

Генетическая вариабельность функционального домена инвазина *Yersinia*
pseudotuberculosis.

Р.Р. Адгамов, Н.Ф. Тимченко, А.В.Алленов, С.А. Ермолаева

В работе исследованы 84 изолята *Y. pseudotuberculosis*, выделенные из разных объектов на территории России в период с 1967 по 2008 гг. Большинство (55) изолятов изолированы из кала больных с диагнозом “псевдотуберкулез/ДСЛ”, подтвержденным клинически и серологически, в том числе 18 изолятов выделены в ходе эпидемиологического расследования трех вспышек этого заболевания в Приморском крае; 9 изолятов изолированы из внутренних органов диких грызунов; остальные изоляты выделены из окружающей среды. Из 84 штаммов *Y. pseudotuberculosis* 9 относились к III серотипу, остальные – к I серотипу. Для всех изолятов была определена последовательность 600 п.н. гена *inv*, кодирующих с 667 по 866 аминокислоты инвазина. Всего выявлено 3 аллельных варианта. Аллель 1 преобладал, он обнаружен у 76 изолятов. В базе данных GenBank аллель 1 представлен штаммом IP31758 (Eppinger et al., 2007), выделенным на Дальнем Востоке РФ. Аллель 2 отличался от аллеля 1 по трем позициям, G₂₂₉₉C, T₂₃₀₀C и T₂₃₀₂C. Замены в положениях 2299 и 2302 были несинонимическими и приводили к заменам Ser₇₆₈Thr и Val₇₆₉Ala в последовательности белка. Аллель 2 был найден у 6 изолятов. Аллель 3 отличался от аллеля 2 одной синонимической заменой G₂₃₂₄T и был найден у двух штаммов. Аллель 3 несут все изоляты *Y. pestis*, чьи последовательности представлены в базе данных GenBank. Не было обнаружено специфичности распределения аллелей в зависимости от серовара: *Y. pseudotuberculosis* III серовара и большинство изолятов, относящихся к I серовару, несли аллель 1. При анализе распределения аллелей в субпопуляциях, сформированных в зависимости от источника и региона выделения, показано, что субпопуляция иерсиний, выделенных от грызунов, достоверно отличалась от субпопуляции этих бактерий, вызвавших инфекционный процесс у людей, и субпопуляции бактерий, выделенных из окружающей среды (p<0,05). Если среди изолятов, изолированных от больных людей, преобладал аллель 1 (95%), то среди изолятов, выделенных от грызунов, аллели 1 и 2 встречались с сопоставимыми частотами (55 % и 45 %, соответственно).

Введение

Псевдотуберкулез широко распространен в Российской Федерации и за рубежом. Особую роль в изучении этиологии, эпидемиологии, клиники и патогенеза этой болезни сыграло возникновение в 50-60 годы XX столетия на Дальнем Востоке России крупных вспышек неизвестного ранее инфекционного заболевания у людей, которое было названо до установления этиологии дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой (ДСЛ) (Грунин И.И. и соавт., 1960). Заболевание характеризовалось циклическим течением, острым началом, выраженной интоксикацией, лихорадкой, экзантемой, с преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта, печени и суставов.

В последующем обнаружено, что возбудителем этого заболевания является *Y.pseudotuberculosis* (Знаменский В.А., Вишняков А.К., 1967). Таким образом, была открыта новая клинико-эпидемическая форма псевдотуберкулеза. После этого и до настоящего времени в РФ зарегистрированы многочисленные вспышки и спорадические случаи названного заболевания (Рожкова Л.П., 1977; Сомов, 1979; Сомов Г.П. и соавт., 1990; Чеснокова М.В. и соавт., 2006).

Y. pseudotuberculosis является факультативным внутриклеточным паразитом и характеризуется высокой адаптацией. Эти микроорганизмы выделены от людей, многих видов экто- и эндотермных животных, в том числе диких грызунов, из растений, объектов внешней среды (почва, вода), из продуктов питания (Кузнецов В.Г., 1997). Заражение при псевдотуберкулезе, как правило, происходит алиментарным путем через инфицированные *Y. pseudotuberculosis* пищевые продукты, чаще всего овощи и корнеплоды (блюда, приготовленные из них) (Сомов, 1979).

