

А.В.Гаева, Е.Г.Булгакова, И.Ю.Сухонос, Л.В.Анисимова, Л.А.Новичкова, В.В.Кутырев

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВНУТРИВИДОВОЕ ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ЧУМНОГО МИКРОБА С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ МЕТОДОМ ПЦР

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Разработан способ идентификации и внутривидового типирования штаммов чумного микроба с определением их потенциальной вирулентности. Показана возможность внутривидовой дифференциации и определения очаговой принадлежности изученных штаммов чумного микроба в монолокусной VNTR-ПЦР и выявления основных детерминант вирулентности (области пигментации хромосомы и гены плазмиды кальцийзависимости) в мультиплексной ПЦР.

Ключевые слова: возбудитель чумы, генетическое типирование, VNTR-анализ, внутривидовые различия, детерминанты вирулентности.

A.V.Gaeva, E.G.Boolgakova, I.Yu.Sukhonosov, L.V.Anisimova, L.A.Novichkova, V.V.Kutyrev

Identification and Intraspecific Typing of Plague Microbe Strains with Their Potential Virulence Determination Using PCR

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Developed is the method of identification and intraspecific typing of plague microbe strains along with their potential virulence determination. Intraspecific differentiation and focal attribution of the examined plague microbe strains can be determined by monolocus VNTR-PCR, and main virulence determinants (chromosomal pigmentation region and calcium-dependence plasmid genes) – by multiplex PCR.

Key words: plague agent, genetic typing, VNTR-analysis, intraspecific differences, virulence determinants.

Дифференциация двух близкородственных и высокогомологичных видов рода иерсиний – чумного и псевдотуберкулезного микробов важна при мониторинге природных очагов чумы. На территории стран Содружества Независимых Государств действуют 42 природных очага чумы [1]. Штаммы псевдотуберкулезного микроба имеют широкое географическое распространение, патогенны для большого круга теплокровных животных и часто выделяются от грызунов, обитающих на территориях природных очагов чумы. Несмотря на то, что эти микроорганизмы вызывают значительно различающиеся по тяжести заболевания, многие фенотипические свойства у них близки, что затрудняет их дифференциацию. В то же время и среди штаммов чумного микроба наблюдается неравнозначность по вирулентности и эпидемической значимости. Универсальной вирулентностью и большой эпидемической значимостью обладают штаммы основного подвида. Для штаммов неосновных подвигов (алтайский, гиссарский, кавказский, улэгейский) и группы таласских штаммов характерна избирательная вирулентность и низкая эпидемическая значимость. В отдельных природных очагах наблюдается совместная циркуляция штаммов основного и неосновных подвигов (Герско-Сунженский низкогорный, Приараксинский низкогорный). Кроме того, на разных стадиях эпизоотического процесса и в межэпизоотический период выделяют атипичные штаммы, лишённые некоторых детерминант вирулентности [1]. Расширение возможностей коммуникации между странами не исключает вероятность завоза и заноса

чумной инфекции. В связи с этим актуальным становится создание и усовершенствование тест-систем, позволяющих за короткий период времени идентифицировать патоген, определить его географическое происхождение и оценить потенциальную вирулентность штамма. Одним из наиболее простых методов идентификации и типирования микроорганизмов является метод, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для дифференциации штаммов возбудителя чумы от других патогенных иерсиний в настоящее время предложены варианты ПЦР [2]. Однако данные варианты метода не позволяют определять его подвиговую и очаговую принадлежность, а также его потенциальную вирулентность. До настоящего времени в литературе не встречались сведения о ПЦР-системе, обладающей способностью одновременно дифференцировать штаммы возбудителя чумы и псевдотуберкулезного микроба и проводить внутривидовое типирование штаммов чумного микроба с определением его происхождения и эпидемического потенциала.

Целью работы являлась разработка комплекса ПЦР, обеспечивающего быструю идентификацию штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов с одновременным внутривидовым типированием штаммов чумного микроба и определением их потенциальной вирулентности.

