярного типирования штаммов *Mycobacterium tuberculosis* [53]. В Интернете доступна база данных, включающая более 2000 вариантов CRISPR, полученных при анализе почти 40 000 штаммов [43].

Y. pestis и *Y. pseudotuberculosis* содержат по три CRISPR-локуса: YPa, YPb и YPc (старые названия – YP1, YP2 и YP3 соответственно [47, 86]). Из-за перестроек хромосомной ДНК их местоположение в геномах разных штаммов различается. Прямые повторы в составе этих трех локусов консервативны и имеют нуклеотидную последовательность 5'-TTTCTAAGCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3', а их укороченные прямые повторы на 5'-концах каждого из трех типов локусов имеют последовательности 5'-TGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3', 5'-TAAGCTGCCTGTGCGGCAGTG-AAAC-3' и 5'-GCTGCCTGTGCGGCAGTGAAC-3' для YPa, YPb и YPc соответственно. Последовательности прямых повторов (включая первые укороченные прямые повторы) идентичны во всех исследованных штаммах, что свидетельствует о важности сохранения их для жизнедеятельности *Y. pestis*. Примечательно, что YPb и YPc штамма Angola содержат только укороченные прямые повторы и лидерную последовательность. В соответствии с моделью, предложенной I. Grissa и соавт. [55–57], YPb- и YPc-локусы должны быть производными первичного локуса YPa, содержащего все необходимые для их возникновения и эволюционирования "инструменты". Лидерные последовательности схожи у локусов YPa и YPb, но менее консервативны у YPc. Три CRISPR-локуса были детально исследованы нами у 125 штаммов *Y. pestis* из 26 природных очагов Китая,

СНГ и Монголии для оценки эффективности CRISPR-генотипирования и лучшего понимания адаптивной микроэволюции *Y. pestis* [47]. Оказалось, что распространение отдельных спейсеров и/или комбинаций спейсеров приурочено к определенным природным очагам и может быть использовано для эффективного типирования *Y. pestis*. На основании анализа полученных данных предложена модель микроэволюции *Y. pestis*. Доступные в Интернете ресурсы для CRISPR-типирования [53, 54, 56] позволяют сравнить данные, полученные в разных лабораториях. Недостатком метода является необходимость секвенирования локусов CRISPR в случае, если требуется выявление незначительных различий в нуклеотидных последовательностях отдельных спейсеров [47].

VNTR/MLVA-типирование

Специфичный локус VNTR (variable number tandem repeat – тандемные повторы, отличающиеся по числу повторов) включает центральный варибельный и фланкирующие участки. Варибельный участок состоит из нескольких повторов ДНК, присоединенных друг к другу "голова к хвосту". Число повторов может варьировать, изменяя длину последовательности ДНК, при сохранении консервативности фланкирующих участков. VNTR/MLVA-типирование (multiple locus VNTR analysis – мультилокусный VNTR-анализ) основано на значительном количестве ошибок, возникающих в процессе репликации тандемных повторов ДНК. Данная методика предусматривает использование наборов праймеров, гомологичных фрагментам ДНК, фланкирующим последовательности прямых повторов, и анализ различий в размере амплификатов, соответствующих различиям в числе повторов в геномах исследуемых штаммов *Y. pestis*. В 2000 г. D. Adair и соавт. [37] исследовали 35 штаммов *Y. pestis* и выявили 9 аллелей локуса, содержащего повторы последовательности CAAA. Между тем в геномах секвенированных штаммов *Y. pestis* выявлено множество локусов VNTR, а проведение мультилокусного VNTR-анализа значительно повышает дискриминирующую способность метода [66, 71]. Базы данных о тандемных повторах для нескольких полностью секвенированных геномов можно найти по следующему веб-адресу: <http://minisatellites.u-psud.fr/>. Данные базы позволяют отыскивать регионы с VNTR в секвенированных геномах микроорганизмов, сравнить локусы VNTR у различных штаммов или видов и обнаружить подобные, но не идентичные регионы. Веб-сайт дополнительно позволяет рассчитать подходящие для амплификации пары праймеров в полной геномной последовательности или ограниченной последовательности, ассоциированной с локусами VNTR.

