

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

2•2013

Квартальный  
научно-теоретический журнал

Основан в январе 1983 г.

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. В. КОСТРОВ  
Зам. главного редактора Ю. М. РОМАНОВА  
Ответственный секретарь Т. С. ИЛЬИНА

В. И. АГОЛ, А. Д. АЛЬТШТЕЙН, В. А. ГВОЗДЕВ, В. Н. ГЕРШАНОВИЧ,  
А. Л. ГИНЦБУРГ, В. В. ДЕМКИН, Н. В. КАВЕРИН, Е. Д. КУЗНЕЦОВА (научный  
редактор), С. А. ЛИМБОРСКАЯ, С. А. ЛУКЬЯНОВ, Н. Ф. МЯСОЕДОВ,  
С. В. НЕТЕСОВ, Е. Д. СВЕРДЛОВ, Г. Б. СМЕРНОВ, Н. И. СМЕРНОВА,  
В. З. ТАРАНТУЛ

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А. М. БОРОНИН (Пушино-на-Оке), В. И. ВОТЯКОВ (Минск), А. А. ПРОЗОРОВ  
(Москва), Н. В. ТОМИЛИН (Санкт-Петербург), Ю. К. ФОМИЧЕВ (Минск),  
С. В. ШЕСТАКОВ (Москва)

Журнал утвержден в Перечне ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Бюллетень ВАК)

Журнал полностью переводится на английский язык в США издательством ALLERTON PRESS, INC.

Сведения о статьях, публикуемые в журнале, размещаются в следующих международных информационно-справочных изданиях: *Index Medicus*, *Biological Abstracts*, *Chemical Abstracts*, *Current Contents*, *Ulrich's International Periodicals Directory*, а также журнал включен в информационные продукты Thomson Reuters. Начиная с тома 23 (1) 2008 г. издание индексируется и вносится в следующие базы данных:

- Science Citation Index Expanded (известный также как SciSearch®)
- Journal Citation Reports/Science Edition®
- Biotechnology Citation Index®
- Biological Abstracts
- BIOSIS Previews.



МОСКВА «ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"»

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОР

- Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярное типирование *Yersinia pestis* ..... 3

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Маливанова Т.Ф., Скоромыслова Е.В., Юрченко В.А., Кононенко И.Б., Манзюк Л.В., Мазуренко Н.Н. Анализ полиморфизма -238(g/a)tnf при раке молочной железы ..... 13
- Рар В.А., Епихина Т.И., Пуховская Н.М., Высочина Н.П., Иванов Л.И. Генетическое разнообразие бактерий из семейства *Anaplasmataceae*, обнаруженных в клещах рода *Haemaphysalis* и *Dermacentor* на территории Дальнего Востока. .... 16
- Воронина И.В., Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Кунда М.С., Аветисян Л.Р., Орлова А.А., Лукин В.Г., Авакян Л.В., Капранов Н.И., Амелина Е.Л., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. Характеристика генотипов штаммов *Burkholderia cepacia* complex, выделенных от больных в стационарах Российской Федерации. .... 22
- Dogen A., Kaplan E., Serin M. S., Oksuz Z., Tezcan S., Aslan G., Sezgin O., Altintas E., Emekdas G. Detection of Hepatitis B virus X Gene and PreC Promoter Mutations from Chronic Hepatitis B Patients in the South of Turkey ..... 30
- Ozerova L. V., Krasnikova M. S., Troitsky A. V., Solovyev A. G., and Morozov S. Y. TAS3 genes for small ta-siARF RNAs in plants belonging to subtribe Senecioninae: occurrence of prematurely terminated RNA precursors ..... 33

### ХРОНИКА

- Лимборская С.А. Пятая Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике на тему "Непостоянство генома" ..... 37

## CONTENTS

### REVIEW

- Platonov M. E., Evseeva V. V., Dentovskaya S. V., and Anisimov A. P. Molecular Typing of *Yersinia pestis* ..... 3

### EXPERIMENTAL WORKS

- Malivanova T.F., Skoromyslova E.V., Yurchenko V.A., Kononenko I.B., Manzyuk L.V., Mazurenko N.N. Analysis of the -238(g/a)tnf polymorphism in breast cancer patients ..... 13
- Rar V.A., Epikhina T.I., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I. Genetic variability of *Anaplasmataceae* bacteria determined in *Haemaphysalis* spp. and *Dermacentor* sp. ticks in the territory of the Russian Far East ..... 16
- Voronina O.L., Chernukha M.Yu., Shaginyan I.A., Kunda M.S., Avetisyan L.R., Orlova A.A., Lunin V.G., Avakyan L.V., Kapranov N.I., Amelina E.L., Chuchalin A.G., Gintsburg A.L. Characterization of genotypes for *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from patients in hospitals of Russian Federation ..... 22
- Dogen A., Kaplan E., Serin M.S., Oksuz Z., Tezcan S., Aslan G., Sezgin O., Altintas E., Emekdas G. Detection of Hepatitis B virus X Gene and PreC Promoter Mutations from Chronic Hepatitis B Patients in the South of Turkey ..... 30
- Ozerova L. V., Krasnikova M. S., Troitsky A. V., Solovyev A. G., Morozov S. Y. TAS3 Genes for Small ta-siARF RNAs in Plants Belonging to Subtribe Senecioninae: Occurrence of Prematurely Terminated RNA Precursors ..... 33