Материалы и методы

В работе использованы 170 штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов, изолиро-

ванных из природных очагов России и ближнего зарубежья, 68 штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Бактерии выращивали в течение 18 ч на агаре LB (рН 7,2) при температуре 28 °С. По стандартному образцу мутности (10 ед., эквивалентному $1,0 \cdot 10^9$ м.к./мл.) готовили взвесь микроорганизмов в дистиллированной воде в концентрации $1,0 \cdot 10^7$ м.к./мл. Подготовку проб и обеззараживание тестируемых штаммов проводили по схеме, описанной в методических указаниях МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Пары праймеров рассчитывали с помощью компьютерной программы «Primer Express». Праймеры для проведения монолокусной ПЦР TAN1 (5'-TGGGCTTGAATACGGATGATG-3') – TAN2 (5'-ACAACCATGCTGACGTGGG-3'); праймеры для проведения мультиплексной ПЦР IH1 (5'-TTTACCGCAACAACATCATCC-3') – IH4 (5'-ATGGCCGCAACTATGGTG-3'); lcr6 (5'-TTGACGACAAGCGCCTAGC-3') – lcr7 (5'-CAGCTGGCAA TGGAATCCTT-3'). Реакционная смесь для первого этапа содержала: 1 х ПЦР буфер, $MgCl_2$ – 1,5 ммоль, смесь dNTP – 0,4 ммоль, праймеры TAN1 – 1,2 пмоль, TAN2 – 0,8 пмоль, Taq-полимераза – 2 ед., исследуемая ДНК – 10 мкл, вода деионизированная – до 25 мкл. Режим амплификации для образцов с праймерами TAN1–TAN2: первый цикл 94 °С – 1 мин, далее следуют 35 циклов, состоящих из шагов: при 94 °С – 30 с, 62 °С – 30 с, 72 °С – 40 с. Реакционная смесь для второго этапа исследования в объеме 25 мкл содержала: 1 х ПЦР буфер; $MgCl_2$ – 1,5 ммоль; dNTP mix – 0,4 ммоль; праймер IH1 – 3,52 пмоль; праймер IH4 – 0,645 пмоль; lcr6 – 1,5 пмоль; lcr7 – 0,59 пмоль; Taq DNA полимераза – 2 ед.; исследуемая ДНК – 10 мкл; воды до 25 мкл. Режим амплификации для образцов с праймерами IH1 – IH4 и lcr6 – lcr7: первый цикл 94 °С – 2 мин, далее – 35 циклов, состоящих из шагов: при 94 °С – 1 мин, 62 °С – 1 мин, 72 °С – 4 мин.

На гель наносили 3 мкл реакционной смеси с добавлением буфера для нанесения проб (0,25 % бромфенолового синего, 0,25 % ксилोलцианола, 30 % глицерина). Для разделения продуктов амплификации использовали 3 % агарозный гель. Время проведения электрофореза составляло 5 ч при напряжении 120 V. При проведении мультиплексной ПЦР продукты амплификации анализировали в 1 % агарозном геле. Время проведения электрофореза 60 мин при напряжении 90 V. В качестве маркеров молекулярных размеров фрагментов ДНК использовали ДНК фага λ , обработанного рестриктазой AvaII.

Результаты и обсуждение

Разработка монолокусной VNTR–ПЦР для дифференциации штаммов чумного и псевдотуберку-

лезного микробов и внутривидового типирования штаммов чумного микроба

Одним из перспективных методов молекулярно-типирования является VNTR–анализ, основанный на оценке числа варьируемых tandemных повторов. Ранее была показана высокая дискриминирующая способность данного метода при изучении штаммов чумного микроба из разных природных очагов. Для усиления разрешающей способности метода и повышения достоверности типирования обычно применяют модификации метода с использованием нескольких VNTR локусов (мультилокусный VNTR–анализ, или MLVA) [3, 4, 5, 7].