Патогенность возбудителя псевдотуберкулеза обеспечивается действием биомолекул с инвазивной, антифагоцитарной и токсической функциями, которые кодируются генами, расположенными на хромосоме и плазмиде вирулентности pYV

(Isberg et al.,1987; Cornelis ,1998; Carnoy et al.,2002; Carniel E.,1999; Тимченко Н.Ф.и соавт.,2004). Попадая в организм с инфицированной пищей, бактерии быстро преодолевают защитный барьер слизистой кишечника, активно проникая в специализированные М-клетки эпителия пейеровых бляшек (Jang et al., 2004). Основную роль в проникновении *Y. pseudotuberculosis* в клетки играет взаимодействие поверхностного белка иерсиний инвазина с рецептором эукариотической клетки интегрином (Van Nhieu and Isberg.,1993).

Инвазин *Y. pseudotuberculosis*, кодируемый хромосомным геном *inv*, представляет собой мультидоменный белок, состоящий из 986 аминокислотных остатков (McGraw et al., 1999). N-концевой домен длиной 503 аминокислотных остатков локализуется во внешней мембране, обеспечивая представление С-концевого домена на поверхности бактериальной клетки. Ключевую роль в эффективном связывании инвазина с интегрином играют аминокислоты, расположенные в С-конце белка.

Значительные отличия клиники ДСЛ от известного ранее псевдотуберкулеза, экологическая пластичность и полипатогенность возбудителя болезни, вызывающего инфекционный процесс не только у людей, но и у животных, и даже в растениях, позволили нам предположить наличие вариабельности функционально значимых доменов генов факторов патогенности, в частности, инвазина, которые могут влиять на способность *Y. pseudotuberculosis* проникать в эукариотическую клетку, и, следовательно, на степень ее патогенности.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось изучение вариабельности интегрин-связывающего домена среди штаммов *Y. pseudotuberculosis*, изолированных из различных источников в разных регионах РФ.

Материалы и методы.

Бактериальные штаммы, использованные в работе.

В работе использованы 84 изолята *Y. pseudotuberculosis* I и III серотипов из музея живых культур НИИЭМ СО РАМН. Микроорганизмы выделены за период с 1967 по 2008 гг в разных регионах РФ из кала больных людей, из органов грызунов, из смывов с овощей и других объектов внешней среды (Табл. 1).

Получение образцов для проведения ПЦР.

Для выделения ДНК бактерии выращивали на LB агаре при температуре 37С. Изолированную колонию *Y. pseudotuberculosis* суспендировали в 100 мкл деионизованной воды, прогревали взвесь при 100°С в течение 8-10 мин, полученный лизат использовали в дальнейших исследованиях.

Проведение ПЦР и секвенирование.

Фрагмент гена *inv*, кодирующий аминокислоты с 667 по 867 инвазина, был получен в ПЦР с использованием праймеров: *inv1* – 5'-TATGGGGACCCGCAGGCTGGC 3' и *inv2* – 5'-TGCCGCCATCGTATATCCACCG 3' в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей программе амплификации: 1) 94°С – 2 мин; 2) 5 циклов: 94°С – 5 сек, 67°С – 5 сек, 72°С – 5 сек; 3) 25 циклов: 94°С – 1 сек, 67°С – 1 сек, 72°С – 1 сек; 4) 72°С – 5 мин; 5) хранение – 10 °С. Состав ПЦР- смеси был следующий (на 1 реакцию): деионизованная вода – 16,2 мкл; PCR-буфер, поставляемый с Taq-полимеразой – 2,5 мкл; MgCl₂ 25 мМ – 1,5 мкл; смесь дНТФ 10 мМ – 0,8 мкл; праймеры по 1 мкл каждый; Taq-полимераза («Бионем», Россия) – 1 мкл; исследуемый образец – 1 мкл. Результаты ПЦР оценивали на агарозном геле после электрофореза. Для последующего секвенирования продукт ПЦР вырезали из геля и очищали при помощи набора Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System («Promega», USA) по методике производителя. Секвенирование проводили в Центре коллективного пользования «Геном» с одним из праймеров, использованных для постановки ПЦР.

