

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 579.252

Прямые и косвенные методы определения нуклеотидного состава ДНК последовательностей микроорганизмов

Р.А. Волкова¹, Е.С. Сколотнева², Е.В. Эльберт¹, Е.Д. Мыца¹, В.А. Меркулов¹, В.П. Бондарев¹, И.В. Борисевич¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
²МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Direct and indirect methods of determining DNA nucleotide sequences in microorganisms

R.A. Volkova¹, E.S. Skolotneva², E.V. Elbert¹, E.D. Mytsa¹, V.A. Merkulov¹, V.P. Bondarev¹, I.V. Borisevich¹

¹Federal State Budgetary Institution
«Scientific Center on Expertise of Medical Application Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia
²M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

Типирование бактериальных линий и идентификация микроорганизмов – чрезвычайно важные задачи в области профилактики, диагностики и лечения бактериальных инфекций. За последние два десятилетия бурно развивающиеся молекулярные подходы к типированию бактериальных линий стали необходимым инструментом для решения этой задачи. Информация, которую могут дать нуклеиновые кислоты, является наиболее полной по сравнению с другими характеристиками организма. Получить ее можно как непосредственным определением избранных последовательностей генома, так и с помощью различных техник, позволяющих косвенно оценить нуклеотидный состав репрезентативного участка генома исследуемого микроорганизма. Статья посвящена обзору литературных данных по прямым и косвенным методам определения нуклеотидного состава ДНК последовательностей микроорганизмов (типирование по мультилокусным сиквенсам, типирование по множеству отсеквенированных участков, электрофорез в денатурирующей системе, высокочувствительный анализ кривых плавления, ДНК макро(микро)чипы).

Ключевые слова: генотипирование; микроорганизмы; молекулярно-генетические методы; секвенирование; ДНК макро(микро)чипы.

Библиографическое описание: Волкова РА, Сколотнева ЕС, Эльберт ЕВ, Мыца ЕД, Меркулов ВА, Бондарев ВП, Борисевич ИВ. Прямые и косвенные методы определения нуклеотидного состава ДНК последовательностей микроорганизмов. Биопрепараты 2015; (2): 9–14.

Typing of bacterial populations and identification of microorganisms are the overriding priorities in the field of prophylaxis, diagnosis and treatment of bacterial infections. Over the recent two decades rapidly developing approaches to molecular typing of bacterial populations have become an essential tool for the mentioned task. The information encoded in nucleic acids is more complete as compared to other characteristics of an organism. It can be obtained by either direct determination of genome sequences or by using a variety of techniques, that allow to indirectly assess the nucleotide composition in a representative genome locus of a microorganism under study. The article provides an overview of the literature data on direct and indirect methods of determining nucleotide composition of DNA sequences in microorganisms (multiple locus sequence typing, multiple sequenced sites typing, denaturing gel electrophoresis, high-sensitivity melting curve analysis, DNA macro(micro)arrays).

Key words: genotyping; microorganisms; molecular methods; DNA sequencing; DNA macro(micro)arrays.

Bibliographic description: Volkova RA, Skolotneva ES, Elbert EV, Mytsa ED, Merkulov VA, Bondarev VP, Borisevich IV. Direct and indirect methods of determining DNA nucleotide sequences in microorganisms. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (2): 9–14.

За последние десять лет в результате возросшего количества доступных сиквенсов ДНК микроорганизмов обнаружено, что внутривидовое генетическое разнообразие бактерий намного выше, чем считалось ранее [1, 2]. Появилась и широко используется концепция бактериального пангенома («bacterial pan-genome»). В соответствии с ней выделяется так называемый «основной геном» («core genome»), объединяющий гены, общие у всех линий вида, а также «пластичный (мобильный) геном» («flexible»), состоящий из уникальных генов, свойственных только для одной или нескольких штаммов внутри вида. Две линии одного бактериального вида могут на 30 % различаться нуклеотидной последовательностью гена, демонстрируя большой потенциал

изменчивости вида, что заставляет задуматься о критериях разграничения бактериальных видов [3]. Концепция бактериального пангенома подчеркивает необходимость поиска метода типирования микроорганизмов, который бы наиболее полно охарактеризовал генетическое разнообразие бактериальных видов.

Существующие методы генотипирования микроорганизмов можно классифицировать следующим образом: получение профилей из амплифицированных или рестрицированных ДНК фрагментов (фрагментный анализ генома); прямое и косвенное определение состава нуклеотидных последовательностей генома [3]. Информация, которую могут дать нуклеиновые кислоты, является наиболее полной по сравнению с другими характеристиками

организма. Получить ее можно как непосредственным определением избранных последовательностей генома, так и с помощью различных методов, позволяющих косвенно оценить нуклеотидный состав репрезентативного участка генома исследуемого микроорганизма.

Прямые методы определения состава ДНК: секвенирование специфических последовательностей

Источниками разнообразия ДНК сиквенсов могут быть: делеции, вставки, вариации единичных нуклеотидов (SNP полиморфизм – *Single-nucleotide polymorphism*); дупликации, как в случае с локусами VNTR (*Variable number tandem repeat* – варьирующее число tandemных повторов) [4–7]. В зависимости от объекта и задачи исследования мишенями для секвенирования будут служить разные регионы бактериального генома.