В результате проведенного BLAST–анализа *hutG*–YPO1950 региона хромосомы чумного микроба выявлена варьируемая область, расположенная в межгенном пространстве *hutG*–YPO1967. Участок *hutG*–YPO1967 находится перед областью пигментации и включает два VNTR локуса: 1 – (ATAGAAAG)_n и 2 – (CAAGTAAT)_n, GenBank, AL590842. При сравнении нуклеотидных последовательностей штаммов чумного микроба известных биоваров и псевдотуберкулезного микроба, депонированных в GenBank, обнаружена варьируемость этих локусов у штаммов, принадлежащих к разным биоварам и выделенных в разных географических регионах. Генетические формулы *hutG*–YPO1967 области штаммов разного происхождения отличаются по количеству повторов и, в ряде случаев, содержат неполные повторы (AAAG): формула штамма CO92 (биовар *orientalis*) VN 1₈2₄; штамма 6/69 (биовар *orientalis*) VN 1₅2₄; штамма KIM (биовар *medievalis*) VN 1₄2₃; штаммов Antiqua и Nepal 516 (биовар *antique*) VN 1₅2₃; штамма 91001 (биовар *microtus*) VN 1_{12+AAAG}; штамма Pestoides F1 VN 1_{12+2(AAAG)2_{14+IS285}}. У штамма псевдотуберкулезного микроба IP32953 первый локус содержит 2 повтора с единичной нуклеотидной заменой в одном из них, второй – уникальную вставку 363 п.н. и 2 повтора. Приведенные результаты выравнивания ДНК штаммов чумного микроба, представленных в GenBank, послужили основанием для исследования распространения аллелей области *hutG*–YPO1967 у штаммов чумного и псевдотуберкулезного микроба, циркулирующих на территории СНГ и Монголии. Нами рассчитана пара праймеров TAN1–TAN2, ограничивающая область между генами *porina* YPO1967 и *hutG* гистидинового оперона, приближенная к VNTR локусам.

При изучении VNTR области *hutG*–YPO1967 170 штаммов чумного микроба обнаружено 20 аллелей. Сравнение размеров фрагментов ДНК, встречающихся у штаммов различного происхождения, показало, что для штаммов каждого подвида и таласской группы характерен свой диапазон размеров (табл. 1). Так, размеры амплифицируемых фрагментов для штаммов основного подвида находятся в диапазоне 348–388 п.н., штаммов алтайского подвида – 396–420 п.н., улэгейского – 340–416 п.н., гиссарского – 448–456 п.н., кавказского – 1799–1831 п.н., таласской

Определение видовой, внутривидовой и очаговой принадлежности штаммов чумного микроба

Вид, подвид	Очаг, место выделения	Размер фрагмента ДНК с праймерами TAN1–TAN2	VN тип
<i>Y. pestis pestis</i>	Равнинно-предгорные очаги Кавказа и Закавказья, пустынные очаги Средней Азии, Прикаспийский, Волго-Уральский песчаный	348 п.н.	VN 1
	Забайкальский степной, Тувинский горный	356 п.н.	VN 2
	Аксайский высокогорный	364 п.н.	VN 3
	Верхненарынский высокогорный	372 п.н.	VN 4
	Сарыджазский высокогорный	380 п.н.	VN 5
	Сарыджазский высокогорный	388 п.н.	VN 6
<i>Y. pestis altaica</i>	Алтайский горный (Кош-Агачский район)	396 п.н.	VN 9
	Алтайский горный (Уландрик)	420 п.н.	VN 10
	Монголия, аймак Убурхангай	400 п.н.	VN 11
<i>Y. pestis ulegeica</i>	Монголия, аймак Убурхангай	416 п.н.	VN 12
	Монголия, Южно-Гобийский аймак	340 п.н.	VN 7
	Монголия, Баян-Улэгейский аймак	348 п.н.	VN 8
<i>Y. pestis</i>	Таласский высокогорный	444 п.н.	VN 13
<i>Y. pestis hissarica</i>	Гиссарский высокогорный	448 п.н.	VN 15
		456 п.н.	VN 14
<i>Y. pestis caucasica</i>	Восточно-Кавказский высокогорный	392 п.н.	VN 16
	Ленинканский горный, Терско-Сунженский низкогорный	1799 п.н.	VN 17
	Присеванский горный	1807 п.н.	VN 18
	Зангезуро-Карабахский горный	1819 п.н.	VN 19
	Приараксинский низкогорный	1831 п.н.	VN 20
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Алматы	692 п.н.	–
	Франция	711 п.н.	–

группы – 444 п.н. Для 68 штаммов псевдотуберкулезного микроба характерны фрагменты ДНК в диапазоне 692–711 п.н. Первые шесть аллелей (348, 356, 364, 372, 380 и 388 п.н.) встречаются только у штаммов основного подвида. Самым распространенным оказался аллель размером 348 п.н. Он характерен для штаммов из равнинных очагов сусликового типа, расположенных в регионах Северного Прикаспия, Закавказья и высокогорных очагов на Центральном Кавказе, прикаспийских и закавказских очагов песчаночного типа, а также среднеазиатских пустынных очагов. Аллель 356 п.н. встречается только у штаммов из природных очагов сусликового типа Западной Сибири, а аллели 364, 372, 380, 388 п.н. у штаммов Тувинского горного и высокогорных очагов: Сарыджазского, Аксайского, Алайского.