Анализ нуклеотидных последовательностей. Последовательности, полученные в результате секвенирования, были прочитаны с помощью программы Chromas v.1.45

(Copyright© 1996-1998 Conor McCarthy, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Множественное выстраивание последовательностей осуществлено с помощью программы ClustalW 1.83.XP [Thompson et al., 1994]. Построение дендрограммы выполнено с помощью программы Mega version 3.1 [Kumar et al, 2004]. Анализ распределения аллелей и существования положительного отбора среди субпопуляций проведен с помощью пакета программ Arlequin3.1 (Excoffier et al., 2005). Определение отношения скорости возникновения несинонимических мутаций к скорости возникновения синонимических (D_N/D_S) проведено с помощью программы Start2 (Jolley et al., 2001).

Результаты.

Характеристика изолятов, использованных в работе.

Из 84 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, использованных в работе (табл.1), 53 выделены в разные годы на территории Приморского края, 5 – на острове Сахалин, 10 – в Якутии, 8 – на территории Новосибирской и Кемеровской областей. Восемь изолятов имели европейское происхождение, включая один из коллекции Института Пастера (Франция) и изоляты, полученные на территории Московской и Ленинградской областей.

Больше половины (55) изолятов выделены из кала больных с диагнозом “псевдотуберкулез-ДСЛ”, подтвержденным также клинически и серологически, в том числе 18 изолятов получены в ходе эпидемиологического расследования трех вспышек этого заболевания в Приморском крае в 1973 (n = 6), 1976 (n = 4), 1980 (n = 8) гг (Рожкова Л.П., 1977; Сомов Г.П. и соавт., 1990).

Необходимо отметить, что в основном исследованные штаммы *Y. pseudotuberculosis* выделены от больных и из внешней среды в периоды, когда заболеваемость имела вспышечный характер. Вспышка псевдотуберкулеза 1980 г была связана со штаммом, относящимся к III серотипу. Остальные изоляты, за исключением штамма 2517, относились к I серотипу, наиболее распространенному среди *Y.*

pseudotuberculosis. Кроме того, 9 изолятов были выделены из внутренних органов диких грызунов.

Характеристика вариабельности последовательности фрагмента гена *inv*, кодирующего С-концевой домен инвазина.

На первом этапе работы для всех изолятов *Y. pseudotuberculosis* определена последовательность 600 п.н. в 3' – концевой области гена *inv*, которые кодируют фрагмент С-концевого домена инвазина. Определенная последовательность включала триплеты, кодирующие с 667 по 866 аминокислоты, что составляет 41% от последовательности интегрин-связывающего С-концевого домена инвазина.

Всего выявлено 3 аллельных варианта (рис. 1). Аллель 1 преобладал в коллекции, будучи выявлен у 76 из 84 исследованных изолятов. В базе данных GenBank этот вариант представлен штаммом IP31758 (Erpinger et al., 2007), выделенным на Дальнем Востоке РФ от больного с подтвержденным диагнозом ДСЛ.

Аллель 2 отличался от аллеля 1 по трем близко расположенным нуклеотидам. Это были транзиция G₂₂₉₉C и две однотипные трансверзии T₂₃₀₀C и T₂₃₀₂C. Нуклеотидная замена в положении 2300 была синонимической. Замены в положениях 2299 и 2302 – несинонимическими. В результате этих замен в последовательности белка произошли аминокислотные замены Ser₇₆₈Thr и Val₇₆₉Ala. Аллель 2 был обнаружен у 4 из 9 изолятов, выделенных от грызунов на территории Приморского края в разные годы, и у 2 из 55 изолятов, выделенных от больных, а именно, у штамма YH24, изолированного в Якутске, и штамма CH1179, изолированного в Челябинске. В базе данных GenBank этот вариант представлен штаммом европейского происхождения YP32953, выделенным во Франции (Chain et al., 2004).

Аллель 3 отличался от аллеля 2 одной синонимической заменой G₂₃₂₄T. Этот аллель был выявлен у изолятов PV81 и PV83, выделенных из растений (свежая капуста) в Приморском крае в 1981 году. При анализе базы данных GenBank этот аллельный вариант

был обнаружен у штамма *Y. pseudotuberculosis* BP1/+ и у всех имеющихся в базе данных штаммов *Y. pestis*.

