

# Внутривидовая дифференциация *Yersinia pestis*: от фенотипа к полногеномному секвенированию

А.С.Вагайская, А.С.Трунякова, С.В.Дентовская

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,  
Оболенск, Российская Федерация

Для внутривидовой дифференциации штаммов *Yersinia pestis* с разной эффективностью использовали множество методов. В настоящее время молекулярно-генетические подходы все чаще заменяют традиционные методы, основанные на оценке фенотипических свойств возбудителя чумы. В данном обзоре особое внимание уделено методам типирования чумного микроба, отвечающим требованиям популяционной генетики, филогеографии и молекулярной эпидемиологии. Описанные подходы оцениваются с точки зрения стоимости, сложности выполнения, межлабораторной воспроизводимости результатов, дискриминационной способности, полезности для решения различных вопросов исследования и текущей применимости вследствие появления метода полногеномного секвенирования.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, внутривидовая дифференциация, RFLP, IS-элементы, DFR, LCB, MLVA, CRISPR, SNP, полногеномное секвенирование

**Для цитирования:** Вагайская А.С., Трунякова А.С., Дентовская С.В. Внутривидовая дифференциация *Yersinia pestis*: от фенотипа к полногеномному секвенированию. Бактериология. 2019; 4(2): 42–54. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-42-54

## Intraspecific differentiation of *Yersinia pestis*: from the phenotype to the full genome sequencing

A.S.Vagayskaya, A.S.Trunyakova, S.V.Dentovskaya

State Research Center for applied microbiology and biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation

Many methods have been used with different efficiency for intraspecific differentiation of *Yersinia pestis* strains. Currently, molecular genetic approaches are increasingly replacing traditional methods based on the assessment of the phenotypic properties. In this review, special attention is paid to the methods of *Y. pestis* typing that meet the requirements of population genetics, phylogeography and molecular epidemiology. The described approaches are evaluated in terms of expense, difficulty, interlaboratory reproducibility, discriminatory power, usefulness for solving various research issues and current applicability in light of the emergence of the whole-genome sequencing.

**Keywords:** *Yersinia pestis*, intraspecific differentiation, RFLP, ISelement, DFR, LCB, MLVA, CRISPR, SNP, whole genome sequence

**For citation:** Vagayskaya A.S., Trunyakova A.S., Dentovskaya S.V. Intraspecific differentiation of *Yersinia pestis*: from the phenotype to the full genome sequencing. Bacteriology. 2019; 4(2): 42–54. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-42-54

**Ч**ума – одно из самых смертоносных заболеваний в истории человечества, в ходе трех пандемий которого погибли сотни миллионов людей [1]. Несмотря на то что на современном этапе меры, предпринимаемые общественным здравоохранением (улучшение гигиены, использование антибиотиков и инсектицидов и т.д.), позволили эффективнее бороться с чумой, в некоторых частях земного шара сохраняется потенциальная угроза возникновения и распро-

странения вспышек инфекции [1]. Чумной микроб может быть использован как агент биотерроризма, а обнаружение штаммов возбудителя чумы с множественной антибиотикоустойчивостью только увеличивает угрозу человечеству [2].

Считается, что *Y. pestis* – возбудитель чумы – образовался путем дивергенции от *Yersinia pseudotuberculosis* примерно 15 000–20 000 лет назад [3]. Относительно недавнее отделение привело к отсутствию значительного генетического

### Для корреспонденции:

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ

Телефон: (4967) 36-0112

E-mail: dentovskaya@obolensk.org

Статья поступила 30.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

### For correspondence:

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, major researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0112

E-mail: dentovskaya@obolensk.org

The article was received 30.03.2019, accepted for publication 27.06.2019

разнообразия у штаммов чумного микроба. Из-за этого многие методы внутривидовой дифференциации, применяемые для других микроорганизмов, практически не используют при молекулярном типировании чумного микроба. Поиск различий в генетическом строении усложняет тот факт, что, несмотря на то, что природные очаги инфекции разбросаны по всему миру, наибольшее географическое распространение заболевания явилось результатом третьей пандемии, начавшейся в середине XIX в. в провинции Юньнань Китая. Поэтому штаммы чумного микроба, выделяемые во вновь сформировавшихся природных очагах, в том числе в Северной и Южной Америке, отличаются ограниченным биологическим разнообразием [3]. В противоположность этому штаммы *Y. pestis* из регионов Центральной и Восточной Азии, особенно Китая, СНГ и Монголии, обладают значительным полиморфизмом и отличаются по спектру чувствительных к ним млекопитающих (избирательной вирулентности), ферментативной активности, степени аутокотрофности и другим признакам [1, 4–6].

Первоначально для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба использовали методы, основанные на изучении фенотипических характеристик, серотипирование, фаготипирование и плазмидный анализ. Позднее появились молекулярно-генетические методы, основанные на детекции фрагментов ДНК *Y. pestis*: определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов – RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), IS-типирование (IS – Insertion Sequence), анализ отличающихся участков ДНК – DFR-типирование (Different Region), ПЦП-анализ случайно амплифицированной полиморфной ДНК – RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA), ПЦП с праймерами на повторяющиеся экстрагенные палиндромы – REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic), VNTR-анализ – анализ переменного числа tandemных повторов (VNTR – Variable-Number Tandem Repeat) [7]. В последующем появились методы генотипирования, основанные на секвенировании фрагментов ДНК: определение полиморфизма рибосомальных рРНК, мультилокусный анализ переменных tandemных повторов – MLVA (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis) [8, 9], CRISPR-типирование (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – кластеризованные короткие палиндромные повторы, разделенные спейсерами) [10], SNP-типирование – анализ полиморфизма единичных нуклеотидов (Single-Nucleotide Polymorphism) [11], а затем и полногеномное секвенирование [12].

### Ранние методы типирования

**Фенотипические методы.** Самая ранняя и наиболее широко используемая схема типирования *Y. pestis* включает в себя изучение двух фенотипических свойств: способность штаммов к ферментации глицерина (*glpD*+) и восстановлению нитратов (*napA*), делящая штаммы чумного микроба на три биовара: *antiqua* (*glpD*+, *napA*+), *medievalis* (*glpD*+, *napA*–) и *orientalis* (*glpD*–, *napA*+) [13, 14]. R.Devignat [15] и В.Туманский [16] впервые использовали способность к ферментации глицерина, нитрификации и денитрификации для подразделения штаммов *Y. pestis* на три внутривидовые группы, предположительно явившиеся причиной трех пандемий: «Юстиниановой чумы», «Черной смерти» и третьей

пандемии соответственно. Кроме этого, для деления штаммов *Y. pestis* из Китая и СНГ, где уровень генетического разнообразия чумного микроба значительно выше, чем где бы то ни было в мире, оценивают способность к ферментации различных сахаров (рамноза, арабиноза, мелибиоза, мальтоза, манноза и трегалоза), потребность в дополнительных факторах роста (лейцин, метионин, аргинин, тиамин, цистеин, фенилаланин, треонин и тирозин), чувствительность к пестицину, фибринолитическую и плазмокоагуляционную активность, а также степень вирулентности для морских свинок. Набор из фенотипических признаков используют для деления изолятов *Y. pestis* из стран СНГ и Монголии на основной подвид *Y. pestis* subsp. *pestis*, в который входят штаммы, обладающие «универсальной» вирулентностью для человека и животных, а также на несколько неосновных подвидов: *altaica*, *angola*, *caucasica*, *hissarica*, *talassica*, *ulegeica*, авирулентных для человека [13]. Однако сообщают о единичных случаях заражения людей бактериями неосновных подвидов, не передающихся от человека к человеку [4]. Аналогичную схему фенотипической внутривидовой дифференцировки на различные экотипы использовали Zhou et al., [17] для штаммов *Y. pestis* из Китая, которые предложили биовар *microtus* (*glpD*+, *napA*–, *araC*–), штаммы которого, в отличие от биоваров основного подвида, неспособны к ферментации арабинозы [18]. Новый вариант внутривидового деления возбудителя чумы, соответствующий правилам Международного кодекса номенклатуры бактерий, был предложен М.Е.Платоновым и соавт. [7]. Эта классификационная схема содержит всего два подвида *pestis* и *microti*, которые, в свою очередь, делятся на четыре (*antiqua*, *medievalis* и *orientalis*, *intermedium*) и восемь (*caucasica*, *angola*, *talassica*, *qinghaiensis*, *xilingolensis*, *altaica*, *hissarica* и *ulegeica*) биоваров, соответственно. Кроме фенотипических характеристик и вирулентности для человека и морских свинок, различные внутривидовые группы чумного микроба отличаются по географическому ареалу выделения и основному хозяину [13, 17, 19].

Известно, что фенотипические свойства микроорганизмов характеризуются нестабильностью и могут подвергаться конвергентной эволюции. Биоварная принадлежность штаммов может быть ошибочно определена из-за независимых мутаций, вызывающих появление нового фенотипа [7, 13], и, наоборот, штаммы из разных биоваров могут обладать одинаковыми фенотипическими свойствами.

Несмотря на появление новых молекулярно-генетических подходов, фенотипические методы продолжают использовать как средство идентификации изолятов *Y. pestis* и определения их биоварной принадлежности. Было показано, что коммерческая система API20E® эффективна для идентификации монгольских штаммов *Y. pestis* [20], но не для штаммов, выделенных на территории Республики Грузия [21]. Классические микробиологические методы до настоящего времени используют для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба на подвиды и биовары [20, 21]. Оценку фенотипических свойств штаммов *Y. pestis* в качестве дополнения к методам генотипирования успешно применили при расследовании вспышек чумы в Алжире и Ливии [22]. Напротив, попытки использовать данные методы для дифференциации близкородственных

штаммов, например, биовара *orientalis* из природных очагов чумы в Бразилии ожидаемо оказались безуспешными [23, 24].

**Серотипирование и фаготипирование.** Серотипирование и типирование с использованием бактериофагов, как правило, не пригодны для дифференциации штаммов *Y. pestis* из-за высокого уровня гомологичности по этим признакам. Действительно, обычно считают, что все штаммы *Y. pestis* принадлежат к одному серотипу и одному фаготипу.