Наибольшей вариабельностью и в то же время четкой очаговой приуроченностью отличаются аллели штаммов неосновных подвигов. На территории Алтайского горного очага циркулируют, по крайней мере, две группы штаммов: с фрагментами ДНК размером 396 (Кош-Агачский район) и 420 п.н. (урочище Уландрик). Продукты амплификации размером 400 п.н. обнаружены у штаммов алтайского подвида из Монголии (аймак Убурхангай). Три варианта аллелей выявлено и у изученных штаммов улэгейского подвида, каждый из которых характерен для определенного аймака (в Южно-Гобийском аймаке аллель 340 п.н.; в Баян-Улэгейском аймаке – 348 п.н.; в аймаке Убурхангай – 416 п.н.). Только в одном случае произошло совпадение размера фрагментов ДНК штам-

ма неосновного подвида (улэгейский подвид, Баян-Улэгейский аймак) со штаммами основного подвида (348 п.н.). При выявлении фрагмента ДНК размером 348 п.н. обязательно дополнительно учитываются результаты амплификации ДНК данного штамма в мультиплексной ПЦР для дифференциации штаммов основного и неосновных подвигов и определения их потенциальной вирулентности. Амплификация фрагмента размером 2690 п.н. с праймерами IN1–IN4 (на ген порина) свидетельствует о том, что исследуемый штамм принадлежит к основному подвиду, амплификация фрагмента размером 733 п.н. с этими праймерами говорит о принадлежности данного штамма к улэгейскому подвиду (см. ниже). Альтернативно может быть проведено секвенирование ампликонов для дифференциации штаммов из указанных очагов основного и улэгейского подвигов, поскольку в дальнейших исследованиях при секвенировании фрагментов ДНК выявлены отличия в количестве повторов первого и второго локусов у штамма улэгейского подвида по сравнению со штаммами основного подвида (неопубликованные данные). У штаммов таласской группы обнаружен один аллель (444 п.н.). Гиссарские штаммы разделились на две группы: образующие фрагменты ДНК 448 и 456 п.н. Установить их мезоочаговую принадлежность пока не представляется возможным, поскольку нет сведений о районе, в котором выделены эти штаммы. С образцами штаммов кавказского подвида из всех автономных очагов амплифицировались фрагменты размером около 1800 п.н. Исключение составляют штаммы из

Восточно-Кавказского высокогорного очага, у которых образуются фрагменты значительно меньшего размера – 392 п.н. (табл. 1). Как показано выше, у штамма *Pestoides F1* (кавказский подвид) область *hutG*–*YPO1967* содержит мобильный элемент IS285. Судя по размерам продуктов ПЦР штаммов кавказского подвида, все они, кроме штаммов из Восточно-Кавказского высокогорного очага, также несут IS285 в этой области.

При определении подвидовой и очаговой принадлежности штаммов важно точно определить размер образующегося продукта амплификации. Поэтому, кроме стандартных маркеров размеров ДНК, мы использовали наборы из фрагментов ДНК референтных штаммов чумного микроба разных подвидов из различных природных очагов, размеры которых определены секвенированием. Штаммы пронумерованы в соответствии с возрастанием размеров фрагментов ДНК, которые образуются в ПЦР с праймерами TAN1–TAN2. При составлении двух наборов маркеров, четные (M2) и нечетные (M1) образцы фрагментов ДНК вносили в разные микропробирки, а при электрофорезе в гелях наносили в разные лунки (табл. 2; рисунок, А). Это необходимо для того, чтобы фрагменты ДНК близких размеров не наслаивались друг на друга. Образцы кавказского подвида из Зангезуро-Карабахского очага и псевдотуберкулезного микроба добавляли в обе микропробирки. Очистку маркеров от реакционной смеси проводили на колонках *Sentri-Sep spin columns* (Applied Biosystems). При температуре –70 °С маркеры хранятся в течение нескольких лет.