Таким образом, нами выявлены три аллеля гена *inv*, частота встречаемости которых среди изолятов изученной коллекции значительно различалась. В то время как в коллекции преобладал аллель 1, аллели 2 и 3 встречались у относительно небольшого числа изолятов. На следующем этапе проведен анализ распределения аллелей в зависимости от источника и региона выделения.

Анализ распределения аллелей фрагмента гена *inv* среди субпопуляций.

Изоляты коллекции были разбиты на группы, соответствующие субпопуляциям *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующим в различных частях Евразийского континента, или же циркулирующим среди различных хозяев. Для анализа распределения аллелей в зависимости от региона выделения были выделены следующие группы изолятов: (i) изоляты, выделенные в Приморском крае и на острове Сахалин; (ii) в Сибири и на Урале, в эту группу были включены также изоляты, выделенные в Якутии; (iii) третью группу составляли изоляты, полученные в Европейской части Евразийского континента. В качестве субпопуляций, различающихся по источникам выделения, для которых были изучены различия в распределении аллелей, рассмотрены следующие группы: (i) клинические изоляты; (ii) изоляты, выделенные от диких грызунов; и (iii) изоляты, выделенные из абиотических объектов. Распределение аллелей по указанным группам приведено в табл. 2.

Нашей задачей было выявление статистически достоверных различий в составе субпопуляций по композиции аллелей фрагмента гена *inv*. Анализ различий между популяциями был основан на тестировании гипотезы об однородном распределении аллелей между каждыми двумя субпопуляциями. Другими словами, тестируемая гипотеза предполагала одинаковую частоту встречаемости каждого из аллелей в сравниваемых субпопуляциях. Анализ проводился с помощью пакета программ Arlequin3.1 путем

генерации альтернативных таблиц распределения с использованием математического аппарата цепей Маркова (Excoffier et al., 2005). Гипотеза об однородном распределении аллелей отвергалась, т.е. две субпопуляции рассматривались как существенно различающиеся по композиции входящих в них аллелей, если вычисленная для данной пары субпопуляций величина p была меньше уровня достоверности, принятого нами равным 0,05.

После проведения вычислений, нами не было выявлено достоверных различий в распределении аллелей между субпопуляциями возбудителя псевдотуберкулеза, циркулирующими в различных частях Евразийского континента.

Напротив, результаты оценки сходства распределения аллелей между парами субпопуляций, образованных на основании источника выделения, показали, что субпопуляция иерсиний, выделенных от грызунов, достоверно отличалась от субпопуляции этих бактерий, вызвавших инфекционный процесс у людей, и субпопуляции бактерий, циркулирующих в окружающей среде ($p < 0,05$). Действительно, аллель 1 был найден у 53 из 55 (94 %) изолятов, изолированных от больных, и только у 2 изолятов (4 %) был выявлен аллель 2. В то же время, из 9 изолятов, выделенных из грызунов, аллель 1 несли 5 изолятов (55,5 %), и 4 изолята имели аллель 2 (44,5 %). Т.е. аллели 1 и 2 встречались приблизительно с одинаковой частотой среди изолятов, полученных от грызунов. Среди изолятов, выделенных из окружающей среды, 17 (89,5 %) несли аллель 1, и 2 изолята (10,5%) несли аллель 3. Достоверных отличий по изучаемому признаку между субпопуляциями бактерий, выделенных от людей и из окружающей среды, выявлено не было. Возможно, это связано с тем, что содержащиеся в нашей коллекции изоляты были выделены из окружающей среды преимущественно в связи с эпидемиологическими исследованиями случаев псевдотуберкулеза среди людей, т.е. фактически не являлись независимыми. В тоже время изоляты, выделенные от грызунов, были получены в ходе независимого мониторинга заболеваемости среди диких животных.

Анализ возможности положительного отбора аллелей.

Одним из наиболее простых методов оценки существования положительного отбора, направленного на закрепление новых вариантов аминокислотной последовательности, является оценка отношения скорости возникновения мутаций, приводящих к аминокислотным заменам, (несинонимические мутации, D_N) к скорости возникновения молчащих (синонимических) мутаций (D_S). Отношение D_N/D_S меньше или равное единице свидетельствует о нейтральной селекции, поддерживающей консервативность аминокислотной последовательности, отношение большее единицы говорит в пользу существования положительного отбора новых аминокислотных вариантов (Tanaka and Nei, 1989). Мы вычислили величину D_N/D_S для наблюдаемых замен в последовательности фрагмента гена *inv* с помощью программы Start2 и получили значение 0,31. Таким образом, анализ выявленных мутаций предполагает, что интегрин-связывающий домен инвазина в целом находится под действием нейтрального отбора.