**Плазмидный анализ.** Штаммы *Y. pestis* могут характеризоваться различным плазмидным составом. Большинство штаммов чумного микроба обладает тремя плазмидами: pPCP1 (pPst,9,5 т.п.н.), pCD1 (pCad или pYV,70-75 т.п.н.) и pMT1 (pFra,100-110 т.п.н.). Иногда штаммы возбудителя чумы несут криптические плазмиды [1, 13, 25], которые могут представлять собой варианты трех основных плазмид чумного микроба (т.е. содержат инсерции-делеции, являются мультимерными или рекомбинантными вариантами этих плазмид) или могут быть совершенно новыми плазмидами [1, 13, 25, 26]. Для дифференциации штаммов *Y. pestis*, особенно штаммов, выделенных на территории природных очагов чумы стран СНГ и Китая, использовали различия в количестве и размере плазмид [13] и выявили 20 или более различных плазмидных профилей [7] или плазмидоваров [13], которые можно соотнести с местом выделения и фенотипическими характеристиками штаммов [13, 27]. Однако ограниченное количество обнаруженных плазмидоваров снижает диагностическую ценность данного соответствия. Подобно фенотипическим методам, анализ плазмидного состава, как правило, малоэффективен для дифференцировки близкородственных штаммов из одной географической области, как, например, было показано для изолятов из Бразилии [23, 24].

#### Методы генотипирования, основанные на детекции фрагментов ДНК

##### Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Методы генотипирования *Y. pestis*, основанные на изучении полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, включают в себя риботипирование, гель-электрофорез в пульсирующем поле, RFLP-анализ, основанный на изучении расположения в геноме IS-элементов.

**Риботипирование.** У представителей различных биоваров *Y. pestis* опероны рПНК представлены различным количеством копий [7, 14]. Для проведения риботипирования геномную ДНК *Y. pestis* расщепляют рестриктазами EcoRI и EcoRV, далее полученные фрагменты разделяют с помощью гель-электрофореза и проводят Саузерн-блот с использованием зонда 16S-23S рПНК [28]. Показано, что риботипирование обладает ограниченной дискриминирующей способностью. При исследовании данным методом 70 штаммов *Y. pestis*, собранных в течение 72 лет на пяти континентах, выявили только 16 риботипов, при этом 65,7% проанализированных штаммов относилось только к двум риботипам, тогда как в остальные 14 входило не более чем по 3 штамма [28]. Было показано, что риботипы можно соотнести с подвидовой/биоварной принадлежностью штаммов чумного микроба [7, 28, 29] и их PFGE-профилями [30]. Метод риботипирования недавно использовали для доказатель-

ства отсутствия взаимосвязи между вспышками чумы в Алжире и Ливии в 2003 и 2009 гг., вызванных штаммами двух разных биоваров [22]. Аналогичным образом данный метод также успешно использовали для дифференциации штаммов *Y. pestis* из различных природных очагов чумы Китая [31]. Однако из-за низкой дискриминирующей способности и трудоемкости выполнения риботипирование применяли для изучения генетического разнообразия штаммов *Y. pestis* относительно недолго.

**Оценка профилей фрагментов ДНК с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле.** При проведении PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis – гель-электрофорез в пульсирующем поле) геномную ДНК расщепляют различными редкощепляющими рестриктазами и разделяют полученные фрагменты в геле с использованием переменного электрического поля. Этот метод позволяет анализировать геномы отдельных штаммов путем сравнения их RFLP-профилей. При проведении PFGE-анализа штаммов *Y. pestis* разными группами исследователей получали противоречивые результаты. Первоначально PFGE небольшой панели штаммов возбудителя чумы, расщепленных с использованием рестриктаз SpeI или I-CeuI, выявил ограниченное количество пульсотипов, которое коррелировало с биоварной принадлежностью [32, 33]. В другом исследовании показали корреляцию между риботипами и пульсотипами [30]. В дальнейшем установили, что разные колонии одного и того же штамма могут демонстрировать принадлежность к разным пульсотипам, и предположили, что PFGE не подходит для сравнения штаммов *Y. pestis* [28]. Однако в последующих исследованиях не только удалось получить адекватную дифференциацию штаммов чумного микроба, считавшихся гомогенными при тестировании с использованием других молекулярно-генетических методов, например, риботипирования [34–36], но также показать, что пульсотипы оставались неизменными в течение нескольких лабораторных пассажей [34, 36]. Путем PFGE авторы смогли подразделить 17 и 37 штаммов, принадлежащих к риботипу В, из природных очагов Мадагаскара и США [35, 36], на 8 и 26 пульсотипов соответственно, а 22 штамма из Бразилии – на 19 пульсотипов [34]. Однако исследователи не выявили какой-либо сильной корреляции с географическим ареалом выделения штаммов [34–36]. Напротив, изучение при помощи метода PFGE штаммов из Республики Грузия, соседних стран СНГ и провинции Юньнань в Китае выявило корреляцию пульсотипа с регионом выделения [21, 37, 38], вероятно, из-за большей эволюционной дистанции между штаммами, принадлежащими к нескольким внутривидовым группам, и ограниченного географического ареала их распространения. Также использование метода PFGE позволило установить, что причиной вспышек чумы в соседних Алжире и Ливии в 2003 и 2009 гг. соответственно были штаммы двух разных биоваров. В этом же исследовании обнаружили существование небольших различий в пульсотипах изолятов из Алжира в отличие от ливийских штаммов [22]. Таким образом, PFGE обеспечивает определенный уровень дискриминации между штаммами *Y. pestis*. Однако трудоемкость метода и сложности в сравнении результатов между разными лабораториями привели к тому, что он был заменен на более современные методы типирования чумного микроба.

**Методы типирования, основанные на детекции IS-элементов.** Геномы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* содержат четыре типа IS-элементов. В наибольшем количестве копий в геноме *Y. pestis* обнаружен IS100 (75 копий у штамма Antiqua, 30–44 копий у штаммов CO92, KIM, Nepal 516 и 91001). IS1541 в геноме чумного микроба представлен 47–67 копиями; IS285 – 19–25 копиями; а IS1661 – 8–10 копиями [39–42]. Различия в числе и расположении этих генетических элементов на хромосоме и плаزمиде используют для генотипирования штаммов чумного микроба путем риботипирования, PFGE и IS-типирования [7, 14]. Для *Y. pestis* разработано два метода генотипирования с использованием последовательности IS-элементов. Первый метод представляет собой вариант RFLP, где в качестве зонда используется последовательность IS-элемента, а не рПНК, как в риботипировании. В одном из исследований генотипирование изолятов *Y. pestis* проводили при помощи RFLP с последующей гибридизацией полученных фрагментов ДНК с зондом к IS100-элементу, который представлен хотя бы одной копией на каждой из трех плазмид чумного микроба, а также несколькими копиями хромосомной локализации [43]. Секвенирование инсерционной последовательности IS100 провели А.А.Филиппов et al. [44, 45], а затем использовали в сочетании с впервые обнаруженным IS285 для оценки геномного полиморфизма и установления филогенетических взаимоотношений между штаммами чумного микроба [46]. Предложенный метод, сочетающий RFLP с Саузерн-блотом с IS100 и IS285, приобрел популярность для всесторонней характеристики коллекций *Y. pestis*. Наконец, у возбудителя чумы была обнаружена третья инсерционная последовательность (IS1541), которая нарушает ген *inv*, кодирующий инвазин [47]. Сейчас известно, что данный элемент имеет много копий внутри генома чумного микроба, и также может быть использован в качестве ДНК-зонда для RFLP-анализа при геномной дактилоскопии [47, 48]. Местоположения IS1541 в геноме чумного микроба и гены, фланкирующие вставки данной инсерционной последовательности, были определены для штамма *Y. pestis* bv. *orientalis* 6/69 М [48]. Для того чтобы проверить, фланкируют ли те же гены IS1541, авторы использовали пять неродственных между собой штаммов *Y. pestis*, принадлежащих к bv. *orientalis* и bv. *medievalis*, различных риботипов и моделей гибридизации с IS1541, которые были выделены в течение разных временных периодов в разных географических областях. Все штаммы bv. *orientalis* имели вставки IS1541 в одних и тех же местах генома (девять фланкирующих генов были определены), при этом у штаммов bv. *medievalis* одна из вставок отсутствовала. Данные результаты подтвердили, что позиции вставок IS1541 в данных локусах генома представляют собой стабильные события, и подвижность данного элемента внутри генома *Y. pestis* ограничена [48].

IS-RFLP анализ ДНК 49 различных штаммов *Y. pestis*, обработанных рестриктазой EcoRI, с использованием в качестве зонда IS100 элемента, обладал хорошей дискриминационной способностью, позволившей разделить изоляты до уровня биоваров [49]. Также было показано, что при помощи метода IS-RFLP можно различить близкородственные штаммы. Параллельный анализ ДНК 37 штаммов *Y. pestis* из США, предварительно обработанных рестриктазой HindIII

с зондом для IS100 и рестриктазой EcoRI с зондом для IS285, выявил 16 и 4 IS-RFLP типа соответственно, хотя в каждом из анализов большинство штаммов принадлежало к одному типу [36]. Более высокая дискриминирующая способность (59 типов для 61 штамма) была достигнута в методе, названном 3 IS-RLFP, использующем две различные рестриктазы (EcoRI и HindIII) и зонды к трем IS-элементам (IS100, IS285 и IS1541). Метод позволил кластеризовать штаммы в соответствии с биоварной принадлежностью и географическим происхождением, за исключением некоторых штаммов биовара *orientalis*, выделенных на Мадагаскаре [50]. Метод с использованием зондов для двух IS-элементов (IS100 и IS1541), обозначенный 2 IS-RFLP, использовали при расследовании вспышек чумы в Алжире и Ливии. Результаты 2 IS-RFLP продемонстрировали, что причиной вспышек стали штаммы двух различных биоваров, а также метод выявил некоторые различия среди алжирских, но не ливийских штаммов [26]. Трудоемкость метода IS-RFLP помешала его широкому применению на практике и привела к замене более современными подходами.