На рисунке А представлены результаты разделения продуктов ПЦР, полученных с ДНК штаммов чумного микроба разного происхождения, в 3 % агарозном геле в трис-боратной буферной системе с использованием в качестве маркеров наборов M1

и M2. Разработанный нами экспериментальный набор маркеров в сочетании с использованием данных табл. 1 позволяет проводить точное соотнесение полученных фрагментов ДНК с видовой, подвидовой и очаговой принадлежностью.

Результаты анализа штаммов чумного микроба из 39 природных очагов и штаммов псевдотуберкулезного микроба из разных географических областей показали, что с помощью монолокусной ПЦР с праймерами TAN1–TAN2 можно дифференцировать штаммы чумного и псевдотуберкулезного микроба, определять подвидовую и, в ряде случаев, очаговую принадлежность штаммов чумного микроба.

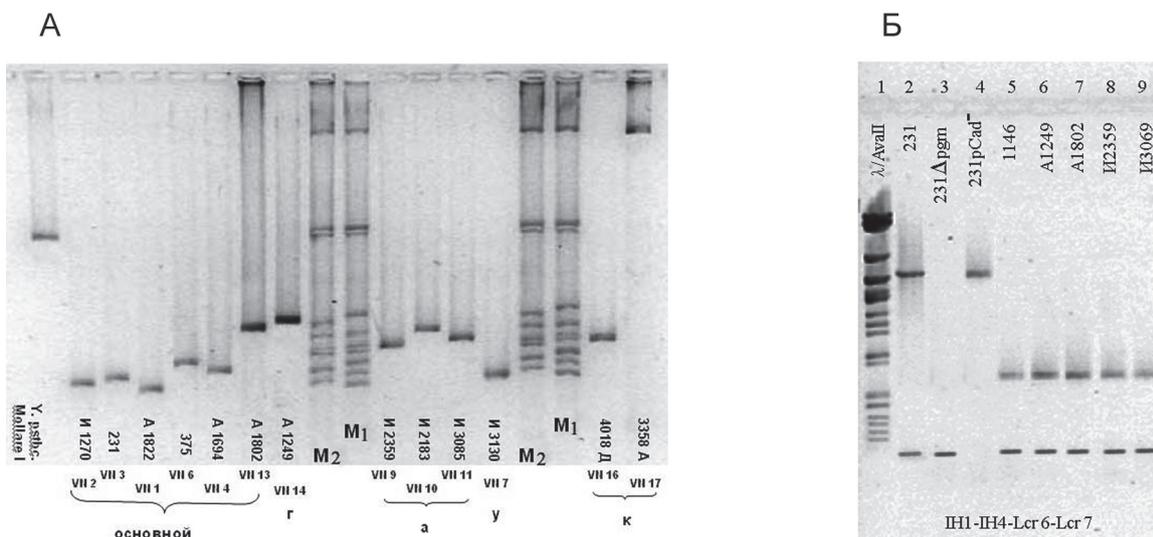
Разработка мультиплексной ПЦР для определения потенциальной вирулентности штаммов чумного микроба

Для дифференциации потенциально вирулентных и авирулентных штаммов чумного микроба разработана мультиплексная ПЦР, включающая две пары праймеров, выявляющих наличие или отсутствие основных детерминант вирулентности – области пигментации (*pgm*) и гены плазмиды кальцийзависимости (*pCad*). В качестве первой ДНК-мишени нами выбран ген порина *YPO1967*, так как структурные особенности этого гена в большинстве случаев позволяют дополнительно различать штаммы основного подвида с универсальной вирулентностью и штаммы неосновных подвидов с избирательной вирулентностью. Ген порина *YPO1967* ограничивает область пигментации со стороны *hms* локуса и у штаммов основного подвида поврежден IS100 элементом. Рекомбинация между двумя фланкирующими *pgm* область IS100 элементами приводит к делеции всей области. Отсутствие продукта в ПЦР с праймерами комплементарными концевым участкам этого гена у штаммов основного подвида свидетельствует об отсутствии *pgm* области и, следовательно,

Таблица 2

Состав наборов маркеров M1 и M2 для определения размеров продуктов амплификации, образующихся при анализе штаммов *Y. pestis* в ПЦР с праймерами TAN1–TAN2