### CHRONICLE

- Limborska S.A. Fifth International School on Molecular Genetics for Young Scientists «The Inconstancy of the Genome» ..... 37



Адрес редакции:

**Москва, 107140**

**ул. Верхняя Красносельская, д. 17А, стр. 1 Б**

**ОАО «Издательство "Медицина"»**

Редакция журнала "Молекулярная генетика, микробиология и вирусология"

Тел. редакции: (499) 264-36-66

e-mail: molgenetica@yandex.ru

Зав. редакцией И. Х. Измайлова

#### ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс 8-499-264-00-90

E-mail: oao-medsina@mail.ru

**Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.**

Редактор Е. И. Константинова

Художественный редактор

А. В. Минаичев

Корректор Т. Д. Малышева

Переводчик С. К. Чаморовский

Верстка Е. Архипова

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Сдано в набор 21.02.13

Подписано в печать 22.03.13

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная. Печ. л. 5,00.

Усл.-печ. л. 4,90. Уч.-изд. л. 5,50.

Заказ 102.

Подписной тираж номера 202 экз.

ЛР №010215 от 29.04.97 г.

E-mail: meditsina@mtu-net.ru

www.medlit.ru

Отпечатано в типографии ООО "Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

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

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ *YERSINIA PESTIS*

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

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

**Ключевые слова:** молекулярное типирование *Y. pestis*

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

## Современное состояние проблемы таксономии возбудителя чумы

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

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

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

Основные таксономические признаки штаммов, характеризующие внутривидовые группы *Y. pestis* (модифицировано из работы [74])

| Подвид                      | Биовар/SNP-тип*                             | Ферментация |            |           |           | Дентрификация | Уреазная активность | Продукция пептицина | Чувствительность к пептицину | Фибринолитическая активность | Коагулязная активность | Зависимость от источников питания |         |           |          |         |         |             | Вирulentность для морских свинок | Район циркуляции | Основные хозяева | Частота мутаций от Pgm <sup>+</sup> к Pgm <sup>-</sup> фенотипу за 10 поколений, % |   |         |
|-----------------------------|---|-------------|------------|-----------|-----------|---------------|---------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------------|---------|-----------|----------|---------|---------|-------------|----------------------------------|------------------|------------------|--|---|---------|
|                             |   | рамнозы     | меллибиозы | арабинозы | глицерина |               |                     |                     |                              |                              |                        | меллецитозы                       | лейцина | метионина | аргинина | тиамина | цистеин | фенилаланин |                                  |                  |                  |  | треонин   | тирозин |
| <i>Pestis</i>               | <i>antiqua</i> / 0.ANT, 3.ANT, 1.ANT, 2.ANT | -**         | -          | +         | +         | -             | +                   | -                   | +                            | +                            | +                      | +                                 | +       | +         | +        | +       | +       | +           | +                                | +                | +                | Центральная Азия и Центральная Африка  | <i>Marmota</i> spp.   | > 20    |
|                             | <i>medievalis</i> /2.MED                    | -           | ±          | +         | +         | -             | +                   | +                   | -                            | +                            | +                      | +                                 | ±       | ±         | ±        | ±       | ±       | ±           | ±                                | ±                | ±                | Центральная Азия   | <i>Citellus (Spermophilus)</i> spp., <i>Meriones</i> spp., <i>Rhombomys</i> spp.                                  | > 20    |
|                             | <i>orientalis</i> /1.ORI                    | -           | -          | +         | -         | -             | ±                   | +                   | -                            | +                            | +                      | +                                 | ±       | -         | -        | -       | -       | -           | -                                | -                | -                | Юго-Восточная Азия, южные районы Африки, Америка                                   | <i>Rattus</i> spp., <i>Cynomys</i> spp., <i>Spermophilus</i> spp., <i>Cavia</i> spp., <i>Peromyscus</i> spp. и др | > 20    |
|                             | <i>intermedium</i> /?                       | +           | +          | +         | +         | ?***          | +                   | ?                   | ?                            | ?                            | ?                      | -                                 | -       | +         | +        | +       | +       | ±           | ±                                | ?                | +                | Северный Тянь-Шань, Китай  | <i>Marmota baibacina</i> , <i>Spermophilus undulatus</i>  | 0       |
|                             | <i>caucasica</i> <sup>#</sup> /0.PE2        | +           | +          | +         | +         | -             | +                   | -                   | +                            | -                            | ±                      | ±                                 | ±       | +         | +        | +       | +       | +           | +                                | ?                | -                | Кавказ и Закавказье  | <i>Microtus arvalis</i>   | 0       |
| <i>microtus (pestoides)</i> | <i>ulegeica</i> /0.PE8                      | +           | +          | +         | +         | ?             | -                   | -                   | +                            | +                            | +                      | +                                 | -       | -         | -        | -       | +       | +           | ?                                | -                | -                | Северо-Восточная Монголия, пустыня Гоби  | <i>Microtus gregalis</i> , <i>Alticola strelzovi</i> , <i>Ochotona pallasi pricei</i>                             | 0       |
|                             | <i>altaica</i> /0.PE1                       | +           | +          | -         | +         | ?             | -                   | -                   | +                            | +                            | +                      | +                                 | +       | -         | +        | +       | +       | ?           | ?                                | -                | -                | Горный Алтай, Монголия   | <i>Microtus gregalis</i> , <i>Alticola strelzovi</i> , <i>Ochotona pallasi pricei</i>                             | 0       |
|                             | <i>hissarica</i> /0.PE9                     | +           | +          | -         | +         | ±             | -                   | ±                   | +                            | +                            | +                      | +                                 | +       | -         | -        | -       | +       | -           | -                                | -                | -                | Гиссарский хребет  | <i>Microtus carruthersi</i>   | 0       |
|                             | <i>angola</i> /0.PE3                        | +           | ?          | +         | +         | ?             | -                   | ?                   | ?                            | ?                            | ?                      | ?                                 | ?       | ?         | ?        | ?       | ?       | ?           | ?                                | -                | -                | Ангола   | ?   | 0       |
|                             | <i>xilingolensis</i> /0.PE4                 | +           | +          | -         | +         | ?             | -                   | -                   | +                            | +                            | ?                      | ?                                 | -       | -         | -        | -       | -       | -           | -                                | -                | -                | Степи Ксилин Гол, Китай  | <i>Microtus brandti</i>   | 0       |
|                             | <i>qinghaiensis</i> /0.PE4                  | +           | +          | -         | +         | -             | -                   | +                   | ?                            | ?                            | ?                      | -                                 | -       | -         | -        | -       | -       | -           | -                                | -                | -                | Куинхай-Тибетское плато, Китай   | <i>Microtus fuscus</i>  | 0       |
|                             | <i>talassica</i> /?                         | +           | +          | -         | +         | -             | -                   | +                   | -                            | +                            | +                      | ?                                 | +       | +         | +        | +       | +       | ?           | ?                                | -                | -                | Таласский хребет   | <i>Microtus gregalis</i> , <i>Marmota caudata</i>   | 0       |