Второй подход основан на использовании ПЦП, мишенью которой являются известные сайты встраивания IS-элемента в геноме. При этом нуклеотидная последовательность одного из праймеров комплементарна IS-элементу, а другой праймер является сайт-специфичным к локусу, фланкирующему IS-элемент. ПЦП с набором праймеров помогает определить, находится ли IS-элемент в конкретном месте генома. Набор из 27 пар праймеров, нацеленных на детекцию 16 вставок IS100 относительно генома штамма CO92, смог разделить 77 штаммов *Y. pestis* на 15 различных генотипов. Генотипы в основном коррелировали с биоварами, наблюдалась также небольшая географическая корреляция, особенно для штаммов биовара *orientalis* [51]. В другом исследовании определяли местоположение 11 сайтов встройки IS100 у 131 штамма чумного микроба. При этом штаммы разделялись на те же генетические линии, что и при использовании методов VNTR и SNP [3]. Интересно, что данный метод предоставил одно из первых молекулярных свидетельств генетической взаимосвязи между штаммами *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* subsp. *microti* и *Y. pestis* subsp. *pestis* [14] и установил промежуточное положение изолятов subsp. *microti* между представителями *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* subsp. *pestis* [51]. Кроме того, данный метод впервые показал, что некоторые штаммы биоваров *medievalis* и *antiqua* действительно могут принадлежать к одной генетической группе [14, 51], что было подтверждено при использовании других методов генотипирования (sSNP, VNTR), идентифицирующих три основные филогенетические ветви *Y. pestis*. Однако дендрограмма, построенная на основании данных IS100-анализа, не всегда корректно отражала филогенез из-за горячих точек с высокой частотой внутригеномных перестроек, часто ведущих к гомоплазии. IS-типирование по сравнению с sSNP и VNTR не является идеальным методом для классификации и филогенетической реконструкции *Y. pestis* [3].

**DFR-анализ.** Для выявления различий в геномах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, а также среди штаммов *Y. pestis* были использованы супрессионная вычитающая гибридизация – SSH (Suppression Subtractive Hybridization), типирова-

ние с использованием микроэзреев и сравнительный анализ полногеномного секвенса. При проведении SSH выявили область размером 41,7 т.п.н., специфичную для *Y. pestis*, последовательность которой затем использовали для разработки ПЦР-анализа [52]. В следующем проведенном исследовании обнаружили шесть геномных областей, названных дифференцирующими фрагментами, по наличию или отсутствию которых удалось выявить 12 DFR-типов для 78 различных штаммов *Y. pestis* [53]. Еще десять DFR были идентифицированы для небольшого набора штаммов при помощи типирования с помощью микроэзрея, специфичного для генов *Y. pestis* CO92 [54]. Анализ штаммов *Y. pestis* из Китая с использованием SSH и микроэзреев выявил 22 и 4 дифференцирующих фрагмента соответственно [8, 19]. При анализе 23 DFR 909 штаммов *Y. pestis* из Китая были поделены на 32 группы, названные геномоварами [9]. Позднее среди 3044 штаммов *Y. pestis* путем DFR-анализа 23 локусов выявили 52 геномовара [55]. Геномовары коррелировали с определенными экотипами и были специфичны для конкретных очагов чумы [9, 55]. Используя 23 DFR при изучении генетического разнообразия 275 штаммов, выделенных в 27 природных очагах чумы стран СНГ и Монголии, обнаружили 56 геномовара [7]. Кроме того, DFR-анализ использовали для изучения штаммов *Y. pestis*, связанных со вспышками чумы среди людей и/или выделенных в очагах чумы на территории Китая [56–60]. Отсутствие или наличие дифференцирующих фрагментов ДНК можно обнаружить, используя ПЦР и электрофорез для визуализации ее продуктов [8, 19]. Благодаря простоте выполнения и дешевизне, метод можно использовать в любой лаборатории. DFR-типирование штаммов возбудителя чумы позволяет дифференцировать штаммы до уровня подвидов, биоваров [7], а в случае со штаммами *Y. pestis* из Китая метод может быть использован для предварительного определения очаговой принадлежности [9]. Было также показано, что результаты кластеризации штаммов, полученные путем DFR-анализа, коррелируют с другими методами генотипирования при определении филогенетических отношений между основными группами *Y. pestis*. Однако DFR-анализ не обладает высокой дискриминирующей способностью в пределах основной группы штаммов [9], что несколько ограничивает его применение в популяционной генетике, филогеографии или молекулярной эпидемиологии.

**LCB.** Геномные перестройки характерны для штаммов всех биоваров *Y. pestis* [12, 28, 39, 41, 42, 61–65]. При исследовании геномов восьми штаммов *Y. pestis* Liang et al. [65] идентифицировали 61 большой сегмент ДНК, нуклеотидные последовательности которых были консервативны по содержанию и структуре, но демонстрировали значительную изменчивость в расположении и ориентации внутри генома. Авторы назвали эти последовательности локально коллинеарными блоками – LSB (Locally Collinear Blocks) и установили, что соединяющие блоки области точек разрыва состоят из IS-элементов и/или кластеров генов рPHK, которые отвечают за наблюдаемые перегруппировки. Liang et al. [66] разработали метод генотипирования для детекции фрагментов ДНК, связанных с перестройками LCB. Метод основан на ПЦР и агарозном гель-электрофорезе, а праймеры для обнаружения 12 возможных сайтов перестроек LCB были скон-

струированы вблизи и внутри границ данных фрагментов. Секвенирование регионов точек разрыва, содержащихся в ПЦР-продуктах, использовали для подтверждения способа соединения LCB. Данный метод позволил разделить 28 штаммов *Y. pestis* из пяти очагов чумы в Китае на 11 групп, коррелирующих с биоварной принадлежностью и географическим происхождением изолятов. Однако его пригодность для решения вопросов популяционной генетики, филогеографии или молекулярной эпидемиологии требует дальнейшего подтверждения.

**ПЦР с произвольными праймерами.** RAPD-ПЦР – метод генотипирования, который использует один или несколько произвольно выбранных праймеров, амплифицирующих случайные последовательности ДНК разной длины. Образованные фрагменты разделяют при помощи электрофореза, а после сравнивают полученные RAPD-фингерпринты изолятов. Данный метод может быть применен при проведении сравнительных исследований небольшого количества штаммов чумного микроба при отслеживании их распространения и выявлении вспышек инфекции. Однако обнаруженные недостатки, такие как отсутствие воспроизводимости, технические проблемы выполнения, а также сложности в сравнении фингерпринтов [67], ограничивают его применимость. Кроме того, метод показал очень низкую дискриминирующую способность. При тестировании 103 штаммов *Y. pestis* из различных очагов чумы Китая удалось выявить только два RAPD-профиля. Причем большинство штаммов из провинции Цинхай относились к одному типу, а большинство штаммов из других районов Китая принадлежало к другому [68].

**ПЦР с праймерами на повторяющиеся элементы генома.** REP-ПЦР – это метод генотипирования, основанный на амплификации различных последовательностей повторяющихся элементов ДНК, таких как экстрагенные повторяющиеся палиндромы, энтеробактериальный повторяющийся межгенный консенсус–ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) и BOX-элементы. Полученные в ПЦР фрагменты разной длины анализируют методом электрофореза. ERIC-ПЦР и ERIC-BOX-ПЦР применяли для расследования вспышки инфекции в Индии, связанной со штаммами *Y. pestis*. При помощи этих методов были идентифицированы все три биовара, и установлена связь заболевания человека с резервуаром инфекции. При использовании ERIC-BOX-ПЦР не удалось отличить штаммы *bv. medievalis* от *bv. antiqua*. Профили ERIC-ПЦР были сопоставимы с MLVA-типами [69]. Несмотря на успех в этом небольшом исследовании, метод REP-ПЦР не может быть рекомендован в качестве единственного метода генотипирования чумного микроба, особенно если необходимо проанализировать большое количество штаммов, поскольку для других видов микроорганизмов была выявлена низкая воспроизводимость результатов типирования [70].

**Мультилокусный VNTR-анализ.** VNTR – относительно короткие тандемные повторы ДНК, количество копий которых может отличаться у разных штаммов. Изменение числа повторов приводит к изменению размера амплифицируемого фрагмента ДНК. Количество повторов определяют в ПЦР с помощью пары праймеров, фланкирующих целевые VNTR. Тандемные повторы большого размера определяют с помо-

щью стандартного электрофореза, а повторы меньшего размера, могут быть детектированы при помощи электрофореза в полиакриламидном геле или путем капиллярного электрофореза, так как требуют более высокой разрешающей способности метода детекции. Анализ нескольких локусов VNTR также известен как MLVA [71]. Первым VNTR, который был использован для типирования штаммов чумного микроба, был повтор CAAA. При исследовании 35 штаммов *Y. pestis* авторы обнаружили 9 аллелей данного повтора [72]. В последующем при анализе доступных полногеномных сиквенсов *Y. pestis* идентифицировали гораздо больше VNTR с разным размером повторяющихся единиц [73–75].

Несколько исследований провели с использованием двух разработанных оригинальных MLVA-систем. Одна из них (MLVA43) первоначально основывалась на анализе 42 локусов VNTR [73], но позднее была модифицирована путем удаления трех локусов и добавления четырех других [76]. Другая схема (MLVA25) содержала праймеры для амплификации 25 локусов VNTR, семь из которых авторы рекомендовали для быстрого сравнения вновь выявленных штаммов с генотипами, включенными в созданную базу данных [74, 77]. Семь локусов VNTR для двух схем анализа были общими [75, 77].

Схему MLVA25 создали, основываясь на анализе трех штаммов *Y. pestis* [74], и затем использовали для изучения внутривидового разнообразия 180 штаммов чумного микроба, 61 генотип которых для дальнейшего сравнения был внесен в сформированную базу данных [77]. При исследовании в MLVA25 более 500 штаммов *Y. pestis*, выделенных большей частью на территории Китая удалось выявить 350 генотипов [78], а изучение 100 штаммов *Y. pestis* из 37 регионов Монголии выявило 65 генотипов, 54 из которых были описаны впервые [79]. MLVA25 адаптировали для полевых условий с использованием биоанализатора Agilent 2100 [80, 81], а 14 из 25 MLVA локусов используют в методе анализа кривых плавления высокого разрешения (HRMA – High-Resolution Melting Analysis) [82].