Название штамма	Подвид	Природный очаг	Размер фрагмента, п.н.	Набор маркеров (M1, M2)
ИЗ130	Улгейский	Монголия, Южно-Гобийский аймак	340	M1
A1822	Основной	Кызылкумский пустынный	348	M2
И1270	Основной	Забайкальский степной	356	M1
231(708)	Основной	Аксайский высокогорный	364	M2
A1694	Основной	Верхненарынский высокогорный	372	M1
375	Основной	Сарыджазский высокогорный	388	M2
4018Д	Кавказский	Восточно-Кавказский высокогорный	392	M1
И2359	Алтайский	Алтайский горный	396	M2
ИЗ085	Алтайский	Монголия, аймак Убурхангай	400	M1
ИЗ069	Улгейский	«	416	M2
A1802	Таласская группа	Таласский высокогорный	444	M1
A1249	Гиссарский	Гиссарский высокогорный	456	M2
1146	Кавказский	Зангезуро-Карабахский горный	1819	M1, M2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> A2526	-	Казахстан	642	M1, M2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Mollaret I	-	Париж (эталонный)	711	M1, M2



ПЦР-анализ штаммов чумного микроба разного происхождения методом VNTR-ПЦР с праймерами TAN1–TAN2, 3 % агарозный гель (А); методом мультиплексной ПЦР (Б):

- А: M1, M2 – маркеры из фрагментов ДНК референтных штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов, г – штамм гиссарского подвида, а – алтайского, у – улзгейского, к – кавказского, «основной» – основного подвида из разных природных очагов.
 Б: 1 – λ /AvaII; 2 – *Y. pestis pestis* 231(708) pgm⁺ pCad⁺; 3 – *Y. pestis pestis* 231 Δ pgm, pCad⁺; 4 – *Y. pestis pestis* 231 pgm⁺ pCad⁺; 5 – *Y. pestis caucasica* 1146 pgm⁺ pCad⁺; 6 – *Y. pestis hissarica* A-1249 pgm⁺ pCad⁺; 7 – *Y. pestis talassica* A-1802 pgm⁺ pCad⁺; 8 – *Y. pestis altaica* И-2359 pgm⁺ pCad⁺; 9 – *Y. pestis ulegeica* И-3069 pgm⁺ pCad⁺

об авирулентности, связанной с потерей «острова патогенности» – части *pgm* области. Ген порина штаммов неосновных подвидов не поврежден IS100 элементом. В результате отсутствия одного из фланкирующих *pgm* область IS100 элементов делеция *pgm* области у этих штаммов невозможна. Поэтому все штаммы неосновных подвидов можно считать потенциально вирулентными по этому признаку. Для выявления структурных особенностей гена YPO1967 использовали разработанные нами праймеры IN1 и IN4, фланкирующие IS100, встроенный в этот ген у штаммов основного подвида. Фрагмент ДНК, образующийся в ПЦР с ДНК вирулентных штаммов, имеет размер 2690 п.н., авирулентные штаммы основного подвида с праймерами IN1–IN4 продуктов амплификации не образуют. Фрагмент ДНК размером 733 п.н. амплифицируется у штаммов неосновных подвидов и группы штаммов основного подвида из Кызылкумского пустынного очага.

При выборе второй ДНК-мишени тестировали гены родоспецифичной плазмиды кальцийзависимости, которая имеет высокую степень гомологии у патогенных иерсиний [6]. Однако даже внутри вида *Y. pestis* имеются различия структурной организации плазмиды. Поэтому важно было выбрать последовательность, присутствующую в плаزمиде рCad штаммов всех подвидов и определяющую наличие области, ответственной за проявление вирулентных свойств. Чтобы определить область второй ДНК-мишени, проведен компьютерный анализ известных нуклеотидных последовательностей плазмиды рCad штаммов чумного микроба разных биоваров. По данным сиквенса полного генома штаммов биоваров *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *microtus* ген

yopM штаммов биовара *microtus* (по сравнению со штаммами других биоваров) несет делецию 126 п.н. через 1465 п.н. после старта. Аллель гена *lcrV* штаммов того же биовара содержит делецию 16 п.н. через 969 п.н. после старта, а ген *yopN* имеет точковую мутацию у штаммов биовара *microtus*. Ген *lcrH*, отвечающий за синтез шаперона для белков Yop D, Yop B, участвующих в формировании пор при транслокации белков-эффекторов в клетку макроорганизма, оказался идентичным у штаммов всех биоваров [8]. Поиск второй пары праймеров для мультиплексной ПЦР был предпринят в области генов *yopN* и *lcrH*.