Типирование по мультилокусным сиквенсам (*Multilocus Sequence Typing, MLST*) основано на определении нуклеотидной последовательности семи консервативных генов, экспрессия которых влияет на протекание реакций основного метаболизма. Эти, так называемые, гены домашнего хозяйства (*housekeeping genes*) [8] присутствуют у всех организмов и характеризуются относительно низкой скоростью накопления мутаций, многие из которых при этом являются селективно нейтральными. В связи с чем, MLST маркеры используются при длительных эпидемиологических и популяционных исследованиях, особенно если вид характеризуется высокой степенью генетической изменчивости, как например *Neisseria meningitidis* [9, 10], *Streptococcus pneumoniae* [11–14], *Enterococcus faecalis* [15, 16]. К настоящему моменту MLST является основным методом генотипирования более чем для 29 видов бактерий, занесенными в общедоступную базу данных по MLST типированию. Однако метод MLST не может быть использован для характеристики индивидуальной изменчивости из-за консервативности маркеров.

Количество локусов, анализируемое в каждом конкретном исследовании, может быть разным, но чаще всего составляет 7–8. Такое количество обеспечивает достаточную разрешающую способность метода, при условии экономии времени и стоимости процедуры. Однако ставит эффективность анализа в зависимость от корректного выбора репрезентативного участка. У каждого из выбранных генов секвенируют только короткий фрагмент, около 500 пар оснований, которые легко депонировать в интерактивные базы данных [17], что облегчает межлабораторное сравнение результатов, обмен информацией, а также ее использование для генотипирования штаммов и обеспечения глобального контроля над бактериальными инфекциями [18]. Так, например, данные, накопленные с помощью MLST анализа бактериального генома, обнаружили, что расхождение клональных линий у бактерий обеспечивается за счет рекомбинационных обменов, а вклад точковых мутаций в процесс дивергенции видов сравнительно невелик [19].

Типирование по множеству отсекуемых участков (*Multispacer sequencing typing, MST*), в отличие от MLST анализа, опирается на информацию о высоковариабельных межгенных регионах (*intergenic spacers*), благодаря чему метод рекомендуется для характеристики бактериальных линий [4]. Сравнение нуклеотидных последовательностей генома из большой выборки бактериальных линий и близкородственных видов микроорганизмов показало, что именно межгенные регионы являются наиболее вариабельными маркерами [4, 20, 21]. Информативность MST генотипирования хорошо иллюстрирует анализ внутривидовой изменчивости трех биоваров *Yersinia pestis*, выделенных из пульпы зубов пациентов, скончавшихся от чумы 1500 лет назад. В результате обнаружено 19 MST генотипов возбудителя, частоты которых удалось установить в популяциях второй и третьей пандемии [4]. Этот пример также демонстрирует широкие возможности для применения метода MST. Так как секвенированию подвергают фрагменты, амплифицированные с помощью ПЦР, метод MST применим для анализа образцов, не поддающихся культивированию. С помощью MST генотипирования была проведена оценка внутривидового полиморфизма *Bartonella henselae* и *Rickettsia conorii* при непосредственном анализе человеческих образцов [22].

Метод MST был успешно применен для генотипирования ряда возбудителей инфекционных заболеваний человека, включая

Mycobacterium abscessus [23], *Yersinia pestis* [4], *Rickettsia conorii* [20], *Rickettsia prowazekii* [24], *Rickettsia sibirica* [20], *Coxiella burnetii* [25], *Bartonella henselae* [21, 22], *Bartonella quintana* [26], *Tropheryma whipplei* [27], *Salmonella enterica* [28], *Escherichia coli* [12, 29]. MST анализ сейчас широко применяется для исследований географического распространения бактериальных штаммов и клинического проявления возбудителей различных инфекций [4, 20–22, 24, 30].

Секвенирование следующего поколения NGS (*Next-Generation Sequencing*). Недавнее появление технологий NGS произвело революцию в исследовании бактериального генома. Метод NGS имеет высокую производительность, и производит тысячи или даже миллионы последовательностей одновременно. Эти последовательности позволяют точно идентифицировать микробные таксоны, включая некультивируемые организмы и микроорганизмы в небольших количествах. В конкретных приложениях NGS обеспечивает полную инвентаризацию всех микробных оперонов и генов [31].

В специализированной литературе активно обсуждается вопрос применения метода WGS (*Whole genome sequencing* – полногеномное секвенирование) на платформах NGS для генотипирования штаммов микроорганизмов. Преимуществом WGS являются отсутствие этапа амплификации специфичного фрагмента ДНК и возможность получения информации о полных геномах микроорганизмов, находящихся в образце. WGS, как и полногеномное секвенирование, включает в себя этап случайной фрагментации генома, отдельные фрагменты ДНК секвенируются, полученные нуклеотидные последовательности затем выравниваются и объединяются [32].

С появлением платформ NGS открываются новые перспективы в изучении полногеномных последовательностей большого числа патогенов: *Streptococcus pneumoniae* [33], *Mycobacterium tuberculosis* [34], *Escherichia coli* [35], *Helicobacter pylori* [36], *Staphylococcus aureus* [37], *Vibrio cholerae* [38], *Neisseria meningitidis* [39] в создании информационных технологий и методов молекулярно-генетической характеристики возбудителей инфекционных заболеваний, позволяющих решать как фундаментальные, так и практические задачи микробиологии [40].