MLVA43 использовали для более разнообразных видов исследований. Первоначально показали, что данный метод способен разделить не только набор из 12 глобально распространенных штаммов *Y. pestis*, но и 12 штаммов из округа Сискию, Калифорния [73]. Данный метод продемонстрировал высокую дискриминационную способность при исследовании штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (102 генотипа среди 104 тестируемых изолятов) [3], анализе штаммов *Y. pestis*, выделенных от павших луговых собачек в Аризоне [76], а также при проведении мониторинга за очагами чумы на территории Мадагаскара [83]. В двух работах доказали пространственные закономерности распределения MLVA43-типов [76, 83], подтверждая пригодность метода для проведения филогеографических исследований. Однако при проведении аналогичного исследования на 48 штаммах *Y. pestis* из Казахстана большинство изолятов попало в неразделенную политомию и мало соотносилось с известными очагами чумы [84]. MLVA43 также успешно использовали для изучения краткосрочной микроэволюции чумного микроба в вымершей колонии луговых собачек и для анализа десятилетней серии вспышек инфекции в Махаджнге на Мадагаскаре [85], выявляя различные пространственные и

временные закономерности соответственно. Метод полезен для изучения штаммов из одной географической области, а также штаммов, выделенных на протяжении какого-то временного периода, так как в этом варианте анализа используют большее число VNTR с очень высокими темпами мутаций по сравнению с системой MLVA25. Экспериментально подтверждено, что скорость мутаций отдельных локусов VNTR достигает  $3,7 \times 10^{-4}$  мутаций/генераций, а общая скорость мутаций метода MLVA43 достигает  $1,1 \times 10^{-3}$  мутаций/генераций [76, 86].

Lowell et al. [87] использовали 17 из 43 локусов MLVA для анализа 13 наборов штаммов чумного микроба, собранных при эпидемиологическом мониторинге за природными очагами инфекции на юго-западе США. Авторам удалось связать штаммы, выделенные от людей, с предполагаемыми источниками инфекции, что еще раз продемонстрировало полезность метода MLVA для проведения эпидрасследований. Особый интерес представлял анализ штамма чумного микроба, выделенного в 2002 г. от человека в Нью-Йорке, не эндемичном для данной инфекции. Авторы установили, что заражение пациента произошло в Нью-Мексико, исключив тем самым случай биотерроризма. Kingston et al. [69] использовали вариации MLVA7 и MLVA25 для анализа небольшого набора штаммов *Y. pestis* из Индии, связанных со вспышкой чумы, и не нашли совпадений с генотипами, находящимися в глобальной базе данных, демонстрируя высокую дискриминационную способность даже небольшого числа локусов VNTR. X.Zhang et al. [88] отобрали 14 наиболее повторяющихся/больших VNTR-локусов из схем MLVA25 и MLVA43 и использовали их для анализа 213 штаммов *Y. pestis* из различных очагов чумы в Китае. Авторы идентифицировали 84 генотипа, которые соответствовали биофармам и очагам выделения чумного микроба. С использованием 11 локусов VNTR из MLVA25, а также одного VNTR локуса из работы Adair et al. [72], Oliveira et al. [89] исследовали 20 штаммов *Y. pestis* с эпизоотической вспышки в Sítio Alagoinha (Бразилия) в 1967 г. и 17 штаммов со вспышки там же в 1986 г. В отличие от предыдущих неудачных попыток генотипирования, в которых штаммы не обладали различиями, анализ на основе VNTR обеспечил 100% разделение 37 штаммов *Y. pestis* и также идентифицировал три генетические группы, которые коррелировали с географическим/временным происхождением штаммов [89].

Недавно разработали третью схему MLVA-типирования (MLVA14+12), включающую анализ 14+12 VNTR, результаты которой были сопоставимы с SNP-типированием. Эти VNTR обеспечивали 100% разделение 97 штаммов *Y. pestis*, представлявших 21 субпопуляцию SNP. Из использованных 14 и 12 VNTR 9 и 8 соответственно были взяты из схем MLVA43 и/или MLVA25, тогда как оставшиеся 5 и 4 были описаны впервые. Набор из 956 штаммов *Y. pestis*, проанализированный с помощью иерархической системы MLVA14+12, позволил получить паттерны кластеризации, в основном согласующиеся с SNP-анализом, и предоставил базу данных для будущих сравнений. Авторы отметили, что эта система обеспечивала дискриминацию при одновременном сокращении времени и затрат и минимизации возможного искажения гомоплазии, вызванного быстро мутирующими локусами VNTR [75].

Таким образом, MLVA обладает наибольшей дискриминационной способностью среди всех методов генотипирования *Y. pestis*, основанных на анализе фрагментов ДНК, разделяя штаммы на основе их биоварной принадлежности и/или популяционной структуры [3, 69, 73–75, 77, 78, 84, 88], географического происхождения [75, 76, 78, 83, 88, 89] и даже времени выделения [85]. Метод отличается высокой воспроизводимостью и возможностью обмена данными между лабораториями. MLVA успешно использовали для дифференциации глобально распространенных штаммов [3, 73, 77, 78], изолятов, выделенных в одном регионе [73, 76, 78, 79, 83, 84, 88, 89], и даже при изучении локальных вспышек инфекции [73, 85]. Хотя MLVA успешно разделяет группы штаммов *Y. pestis* в соответствии с различными критериями, филогенетические связи между ними могут быть искажены из-за мутационного насыщения, которое может быстро происходить в развивающихся локусах VNTR [3, 90, 83]. Определенные успехи в решении данных ограничений получили при использовании иерархического подхода в методе MLVA14+12 [75]. Однако общая дискриминационная способность данной системы, вероятно, ниже, чем у MLVA43, поскольку в ней отсутствуют некоторые из самых разнообразных локусов [75, 86]. Данные, полученные при выполнении MLVA штаммов *Y. pestis*, в основном согласуются с результатами других методов генотипирования, например, с позиционным IS-типированием, DFR-анализом, CRISPR-анализом и SNP-типированием [72, 78, 79, 83, 85].

#### Методы генотипирования, основанные на секвенировании

**Анализ 16S и 23S рPHK.** Гены 16Sp PHK *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* идентичны на 100%. Сообщалось о существовании только одного сайта SNP в гене 23S рPHK у двух данных видов [91]. Таким образом, данный метод не подходит для идентификации иерсиний на уровне вида и их генотипирования.

**Мультилокусное секвенирование.** MLST (Multilocus Sequencing Typing) – один из методов молекулярного типирования, позволяющий оценить варибельность нуклеотидных последовательностей нескольких генов одновременно [5]. Схемы анализа направлены на 6 различных генов, которые распределены по геному так, чтобы избежать связи между ними. Схему MLST-анализа, включающую фрагменты генов 16Sp PHK, *glnA*, *gyrB*, *recA* и *hsp60*, использовали для типирования 58 штаммов, принадлежащих ко всем известным видам внутри рода *Yersinia*. Данный метод смог отделить штаммы *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis*, но оказался непригодным для субтипирования штаммов чумного микроба из-за низкого количества обнаруженных полиморфизмов [92]. Схему MLST, включающая анализ полиморфизма 5 генов «домашнего хозяйства» (*thrA*, *trpE*, *glnA*, *tmk*, *dmsA*) и одного гена, отвечающего за биосинтез липополисахарида (*manB*), использованная для типирования 36 штаммов *Y. pestis*, 12 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 13 штаммов *Y. enterocolitica*, не выявила различий среди штаммов чумного микроба, но обнаружила идентичные или почти идентичные последовательности для штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, что позволило предположить, что чумной микроб образовался путем дивергенции от *Y. pseudotuberculosis*

примерно 1500 и 20 000 лет назад [49]. Аналогичную схему MLST применили для изучения генетического полиморфизма девяти штаммов группы *Y. pestis* subsp. *microti*, показав при этом, что данные штаммы более близки *Y. pestis* subsp. *pestis*, чем *Y. pseudotuberculosis* [3]. MLST 46 штаммов *Y. pestis* из Республики Грузии и стран СНГ с использованием большего числа локусов (гены 16S рPHK, *hsp60*, *glnA*, *gyrB*, *recA*, *manB*, *thrA* и *tmk*, а также *caf1*, *lcrV*, *psaA* и *pla*) выявил два сиквенс-типа, отличавшихся одним полиморфизмом в двух генах и отделявших «грузинские» штаммы от «негрузинских» [21]. Другую схему MLST, нацеленную на фрагменты генов «домашнего хозяйства» (*adk*, *argA*, *aroA*, *glnA*, *thrA*, *tmk* и *trpE*), использовали для анализа 1015 штаммов патогенных иерсиний, в том числе и 52 штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы Китая и других стран. Схема типирования позволила успешно отличить *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis*, используя лишь один полиморфизм в локусе гена *trpE*, но обнаружила очень мало вариаций внутри штаммов возбудителя чумы. В данном исследовании было выявлено четыре сиквенс-типа среди штаммов чумного микроба, три из которых были уникальны для отдельных штаммов [93]. Секвенирование других фрагментов генома возбудителя чумы (ген *lcrV* и локус *pgm*) также не позволило идентифицировать генетический полиморфизм, пригодный для типирования штаммов [72, 94]. В целом при помощи MLST подтвердилась идея о том, что *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, скорее всего, являются двумя линиями одного вида [49, 92]. Данный метод не подходит для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба из-за его низкой разрешающей способности.

Разработанная на основе MLST методика для быстрой индикации и идентификации трех возбудителей особо опасных инфекций (*Bacillus anthracis*, *Y. pestis* и *Francisella tularensis*) продемонстрировала потенциальную возможность дифференциации штаммов чумного микроба. Данный метод состоит из двух отдельных анализов, основанных на микрофлюидике, которые нацелены на десять локусов для каждого из трех потенциальных агентов биотерроризма. Первый анализ состоит из мультиплексной ПЦП, которая позволяет идентифицировать каждого из возбудителей, основываясь на его уникальном электрофоретическом профиле. Второй анализ связан с нетрадиционным анализом, подобным MLST, который направлен на секвенирование определенных локусов в геноме и обеспечивает дополнительную дискриминацию штаммов. Благодаря целевым локусам, которые включают как хромосомные, так и плазмидные мишени, методика при тестировании панели из 34 штаммов *Y. pestis* позволяла успешно дифференцировать отдельные биовары [95].