Подходящая пара праймеров не комплементарная паре праймеров IN1 и IN4, обозначенная *lcr7*–*lcr6*, выявлена при анализе последовательности гена *lcrH* и образует продукт амплификации размером 262 п.н. Специфичность полученного фрагмента подтверждена методом секвенирования. Нуклеотидная последовательность фрагментов ДНК типичных штаммов разных подвидов идентична и не отличается от аналогичных известных последовательностей штаммов биоваров *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *microtus*.

Условия проведения мультиплексной ПЦР для определения потенциальной вирулентности штаммов чумного микроба подбирали на изогенной системе штамма *Y. pestis* 231 (исходный; Δ pgm, pCad⁺; pgm⁺ pCad⁺) и пяти штаммах неосновных подвидов: 1146 (*Y. pestis subsp. caucasica*), A1249 (*Y. pestis subsp. hissarica*), A1802 (*Y. pestis* таласская группа), И2359 (*Y. pestis subsp. altaica*), И3069 (*Y. pestis subsp. ulegeica*). У всех штаммов дикого типа основного подвида во всех случаях наблюдали образование фрагментов 2690 и 262 п.н., неосновных подвидов – 733 и 262 п.н. (рисунок, Б). Такие результаты указывают на то, что

изученные культуры потенциально вирулентные. Отсутствие одного или двух ПЦР продуктов указывает на потерю штаммом одной или двух основных детерминант вирулентности и, как следствие, на авирулентность штамма. Эффективность разработанного способа проверена на 170 штаммах чумного микроба всех подвидов из разных природных очагов и 68 штаммах псевдотуберкулезного микроба. Результаты тестирования четко коррелировали с паспортными данными штаммов по вирулентности, представленными ГКПБ «М».

Таким образом, комплексное использование разработанных монолокусного и мультиплексного вариантов ПЦР обеспечивает быструю и надежную идентификацию штаммов чумного микроба с определением подвидовой, очаговой принадлежности и потенциальной вирулентности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В.*, редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: 2004. 192 с.
2. *Савостина Е.П., Попов Ю.А., Каштанова Т.Н., Яшечкин Ю.И.* Анализ геномного полиморфизма типовых и атипичных штаммов возбудителя чумы с использованием полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 1:22–6.
3. *Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P., Wong J., Keim P.* Identification and characterization of Variable-Number Tandem Repeats in the *Yersinia pestis* genome. J. Clin. Microbiol. 2001; 39(9):3179–85.
4. *Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M., Dai E., Song Y., Guo Zh., Pourcel C., Dentovskaya S., Anisimov A., Yang R., Vergnaud G.* Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA:

insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. PLoS ONE. 2009; 4(6):e6000.

5. *Lowell J.L., Wagner D.M., Atshabar B., Antolin M.F., Vogler A.J., Keim P., Chu M.C., Gage K.L.* Identifying sources of human exposure to plague. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:650–6.

6. *Portnoy D.A., Wolf-Watz H., Bolin I., Beeder A.B., Falkow S.* Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in expression of outer membrane proteins. Infect. Immun. 1984; 43:108–14.

7. *Pourcel C., Andre-Mazeaud F., Neubauer H., Ramiise F., Vergnaud G.* Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 2004; 4:22.

8. *Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Du Z., Wang J., Guo Z., Wang J., Huang P., Yang R.* Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. J. Bacteriol. 2004; 186 (15):5147–52.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. *Onishchenko G.G., Kutyrev V.V.*, editors. [Plague Natural Foci of Caucasus, Precaspian Region, Central Asia and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.

2. *Savostina E.P., Popov Yu.A., Kashtanova T.N., Yashchkin Yu.I.* [Analysis of genomic polymorphism of typical and atypical strains of the plague pathogen using polymerase chain reaction with universal primers]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2004; 1:22–6.

Authors:

Gaeva A.V., Boolgakova E.G., Sukhonosov I.Yu., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Гаева А.В., Булгакова Е.Г., Суханосов И.Ю., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 01.04.11.