

Ю.А.Попов, Г.А.Ерошенко, Е.Г.Булгакова, Н.И.Смирнова

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО АЛГОРИТМА ГЕНОТИПИРОВАНИЯ И МЕТОДОВ
ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ И ХОЛЕРЫ**

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

В обзоре обобщены и проанализированы данные литературы по использованию молекулярно-генетических методов для оценки генетического разнообразия штаммов возбудителей чумы и холеры. Предложен алгоритм генодиагностического анализа штаммов *Yersinia pestis* и *Vibrio cholerae*.

Ключевые слова: возбудители чумы и холеры, генетическое разнообразие, алгоритм генотипирования.

Большинство существующих методов индикации, идентификации, дифференциации, типирования микроорганизмов, в том числе патогенных бактерий, основано на определении различных фенотипических свойств. Однако нестабильность фенотипа (в частности, зависимость экспрессии генов от условий роста, мутационная утрата свойства) затрудняет интерпретацию получаемых результатов. Это вызывает необходимость разработки приемов молекулярной диагностики, основанной на анализе структуры генома, отличающегося большей консервативностью по сравнению с фенотипическими свойствами.

В настоящее время разработано множество молекулярно-генетических технологий и методов генодиагностического анализа, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки, которые могут быть устранены при комплексном подходе с использованием наиболее эффективных способов.

Целью данной работы был анализ данных литературы, посвященных применению методов молекулярной генетики для типирования, дифференциации и изучения генетического полиморфизма штаммов чумы и холеры, определение эффективности использования разных методов и разработка комплексного алгоритма оценки генетического разнообразия природных изолятов этих патогенов.

Возбудители чумы и холеры вызывают особо опасные инфекционные заболевания, представляющие серьезную проблему здравоохранения. Кроме того, существует реальная угроза их применения в качестве агентов биотерроризма.

Чума – природно-очаговая инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя. По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более 2000 случаев заболеваний человека чумой [58].

Геном возбудителя чумы состоит из хромосомы размером 4,65 млн п.н. и трех неконъюгативных плазмид – pCad (70,3 т.п.н.), pFra (96,2 т.п.н.) и pPst (9,6 т.п.н.). Плазмида кальцийзависимости pCad (синонимы pYV, pCD) родоспецифична и присутствует в клетках менее патогенных иерсиний – *Y. pseudotu-*

berculosis и *Y. enterocolitica*. Наличие этой плазмиды обязательно для вирулентности *Y. pestis*. Две другие плазмиды – pFra (pMT1) и pPst (pPla, pPCP1) видоспецифичны. Первая из них кодирует синтез капсульного антигена и «мышинного» токсина, а вторая – продукцию бактериоцина пестицина и активатора плазминогена [11].

По данным многих авторов, даже среди изолятов из одного природного очага чумы наблюдается генетическая и фенотипическая изменчивость, в том числе различия по составу и структуре плазмид [1, 18, 27]. Их размеры варьируют, что может быть результатом мутаций (делеций, вставок), мультимеризации или рекомбинаций. Чаще всего мультимеры образует плазмида pPst. Размеры плазмиды pCad меняются от 65 до 75 т.п.н. Изменчивы размеры и плазмиды pFra – от 60 до 80–90 т.п.н. [27]. Кроме того у штаммов чумного микроба из разных природных очагов выявляются дополнительные плазмиды.

Хромосома *Y. pestis* содержит большое количество псевдогенов, представляющих собой остатки генов, которые функционально активны у возбудителя псевдотуберкулеза. Структура этих генов нарушена внедрениями различных IS элементов (IS100, IS285, IS1541 и др.), делециями, вставками, точечными мутациями [15]. В геноме возбудителя чумы присутствуют участки, содержащие варибельные tandemные повторы различной протяженности [47]. Наличие перечисленных особенностей генома и обуславливает фенотипическое и генетическое разнообразие штаммов *Y. pestis*.