Для оценки результатов MLVA-типирования используют гель-электрофорез (25 VNTR-маркеров) [71] или капиллярный электрофорез (42 VNTR-маркера) [66], причем только 6 VNTR-локусов являются общими для двух наборов маркеров. Используя гель-электрофорез можно различать ПЦР-продукты с разницей в одну повторяющуюся единицу. Данный метод анализа дешев, легок в использовании, но требует много времени и обладает невысокой разрешающей способностью при анализе VNTR-локусов с малым размером повторов, для дискриминации которых используют капиллярный электрофорез.

Кластеризация возбудителя чумы на основе MLVA согласуется с классификациями на основе биохимических тестов, IS-анализа и других методов, не характеризуется большей дискриминирующей способностью независимо от выбранного набора VNTR-локусов. Типирование может быть проведено быстро и с низкой себестоимостью [66, 71, 85]. Для совместного использования данные MLVA размещают на Интернет-сайтах (<http://bacterial-genotyping.igmors.u-psud.fr/> [70] и <http://www.mlva.umcutrecht.nl> [99]), что позволяет сравнивать результаты исследований, полученные в разных лабораториях.

К настоящему моменту выявлено более 430 MLVA25 типов *Y. pestis* [23]. Установлено, что на территориях стран СНГ и Монголии циркулируют как минимум 352 MLVA25 типов; определено распределение MLVA25 типов *Y. pestis* по отдельным природным очагам чумы. MLVA25 кластеры/подкластеры, включающие близкие генотипы, соответствуют определенным природным очагам. Основные ветви дендрограмм, полученных на основе анализа MLVA-профилей, соответствуют такому при SNP-типировании [35].

DFR-анализ

Анализ известных к настоящему моменту полногеномных последовательностей *Y. pestis* свидетельствует, что патоген претерпевает постоянное изменение генома, начавшееся с его увеличения за счет горизонтального переноса генов (как плазмид, так и хромосомных генов) [39, 48, 83, 95, 101]. Так как бактериальные геномы не могут беспредельно увеличиваться в размерах, приобретение чужеродных генов должно уравновешиваться утратой собственных. Определенные гены сохраняются в геноме только в случае, если они дают селективные преимущества микроорганизму. В противном случае они утрачиваются [50]. Все эти изменения – следствие адаптации *Y. pestis* к новым экологическим нишам, они дают уникальную возможность проследить видообразование и микроэволюцию этого патогена [74].

В геноме *Y. pestis* с помощью сравнительного анализа полногеномных последовательностей *in silico*, сравнительной гибридизации геномов с помощью технологии ДНК-микроэреев и вычитающей гибридизации было выявлено 23 участка, по наличию которых штаммы данного вида отличаются друг от друга (*different region* – DFR), и разработана технология генотипирования *Y. pestis*, основанная на учете присутствующего в штамме набора DFR. Было показано, что на территории природных очагов Китая циркулируют штаммы 32 "геномоваров" (DFR-типов), причем для каждого очага характерен свой основной DFR-тип [75]. У штаммов биоваров *orientalis*, *medievalis*, *xilingolensis* и *qinghaiensis* выявлены биоварспецифичные DFR-профили, и каждый из биоваров образовывал свой отдельный кластер. Штаммы разных "геномоваров" биовара *antiqua* были распределены по всем трем кластерам. Так как в определенных очагах чумы циркулируют штаммы определенных геномоваров, то возможно использование DFR-типирования для предварительного определения очаговой принадлежности штаммов. Основанные на DFR-профилях "геномовары" четко совпадают с традиционно используемыми в Китае экотипами *Y. pestis* [34, 97, 106]. Анализ *in silico* DFR-профилей полно-

стью секвенированных геномов позволяет проводить их сравнение с DFR-типами китайских штаммов. Так, сравнение DFR-профилей штаммов биовара *orientalis* подтверждает, что китайские штаммы являются наиболее древними родоначальниками этой группы [75].