На следующем этапе мы оценили возможности селективного отбора отдельных аллелей внутри субпопуляций. Для проведения этой оценки были использованы тест Тахимы (Tajima's test of selective neutrality) и тест Fu (Fu's F_s test of selective neutrality), включенные в пакет программного обеспечения Arlequin 3.1. Исходной гипотезой для обеих моделей является отсутствие селективного преимущества для любого из аллелей в популяции. Гипотеза отвергается, если наблюдаемые на имеющейся выборке величины, характеризующие распределение замен внутри популяции, значительно отличаются от величин, полученных в результате компьютерного моделирования большого числа случайных выборок с теми же параметрами.

Применение теста Fu не выявило существенных отклонений от нейтральной модели для всех рассматриваемых нами субпопуляций. При использовании теста Тахимы отклонение от нейтральной модели было предположено для субпопуляции клинических изолятов ($p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты не позволяют однозначно

утверждать существования селективного преимущества ни для одного из аллелей внутри изученных субпопуляций.

Обсуждение.

В представленной работе изучена вариабельность фрагмента гена *inv*, кодирующего функционально значимый С-концевой домен инвазина *Y. pseudotuberculosis*. В результате анализа последовательности 600 п.н. участка гена *inv* у 84 изолятов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных в разные года на территории РФ, выявлено 4 полиморфных сайта, замены в которых формировали 3 аллеля. Если проводить сравнение с другими возбудителями сапронозов, то наблюдаемая вариабельность может быть охарактеризована как невысокая. Так, анализ последовательности сравнимого по длине фрагмента гена *mip*, кодирующего фактор патогенности грам-отрицательной бактерии *Legionella pneumophila*, выявил 15 аллелей на коллекции из 134 изолятов (Aurell et al., 2005). Анализ последовательности участков генов *inlA* и *inlB* широко распространенной в естественных экосистемах грам-положительной бактерии *Listeria monocytogenes*, кодирующих функционально-значимые домены факторов инвазии InlA и InlB, выявил, соответственно, 15 и 48 полиморфных сайтов, формирующих 4 и 6 аллелей, на коллекции всего из 17 изолятов (Зайцева и др., 2007).

Большинство изолятов *Y. pseudotuberculosis*, 76 из 84, несли аллель 1. В том числе, этот аллель имели как изоляты, относящиеся к I серовару, так и изоляты III серовара. Таким образом, распространение данного аллеля, по-видимому, не является специфически связанным со штаммами определенного серовара. Изоляты, выделенные от больных при вспышках псевдотуберкулеза как и при спорадических случаях, несли аллель 1. Анализ распределения аллелей между популяциями возбудителя, циркулирующими в разных регионах РФ, на Дальнем Востоке, на Урале и в Сибири, и в Европейской части, также не выявил статистически достоверных отличий между популяциями по частоте встречаемости трех аллелей. Однако, при анализе субпопуляций *Y. pseudotuberculosis*,

выделенных от различных хозяев, наблюдаемые различия в распределении аллелей, оказались статистически достоверными. Так, среди изолятов, полученных от больных людей (95 % от всех изолятов) преобладал аллель 1, в тоже время среди изолятов, выделенных из внутренних органов грызунов, аллели 1 и 2 встречались с одинаковой частотой. Эти данные могут указывать, во- первых, на то, что штаммы *Y. pseudotuberculosis*, несущие 1 аллель, могут быть более вирулентными для человека, во- вторых ,что штаммы с этим аллелем более распространены среди источников заражения людей, например, продуктов питания.

Фрагмент гена *inv Y. pseudotuberculosis*, последовательность которого была изучена, кодирует домен, вовлеченный во взаимодействие с эукариотическим рецептором интегрином, поэтому замены в его аминокислотной последовательности могут влиять на эффективность инвазии иерсиний в эукариотические клетки и, следовательно, на их вирулентность. Интегрины являются консервативными белками, найденными практически у всех высших эукариот. Тем не менее, у интегринов существуют видовые вариации, которые могут влиять на эффективность взаимодействия между ними и бактериальными лигандами. Таким образом, варибельность бактериальных факторов инвазии, в частности, инвазина *Y. pseudotuberculosis*, потенциально может влиять на специфичность некоторых штаммов в отношении определенных хозяев.