Согласно распространенной классификации чумного микроба, предложенной R.Devignat (1951), штаммы *Y. pestis*, на основании биохимических различий (способности к ферментации глицерина, редукции нитратов и окислению аммиака) и по историко-географическому происхождению, разделены на три биовара: *antiqua* (античный), *medievalis* (средневековый) и *orientalis* (восточный). Изоляты античного биовара наиболее активны по экспрессии дифференциальных биохимических признаков: они ферментируют глицерин и обладают денитрифи-

цирующей активностью. Штаммы средневекового биовара не редуцируют нитраты, но ферментируют глицерин и арабинозу, восточного – не способны ферментировать глицерин, но активно редуцируют нитраты. Штаммы предложенного недавно биовара *microtus*, циркулирующие в природных очагах полевого типа на территории Китая, в отличие от штаммов античного, средневекового и восточного биоваров, арабинозонегативны, но утилизируют рамнозу и мелибиозу.

В соответствии с классификацией, принятой в 1985 г. на Всесоюзном совещании по таксономии чумного микроба, которая основана на фенотипических свойствах, вирулентности по отношению к лабораторным животным и ландшафтно-географической приуроченности, штаммы *Y. pestis* делят на пять подвидов – основной и 4 неосновных (кавказский, алтайский, гиссарский и улегейский). Как правило, штаммы основного подвида высоковирулентны и имеют большой эпидемический потенциал. Они не ферментируют рамнозу и мелибиозу, не чувствительны к пестицину, вирулентны для лабораторных животных. По фенотипическим характеристикам штаммы основного подвида включают три классических биовара: *antiqua*, *medievalis*, *orientalis*. Штаммы неосновных подвида ферментируют рамнозу и мелибиозу, избирательно вирулентны для лабораторных животных, эпидемически малозначимы.

Существующие фенотипические схемы классификации, базирующиеся на морфологических, культуральных, биохимических, серологических и других свойствах не утратили своего значения и в настоящее время, однако достигнутые в последнее время успехи генетики и молекулярной микробиологии позволяют перевести решение задач по систематике *Y. pestis* на новый уровень, основанный на использовании молекулярно-генетических особенностей возбудителя. Перевод классификации чумного микроба на генетическую основу повысит надежность, достоверность и качество систематизации, благодаря отсутствию присущих классическим схемам недостатков, обусловленных изменчивостью фенотипических свойств.

Холера – антропонозная инфекционная болезнь с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя. Распространение холеры во многих странах определяет реальную возможность ее завоза на территорию России.

Согласно современным представлениям, в пределах вида *Vibrio cholerae*, образовались три эпидемически опасных варианта: вибрионы O1-серогруппы классического биовара, вызвавшие, видимо, первые 6 пандемий азиатской холеры (1817–1923 гг.), вибрионы O1-серогруппы биовара эльтор – возбудители 7-й пандемии (с 1961 г. по настоящее время) и появившийся в 1992 г. высоковирулентный штамм *V. cholerae* O139-серогруппы, с которым связывали начало 8-й пандемии холеры [10, 43].

Поскольку в современный период продолжа-

ется 7-я пандемия холеры, *V. cholerae* биовара эльтор, остается в центре внимания исследователей. Секвенирование его генома позволило выявить следующие особенности.

1. Этот патоген имеет две кольцевые хромосомы, различающиеся по размеру (2,96 и 1,07 млн п.н.) и кодируемым продуктам [32].

2. Значительная часть генов вирулентности входит в состав мигрирующих генетических элементов (профаги CTXφ и RS1φ, острова патогенности VPI-1 и VPI-2, острова пандемичности VSP-1 и VSP-2, остров персистенции EPI и остров кодирующий O-антиген). Они локализованы на большой хромосоме и отличаются по ГЦ-составу от остальной части генома [25, 32].

3. Многие гены малой хромосомы входят в состав интегронного острова протяженностью 126 т.п.н., содержащего 179 генных кассет, из которых лишь немногие связаны с вирулентностью или резистентностью к антибиотикам.

Мобильность генетических элементов и обусловленная этим нестабильность геномов, а также изменение экологии и иммунного статуса человека во многих регионах мира, включая Россию, создают предпосылки для образования штаммов с новыми ранее неизвестными свойствами. Такая ситуация определяет актуальность выяснения генетического разнообразия природных штаммов для оценки основных направлений эволюции возбудителя холеры эльтор в современный период, что необходимо для прогнозирования эпидситуации.

Для исследования природного разнообразия штаммов возбудителей чумы и холеры используются различные молекулярно-генетические технологии: мультилокусное секвенирование, мультилокусный анализ вариабельного числа tandemных повторов, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и его варианты – риботипирование, IS-типирование, макрорестрикционный анализ, различные виды полимеразной цепной реакции, оценки плазмидного состава [44, 53].