С помощью DFR-типирования [75] набора из 275 штаммов *Y. pestis*, выделенных преимущественно в природных очагах чумы стран СНГ, нами определены "геномовары" (DFR-типы), характерные для 27 очагов чумы данного региона [24]. Выявлено 64 новых DFR-типа *Y. pestis* (из 96, описанных к настоящему времени) и установлено, что на территории стран СНГ и в Монголии циркулирует не менее 56 "геномоваров". Показано, что все исследованные методом DFR-типирования штаммы кластеризуются в соответствии с филогенетической схемой, предложенной на основании данных сочетанного SNP- и IS100-типирования [35], и дифференцируются до уровня подвидов, популяций и даже штаммов, циркулирующих на территории определенных природных очагов.

Типирование с помощью микроэреев

Технологию микроэреев используют для определения наличия отдельных генов у различных штаммов в составе вида *Y. pestis* и сравнения с набором генов *Y. pseudotuberculosis*. Так, S. Hincliffe и соавт. [60] при исследовании 22 штаммов *Y. pestis* и 10 штаммов *Y. pseudotuberculosis* выявили в геноме *Y. pestis* 11 областей, которые отсутствовали либо значительно отличались у изученных штаммов *Y. pseudotuberculosis*. 4 отличия были связаны с встраиванием в геном *Y. pestis* бактериофагов. Только один из 11 выявленных белков, YPO2277, был подобен выявленному ранее фактору патогенности *E. coli*, кодируемому геном *puvA*; 21 фрагмент ДНК присутствовал только у части из изученных штаммов *Y. pestis*; лишь у штаммов *Y. pestis* bv. *orientalis* присутствовал профаг CUS-2 (YPO2271-2281). На основании сравнения профилей генов было сделано заключение о том, что часть штаммов биовара *antiqua* филогенетически близка изолятам биовара *medievalis* и значительно отличается от bv. *orientalis*.

Сотрудники лаборатории R. Yang [108] исследовали штаммы *Y. pestis* из всех 13 природных очагов Китая и сравнивали их с 7 штаммами *Y. pseudotuberculosis* с помощью разработанной ими системы микроэрей-генотипирования, основанной на выявлении приобретения или утраты отдельных генов. Они выявили 22 области генома, отсутствующие как минимум у 1 из 36 изученных штаммов *Y. pestis*. Затем они провели ПЦР-амплификацию этих фрагментов ДНК у 260 изолятов *Y. pestis*, определив "геномовары" возбудителя чумы, свойственные каждому из природных очагов, и филогенетические взаимоотношения циркулирующих там штаммов. Было показано, что биовар *orientalis* более близок к биовару *antiqua*, чем к *medievalis*. Полученные данные свидетельствуют, что распространение *Y. pestis* по территории Китая проходило из северо-западных в южные регионы, и соответственно "геномовары" северо-западных природных очагов наиболее древние. "Полевочки" штаммы подвида *microtus* с избирательной вирулентностью эволюционно старше, чем штаммы *Y. pestis* с универсальной вирулентностью.

К недостаткам метода можно отнести то, что технология ДНК-микрорреев малоприспособлена для выявления полиморфизма единичных нуклеотидных последовательностей, не способна выявлять гены, отсутствующие в ранее изученных геномах бактериального вида и через 3–4 года утратит свою актуальность [40], так и не успев внедриться в российских лабораториях.