Наблюдения такого рода уже были сделаны для ряда патогенных микроорганизмов. Так, для *L. monocytogenes* установлена корреляция между отдельными аллелями функционально-значимого домена выше упомянутого фактора инвазии InlA и частотой выделения бактерий, несущих эти аллели, при патологии плода у беременных женщин (Зайцева и др., 2007). Существование отбора мутаций, усиливающих адгезию к мономаннозным рецепторам, и, следовательно, увеличивающих тропизм к эпителию вагины, было продемонстрировано для уропатогенных *Escherichia coli* при анализе варибельности субъединицы головки пилей I типа, белка FimH (Weissman et al., 2005).

Недостаточно большая выборка изученных штаммов не позволила нам однозначно связать распространение выявленных аллелей, с селективным преимуществом аллеля 1 при инфицировании человека. Однако полученные данные позволяют наметить дальнейшее направление исследований в области экспериментального сравнения эффективности инвазии *Y. pseudotuberculosis*, несущих разные аллели гена инвазина.

Библиография.

1. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl Acid Res 1994; 22: 4673-4680.
2. Kumar S., Tamura T., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 2004; 5: 150-163.
3. Eppinger, M., Rosovitz, M.J., Fricke, W.F., Rasko, D.A., Kokorina, G., Fayolle, C., Lindler, L.E., Carniel, E. and Ravel, J. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever PLoS Genet. 3 (8), E142 (2007)
4. Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC. Sequence type analysis and recombinational tests (START). : Bioinformatics. 2001 Dec;17(12):1230-1231
5. Chain PS, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, Georgescu AM, Vergez LM, Land ML, Motin VL, Brubaker RR, Fowler J, Hinnebusch J, Marceau M, Medigue C, Simonet M, Chenal-Francisque V, Souza B, Dacheux D, Elliott JM, Derbise A, Hauser LJ, Garcia E. [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
6. Tanaka T, Nei M. Positive darwinian selection observed at the variable-region genes of immunoglobulins. Mol Biol Evol 1989;6:447-459. [PubMed: 2796726]

Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*

Scott J. Weissman¹, Sujay Chattopadhyay², Pavel Aprikian², Mana Obata-Yasuoka³, Yuliya Yarova-Yarovaya⁴, Ann Stapleton⁴, William Ba-Thein⁵, Daniel Dykhuizen⁶, James R. Johnson^{7,8}, and Evgeni V. Sokurenko^{2,*}

7. Aurell H, Farge P, Meugnier H, Gouy M, Forey F, Lina G, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 cannot be distinguished by sequence analysis of two surface protein genes and three housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jan;71(1):282-9.
8. Зайцева Е.А., Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С., Иванов Л.И., Ермолаева С.А., Сомов Г.П.. Молекулярно-генетические особенности и эпидемиологическая значимость штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных от беременных женщин и из абортного материала в дальневосточном регионе России. *Клин Микробиол Антимикроб Химиотер.* 2007; 9(1):80-88
9. Грунин И.И., Сомов Г.П., Залмовер И.Ю. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка//Военно-медицинский журн.,1960.-N8.-С.62-66
10. Знаменский В.А., Вишняков А.К.. Этиология дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки// ЖМЭИ,1967.-N 2.-С.125-130
11. Кузнецов В.Г. Роль местообитаний внеорганизменной популяции возбудителя в эпидемиологии псевдотуберкулеза// ЖМЭИ, 1997,N5.С.17-21.
12. Рожкова Л.П. Эпидемиология дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (псевдотуберкулеза человека) на Дальнем Востоке. Автореф.дисс кмн.1977
13. Сомов Г.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка.М. Медицина.1979;
14. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова. Псевдотуберкулез. М.Медицина,1990.
15. Тимченко Н.Ф., Недащковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, 2004
16. Чеснокова М.В., Климов В.Т., Иванова Л.К., Попов А.В.Эпидемиологические

аспекты псевдотуберкулеза в России.//Иерсинии и иерсиниозы Ред.Ценева Г.Я. С-
Петербург.2006.С7-34.