Косвенные методы определения нуклеотидного состава генома

Из множества подходов, позволяющих получить информацию о нуклеотидном составе генома, не прибегая к непосредственному секвенированию ДНК, при работе с микроорганизмами обычно отдают предпочтение двум типам методов, в основе которых лежат разные принципы. В одном случае это оценка электрофоретической подвижности плавких доменов, являющихся результатом денатурации продуктов ПЦР, в другом случае аналитическим инструментом является ДНК зонд для гибридизации с тестируемой матрицей.

Электрофорез в денатурирующей системе (*Denaturing Gel Electrophoresis, DGE*) позволяет разделить продукты ПЦР амплификации (ПЦР ампликоны) сходных размеров в соответствии с их нуклеотидной последовательностью. Денатурирующий компонент в полиакриламидном геле раскрывает двуцепочечные ампликоны в одноцепочечные продукты, проходя стадию плавких доменов (*melting domains*). Температура плавления (диссоциации) доменов зависит от нуклеотидного состава и влияет на их подвижность, что определяет положение маркера среди DGE профиля [41]. Подобный градиент может достигаться несколькими способами, благодаря чему существуют различные модификации DGE фингерпринтинга. При использовании денатурирующих химических соединений модификация носит название электрофорез в денатурирующем градиентном геле (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE*). Данная модификация позволяет выделить интересующий ДНК фрагмент непосредственно из геля для дальнейшего определения нуклеотидной последовательности, т.е. решает задачи мониторинга идентификации конкретного генотипа в образцах. Модификация электрофореза с температурным градиентом (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) подразумевает тепловую денатурацию ПЦР ампликона, причем температуру можно регулировать, что используется в модификации TTGE (*Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*) [42]. Наиболее популярной мишенью для DGE анализа яв-

ляется ген рибосомного оперона, кодирующий 16S rRNA. Он присутствует в геноме у всех бактерий и может быть легко амплифицирован без предварительных знаний о ДНК матрице исследуемого штамма. Техника DGE фингерпринтинга позволяет осуществлять мониторинг микробиологических сообществ, так как возможен одновременный анализ большого количества образцов. Для обработки результатов DGE уже созданы статистические программы, что делает метод весьма перспективным инструментом генотипирования [42].

Денатурирующая система применяется и при капиллярном электрофорезе (*Constant Denaturant Capillary Electrophoresis, CDCE*). Такой подход приводит к увеличению разрешающей способности метода: при CDCE анализе возможно дифференцировать последовательности, отличающиеся единичными нуклеотидами. Кроме того, использование лазерной системы детекции позволяет количественно описать результаты [17, 43].

Метод DGE успешно применяется для исследования генетического разнообразия бактерий уже с 1993 г. [41, 44–46]. Разработаны универсальные праймеры для амплификации ДНК регионов, DGE анализ которых наиболее информативен для патогенных бактерий [47]. Однако осуществление процедуры DGE генотипирования требует дорогостоящего оборудования, что пока сдерживает широкое применение техники.

Высокочувствительный анализ кривых плавления (High-Resolution Melting Analysis, HRM), также как и DGE, призван дифференцировать ДНК аллели путем сравнения температуры плавления ПЦР ампликонов. Процедура HRM основана на определении различий в кривых плавления ПЦР с помощью окрашивания двуцепочечной ДНК специальными интеркалирующими красителями и анализе на приборе для проведения ПЦР в реальном времени (*real-time PCR*) [48], которые позволяют наиболее точно оценить изменения температуры и провести улучшенную обработку данных. Данные анализируют и преобразовывают с помощью программного обеспечения, созданного специально для анализа HRM [49, 50]. Использование метода HRM позволяет выявлять *полиморфизм единичных нуклеотидов (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)* и других более сложных регионов ДНК, что является адекватной альтернативой процедуре гибридизации со специфическими пробами. Так, для *Mycoplasma synoviae* было выявлено 10 вариативных последовательностей внутри гена *vlhA* [51]. Разделение вида *Yersinia pseudotuberculosis* на кластеры возможно при HRM анализе последовательностей генов 16S rRNA, *glnA*, *gyrB* и *recA* [52]. Для удобства генотипирования бактериальных штаммов методов HRM может включать различные стратегии проведения ПЦР. Например, когда мишенью для ПЦР амплификации служит locus, содержащий *кластеризованные короткие палиндромные повторы, разделенные спейсерами (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, locus CRISPR)* [53], разрешающая способность HRM генотипирования *Campylobacter jejuni* сравнима с методом PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis* – электрофорез в пульсирующем геле) [54]. При анализе кривых плавления ПЦР ампликонов VNTR locus *Bacillus anthracis*, результаты HRM генотипирования сравнимы с MLVA анализом (*Multiple locus VNTR analysis* – мультилокусный VNTR анализ) [55]. Преимущество метода HRM заключаются в скорости (1–5 мин), возможности анализировать природные образцы, выполнение теста в закрытой пробирке. Чувствительность и специфичность метода сравнима либо превосходит большинство методов типирования, требующих физического фракционирования молекулярных маркеров. Как показала практика, слабым местом метода является нестрогое соответствие результатов анализа при межлабораторном сравнении.