Типирование с помощью полногеномного секвенирования

Доступность полногеномных последовательностей внесла кардинальные изменения в методологию эпидемиологии, бактериологии и лечения инфекционных болезней. Полногеномный анализ позволяет сравнивать не только наличие отдельных генов, но также количество и расположение в геноме IS-элементов, локализацию генов по сравнению с другими представителями вида, рода и/или семейства. Полногеномное секвенирование бактериальных патогенов в настоящее время дает возможность определять структурную организацию генома и анализировать особенности метаболизма и, кроме того, проводить сравнение множества изолятов для выявления генов, ответственных за различия в вирулентности отдельных штаммов [40]. Такая сравнительная оценка особенно эффективна при исследовании штаммов с необычно высокой вирулентностью, контагиозностью и/или множественной лекарственной устойчивостью, которые могут быть причиной эпидемических вспышек или использованы биотеррористами. С этой точки зрения, быстрое выявление новых генов, утраты или модификации собственных генов бактерии поможет объяснить изменение вирулентности и/или лекарственной устойчивости штамма, а выявление штаммоспецифичных нуклеотидных последовательностей позволит с высокой достоверностью подтвердить все этапы эпидемического процесса начиная с источника заражения.

Полногеномное секвенирование предпринимают также для поиска мишеней для генотипирования и генотипирования *in silico*. В настоящее время в базе данных NCBI GenBank представлены полные геномы штаммов *Y. pestis* CO92, KIM, Nepal 516, Antiqua, Angola, 91001, Pestoides F, Z176003, D106004, D182038, а в базе данных EMBL–EBI – геномы штаммов A1122 и Harbin35. В современной России это перспективное направление – полногеномное секвенирование возбудителей особо опасных инфекций бактериальной этиологии – до сих пор не получило развития.

Заключение

Несмотря на большое количество статей, посвященных молекулярному типированию *Y. pestis*, лишь в незначительной их части описано использование в нескольких лабораториях унифицированных методов, обладающих воспроизводимостью и применимых для дифференциации как внутривидовых групп (биоваров, подвидов, экотипов и т. д.), так и отдельных штаммов [23, 24, 47, 69, 74, 75, 79].

Каждый из рассмотренных в обзоре методов имеет достоинства и недостатки, определяющие его пригодность для молекулярного типирования *Y. pestis*.

Исследователю часто приходится делать выбор между скоростью получения результата и воспроизводимостью или разрешающей способностью метода. Так, PFGE очень привлекателен для субтипирования изолятов, выделенных во время одной эпидемии и даже эпидемической вспышки. В то же время разработанные в постгеномный период методы MLVA-, MLST- и SNP-типирование не уступают, а иногда и превосходят PFGE в разрешающей способности и требуют меньше времени для получения результата. Основным недостатком MLST- и SNP-типирования является необходимость относительно дорогого даже на сегодняшний день секвенирования, что ограничивает широкое внедрение указанных методов в практику лабораторной диагностики. Широкий набор доступных методов гено- и геномотипирования, различающихся как по исследуемым мишеням, так и по методам оценки их изменчивости, затрудняет выбор оптимального для решения эпидемиологических задач. Разница между изолятами только по одной из мишеней молекулярного типирования может быть пропущена при использовании метода, направленного на другую цель. Полиморфизм единичных нуклеотидов, выявляемый с помощью MLST- или SNP-типирования, вряд ли может влиять на PFGE-профили исследуемых штаммов. Поэтому альтернативой типированию с помощью полногеномного секвенирования, которое, по мнению большинства западных экспертов, будет внедрено в лабораторную практику не позднее чем через 3–4 года, является комбинация методов, направленных на разные мишени. Один из методов используют для первичной кластеризации изучаемых изолятов, а второй или несколько дополнительных методов – для верификации полученных данных и/или субтипирования изолятов в составе кластеров, сгруппированных по результатам типирования первым методом.

Благодарности

Обзор подготовлен по Государственному контракту № 61-Д от 22.07.11 в рамках Федеральной целевой программы "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)".

Сведения об авторах:

Платонов Михаил Евгеньевич – канд. биол. наук, ст. научн. сотр. лаборатории микробиологии чумы отд. особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; e-mail: platonov@obolensk.org.