**CRISPR-анализ.** Элементы CRISPR состоят из коротких палиндромных повторов размером 21–37 п.н., разделенных спейсерами сопоставимого размера [96]. Типирование штаммов на основе CRISPR возможно благодаря высокой степени полиморфизма спейсеров. У *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* существует три локуса CRISPR: YPa, YPb и YPc (также называемые YP1, YP2 и YP3 соответственно), причем локус YPa является наиболее варибельным [10, 97]. С. Pourcel et al. [10] впервые описали изменчивость локусов CRISPR для штаммов *Y. pestis*, идентифицировав 21, 9 и

3 аллеля, которые были результатом различных комбинаций 26, 14, и 5 различных спейсеров для YPa, YPb и YPc. G.Vergnaud et al. [98] идентифицировали дополнительные уникальные спейсеры в локусе YPa штаммов *Y. pestis*, после чего их общее количество достигло 71. Cui et al. [97] проанализировали все три локуса CRISPR в шести доступных полногеномных последовательностях чумного микроба, а также у 125 штаммов *Y. pestis* из 26 природных очагов чумы Китая, Монголии и стран СНГ. В данном исследовании идентифицировали 35, 16 и 7 аллелей 83, 37 и 11 спейсеров в локусах YPa, YPb и YPc соответственно и обнаружили 49 CRISPR-типов для 131 штамма *Y. pestis*. Распределение CRISPR-типов, а также отдельных спейсеров среди штаммов коррелировало с природными очагами чумы, что указывает на возможность использования данного метода для филогенетического анализа. В дальнейшем при анализе 100 штаммов *Y. pestis* из 37 районов Монголии обнаружили в общей сложности 14 CRISPR-типов, шесть из которых были описаны впервые [79]. Недавно выполненный анализ полиморфизма локусов CRISPR у 128 штаммов *Y. pestis* из Бразилии выявил 16 и 5 новых спейсеров в локусах YPa и YPb соответственно [99].

Данный метод может быть использован для проведения филогенетических исследований. CRISPR-анализ близкородственных штаммов *Y. pestis* позволил определить правила эволюции локусов CRISPR [10], а исследование разнообразной коллекции изолятов чумного микроба – предположить, какой CRISPR-тип имел предок современных штаммов *Y. pestis* [98]. В ходе исследования большого числа штаммов из Китая и стран СНГ был предложен эволюционный сценарий *Y. pestis*, а также пути распространения штаммов [94]. Анализ 128 генетически гомогенных изолятов чумного микроба из 5 очагов чумы в Бразилии выявил ограниченное число уникальных CRISPR-типов, причем большинство штаммов принадлежало к одному CRISPR-типу [99].

В целом было показано, что данные CRISPR-анализа при проведении типирования чумного микроба согласуются с результатами кластеризации штаммов на основе SNP, DFR и MLVA [9, 79, 97, 99]. Таким образом, CRISPR-типирование может быть эффективным методом внутривидовой дифференциации, когда не требуется высокий уровень дискриминации, хотя необходимо учитывать стоимость секвенирования фрагментов ДНК.

**Полногеномное секвенирование.** Данные по полногеномному секвенированию *Y. pestis* растут быстрыми темпами. Первый полногеномный сиквенс был сделан для штамма *Y. pestis* CO92 из Северной Америки [41]. Это дало новый толчок исследованиям по выявлению потенциальных полиморфных локусов, которые можно было бы использовать в различных схемах субтипирования штаммов чумного микроба [51, 73, 77]. Затем выполнили полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* KIM10+ (популяция 2.MED, биовар *medievalis*) [40], *Antiqua* (популяция 1.ANT, биовар *antiqua*), Nepal516 (популяция 2.ANT, биовар *antiqua*) [39] и 91001 (популяция 0.PE4 биовар *microti*) [42]. После чего было опубликовано еще несколько полногеномных сиквенсов для штаммов чумного микроба из различных природных очагов инфекции в странах СНГ и Китае, включающих штаммы Pestoides F [63], B42003004, K1973002, E1979001, F1991016

[62], D106004, D182038 [64, 68], Z176003 [64] и 2501 [100]. Полногеномные сиквенсы получили для штаммов из Африки: Angola [12] и UG05-0454 (популяция 1.ANT, биовар *antiqua*) [5] и штамма S3 из Индии (биовар *antiqua*) [101]. Дополнительно провели полногеномное секвенирование штаммов 1.ORI (биовар *orientalis*), в том числе из Северной Америки: FV-1 [102], CA88-4125 [61], 90A-4021, 92A-4261, 97A-7970 [103] и EBD10-058 [104]; La Paz из Боливии [103]; INS из Перу [105]; 9, 113 и 24H из Индии [101]; MG05-1020 и IP275 из Мадагаскара; и IP674 из Турции [5]. Черновое полногеномное секвенирование также было проведено для штаммов из стран СНГ и Монголии 0.PE2 (биовар *caucasica*) C-537, C-590, C-290, C-197, C-235, C-267, C-359, C-291, C-346, C-666 [106], C-746, C-824, C-739, C-712, C-370, C-535, C-678, C-700 [107]; 0.PE4B (биовар *altaica*) I-3455, A-513 [106], I-3442, I-3443, I-3446, I-3447, I-3515, I-3516, I-3517, I-3518, I-3519 [108]; 0.PE4B (биовар *talassica*) A-1804, A-1807 [106]; 0.PE4B (биовар *hissarica*) 5307-Gis; 0.PE4C (биовар *xilingolensis*) I-3134; 0.PE5 (биовар *ulegeica*) I-3189, I-2422, I-2239 [106], I-2231, I-2238, I-3190, I-2236, I-2457 [109]. Все вышеперечисленные полногеномные сиквенсы предоставили достаточно данных для сравнения геномов и исследования микроэволюции и распространения штаммов *Y. pestis*.

Кроме этого, полногеномное секвенирование проводили для решения более конкретных задач. Так, секвенирование полного генома штамма *Y. pestis* KIMD27 подчеркнуло важность устранения ошибок секвенирования при сравнении геномов, особенно между близкородственными штаммами [110]. Полногеномный сиквенс нескольких вариантов штамма *Y. pestis* EV76 (EV76-CH) из Китая выявил полиморфизмы, которые могут использоваться при изучении истории распространения линий данного вакцинного штамма [111]. Проведение черного полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis* от жертв «Черной смерти» в 1348–1350 гг. в Лондоне позволило понять происхождение второй пандемии инфекции [112]. Кроме того, черновое полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* от жертв Юстиановой чумы помогло выявить источник первой пандемии [113]. Cui et al. [4] секвенировали геномы 118 штаммов чумного микроба из Китая, стран СНГ и Монголии для изучения филогении вида *Y. pestis* и поиска общего предшественника. Gibbons et al. [114] секвенировали девять штаммов *Y. pestis*, выделенных во время сезонной вспышки чумы 2009 г. в Нью-Мексико. Vogler et al. [85] секвенировали четыре штамма чумного микроба, изолированных во время вспышек чумы на Мадагаскаре в 1990-х гг.

В целом за последние годы полногеномное секвенирование превратилось из единичных исследований, полезных для обнаружения полиморфных локусов для последующего изучения большего количества штаммов с помощью других молекулярно-генетических методов, в самостоятельный метод генотипирования.

Полногеномное секвенирование штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 подтвердило тесную генетическую связь между возбудителями псевдотуберкулеза и чумы, выявив, что с момента отделения от *Y. pseudotuberculosis* чумной микроб приобрел 32 хромосомных гена [115]. Существование небольших генетических отличий между двумя видами создает проблему для разработки надежных видоспецифиче-



ских методов идентификации *Y. pestis*. Различия внутри геномов штаммов *Y. pestis* встречаются достаточно редко и могут представлять собой SNP, вставки, делеции, различия в расположении IS-элементов и внутригеномные перестройки [4, 5, 12, 39, 40–42, 61–65, 85, 102–105, 110–114, 116]. Геномные перестройки, связанные с вставками инсерционных последовательностей, являются наиболее часто встречающимися для штаммов *Y. pestis*, что было отмечено в ряде полногеномных исследований [12, 39, 40–42, 61–65]. На поиске различий в расположении IS-элементов основываются ряд методов типирования чумного микроба, таких как PFGE, IS-RFLP, позиционное IS-типирование [7, 14]. Полиморфизм единичных нуклеотидов, обнаруженный при помощи сравнения полногеномных последовательностей, оказал большое влияние на типирование *Y. pestis*, что позволило детально реконструировать филогению чумного микроба [4, 5, 72]. Хотя SNP очень полезны, но относительно редки из-за происхождения и низкой частоты встречаемости. Несмотря на относительно низкую частоту встречаемости SNP происхождения чумного микроба встречаются редко, они могут служить высокоинформативными маркерами при проведении генотипирования штаммов возбудителя чумы и изучения их филогенетических взаимоотношений, почти не проявляя гомоплазии [4, 5, 72].

**SNP-анализ.** Увеличение количества данных, полученных при полногеномном секвенировании штаммов, привело к росту выявления SNP, проведению филогенетического анализа и определению микроэволюции и путей распространения *Y. pestis*. M.Achtman et al. [3] впервые провели анализ 3250 ортологичных кодирующих последовательностей трех доступных на тот момент геномов *Y. pestis* (штаммы CO92, KIM10+ и 91001) и выявили среди них 76 синонимичных SNP (sSNP). Скрининг 105 различных штаммов чумного микроба на основе денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) выявил 4 дополнительных sSNP и позволил построить первое филогенетическое дерево для *Y. pestis*, содержащее три основных ветви (0, 1 и 2), восемь основных популяций (0.PE1, 0.PE2, 0.PE3, 0.PE4, 1.ANT, 1.ORI, 2.ANT и 2.MED), а также провести оценку возраста для точек ветвления. Это филогенетическое деление соответствовало классической номенклатуре биоваров, что привело M.Achtman et al. [3] к предложению новой номенклатуры вида, основанной на названиях ветвей дендрограммы, содержащих ссылки на соответствующие им биовары (т.е. PE для биовара *microti* (PEstoides), ANT для биовара *ANTiqua*, MED для биовара *MEDievalis* и ORI для биовара *ORientalis*). Это исследование определило, что биовар *antiqua* состоит как минимум из двух отдельных популяций 1.ANT и 2.ANT из Африки и Азии соответственно, что дискредитировало гипотезу Devignat [15], связывающую три классических биовара с тремя пандемиями чумы [3].

Позднее при анализе 17 полногеномных сиквенсов обнаружили 933 SNP, которые использовали для изучения генетического многообразия 286 штаммов *Y. pestis*, выделенных в различных местах мира. При построении расширенного филогенетического дерева идентифицировали еще несколько популяций, позволяющих сделать многочисленные выводы о микроэволюции и распространении штаммов чумного микроба. В частности, предположили, что образование

*Y. pestis* произошло, скорее всего, на территории Китая или вблизи от него, а затем в результате многочисленных эпидемий и пандемий возбудитель распространился по миру. Временная оценка при использовании филогении в сочетании с историческими записями позволяет предположить, что чума пришла в Западную Азию по Великому Шелковому Пути, а в Африку – морским путем из Китая [5].