ДНК гибридизация широко используется для выявления мутаций ДНК, так как основной механизм процедуры состоит в комплексном взаимодействии пробы (зонда) и мишени. Пробой является ДНК фрагмент с известной последовательностью нуклеотидов. Гибридизация мишени с флуоресцентной пробой призвана выявить как нуклеотидную последовательность мишени, так и ее количественное содержание в тестируемом образце.

ДНК чипы позволяют протестировать геномную ДНК одновременно с помощью тысячи и даже десятков тысяч зондов (крупных фрагментов либо олигонуклеотидов). Зонды ковалентно прикрепляются к подложке, которая представляет собой мембрану или пластинку из стекла, пластмассы, силиконы или металла. ДНК

чипы являются мощным инструментом изучения транскриптосом эукариот, а также исследования генетического разнообразия бактерий. В зависимости от размеров, количества зондов в ДНК чипе различают макро- и микрочипы.

ДНК макрочипы (DNA macroarrays) зарекомендовали себя как надежные инструменты для выявления генов, ответственных за устойчивость к антибиотикам [37]. В связи с этим они широко используются при эпидемиологических исследованиях таких патогенов, как *Mycobacterium tuberculosis* [56–59], *Corynebacterium diphtheria* [60], *Staphylococcus aureus* [61]. Работа с макрочипами обходится не так дорого, как анализ ДНК матрицы с помощью микрочипов. Однако последние обладают гораздо большей разрешающей способностью в связи с большим спектром тестируемых характеристик ДНК.

Зонды ДНК микрочипов (DNA microarrays) могут представлять собой референтные ДНК последовательности генов, ассоциированных с такими признаками как вирулентность, устойчивость к антибиотикам, специализация, а также с общим уровнем обменных процессов (*housekeeping genes*) [62, 63]. Подобные микрочипы эффективно применялись для одновременной идентификации, характеристики и дифференциации видов *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* [63–66]. В настоящее время выпускаются коммерческие наборы DNA microarrays для анализа геномов патогенных бактерий *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* (www.arrayit.com; www.microarray.com).

Еще большей разрешающей способностью обладают *олигонуклотидные микрочипы*, зондами которых являются олигонуклотидные последовательности, выявляющие в результате гибридизации с тестируемой ДНК матрицей замены и делеции единичных нуклеотидов [2, 67, 68].

Заключение

Прямые и косвенные методы исследования нуклеотидного состава ДНК последовательностей микроорганизмов обладают различными характеристиками. Первые, на основе секвенирования ДНК последовательностей, обеспечивают исследователя исчерпывающей генетической информацией о составе проанализированных последовательностей генома. Полученные данные могут быть использованы непосредственно для идентификации объекта. Напротив, основная задача косвенных методов – это не конструирование точного ряда нуклеотидов, а поиск соответствий и полиморфизма структуры ДНК между несколькими тестируемыми образцами, что наиболее ценно для дифференциации и филогенетического анализа бактериальных штаммов.

Косвенные методы исследования нуклеотидного состава ДНК являются достаточно экономичными, быстрыми и относительно нетрудоемкими. Однако их воспроизводимость уступает процедуре секвенирования, условия которой легче стандартизировать, чем для других методов типирования. Поэтому наиболее значимым преимуществом методов генотипирования с помощью секвенирования является высокая воспроизводимость результатов сканирования однозначных ДНК последовательностей, которые могут быть легко депонированы в базы данных on-line и протестированы между лабораториями. Крупнейшей базой данных отсеквенированных ДНК последовательностей является GenBank, которая наиболее часто используется микробиологами.

Среди доступных в настоящее время техник генотипирования ни одна не может быть названа универсальной и отвечать сразу всем предъявляемым критериям. Выбор метода для генотипирования микроорганизмов зависит от задач исследования. В свою очередь, эффективность процедуры типирования зависит от ДНК последовательности, используемой в качестве молекулярного маркера.

Литература:

1. Binnewies TT, Motro Y, Hallin PF, Lund O, Dunn D, La T, Hampson DJ, Bellgard M, Wassenaar TM, Ussery DW. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative genomics-based discoveries. *Funct Integr Genomics*. 2006; 6: 165–85.
2. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, Small PM. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*. 2001; 11: 547–54.
3. Li W, Raoult D, Fournier P. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev*. 2009; 33 (5): 892–916.