Евсеева Вера Васильевна – мл. научн. сотр. лаб. микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; e-mail: info@obolensk.org.

Дентовская Светлана Владимировна – канд. мед. наук, зав. лаб. микробиологии чумы отд. особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; e-mail: dentovskaya@obolensk.org

Анисимов Андрей Павлович – д-р мед. наук, проф., зам. директора ФБУН Государственный научный

центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; e-mail: anisimov@obolensk.org.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апарин Г. П., Голубинский Е. П. Микробиология чумы. Руководство. – Иркутск, 1989.
2. Балахонов С. В., Цэнджав С., Эрдэнэбат А. // Молекул. генетика. – 1991. – № 11. – С. 22–29.
3. Бобров А. Г., Филиппов А. А. // Молекул. генетика – 1997. – № 2. – С. 36–40.
4. Горшков О. В., Савостина Е. П., Попов Ю. А. и др. // Молекул. генетика. – 2000. – № 3. – С. 12–17.
5. Грачева И. В., Караваева Т. Б., Меркулова Т. К. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – Вып. 99. – С. 42–49.
6. Ерошенко Г. А., Видяева Н. А., Одинокоев Г. Н. и др. // Молекул. генетика. – 2009. – № 3. – С. 21–25.
7. Ерошенко Г. А., Одинокоев Г. Н., Краснов Я. М. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – Вып. 99. – С. 52–54.
8. Ерошенко Г. А., Павлова А. И., Куклева Л. М. и др. // Журн. микробиол. – 2007. – № 3. – С. 6–10.
9. Иванова В. С., Лебедева С. А., Гончарова Н. А. и др. // Молекул. генетика. – 1990. – № 3. – С. 16–18.
10. Иннокентьева Т. И. // Известия Иркутского государственного научно-исследовательского института Сибири и Дальнего Востока. 1968. – Т. 27. – С. 432–438.
11. Козлов М. П. Чума (природная очаговость, эпизоотология, эпидемиологические проявления). – М., 1979.
12. Куклева Л. М., Ерошенко Г. А., Куклев В. Е. и др. // Молекул. генетика. – 2008. – № 2. – С. 23–27.
13. Куклева Л. М., Ерошенко Г. А., Куклев В. Е. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2008. – Вып. 97. – С. 38–42.
14. Куклева Л. М., Ерошенко Г. А., Павлова А. И. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2007. – Вып. 94. – С. 50–53.
15. Кутырев В. В., Смирнова Н. И. // Молекул. генетика. – 2003. – № 1. – С. 6–14.
16. Леви М. И. // Тезисы докл. науч. конф. по природной очаговости и профилактике чумы и туляремии. – Ростов-н/Д., 1962. – С. 72–74.
17. Мартиневский И. Л. Биология и генетические особенности чумного и близкородственных ему микробов. – М., 1969.
18. Михайлова Р. С. Характеристика свойств и классификация штаммов чумного микроба, выделенных на Кавказе: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ставрополь, 1968.
19. Одинокоев Г. Н., Ерошенко Г. А., Видяева Н. А. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2008. – Вып. 98. – С. 40–42.
20. Одинокоев Г. Н., Ерошенко Г. А., Кутырев В. В. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – Вып. 100. – С. 50–52.
21. Пейсахис Л. А., Степанов В. М. // Проблемы особо опасных инфекций. – 1975. – Вып. 2. – С. 5–9.