Совсем недавно было проведено еще одно обширное исследование с использованием 2326 SNP, обнаруженных при анализе 133 полногеномных сиквенсов чумного микроба. Результаты работы еще более уточнили филогению *Y. pestis*, выявив при этом дополнительные ветви, а также несколько политомий, включающих одну во время пандемии чумы, названной «Черной смертью», и вторую в основании группы 1.ORI, отвечающей за третью пандемию. Анализ молекулярных часов в этом исследовании показал значительное изменение скорости фиксации SNP в течение филогении, возможно, из-за чередования эндемического и эпидемического периодов. Что касается микроэволюции и распространения штаммов *Y. pestis*, данное исследование подтвердило происхождение чумы в Китае, а также предположительно сузило этот ареал до Тибетского нагорья. Кроме того, авторы высказали предположение, что штамм Angola может быть родственен штамму, ответственному за Юстинианову чуму [4], а гипотезу, связывающую распространение штаммов ветви 1.ANT морскими путями из Китая, опровергли [4, 5].

SNP-анализ также может быть использован при исследовании различных по размеру выборок штаммов, отличающихся по географическим ареалам и продолжительности времени выделения. Morelli et al. [5] представили анализ экспансии штаммов *Y. pestis* в США и на Мадагаскаре, основанный на SNP. В независимом исследовании 262 штаммов *Y. pestis* из 25 районов Мадагаскара за период 1939–2005 гг. провели анализ набора из 56 SNP и 43 локусов VNTR (MLVA43). SNP-анализ выявил существование несколько групп штаммов и был использован в качестве средства валидации результатов MLVA43, который продемонстрировал более высокую дискриминационную способность [83]. Riehm et al. [79] использовали MLVA25 для подразделения 100 монгольских штаммов чумного микроба на 65 MLVA25-типов, образующих шесть кластеров. Авторы провели выборочное SNP-типирование для некоторых штаммов, чтобы связать обнаруженные при помощи MLVA25 кластеры с ранее идентифицированными группами на основе SNP-анализа.

Хотя обнаружение SNP для *Y. pestis* напрямую зависит от доступности данных полногеномного секвенирования, скрининг SNP проводят несколькими способами. Могут быть использованы ПЦП-амплификация и секвенирование [79], мультиплексный анализ Lumiplex [111]. Денатурирующая ВЭЖХ применялась как метод генотипирования известных SNP и обнаружения дополнительных SNP в двух крупных глобальных исследованиях [3, 5]. Масс-спектрометрия MALDI-TOF (MS) была использована в качестве метода скрининга для панелей SNP разного размера как для большого (900), так и для небольшого (19) количества [5, 102]. Анализ мутационной амплификации по несоответствию расплава (Melt-MAMA) очень универсален и использовался для скрининга большой коллекции штаммов *Y. pestis* из Мада-

гаскара по 77 SNP с дополнительным скринингом SNP с использованием анализа TaqMan-минорной бороздки (MGB) [83, 85]. ПЦР-анализ TaqMan в реальном времени особенно хорошо подходит в случаях, когда требуется высокая чувствительность. Vogler et al. [117] разработали два анализа TaqMan-MGB, нацеленных на SNP, специфичные для североамериканского штамма *Y. pestis* CO92 соответственно, и проверили их на панели из 116 разнообразных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Кроме того, McAvin et al. [118] разработали специфичный для *Y. pestis* анализ Taqman для развертываемого в полевых условиях термоциклера RAPID, хотя о целевом SNP не сообщалось, как и об идентичности протестированных штаммов *Y. pestis* филогенетическим группам.

### Заключение

Успешность подхода для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* зависит от нескольких факторов, а именно метода, выбранного для типирования, а также конкретных задач, которые должны быть решены в процессе типирования. Ключевыми факторами по отношению к *Y. pestis* является общее низкое внутривидовое разнообразие, относительно недавнее происхождение (данный микроорганизм является эволюционно «молодым»), клональность и различные типы вариаций, присутствующие в геноме возбудителя чумы (наличие различных геномных перестроек, IS-элементов, VNTRs и SNPs). Несколько методов типирования успешно применяли для идентификации вида *Y. pestis* и его двух подвидов. Меньшее число методов являются применимыми для дальнейшей дифференциации штаммов чумного микроба до отдельных биоваров или даже до конкретной очаговой географической приуроченности. Успех типирования зависит от выбранной мишени, частоты мутаций и подверженности конвергентной эволюции. Таким образом, при использовании VNTR-локусов возможно различить даже очень близкородственные штаммы чумного микроба, что делает этот метод особенно успешным при проведении эпидемиологических исследований. В свою очередь, SNP-типирование позволяет точно определять филогенетические связи между штаммами, тем самым предоставляя информацию о появлении и распространении *Y. pestis*. В настоящее время кажется очевидным, что полногеномное секвенирование является предпочтительным методом генетической характеристики штаммов чумного микроба. Однако этот молекулярно-генетический подход до сих пор остается дорогостоящим и не подходит для рутинных лабораторных исследований. В связи с этим поиск SNP является предпочтительным методом типирования при проведении филогенетических исследований, а для обеспечения дополнительной дискриминационной силы лучше использовать MLVA.

### Финансирование

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

### Литература/References

- Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev. 1997 Jan;10(1):35-66.
- Galimand M, Guiyoule A, Gerbaud G, Rasoamanana B, Chanteau S, Carniel E? et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. N Engl J Med. 1997 Sep 4;337(10):677-80. DOI: 10.1056/NEJM199709043371004
- Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 21;101(51):17837-42. Epub 2004 Dec 14. DOI: 10.1073/pnas.0408026101.
- Cui Y, Yu C, Yan Y, Li D, Li Y, Jombart T, et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 8;110(2):577-82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110
- Morelli G, Song Y, Mazzoni CJ, Eppinger M, Roumagnac P, Wagner DM, et al. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1140-3. DOI: 10.1038/ng.705
- Keim PS, Wagner DM. Humans and evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. Nat Rev Microbiol. 2009 Nov; 7(11):813-21. DOI: 10.1038/nrmicro2219
- Platonov ME, Evseeva VV, Dentovskaya SV, Anisimov AP (2013) Molecular typing of *Yersinia pestis*. Mol Gen Mikrobiol Virusol. 2013 Apr;2:3–12.
- Dai E, Tong Z, Wang X, Li M, Cui B, Dai R, et al. Identification of different regions among strains of *Yersinia pestis* by suppression subtractive hybridization. Res Microbiol. 2005 Aug;156(7):785-9. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.02.012
- Li Y, Dai E, Cui Y, Li M, Zhang Y, Wu M, et al. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. PLoS One. 2008 May 14;3(5): e2166. DOI: 10.1371/journal.pone.0002166
- 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 Mar;151(Pt 3):653-63. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0
- Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. Clin Genet. 2000 Oct;58(4):250-64.
- Eppinger M, Worsham PL, Nikolich MP, Riley DR, Sebastian Y, Mou S, et al. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. J Bacteriol. 2010 Mar;192(6):1685-99. DOI: 10.1128/JB.01518-09
- Anisimov AP1, Lindler LE, Pier GB. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin Microbiol Rev. 2004 Apr;17(2):434-64. DOI: 10.1128/cmr.17.2.434-464.2004
- Lindler LE. Typing methods for the plague pathogen, *Yersinia pestis*. J AOAC Int. 2009 Jul-Aug;92(4):1174-83.
- Devignat R. Varietes de l'espece *Pasteurella pestis*: nouvelle hypothese. Bull World Health Organ. 1951;4(2):247-63.
- Одиноков ГН, Ерошенко ГА, Кутырев ВВ. Сравнительный анализ структуры гена *invY* штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов. Проблемы особо опасных инфекций. 2009;2(100):50-52. / Odinokov GN, Eroshenko GA, Kutyrev VV Comparative Analysis of *invY* Gene Structure in Strains of Plague and Pseudotuberculosis Agents. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2009;2(100):50-52. (In Russian).
- Zhou D, Han Y, Song Y, Huang P, Yang R. Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis*. Microbes Infect. 2004 Nov;6(13):1226-34. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.08.002.
- Zhou D, Tong Z, Song Y, Han Y, Pei D, Pang X, et al. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. J Bacteriol. 2004 Aug;186(15):5147-52. DOI: 10.1128/JB.186.15.5147-5152.2004
- Zhou D, Han Y, Song Y, Tong Z, Wang J, Guo Z, et al. DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. J Bacteriol. 2004 Aug;186(15):5138-46. DOI: 10.1128/JB.186.15.5138-5146.2004
- Kiefer D, Dalantai G, Damdindorj T, Riehm JM, Tomaso H, Zöller L, et al. Phenotypical characterization of Mongolian *Yersinia pestis* strains. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012 Mar;12(3):183-8. DOI: 10.1089/vbz.2011.0748