Метод определения плазмидного профиля штаммов достаточно прост и эффективен для мониторинга патогенных микроорганизмов, однако его применение возможно только в отношении плазмидосодержащих видов и штаммов. Исследования показали, что как типизирующий критерий плазмидный профиль может использоваться только в отношении штаммов кавказского подвида.

Параллельно с плазмидным анализом используют методы, основанные на идентификации более стабильных генетических последовательностей. Удачным генетическим маркером для видовой и подвидовой классификации является полиморфизм длин рестрикционных фрагментов высококонсервативной ДНК, кодирующей рибосомальную РНК. В настоящее время описано более 20 риботипов чумного микроба, которые авторы соотносят с различными биоварами [30, 31]. Однако штаммы чумного микро-

ба неосновных подвидов этим методом не дифференцируются [7].

Метод IS-типирования широко применяется для сравнения штаммов чумного микроба разного географического происхождения и выяснения их филогенетических связей [2, 5, 16]. Типирование ДНК-зондом на основе IS100 позволило А.Г.Боброву и А.А.Филиппову (1997) построить филогенетическое дерево, три ветви которого представляют биовары возбудителя чумы: *orientalis*, *antiqua* и *medievalis* [2]. Е.П.Савостина и соавт. выявили корреляцию полученных при помощи ДНК-зонда ВХ фингерпринтов штаммов *Y. pestis* с определенным видом носителя и разделили по этому принципу все штаммы на семь генетических вариантов [9]. М.Аchtman *et al.* выяснили геномный полиморфизм 49 штаммов *Y. pestis* трех биоваров генным зондированием с 255 т.п.н.-фрагментом IS100-элемента в качестве зонда [16]. А. Leclercq *et al.* [37], G.Torrea *et al.* [55] успешно применили комбинацию трех IS-RFLP (IS100, IS285, IS1541) для дискриминации штаммов *Y. pestis* и одновременно их кластеризации по биоварам и географическому положению [37, 55]. К недостаткам этой модификации метода генетического зондирования следует отнести то, что мобильные элементы придают нестабильность геному чумного микроба, следствием которой могут быть вариации фингерпринтов одних и тех же штаммов.

Одним из вариантов молекулярного типирования является оценка числа вариабельных тандемных повторов (VNTR-анализ) – монотонно повторяющихся нуклеотидных последовательностей произвольного состава, которые могут быть использованы для определения степени родства отдельных штаммов и групп штаммов. Данный метод успешно применяется для типирования чумного микроба [34]. Возможно его применение для эпидемиологического мониторинга [17]. Показана высокая дискриминирующая способность VNTR-тестирования для установления источника происхождения штаммов чумного микроба [1, 3, 9, 12, 13, 40]. Метод позволяет определять филогенетическое родство штаммов из разных регионов, принадлежащих к одному биовару [33, 47]. В настоящее время разрабатываются различные модификации мультилокусного VNTR-анализа (MLVA) с использованием новых локусов и способов регистрации результатов [22].

Наибольшей простотой и доступностью среди методов генотипирования отличается полимеразная цепная реакция (ПЦР). Существуют множество модификаций метода (REP, ERIC, RAPD и др.), но принцип ПЦР един – многократная амплификация различных коротких последовательностей ДНК, присутствующих в геноме бактерий. В качестве примера: с помощью пяти «произвольных» праймеров методом RAPD-ПЦР S.Shivaji *et al.* дифференцировали штаммы чумного микроба, выделенные от больных людей и из других источников [52]. Полученные результаты коррелировали с данными риботипирова-

ния [31].

Наиболее информативным методом молекулярного типирования является мультилокусное секвенирование (MLST), при этом в качестве ДНК-мишеней используются гены жизнеобеспечения. Две MLST системы разработали для дифференциации патогенных иерсиний М.Аchtman *et al.*, М.Котетшвили *et al.* – для других представителей рода *Yersinia* [16, 35]. Т.Revazishvili *et al.* провели сравнение MLST-профилей, основанных на анализе структуры генов жизнеобеспечения и патогенности штаммов, выделенных на территории США и Грузии [50]. Вариантом MLST является метод выявления единичного нуклеотидного полиморфизма. Компьютерное сравнение геномов штаммов *Y. pestis* CO92 и FP1 обнаружило 32 единичные нуклеотидные замены. В коллекции из 24 штаммов чумного микроба, выделенных в Северной Америке, при скринировании единичных замен нуклеотидов выделено семь генотипов [56]. С.Pourcel *et al.* и G.Vergnaud *et al.* применили метод анализа кластеризованных регулярно-расположенных в межгенных пространствах коротких палиндромных последовательностей для изучения геномного полиморфизма штаммов *Y. pestis* [47, 57]. Y.Cui *et al.* использовали его для типирования 125 штаммов возбудителя чумы, выделенных на энзоотических территориях Китая, Монголии и бывшего Советского Союза [23].