22. Пейсахис Л. А., Степанов В. М., Пошевина Г. О. // Проблемы особо опасных инфекций. – 1971. – Вып. 4(20). – С. 28–32.
23. Платонов М. Е. Молекулярно-генетическое изучение разнообразия и микроразноличия *Yersinia pestis*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Оболensk, 2010.
24. Платонов М. Е., Евсеева В. В., Ефременко Д. В. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – Вып. 108. – С. 42–45.
25. Попов Ю. А., Ерошенко Г. А., Булгакова Е. Г. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – Вып. 2. – С. 5–10.
26. Раль Ю. М. Природная очаговость и эпизоотология чумы. – М., 1965.
27. Савостина Е. П., Попов Ю. А., Каптанова Т. Н. и др. // Молекул. генетика. – 2004. – № 1. – С. 22–26.
28. Слудский А. А. // Тезисы докл. V съезд Всесоюзного териологического об-ва АН СССР. – М., 1990. – Т. 3. – С. 222–223.
29. Смирнова Н. И., Кутырев В. В. // Молекул. генетика. – 2006. – № 1. – С. 9–19.
30. Тимофеева Л. А. // Проблемы особо опасных инфекций. – 1972. – Вып. 1(23). – С. 15–22.
31. Трухачев А. Л., Лебедева С. А. // Молекул. генетика. – 2007. – № 1. – с. 3–6; 2007. – № 1. – С. 3–8.
32. Туманский В. М. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1957. – № 6. – С. 3–7.
33. Филиппов А. А., Солодовников Н. С., Куклева Л. М. и др. // Журн. микробиол. – 1992. – № 3. – С. 10–13.
34. Ян Г., Евченко Ю. М., Грижебовский Г. М. и др. // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных болезней. Биотехнология. Ветеринария: Материалы юбил. науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ / Под ред. Е.В. Пименова, И.В. Дармова (Киров, 30 ноября–1 декабря 1998 г.). Киров: НИИ микробиологии МО РФ, 1998. – С. 408–409.
35. Achtman M., Morelli G., Zhu P. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 17837–17842.
36. Achtman M., Zurth K., Molelli G. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96. – P. 14043–14048.
37. Adair D. M., Worsham P. L., Hill K. K. et al. // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38. – P. 1516–1519.
38. Anisimov A. P., Lindler L. E., Pier G. B. // Clin. Microbiol. Rev. – 2004. – Vol. 17. – P. 434–464.
39. Auerbach R. K., Tuanyok A., Probert W. S. et al. // PLoS ONE. – 2007. – Vol. 2. – e 770.
40. Beres S. B., Richter E. W., Nagiec M. J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, N 18. – P. 7059–7064.
41. Bobrov A. G., Huang X. Z., Lindler L. E. // In Proceedings, 25th Army Science Conference, N 27–30, 2006, Orlando, Florida.
42. Brubaker R. R. // Clin. Microbiol. Rev. – 1991. – Vol. 4. – P. 309–324.
43. Brudey K., Driscoll J. R., Rigouts L. et al. // BMC Microbiol. – 2006. – Vol. 9, N 6 – P. 23.
44. Butler T. Plague and other *Yersinia* infections. – New York, 1983.
45. Chain P. S., Carniel E., Larimer F. W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P 3826–13831.
46. Chain P. S., Hu P., Malfatti S. A. et al. // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188. – P. 4453–4463.
47. Cui Y., Li Y., Gorge O. et al. // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3. – e2652.