17. Carniel E. The Yersinia high-pathogenicity island//Int.Microbiol.-1999.-Vol.2.-P.161-167.
18. Carnoy C.,Mullet C.,Muller-Alouf H. Superantigen YPMa exacerbates the virulence of Yersinia pseudotuberculosis in mice//Infect.Immun.-2000.-Vol.68.-P.2553-2559.
19. Cornelis G.R.,Boland A.,Boyd A.P. et al The virulence plasmid of Yersinia, an antihost Genome// Microbiol Mol Biol Rev.,1998. Vol.62 (4).P.1315-1352
20. Isberg R.R, Voorhis D.,Falkow S. Identification of invasion: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells// Cell.- 1987.-Vol.50.-P.769-778.
21. Nhieu Guy Tran Van, Isberg R.R. Bacterial internalization mediated by $\beta 1$ chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density// EMBO J.1993.Vol12.N5.pp1887-1895

Таблица 1. Изоляты *Y. pseudotuberculosis*, использованные в работе

№ п/п	изолят	серовар	Год	Регион выделения	Источник выделения	Аллель
1.	PV696	I	1981	Приморский край	Окружающая среда*	1
2	PV76	I	1980	—?—	—?—	1
3	PV77	I	1980	—?—	—?—	1
4	PV82	I	1980	—?—	—?—	1
5	PV84	I	1980	—?—	—?—	1
6	PV81	I	1981	—?—	—?—	3
7	PV83	I	1981	—?—	—?—	3
8	PV569	III	1981	—?—	—?—	1
9	PV249	I	1977	—?—	—?—	1
10	PV75	I	1978	—?—	—?—	1
11	PV673	I	1978	—?—	—?—	1
12	PV608	I	1978	—?—	—?—	1
13	PV252	I	1977	—?—	—?—	1
14	PV162	I	1978	—?—	—?—	1
15	PV238	I	1977	—?—	—?—	1
16	PV270	I	1977	—?—	—?—	1
17	PR105-106	I	1997	—?—	Грызун	2
18	PR1694-98	I	1994	—?—	—?—	2
19.	PR184	I	1988	—?—	—?—	1
20	PR177	I	1988	—?—	—?—	1
21	PR152	I	1988	—?—	—?—	1
22	PR92	I	1987	—?—	—?—	1
23	PR1759	I	1960	—?—	—?—	1
24	PR76-78-98	I	1998	—?—	—?—	2
25	PR138-40	I	1996	—?—	—?—	2
26	PFi3945	I	1978	—?—	Рыба	1
27	PFi3934	I	1978	—?—	—?—	1
28	PH1D(3)**	III	1980	—?—	Человек***	1
29	PH3D(3)	III	1980	—?—	—?—	1
30	PH21D(3)	III	1980	—?—	—?—	1
31	PH44D(3)	III	1980	—?—	—?—	1
32	PH45D(3)	III	1980	—?—	—?—	I
33	PH40D(3)	III	1980	—?—	—?—	1
34	PH112D(3)	III	1980	—?—	—?—	1
35	PH33D(3)	III	1980	—?—	—?—	1
36	PH512	I	1981	—?—	—?—	1
37	PH7530	I	1994	—?—	—?—	1
38	PH501(1)	I	1973	—?—	—?—	1
39	PH740(1)	I	1973	—?—	—?—	1
40	PH742(1)	I	1973	—?—	—?—	1
41	PH743(1)	I	1973	—?—	—?—	1
42	PH749(1)	I	1973	—?—	—?—	1
43	PH793(1)	I	1973	—?—	—?—	1
44	PH84	I	1989	—?—	—?—	1
45	PH64	I	1989	—?—	—?—	1
46	PH67	I	1989	—?—	—?—	1
47	PH2051	I	2008	—?—	—?—	1
48	PH2053	I	2008	—?—	—?—	1
49.	PH1084	I	1973	—?—	—?—	1
50	PV1658(2)	I	1976	—?—	Окружающая среда*	1
51	PH2204(2)	I	1976	—?—	Человек**	1
52	PH2128(2)	I	1976	—?—	—?—	1
53	PH2113(2)	I	1976	—?—	—?—	1
54	MH к-29	I	1989	Московская область	—?—	1