Примечание. \* – SNP-тип в соответствии с данными [79]. Цифра перед точкой указывает на одну из основных ветвей на филогенетическом древе; \*\* – наличие признака; – отсутствие признака; ± – наличие признака не у всех штаммов. \*\*\*? – нет штаммов. # – штаммы подвида *caucasica* лишены плазмиды pPst; ##+/- – чувствительны к пептицину штаммов подвида *pestis* и *altaica* и нечувствительны к пептицину штаммов собственного подвида.



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

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

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

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

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

ведения внутривидовой таксономии чумного микроба в соответствии с правилами МКНБ необходимо переименование биовара *microtus* в подвид, а входящих в него филогенетических групп – в биовары, тем более что эта новая внутривидовая классификация уже используется в работах исследователей из Германии, Монголии и Франции [64]. В качестве типового штамма подвида *microtus* можно предложить штамм bv. *caucasica* – *Pestoides* F (номера доступа в GenBank: хромосома – NC\_009381.1, плазмиды CD – NC\_009377 и MT – NC\_009378). В данной публикации мы будем пользоваться этой новой классификацией (см. таблицу, рисунок).

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

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

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

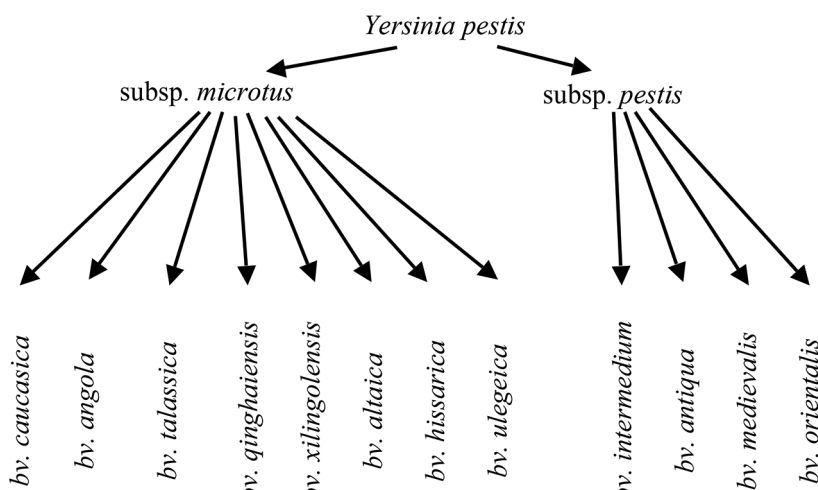


Рис. 1. Предлагаемая внутривидовая таксономия *Y. pestis*.