4. Drancourt M, Roux V, Dang LV, Tran-Hung L, Castex D, Chenal-Francoise V, Ogata H, Fournier PE, Crubezy E, Raoult D. Genotyping, orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 1585–92.
5. Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol.* 1992; 174: 4525–9.
6. Ogata H, Audic S, Barbe V, Artiguenave F, Fournier PE, Raoult D, Claverie JM. Selfish DNA in protein-coding genes of *Rickettsia*. *Science* 2000; 290: 347–50.
7. Van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, Verbrugh H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol R.* 1998; 62: 275–93.
8. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, SG. Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(10): 728–36
9. Gottfredsson M, Diggle MA, Lawrie DI, Erlensdóttir H, Hardardóttir H, Kristinsson KG, Clarke SC. *Neisseria meningitidis* sequence type and risk for death, Iceland. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(7): 1066–73
10. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 3140–5.
11. Duarte C, Sanabria O, Moreno J. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 invasive isolates in Colombia. *Rev Panam Salud Publica.* 2013; 33(6): 422–6.
12. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998; 144: 3049–60.
13. Jauneikaite E, Carnon Jefferies JM, Vere Churton NW, Pin Lin RT., Hibberd ML, Clarke SC. Genetic diversity of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis and sepsis in Singapore during the first year of PCV7 implementation. *Emerging Microbes Infect.* 2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4078789/pdf/emi201437a.pdf>.
14. Lefebvre T, Stanhope MJ. Evolution of the core and pangenome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. *Genome Biol.* 2007; 8: 71–9.
15. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol.* 2006; 44P: 2220–8.
16. Rathnayake I, Hargreaves M, Huygens F. SNP diversity of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a South East Queensland waterway, Australia, and associated antibiotic resistance gene profiles. *BMC Microbiology* 2011; 11: 201.
17. Lim EL, Tomita AV, Thilly WG, Polz MF. Combination of competitive quantitative PCR and constant-denaturant capillary electrophoresis for high-resolution detection and enumeration of microbial cells. *Appl Environ Microb.* 2001; 67: 3897–903.
18. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 2003; 10(11): 479–87.
19. Feil EJ, Spratt BG. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55: 561–90.
20. Fournier PE, Zhu Y, Ogata H, Raoult D. Use of highly variable intergenetic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5757–66.
21. Li W, Chomel BB, Maruyama S, Gupta L, Sander A, Raoult D, Fournier PE. Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2499–2506.
22. Li W, Raoult D, Fournier PE. Genetic diversity of *Bartonella henselae* in human infection detected with multispacer typing. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 1178–83.
23. Sassi M, Ben Kahla I, Drancourt M. *Mycobacterium abscessus* multispacer sequence typing. *BMC Microbiology* 2013; 3.
24. Zhu Y, Fournier PE, Ogata H, Raoult D. Multispacer typing of *Rickettsia prowazekii* enabling epidemiological studies of epidemic typhus. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4708–12.
25. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie TJ, Raoult D. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1211–7.
26. Foucault C, La SB, Lindroos H, Andersson SG, Raoult D. Multispacer typing technique for sequence-based typing of *Bartonella Quintana*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 41–8.
27. Li W, Fenollar F, Rolain JM. Genotyping reveals a wide heterogeneity of *Tropheryma whippelii*. *Microbiology.* 2008; 154: 521–7.
28. Hughes LA, Wigley P, Bennett M, Chantrey J, Williams N. Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolates from wild birds in northern England suggests host-adapted strain. *Lett Appl Microbiol.* 2010; 51: 477–9.
29. Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, Fitzgerald M, et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(8): 3065–70.
30. Arvand M, Viezens J. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the analysis of clonal relatedness among *Bartonella henselae* isolates. *Int J Med Microbiol.* 2007; 297: 255–62.
31. Алексеева АЕ, Бруснигина НФ. Возможности и перспективы применения методов массового параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями (аналитический обзор). *Медиаль* 2014; 2(12): 1–28.
32. Olsen RJ, Long SW, Musser JM. Bacterial genomics in infectious disease and the clinical pathology laboratory. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136: 1414–22.
33. Veranja L, Ang I, Tsang D, Fung K, Keung Ng T, Zhou H, Ip M. Application of a target enrichment-based next-generation sequencing protocol for identification and sequence-based prediction of pneumococcal serotypes. *BMC Microbiology* 2014. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/60>.
34. Мокроусов ИВ. Методологические подходы к генотипированию *Mycobacterium tuberculosis* для эволюционных и эпидемиологических исследований. *Инфекция и иммунитет* 2012; 2(3): 603–14.
35. Eppinger M, Mammel MK, LeClerc JE, Ravel J, Cebula TA. Genomic anatomy of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 20142–7.
36. Satou K, Shiroma A, Teruya K, Shimoji M, Nakano K, Juan A, Tamotsu H, Terabayashi Y, Aoyama M, Teruya M, Suzuki R, Matsuda M, Sekine A, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y, Hirano T. Complete genome sequences of eight *Helicobacter pylori* strains with different virulence factor genotypes and methylation profiles, isolated from patients with diverse gastrointestinal diseases on Okinawa Island, Japan, determined using PacBio Single-Molecule Real-Time technology. *Genome Announcements.* 2014; 2: 1–2.
37. Harris SR., Cartwright EJP, Török ME, Holden MT, Brown NM, Ogiwly-Stuart AL, et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(2): 130–6.
38. Попов ЮА, Ерошенко ГА, Булгакова ЕГ, Смирнова НИ. Разработка комплексного алгоритма генотипирования и методов оценки генетического разнообразия природных штаммов возбудителей чумы и холеры. *Проблемы особо опасных инфекций* 2009; 4(102): 5–10.
39. Filippis I, Paula de Lemos AS, Hostetler JB, Wollenberg K, Sacchi CT, Harrison LH, Bash MC, Prevost DR. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup B in Brazil. *Pub Library Sci.* 2012; 7(3): 1–9.
40. Wyres KL., Conway TC, Garg S, Queiroz C, Reumann M, Holt K, Rusu LI. WGS analysis and interpretation in clinical and public health microbiology laboratories: what are the requirements and how do existing tools compare? *Pathogens* 2014; (3): 437–58.
41. Muzeyr G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb.* 1993; 59: 695–700.
42. Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teysier-Cuvelles S, Gillet F, Aragno M, Rossi P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol.* 2002; 4: 634–43.
43. Thompson JR, Randa MA, Marcelino LA, Tomita-Mitchell A, Lim E, Polz MF. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microb.* 2004; 70: 4103–10.
44. Iwamoto T, Tani K, Nakamura K. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiol Ecol.* 2000; 32: 129–41.
45. Ji NN, Liu MM, Huang XR, Zhen J, Li SS, Jiang S, Yu HH, Wang SY, Peng XX. Immunocapture UPPCR combined with DGGE for rapid detection of *Shigella* species. *J Appl Microbiol.* 2006; 100(4): 795–9.
46. Portillo MC, Villahermosa D, Corzo A, Gonzalez JM. Microbial community fingerprinting by differential display-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(1): 351–4.
47. Ji N, Peng B, Wang G, Wang S, Peng X. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *J Microbiol Methods.* 2004; 57(3): 409–13.
48. Wongkamchai S, Mayoon B, Wanachiwanawin D, Foongladda S, Boitano JJ, Nochote I H, Loymak S. Real-time PCR with high-resolution melting analysis for diagnosis of Lymphatic filariasis. *JITMM Proceedings* 2014; 3: 23–30.
49. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem.* 2003; 49: 396–406.
50. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet.* 2000; 58: 250–64.
51. Jeffery N, Gasser RB, Steer PA, Noorhammadi AH. Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. *Microbiology.* 2007; 153: 2679–88.
52. Souza RA, Falcó JP. A novel high-resolution melting analysis-based method for *Yersinia pseudotuberculosis* genotyping. *J Microbiol Meth.* 2012; 91(3): 329–35.
53. Poursel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 2005; 151: 653–63.
54. Price EP, Smith H, Huygens F, Giffard PM. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microb.* 2007; 72: 3431–6.
55. Fortini D, Ciammaruconi A, De SR, Fasanello A, Battisti A, D'Amelio R, Lista F, Cassone A, Carattoli A. Optimization of high-resolution melting analysis for low-cost and rapid screening of allelic variants of *Bacillus anthracis* by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Clin Chem.* 2007; 53: 1377–80.
56. Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 647–51.
57. Hayward AC, Watson JM. Typing of mycobacteria using spoligotyping. *Thorax* 1998; 53: 329–30.