48. Deng W., Burland V., Plunkett III G. et al. // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184. – P. 4601–4611.
49. Devignat R. // Bull. WHO. – 1951. – Vol. 4. – P. 247–263.
50. Dobrindt U., Hacker J. // Curr. Opin. Microbiol. – 2001. – Vol. 4, № 5. – P. 550–557.
51. Esaki H., Noda K., Otsuki N. et al. // J. Microbiol. Meth. – 2004. – Vol. 58. – P. 131–134.
52. Gage K. L., Kosoy M. Y. // Annu. Rev. Entomol. – 2005. – Vol. 50. – P. 505–528.
53. Goyal M., Saunders N. A., van Embden J. D. et al. // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35, N 3. – P. 647–651.
54. Grissa I., Bouchon P., Pourcel C. et al. // Biochimie. – 2008. – Vol. 90. – P. 660–668.
55. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. // BMC Bioinformatics. – 2007. – Vol. 8, N 1. – P. 172.
56. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. // Nucl. Acids Res. – 2007. – Vol. 35(Web Server issue). – P. 2–7.
57. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. // Nucl. Acids Res. – 2008. – Vol. 36(Web Server issue). – P. 145–148.
58. Guiyoule A., Grimont F., Iteman I. et al. // J. Clin. Microbiol. – 1994. – Vol. 32. – P. 634–641.
59. Guiyoule A., Rasoamanana B., Buchrieser C. et al. // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35. – P. 2826–2833.
60. Hinchliffe S. J., Isherwood K. E., Stabler R. A. et al. // Genome Res. – 2003. – Vol. 13, N 9. – P. 2018–2029.
61. Huang X.-Z., Chu M. C., Engelthaler D. M. et al. // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40. – P. 1164–1173.
62. Hurst M. R., Becher S. A., Young S. D. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2011. – Vol. 61, N 4. – P. 844–849.
63. Jansen R., Embden J. D., Gastra W. et al. // Mol. Microbiol. – 2002. – Vol. 43, N 6. – P. 1565–1575.
64. Kiefer D., Dalantai G., Damdindorj T. et al. // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2012. – Vol. 12, N 3. – P. 183–188.
65. Kim W., Song M. O., Song W. et al. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2003. – Vol. 83, N 2. – P. 125–133.
66. Klevytska A. M., Price L. B., Schupp J. M. et al. // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – P. 3179–3185.
67. Knirel Y. A., Dentovskaya S. V., Shenchenkova S. N. et al. // J. Endotoxin Res. – 2006. – Vol. 12. – P. 3–9.
68. Kotetishvili M., Kreger A., Wauters G. et al. // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 2674–2684.
69. Laukkanen-Ninios R., Didelot X., Jolley K. A. et al. // Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 95. – P. 3114–3127.
70. Le Flèche P., Fabre M., Denoëud F. et al. // BMC Microbiol. – 2002. – Vol. 2, N 37. – P. 27.
71. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L. et al. // BMC Microbiol. – 2001. – Vol. 1, N 2. – P. 2180–2193.
72. Lechner D., Lathrop G. M., Gut I. G. // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2002. – Vol. 6. – P. 31–38.
73. Lehmann K. B., Neumann R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen diagnostic 1st ed. München, 1896.