55	2517	III	1980	Франция	Коллекция	1
56	CH1179	I	1983	Челябинск	Человек**	2
57	SPbH1373		1983	Санкт-Петербург	—?—	1
58	SPbH728	I	1975	—?—	—?—	1
59	SPbH823	I	1975	—?—	—?—	1
60	SPbH817	I	1975	—?—	—?—	1
61	SPbH531	I	1975	—?—	—?—	1
62	KH870	I	1975	Кемеровская область	—?—	1
63	KH52	I	1975	—?—	—?—	1
64	KH47	I	1975	«	—?—	1
65	KH52	I	1975	—?—	—?—	1
66	NH10	I	1976	Новосибирская область	—?—	1
67	NH105	I	1976	—?—	—?—	1
68	NH1	I	1976	—?—	—?—	1
69	NH103	I	1976	—?—	—?—	1
70	YH1	I	1977	Якутия	—?—	1
71	YH14	I	1977	—?—	—?—	1
72	YH20	I	1977	—?—	—?—	1
73	YH39	I	1977	—?—	—?—	1
74	YH24	I	1977	—?—	—?—	2
75	YH34	I	1977	—?—	—?—	1
76	YH29	I	1977	—?—	—?—	1
77	YH3	I	1977	—?—	—?—	1
78	YH6	I	1977	—?—	—?—	1
79	YH8	I	1977	—?—	—?—	1
80	SH426	I	1977	Сахалин	—?—	1
81	SH350	I	1977	—?—	—?—	1
82	SH525	I	1977	—?—	—?—	1
83	SH33	I	1977	—?—	—?—	1
84	SH310	I	1977	—?—	—?—	1

* – овощи, корнеплоды, другие продукты, смывы с овощей и корнеплодов, с тары, в которых они хранились, с оборудования овощехранилищ, пищеблоков.

** - цифра в скобках указывает на эпидемиологически подтвержденную принадлежность изолятов к одной эпидемической вспышке ДСЛ

***- пациенты с подтвержденным диагнозом псевдотуберкулеза или ДСЛ

Таблица 2. Встречаемость аллелей гена *inv* среди изолятов *Y. pseudotuberculosis* в зависимости от источника и региона выделения.

n=85	Приморский край + Сахалин n=59	Сибирь+ Урал n=17	Европейский регион n=9	Клинические n=55	Абиотические объекты n=19	Грызуны n=9
Allele 1 n=77	53	15	9	53	17	5
Allele 2 n=6	4	2	0	2	0	4
Allele 3 n=2	2	0	0	0	2	0

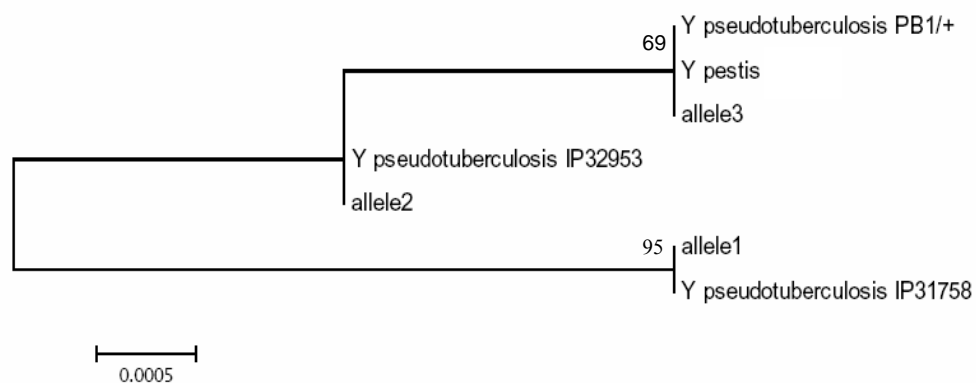


Рис. 1. Дендрограмма, устанавливающая степень схожести последовательностей фрагмента гена *inv*, кодирующего функционально-значимый домен инвазина. Аллели 1, 2, 3 описаны в тексте. Последовательности фрагмента гена *inv* штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* взяты из базы данных GenBank. Для построения дендрограммы был использован метод минимальной эволюции, включенный в программный пакет Mega, версия 3.1. Цифры показывают величины, полученные при моделировании, выполненном на всей коллекции после 1000 итераций.