58. Heyderman RS, Goyal M, Roberts P, Ushewokunze S, Zizhou S, Marshall BG, Makombe R, van Embden JD, Mason PR, Shaw RJ. Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by spoligotyping. *Thorax* 1998; 53: 346–50.
59. Zhang SL, Shen JG, Xu PH, Li DX, Sun ZQ, Li L, Yang ZR, Sun Q. A novel genotypic test for rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by a multiplex probe array. *J Appl Microbiol.* 2007; 103: 1262–71.
60. Mokrousova I, Vyazovaya A, Kolodkina V, Limeschenko E, Titov L, Narvskaya O. Novel macroarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus. *Eur J Clin Microbiol.* 2008; 28: 701–3.
61. Trad S, Allignet J, Frangeul L. DNA macroarray for identification and typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2054–64.
62. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.* 1999; 21: 10–14.
63. Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, Frye J, Usera MA, McClelland M. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2074–8.
64. Borucki MK, Kim SH, Call DR, Smole SC, Pagotto F. Selective discrimination of *Listeria monocytogenes* epidemic strains by a mixed-genome DNA microarray compared to discrimination by pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5270–6.
65. Cleven BE, Palka-Santini M, Gielen J, Meembor S, Kronke M, Krut O. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2389–97.
66. Dorrell N, Mangan JA, Laing KG. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res.* 2001; 11: 1706–15.
67. Iwasaki H, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Knight J, Daniel S, Shi M, Emi M. Accuracy of genotyping for single nucleotide polymorphisms by a microarray-based single nucleotide polymorphism typing method involving hybridization of short allele-specific oligonucleotides. *DNA Res.* 2002; 9: 59–62.
68. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* 1996; 14: 1675–80.