21. Revazishvili T, Rajana C, Bakanidze L, Tsertsvadze N, Imnadze P, O'Connell K, et al. Characterisation of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. *Clin Microbiol Infect.* 2008 May;14(5):429-36. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.01953.x
22. Cabanel N, Leclercq A, Chenal-Francisque V, Annajar B, Rajerison M, Bekkhoucha S. Plague outbreak in Libya, 2009, unrelated to plague in Algeria. *Emerg Infect Dis.* 2013 Feb;19(2):230-6. DOI: 10.3201/eid1902.121031
23. Cavalcanti YV, Leal NC, De Almeida AM. Typing of *Yersinia pestis* isolates from the state of Ceara, Brazil. *Lett Appl Microbiol.* 2002;35(6):543-7.
24. Leal NC, de Almeida AM, Ferreira LC. Plasmid composition and virulence-associated factors of *Yersinia pestis* isolates from a plague outbreak at the Paraiba State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1989 Sep-Oct;31(5):295-300. DOI: 10.1590/s0036-46651989000500001.
25. Eppinger M, Radnedge L, Andersen G, Vietri N, Severson G, Mou S, et al. Novel plasmids and resistance phenotypes in *Yersinia pestis*: unique plasmid inventory of strain Java 9 mediates high levels of arsenic resistance. *PLoS One.* 2012; 7(3):e32911. DOI: 10.1371/journal.pone.0032911
26. Chu MC, Dong XQ, Zhou X, Garon CF. A cryptic 19-kilobase plasmid associated with US isolates of *Yersinia pestis*: a dimer of the 9.5-kilobase plasmid. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Nov;59(5):679-86. DOI: 10.4269/ajtmh.1998.59.679
27. Dong X, Ye F, Peng H. Geographic distribution and feature of *Yersinia pestis* plasmid isolated from Yunnan province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2001 Oct;22(5):344-7.
28. Guiyoule A, Grimont F, Iteman I, Grimont PA, Lefèvre M, Carniel E. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J Clin Microbiol.* 1994 Mar;32(3):634-41.
29. Eroshenko GA, Pavlova AI, Kukleva LM, Shavina Nlu, Kutyrev VV. Genotyping of *Yersinia pestis* strains on the basis of variation of ribosomal rRNA biosynthesis genes. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2007 May-Jun;(3):6-10.
30. Hai R, Yu DZ, Wei JC, Xia LX, Shi XM, Zhang ZK, Zhang EM. Molecular biological characteristics and genetic significance of *Yersinia pestis* in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2004 Jun;25(6):509-13.
31. Wei JC, Yu DZ, Hai R. The geographical distribution of ribotypes of *Yersinia pestis* in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2003 Nov;24(11):1027-30.
32. Lucier TS, Brubaker RR. Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 1992 Apr;174(7):2078-86. DOI: 10.1128/jb.174.7.2078-2086.1992
33. Rakin A, Heesemann J. The established *Yersinia pestis* biovars are characterized by typical patterns of I-CeuI restriction fragment length polymorphism. *Mol Gen Microbiol Virusol.* 1995 Jul-Sep;(3):26-9.
34. Barros MP, Silveira-Filho VM, Lins RH, Oliveira MB, Almeida AM, Leal-Balbino TC. Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Genet Mol Res.* 2013 Apr 17;12(2):1294-302. DOI: 10.4238/2013
35. Guiyoule A, Rasoamanana B, Buchrieser C, Michel P, Chanteau S, Carniel E. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *J Clin Microbiol.* 1997 Nov;35(11):2826-33.
36. Huang XZ, Chu MC, Engelthaler DM, Lindler LE. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1164-73. DOI: 10.1128/jcm.40.4.1164-1173.2002
37. Shi L, Ye R, Dong S, Guo Y, Yang G, Zhang R, et al. Genotyping and its epidemiological significance on Yunnan *Yersinia pestis* under Fse I enzyme digestion method. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2014 Feb;35(2):182-5.
38. Zhang Z, Hai R, Song Z, Xia L, Liang Y, Cai H, et al. Spatial variation of *Yersinia pestis* from Yunnan Province of China. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Oct;81(4):714-7. DOI: 10.4269/ajtmh.2009.09-0174.
39. Chain PS, Hu P, Malfatti SA, Radnedge L, Larimer F, Vergez LM, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. *J Bacteriol.* 2006 Jun;188(12):4453-63. DOI: 10.1128/JB.00124-06
40. Deng W, Burland V, Plunkett G 3rd, Boutin A, Mayhew GF, Liss P, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J Bacteriol.* 2002 Aug;184(16):4601-11. DOI: 10.1128/jb.184.16.4601-4611.2002
41. Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature.* 2001 Oct 4; 413(6855):523-7. DOI: 10.1038/35097083
42. Song Y, Tong Z, Wang J, Wang L, Guo Z, Han Y, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Res.* 2004 Jun 30;11(3):179-97. DOI: 10.1093/dnares/11.3.179
43. Portnoy DA, Falkow S. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* 1981 Dec;148(3):877-83.
44. Filippov AA, Solodovnikov NS, Kookleva LM, Protsenko OA. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. *FEMS Microbiol Lett.* 1990 Jan 15;55(1-2):45-8. DOI: 10.1016/0378-1097(90)90165-m
45. Filippov AA, Oleinikov PV, Motin VL, Protsenko OA, Smirnov GB. Sequencing of two *Yersinia pestis* IS elements, IS285 and IS100. *Contrib Microbiol Immunol.* 1995;13:306-9.
46. Filippov AA, Oleinikov PN, Bobrov AG, Motin VL, Konnov NP, Smirnov GB. Comparative study of the structure and distribution of two IS elements in *Yersinia pestis*. *Genetika.* 1994;30:166.
47. Simonet M, Riot B, Fortineau N, Berche P. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect Immun.* 1996 Jan;64(1):375-9.
48. Odaert M, Devalckenaere A, Trieu-Cuot P, Simonet M. Molecular Characterization of IS1541 Insertions in the Genome of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* 1998 Jan; 180(1):178-81.
49. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23;96(24):14043-8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043
50. Torrea G, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):2084-92. DOI: 10.1128/JCM.02618-05
51. Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, Hu P, Worsham PL, Ott LL, et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). *J Bacteriol.* 2002 Feb;184(4):1019-27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002
52. Radnedge L, Gamez-Chin S, McCready PM, Worsham PL, Andersen GL. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*. *J Appl Environ Microbiol.* 2001 Aug;67(8):3759-62. DOI: 10.1128/AEM.67.8.3759-3762.2001
53. Radnedge L, Agron PG, Worsham PL, Andersen GL. Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology.* 2002 Jun;148(Pt 6):1687-98. DOI: 10.1099/00221287-148-6-1687
54. Hinchliffe SJ, Isherwood KE, Stabler RA, Prentice MB, Rakin A, Nichols RA. Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Res.* 2003 Sep;13(9):2018-29. DOI: 10.1101/gr.1507303
55. Yang X, Wei B, Jin J, Li C, Xiong H, Xin Y, et al. Regional genotyping and the geographical distribution regarding *Yersinia pestis* isolates in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2014 Aug;35(8):943-8.
56. Dai RX, Wei BQ, Li CX, Xiong HM, Yang XY, Fan W, et al. The pathogenic ecology research on plague in Qinghai plateau. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2013 Dec;47(12):1083-8.
57. Li C, Wei B, Xiong H, Qi M, Yang X, Xin Y, et al. Sources of infection on human plague in Qinghai province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2014 Feb; 35(2):178-81.

58. Li M, Dai EH, Dai RX, Zhou DS, Yang XY, Cui BZ, et al. Study on the genotyping and microevolution of *Yersinia pestis* in the Qinghai-Tibet Plateau. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2006 May;27(5):412-5.
59. Qi ZZ, Dai EH, Zhou DS, Yang YH, Yu SH, Dai RX, et al. A molecular epidemiological study on human plague fulminant epidemic in Qinghai, 2004. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2006 Apr;27(4):316-8.
60. Wang XH, Zhang H, Guo LM, Miao KJ, DA WP, Wu B. Analysis on genotype distributions and epidemiological characteristics of *Yersinia pestis* plague foci in Gansu province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2013 May;34(5):433-7.
61. Auerbach RK, Tuanyok A, Probert WS, Kenefic L, Vogler AJ, Bruce DC, et al. *Yersinia pestis* evolution on a small timescale: comparison of whole genome sequences from North America. *PLoS One*. 2007 Aug 22;2(8):e770. DOI: 10.1371/journal.pone.0000770
62. Eppinger M, Guo Z, Sebastian Y, Song Y, Lindler LE, Yang R, et al. Draft genome sequences of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of endemic plague in China. *J Bacteriol*. 2009 Dec;191(24):7628-9. DOI: 10.1128/JB.01227-09
63. Garcia E, Worsham P, Bearden S, Malfatti S, Lang D, Larimer F, et al. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union. *Adv Exp Med Biol*. 2007;603:17-22. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8\_2
64. Shen X, Wang Q, Xia L, Zhu X, Zhang Z, Liang Y, et al. Complete genome sequences of *Yersinia pestis* from natural foci in China. *J Bacteriol*. 2010 Jul;192(13):3551-2. DOI: 10.1128/JB.00340-10
65. Liang Y, Hou X, Wang Y, Cui Z, Zhang Z, Zhu X. Genome rearrangements of completely sequenced strains of *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol*. 2010 May; 48(5):1619-23. DOI: 10.1128/JCM.01473-09
66. Liang Y, Xie F, Tang X, Wang M, Zhang E, Zhang Z, et al. Chromosomal rearrangement features of *Yersinia pestis* strains from natural plague foci in China. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Oct;91(4):722-8. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0491
67. Power EG. RAPD typing in microbiology – a technical review. *J Hosp Infect*. 1996 Dec;34(4):247-65.
68. Huang F, Yu D, Hai R, Cai H. Study on the application of random amplified polymorphic DNA in *Yersinia pestis* genotyping. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2000 Dec;21(6):424-6.
69. Kingston JJ, Tuteja U, Kapil M, Murali HS, Batra HV. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009 Oct;96(3):303-12. DOI: 10.1007/s10482-009-9347-2
70. Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003 Nov;41(11):5224-6.
71. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 2000 May;182(10):2928-36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000
72. Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, et al. Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol*. 2000 Apr;38(4):1516-9.
73. Klevytska AM1, Price LB, Schupp JM, Worsham PL, Wong J, Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep;39(9):3179-85. DOI: 10.1128/jcm.39.9.3179-3185.2001
74. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoëud F, Ramisse V, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol*. 2001;1:2.
75. Li Y, Cui Y, Cui B, Yan Y, Yang X, Wang H, et al. Features of variable number of tandem repeats in *Yersinia pestis* and the development of a hierarchical genotyping scheme. *PLoS One*. 2013 Jun 21;8(6):e66567. DOI: 10.1371/journal.pone.0066567
76. Girard JM, Wagner DM, Vogler AJ, Keys C, Allender CJ, Drickamer LC, et al. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8408-13. Epub 2004 May 20. DOI: 10.1073/pnas.0401561101
77. Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol*. 2004 Jun 8;4:22. DOI: 10.1186/1471-2180-4-22
78. Li Y, Cui Y, Hauck Y, Platonov ME, Dai E, Song Y. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS One*. 2009 Jun 22;4(6):e6000. DOI: 10.1371/journal.pone.0006000
79. Riehm JM1, Vergnaud G, Kiefer D, Damdindorj T, Dashdavaa O, Khurelsukh T, et al. *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One*. 2012;7(2):e30624. DOI: 10.1371/journal.pone.0030624. Epub 2012 Feb 17. DOI: 10.1371/journal.pone.0030624
80. Ciammaruoni A. Microchip Capillary electrophoresis of multi-locus VNTR analysis for genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* in microbial forensic cases. *Methods Mol Biol*. 2012;830:381-90. DOI: 10.1007/978-1-61779-461-2\_26. DOI: 10.1007/978-1-61779-461-2\_26
81. Ciammaruoni A, Grassi S, De Santis R, Faggioni G, Pittiglio V, D'Amelio R, et al. Fieldable genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* based on 25-loci Multi Locus VNTR Analysis. *BMC Microbiol*. 2008 Jan 29;8:21. DOI: 10.1186/1471-2180-8-21
82. Ciammaruoni A, Grassi S, Faggioni G, De Santis R, Pittiglio V, D'Amelio R, et al. A rapid allele variant discrimination method for *Yersinia pestis* strains based on high-resolution melting curve analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Sep; 65(1):7-13. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.04.015
83. Vogler AJ, Chan F, Wagner DM, Roumagnac P, Lee J, Nera R, et al. Phylogeography and molecular epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Sep;5(9):e1319. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001319
84. Lowell JL, Zhansarina A, Yockey B, Meka-Mechenko T, Stybayeva G, Atshabar B, et al. Phenotypic and molecular characterizations of *Yersinia pestis* isolates from Kazakhstan and adjacent regions. *Microbiology*. 2007 Jan;153(1):169-77. DOI: 10.1099/mic.0.29059-0
85. Vogler AJ, Chan F, Nottingham R, Andersen G, Drees K, Beckstrom-Sternberg SM, et al. A decade of plague in Mahajanga, Madagascar: insights into the global maritime spread of pandemic plague. *MBio*. 2013 Feb 12;4(1):e00623-12. DOI: 10.1128/mBio.00623-12
86. Vogler AJ, Keys CE, Allender C, Bailey I, Girard J, Pearson T, et al. Mutations, mutation rates, and evolution at the hypervariable VNTR loci of *Yersinia pestis*. *Mutat Res*. 2007 Mar 1;616(1-2):145-58. Epub 2006 Dec 11. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.11.007
87. Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, et al. Identifying sources of human exposure to plague. *J Clin Microbiol*. 2005 Feb;43(2):650-6. DOI: 10.1128/JCM.43.2.650-656.2005
88. Zhang X, Hai R, Wei J, Cui Z, Zhang E, Song Z, et al. MLVA distribution characteristics of *Yersinia pestis* in China and the correlation analysis. *BMC Microbiol*. 2009 Sep 23;9:205. DOI: 10.1186/1471-2180-9-205
89. Oliveira MB, Barros MP, Silveira-Filho VM, Araújo-Nepomuceno MR, Balbino VQ, Leal NC, et al. Genetic diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. *Genet Mol Res*. 2012 Sep 25;11(3):3414-24. DOI: 10.4238/2012.September.25.10
90. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol*. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
91. Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol*. 1998 Sep;36(9):2557-64.
92. Kotetishvili M, Kreger A, Wauters G, Morris JG Jr, Sulakvelidze A, Stine OC. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J Clin Microbiol*. 2005 Jun;43(6):2674-84. DOI: 10.1128/JCM.43.6.2674-2684.2005