74. Li Y., Cui Y., Hauck Y. // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, N 5. – e 6000.
 75. Li Y., Dai E., Cui Y. et al. // PLoS One. – 2008. – Vol. 3, N 5. – e 2166.
 76. Lindler L. E. // J. AOAC Int. – 2009. – Vol. 92, N 4. – P. 1174–1183.
 77. Lucier T. S., Brubaker R. R. // J. Bacteriol. – 1992. – Vol. 174. – P. 2078–2086.
 78. Maiden M. C., Bygraves J. A., Feil E. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95. – P. 3140–3145.
 79. Morelli G., Song Y., Mazzoni C. J. et al. // Nat. Genet. – 2010. – Vol. 42. – P. 1140–1143.
 80. Motin V. L., Georgescu A. M., Elliott J. M. et al. // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184. – P. 1019–1027.
 81. Murros-Konttinen A., Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2011. – Vol. 61, 10. – P. 2368–2372.
 82. Ogata M. // Zbl. Bakt. – 1897. – Vol. 21. – P. 769–777.
 83. Parkhill J., Wren B. W., Thomson N. R. et al. // Nature. – 2001. – Vol. 413. – P. 523–527.
 84. Perry R. D., Fetherston J. D. // Clin. Microbiol. Rev. – 1997. – Vol. 10. – P. 35–66.
 85. Pourcel C., André-Mazeaud F., Neubauer H. et al. // BMC Microbiol. – 2004. – Vol. 4. – P. 22.
 86. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. // Microbiology. – 2005. – Vol. 151. – P. 653–663.
 87. Qiu J., Guo Z., Liu H. et al. // J. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, N 5. – P. 557–563.
 88. Radnedge L., Agron P. G., Worsham P. L. et al. // Microbiology. – 2002. – Vol. 148. – P. 1687–1698.
 89. Rakin A., Heesemann J. // Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. – 1995. – Vol. 3. – P. 26–29.
 90. Ruiz M., Rodríguez J. C., Sirvent E. et al. // APMIS. – 2003. – Vol. 111, N 9. – P. 848–856.
 91. Schork N. J., Fallin D., Lanchbury J. S. // Clin. Genet. – 2000. – Vol. 58. – P. 250–264.
 92. Simond P. L. // Ann. Inst. Pasteur. – 1898. – Vol. 12. – P. 625–687.
 93. Skerman V. B. D., McGowan V., Sneath P. H. A. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1980. – Vol. 30. – P. 225–420.
 94. Smith J. E., Thal E. // Acta Pathol. Microbiol. Scand. – 1965. – Vol. 64. – P. 213–233.
 95. Song Y., Tong Z., Wang J. et al. // DNA Res. – 2004. – Vol. 11. – P. 179–197.
 96. Stenseth N. C., Atshabar B. B., Begon M. et al. // PLoS Med. – 2008. – Vol. 5, N 1 – e 3.
 97. Tan J., Liu Y., Shen E. et al. // Huan Jing Ke Xue. – 2002. – Vol. 23, № 3. – P. 1–8.
 98. Tang T. H., Bachelier J. P., Rozhdvestvensky T. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 7536–7541.
 99. Top J., Schouls L. M., Bonten M. J. et al. // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, N 10. – P. 4503–4511.
 100. Torrea G., Chenal-Francisque V., Leclercq A. et al. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, N 6. – P. 2084–2092.
 101. Touchman J. W., Wagner D. M., Hao J. et al. // PLoS ONE. – 2007. – Vol. 2. – e 220.
 102. Tyagi S., Bratu D. P., Kramer F. R. // Nat. Biotechnol. – 1998. – Vol. 16. – P. 49–53.
 103. van Loghem J. J. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1944. – Vol. 10. – P. 15–16.
 104. Weiner M. P., Hudson T. J. // Biotechniques. – 2002. – Suppl. 4–7. – P. 12–13.
 105. Yersin A. // Ann. Inst. Pasteur. – 1894. – Vol. 8. – P. 662–667.
 106. Zhang G., Zhang J., Wang R. // Chin. J. Ctrl. Endem. Dis. – 2002. – Vol. 17. – P. 101–103.
 107. Zhang W., Qi W., Albert T. J. et al. // Genome Res. – 2006. – Vol. 16. – P. 757–767.
 108. Zhou D., Han Y., Song Y. et al. // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186, N 15. – P. 5138–5146.
 109. Zhou D., Han Y., Song Y. et al. // Microbes Infect. – 2004. – Vol. 6 – P. 1226–1234.
 110. Zhou D., Tong Z., Song Y. et al. // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186 – P. 5147–5152.

MOLECULAR TYPING OF *YERSINIA PESTIS*

M. E. Platonov, V. V. Evseeva, S. V. Dentovskaya, and A. P. Anisimov

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russia

Techniques for differentiating single bacterial isolates into intraspecies clusters corresponding to subspecies, biovars, and natural foci are reviewed. The techniques under consideration are reproducible under different laboratory settings. A version of the intraspecies classification of *Y. pestis* that is in harmony with the International Code of Nomenclature of Bacteria is suggested.

Key words: *molecular typing, Yersinia pestis, plague*

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Впервые на сайте Научной электронной библиотеки www.elibrary.ru открыта подписка на электронную версию нашего журнала. Вы можете оформить подписку на журнал на 2013 г., а также на архивные номера или на отдельную заинтересовавшую вас статью из любого номера журнала, начиная с 2012 г. Также на сайте НЭБ открыта подписка и на другие журналы Издательства "Медицина".