References

1. Binnewies TT, Motro Y, Hallin PF, Lund O, Dunn D, La T, Hampson DJ, Bellgard M, Wassenaar TM, Ussery DW. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative genomics-based discoveries. *Funct Integr Genomics.* 2006; 6: 165–85.
2. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, Small PM. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 2001; 11: 547–54.
3. Li W, Raoult D, Fournier P. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009; 33(5): 892–916.
4. Drancourt M, Roux V, Dang LV, Tran-Hung L, Castex D, Chenal-Francois V, Ogata H, Fournier PE, Crubezy E, Raoult D. Genotyping, orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 1585–92.
5. Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol.* 1992; 174: 4525–9.
6. Ogata H, Audic S, Barbe V, Artiguenave F, Fournier PE, Raoult D, Claverie JM. Selfish DNA in protein-coding genes of *Rickettsia*. *Science* 2000; 290: 347–50.
7. Van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, Verbrugh H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol R.* 1998; 62: 275–93.
8. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, SG, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(10): 728–36.
9. Gottfredsson M, Diggel M, Lawrie DI, Erlensdóttir H, Hardardóttir H, Kristinsson KG, Clarke SC. *Neisseria meningitidis* sequence type and risk for death, Iceland. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(7): 1066–73.
10. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 3140–5.
11. Duarte C, Sanabria O, Moreno J. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 invasive isolates in Colombia. *Rev Panam Salud Publica.* 2013; 33(6): 422–6.
12. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998; 144: 3049–60.
13. Jauneikaite E, Carnon Jefferies JM, Vere Churton NW, Pin Lin RT., Hibberd ML, Clarke SC. Genetic diversity of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis and sepsis in Singapore during the first year of PCV7 implementation. *Emerging Microbes Infect.* 2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4078789/pdf/emi201437a.pdf>.
14. Lefebvre T, Stanhope MJ. Evolution of the core and pangenome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. *Genome Biol.* 2007; 8: 71–9.
15. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol.* 2006; 44P: 2220–8.
16. Rathnayake I, Hargreaves M, Huygens F. SNP diversity of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a South East Queensland waterway, Australia, and associated antibiotic resistance gene profiles. *BMC Microbiology* 2011; 11: 201.
17. Lim EL, Tomita AV, Thilly WG, Polz MF. Combination of competitive quantitative PCR and constant-denaturant capillary electrophoresis for high-resolution detection and enumeration of microbial cells. *Appl Environ Microb.* 2001; 67: 3897–903.
18. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 2003; 10(11): 479–87.
19. Feil EJ, Spratt BG. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55: 561–90.
20. Fournier PE, Zhu Y, Ogata H, Raoult D. Use of highly variable intergenetic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5757–66.
21. Li W, Chomel BB, Maruyama S, Guptil L, Sander A, Raoult D, Fournier PE. Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2499–2506.
22. Li W, Raoult D, Fournier PE. Genetic diversity of *Bartonella henselae* in human infection detected with multispacer typing. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 1178–83.
23. Sassi M, Ben Kahla I, Drancourt M. *Mycobacterium abscessus* multispacer sequence typing. *BMC Microbiology* 2013; 3.
24. Zhu Y, Fournier PE, Ogata H, Raoult D. Multispacer typing of *Rickettsia prowazekii* enabling epidemiological studies of epidemic typhus. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4708–12.
25. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie TJ, Raoult D. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1211–7.
26. Foucault C, La SB, Lindroos H, Andersson SG, Raoult D. Multispacer typing technique for sequence-based typing of *Bartonella Quintana*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 41–8.
27. Li W, Fenollar F, Rolain JM. Genotyping reveals a wide heterogeneity of *Tropheryma whipplei*. *Microbiology.* 2008; 154: 521–7.
28. Hughes LA, Wigley P, Bennett M, Chantrey J, Williams N. Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolates from wild birds in northern England suggests host-adapted strain. *Let Appl Microbiol.* 2010; 51: 477–9.
29. Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, Fitzgerald M, et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(8): 3065–70.
30. Arvand M, Viezens J. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the analysis of clonal relatedness among *Bartonella henselae* isolates. *Int J Med Microbiol.* 2007; 297: 255–62.
31. Alekseeva AE, Brusnigina NF. Opportunities and prospects of application of massive parallel sequencing in the diagnosis and surveillance of communicable diseases (analytical review). *Medial* 2014; 2(12): 1–28 (in Russian).
32. Olsen RJ, Long SW, Musser JM. Bacterial genomics in infectious disease and the clinical pathology laboratory. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136: 1414–22.
33. Veranja L, Ang I, Tsang D, Fung K, Keung Ng T, Zhou H, Ip M. Application of a target enrichment-based next-generation sequencing protocol for identification and sequence-based prediction of pneumococcal serotypes. *BMC Microbiology* 2014. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/60>.
34. Mokrousov IV. Methodological approaches to genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* to the evolutionary and epidemiological studies. *Infektsiya i immunitet* 2012; 2(3): 603–14 (in Russian).
35. Eppinger M, Mammel MK, LeClerc JE, Ravel J, Cebula TA. Genomic anatomy of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 20142–7.
36. Satou K, Shiroma A, Teruya K, Shimoji M, Nakano K, Juan A, Tamotsu H, Terabayashi Y, Aoyama M, Teruya M, Suzuki R, Matsuda M, Sekine A, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y, Hirano T. Complete genome sequences of eight *Helicobacter pylori* strains with different virulence factor genotypes and methylation profiles, isolated from patients with diverse gastrointestinal diseases on Okinawa Island, Japan, determined using PacBio Single-Molecule Real-Time technology. *Genome Announcements.* 2014; 2: 1–2.
37. Harris SR., Cartwright EJP, Török ME, Holden MT, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(2): 130–6.
38. Popov YuA, Eroshenko GA, Bulgakova EG, Smirnova NI. Development of complex algorithm of genotyping and methods for assessing the genetic diversity of natural strains of the plague and cholera. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2009; 4(102): 5–10 (in Russian).
39. Filipi I, Paula de Lemos AS, Hostetter JB, Wollenberg K, Sacchi CT, Harrison LH, Bash MC, Prevots DR. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup B in Brazil. *Pub Library Sci.* 2012; 7(3): 1–9.
40. Wyres KL., Conway TC, Garg S, Queiroz C, Reumann M, Holt K, Rusu LI. WGS analysis and interpretation in clinical and public health microbiology laboratories: what are the requirements and how do existing tools compare? *Pathogens* 2014; (3): 437–58.
41. Muzyer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb.* 1993; 59: 695–700.
42. Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvellé S, Gillet F, Aragno M, Rossi P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol.* 2002; 4: 634–43.