93. Duan R, Liang J, Shi G, Cui Z, Hai R, Wang P, et al. Homology analysis of pathogenic *Yersinia species*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2014 Jan;52(1):20-9. DOI: 10.1128/JCM.02185-13
94. Buchrieser C, Rusniok C, Frangeul L, Couve E, Billault A, Kunst F. The 102-kilobase *pgm* locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4851-61.
95. Turingan RS, Thomann HU, Zolotova A, Tan E, Selden RF. Rapid focused sequencing: a multiplexed assay for simultaneous detection and strain typing of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, and *Yersinia pestis*. PLoS One. 2013;8(2):e56093. DOI: 10.1371/journal.pone.0056093. Epub 2013 Feb 13.
96. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol. 2002 Mar;43(6):1565-75.
97. Cui Y, Li Y, Gorgé O, Platonov ME, Yan Y, Guo Z, et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. PLoS One. 2008 Jul 9;3(7):e2652. DOI: 10.1371/journal.pone.0002652
98. Vergnaud G, Li Y, Gorgé O, Cui Y, Song Y, Zhou D, et al. Analysis of the three *Yersinia pestis* CRISPR loci provides new tools for phylogenetic studies and possibly for the investigation of ancient DNA. Adv Exp Med Biol. 2007;603:327-38. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8\_30
99. Barros MP, França CT, Lins RH, Santos MD, Silva EJ, Oliveira MB et al. Dynamics of CRISPR loci in microevolutionary process of *Yersinia pestis* strains. PLoS One. 2014 Sep 29;9(9):e108353. DOI: 10.1371/journal.pone.0108353. eCollection 2014
100. Sun S, Yang X, Yuan Y, Dai X, Yan Y, Cao H, et al. Draft genome sequence of *Yersinia pestis* strain 2501, an isolate from the great gerbil plague focus in Xinjiang, China. J Bacteriol. 2012 Oct;194(19):5447-8. DOI: 10.1128/JB.01150-12
101. Mahale KN, Paranjape PS, Marathe NP, Dhotre DP, Chowdhury S, Shetty SA, et al. Draft genome sequences of *Yersinia pestis* strains from the 1994 plague epidemic of Surat and 2002 Shimla outbreak in India. Indian J Microbiol. 2014 Dec;54(4):480-2. DOI: 10.1007/s12088-014-0475-7
102. Touchman JW, Wagner DM, Hao J, Mastrian SD, Shah MK, Vogler AJ, et al. A North American *Yersinia pestis* draft genome sequence: SNPs and phylogenetic analysis. PLoS One. 2007 Feb 21;2(2):e220. DOI: 10.1371/journal.pone.0000220
103. Cummings CA, Bormann Chung CA, Fang R, Barker M, Brzoska P. Accurate, rapid and high-throughput detection of strain-specific polymorphisms in *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* by next-generation sequencing. Investig Genet. 2010 Sep 1;1(1):5. DOI: 10.1186/2041-2223-1-5
104. Antonation KS, Shury TK, Bollinger TK, Olson A, Mabon P, Van Domselaar G, et al. Sylvatic plague in a Canadian black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). J Wildl Dis. 2014 Jul;50(3):699-702. DOI: 10.7589/2013-08-215
105. Cáceres O, Montenegro J, Padilla C, Tarazona D, Bailón H, García P, et al. Whole-genome sequencing and comparative analysis of *Yersinia pestis*, the causative agent of a plague outbreak in northern Peru. Genome Announc. 2013 Jan;1(1):pii: e00249-12. DOI: 10.1128/genomeA.00249-12. Epub 2013 Feb 28.
106. Kislichkina AA, Bogun AG, Kadnikova LA, Maiskaya NV, Platonov ME, Anisimov NV, et al. Nineteen Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus*, Including Representatives of Biovars *caucasica*, *talassica*, *hissarica*, *altaica*, *xilingolensis*, and *ulegeica*. Genome Announc. 2015 Nov-Dec; 3(6): e01342-15. DOI: 10.1128/genomeA.01342-15
107. Kislichkina AA, Bogun AG, Kadnikova LA, Maiskaya NV, Solomentsev VI, Platonov ME, et al. Eight Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* Isolated from the Common Vole (*Microtus arvalis*) Plague Focus in Dagestan, Russia. Genome Announc. 2017 Aug; 5(34): e00847-17. DOI: 10.1128/genomeA.00847-17
108. Kislichkina AA, Bogun AG, Kadnikova LA, Maiskaya NV, Solomentsev VI, Dentovskaya SV, et al. Nine Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica* Strains Isolated from the Altai Mountain Natural Plague Focus (No. 36) in Russia. Genome Announc. 2018 Jan; 6(3): e01440-17. DOI: 10.1128/genomeA.01440-17
109. Kislichkina AA, Bogun AG, Kadnikova LA, Maiskaya NV, Solomentsev VI, Sizova AA, et al. Six Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus* bv. *ulegeica* (Phylogroup O.PE5) Strains Isolated from Mongolian Natural Plague Foci. Genome Announc. 2018 Jun; 6(25): e00536-18. DOI: 10.1128/genomeA.00536-18
110. Losada L, Varga JJ, Hostetler J, Radune D, Kim M, Durkin S, et al. Genome sequencing and analysis of *Yersinia pestis* KIM D27, an avirulent strain exempt from select agent regulation. PLoS One. 2011 Apr 29;6(4):e19054. DOI: 10.1371/journal.pone.0019054
111. Cui Y, Yang X, Xiao X, Anisimov AP, Li D, Yan Y, et al. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. Infect Genet Evol. 2014 Aug;26:172-9. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.023.
112. Bos KI, Schuenemann VJ, Golding GB, Burbano HA, Waglegner N, Coombes BK, et al. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. Nature. 2011 Oct 12;478(7370):506-10. DOI: 10.1038/nature10549
113. Wagner DM, Klunk J, Harbeck M, Devault A, Waglegner N, Sahl JW, et al. *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. Lancet Infect Dis. 2014 Apr;14(4):319-26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2
114. Gibbons HS, Krepps MD, Ouellette G, Karavis M, Onischuk L, Leonard P, et al. Comparative genomics of 2009 seasonal plague (*Yersinia pestis*) in New Mexico. PLoS One. 2012;7(2):e31604. DOI: 10.1371/journal.pone.0031604
115. Chain PS, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Sep 21; 101(38):13826-31. Epub 2004 Sep 9. DOI: 10.1073/pnas.0404012101
116. Yan Y, Wang H, Li D, Yang X, Wang Z, Qi Z, et al. Two-step source tracing strategy of *Yersinia pestis* and its historical epidemiology in a specific region. PLoS One. 2014 Jan 9;9(1):e85374. DOI: 10.1371/journal.pone
117. Vogler AJ, Keim P, Wagner DM. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: from phenotypes to whole genome sequencing. Infect Genet Evol. 2016 Jan;37:21-36. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.024
118. McAvin JC, McConathy MA, Rohrer AJ, Huff WB, Barnes WJ, Lohman KL. A real-time fluorescence polymerase chain reaction assay for the identification of *Yersinia pestis* using a field-deployable thermocycler. Mil Med. 2003 Oct;168(10):852-5.

**Информация об авторах:**

Вагайская Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 36-0102  
 E-mail: vagaiskaya.anastasiya@gmail.com

Трунякова Александра Сергеевна, стажер-исследователь лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 36-0102  
 E-mail: Sasha\_trunyakova@mail.ru

**Information about authors:**

Anastasiya S. Vagaiskaya, junior researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0112  
 E-mail: vagaiskaya.anastasiya@gmail.com

Alexandra S. Trunyakova, junior researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0112  
 E-mail: Sasha\_trunyakova@mail.ru