43. Thompson JR, Randa MA, Marcelino LA, Tomita-Mitchell A, Lim E, Polz MF. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microb*. 2004; 70: 4103–10.
44. Iwamoto T, Tani K, Nakamura K. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiol Ecol*. 2000; 32: 129–41.
45. Ji NN, Liu MM, Huang XR, Zhen J, Li SS, Jiang S, Yu HH, Wang SY, Peng XX. Immunocapture UPPCR combined with DGGE for rapid detection of *Shigella* species. *J Appl Microbiol*. 2006; 100(4): 795–9.
46. Portillo MC, Villahermosa D, Corzo A, Gonzalez JM. Microbial community fingerprinting by differential display-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol*. 2011; 77(1): 351–4.
47. Ji N, Peng B, Wang G, Wang S, Peng X. Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *J Microbiol Methods*. 2004; 57(3): 409–13.
48. Wongkamchai S, Mayo B, Wanachiwanawin D, Foongladda S, Boitano JJ, Nochote H, Loymak S. Real-time PCR with high-resolution melting analysis for diagnosis of Lymphatic filariasis. *JITMM Proceedings 2014*; 3: 23–30.
49. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*. 2003; 49: 396–406.
50. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet*. 2000; 58: 250–64.
51. Jeffery N, Gasser RB, Steer PA, Noormohammadi AH. Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlaA* gene single-copy region. *Microbiology*. 2007; 153: 2679–88.
52. Souza RA, Falcão JP. A novel high-resolution melting analysis-based method for *Yersinia pseudotuberculosis* genotyping. *J Microbiol Meth*. 2012; 91(3): 329–35.
53. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 2005; 151: 653–63.
54. Price EP, Smith H, Huygens F, Giffard PM. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microb*. 2007; 72: 3431–6.
55. Fortini D, Ciannarucci A, De SR, Fasanella A, Battisti A, D'Amelio R, Lista F, Cassone A, Carattoli A. Optimization of high-resolution melting analysis for low-cost and rapid screening of allelic variants of *Bacillus anthracis* by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Clin Chem*. 2007; 53: 1377–80.
56. Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 647–51.
57. Hayward AC, Watson JM. Typing of mycobacteria using spoligotyping. *Thorax* 1998; 53: 329–30.
58. Heyderman RS, Goyal M, Roberts P, Ushewokunze S, Zizhou S, Marshall BG, Makombe R, van Embden JD, Mason PR, Shaw RJ. Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by spoligotyping. *Thorax* 1998; 53: 346–50.
59. Zhang SL, Shen JG, Xu PH, Li DX, Sun ZQ, Li L, Yang ZR, Sun Q. A novel genotypic test for rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by a multiplex probe array. *J Appl Microbiol*. 2007; 103: 1262–71.
60. Mokrousov I, Vyazovaya A, Kolodkina V, Limeschenko E, Titov L, Narvskaya O. Novel microarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus. *Eur J Clin Microbiol*. 2008; 28: 701–3.
61. Trad S, Allignet J, Frangeul L. DNA microarray for identification and typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 2054–64.
62. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999; 21: 10–14.
63. Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, Frye J, Usera MA, McClelland M. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2074–8.
64. Borucki MK, Kim SH, Call DR, Smole SC, Pagotto F. Selective discrimination of *Listeria monocytogenes* epidemic strains by a mixed-genome DNA microarray compared to discrimination by pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 5270–6.
65. Cleven BE, Palka-Santini M, Gielen J, Meembor S, Kronke M, Krut O. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 2389–97.
66. Dorrell N, Mangan JA, Laing KG. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res*. 2001; 11: 1706–15.
67. Iwasaki H, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Knight J, Daniel S, Shi M, Emi M. Accuracy of genotyping for single nucleotide polymorphisms by a microarray-based single nucleotide polymorphism typing method involving hybridization of short allele-specific oligonucleotides. *DNA Res*. 2002; 9: 59–62.
68. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*. 1996; 14: 1675–80.

Authors:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Volkova RA. Head of the laboratory of molecular biology and genetic testing methods. Doctor of Biological Sciences.

Elbert EV. Leading expert of the laboratory of molecular biology and genetic testing methods. Candidate of Biological Sciences.

Mytsa ED. 2nd category expert/engineer-technician of the laboratory of molecular biology and genetic testing methods.

Merkulov VA. First Deputy Director General. Doctor of Medical Sciences, professor.

Bondarev VP. Director of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Borisevich IV. Director, Center for the planning and coordination of scientific research. Doctor of Medical Sciences, professor.

Moscow State University, Biological faculty. 1 Leninskie gory, Moscow, 119992, Russian Federation.

Skolotneva ES. Researcher. Candidate of Biological Sciences.

Об авторах:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний, д-р биол. наук.

Эльберт Елизавета Викторовна. Ведущий эксперт Лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний, канд. биол. наук.

Мыца Елена Дмитриевна. Эксперт 2-ой категории/инженер-лаборант лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний.

Меркулов Вадим Анатольевич. Первый заместитель генерального директора, д-р мед. наук, профессор.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Борисевич Игорь Владимирович. Директор Центра планирования и координации НИР, д-р мед. наук, профессор.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Биологический факультет. Российская Федерация, 119992, Москва, Ленинские горы, 1.

Сколотнева Екатерина Сергеевна. Научный сотрудник, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Волкова Рауза Асхатовна; volkova@expmed.ru

Поступила 13.11.2014 г.
Принята 20.05.2015 г.