Анализ изложенных материалов позволяет сделать следующие предложения по формированию комплексного алгоритма генодиагностического анализа штаммов *Y. pestis*. Определение видовой принадлежности штамма (дифференциация чумного микроба от близкородственных иерсиний) проведением моно- и мультилокусных ПЦР и плазмидного скрининга; определение распространенности генов, ассоциированных с вирулентностью возбудителя с помощью моно- и мультилокусных ПЦР; определение параметров изменчивости генов вирулентности у штаммов *Y. pestis* различного происхождения методом секвенирования; определение принадлежности штаммов к конкретному подвиду, биовару, природному очагу посредством моно- и мультилокусных ПЦР, мультилокусного VNTR-анализа и секвенирования генов, кодирующих дифференциальные признаки.

Исследование выделенного изолята последовательно по четырем ступеням позволит: идентифицировать его видовой и подвидовой статус; определить наличие генов вирулентности и степень их полиморфизма, принадлежность штамма к конкретному биовару, природному очагу, а также оценить наличие филогенетических связей с другими штаммами *Y. pestis*.

Центральными проблемами ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа холеры остаются выявление генетических связей между штаммами холерного вибриона со сходными фенотипическими свойствами и разным эпидемическим потенциалом, а также расшифровка механизма фор-

мирования патогенных клонов с новыми свойствами. Для решения этих проблем используют методы молекулярного типирования. В геноме *V. cholerae* присутствует несколько копий *rrn* оперона, кодирующих рРНК. Рекомбинации, происходящие между *rrn* оперонами, лежат в основе вариативности риботипов холерных вибрионов. По результатам риботипирования был сделан вывод, что *V. cholerae* классического биовара, вызвавший шестую пандемию холеры, отличается по структуре генома от возбудителя седьмой пандемии. Вибрионы двух биоваров произошли от разных авирулентных штаммов, обитающих во внешней среде, которые независимо друг от друга в процессе горизонтального переноса генов получили гены O1-антигена, а также умеренные фаги CTXφ и VPI с ключевыми генами вирулентности [19, 32]. Несмотря на то, что этот метод характеризуется умеренной разрешающей способностью [14], он широко используется для типирования штаммов *V. cholerae*, выделенных из различных географических регионов и обладающих разным эпидемическим потенциалом [24, 49]. Так, по данным риботипирования с зондом на 16S рРНК, установлено, что клинические штаммы *V. cholerae* O139, возникшие в Индии и Бангладеш (1992–1993 гг.), и авирулентные *V. cholerae* O139, появившиеся в воде открытых водоемов России с 1993 г., не имеют генетического родства и последние не могут служить резервуаром для формирования эпидемически опасной популяции возбудителя O139 серогруппы [6]. Таким образом, обладая высокой воспроизводимостью и легко интерпретируемыми результатами, позволяющими объединять тестируемые штаммы в группы (риботипы), этот метод может быть использован при определении степени родства штаммов *V. cholerae*, выделенных на географически удаленных территориях [24, 36].

Сравнительно недавно для генотипирования холерного вибриона стали использовать в качестве зондов мобильные генетические элементы. В 2002 г. M.Li *et al.* с помощью RFLP-анализа полиморфных длин рестрикционных фрагментов большой и малой хромосом, расщепленных эндонуклеазой *SphI*, и фингерпринтинга на основе IS1004-элемента исследовали 300 штаммов *V. cholerae* не O1 было обнаружено четыре изолята неэпидемических серогрупп, имеющих сходные с классическими и эльтор холерными вибрионами фингерпринты, геномы которых, по данным секвенирования и ПЦР-анализа, содержали основные «блоки вирулентности» (CTXφ и VPI) различного происхождения. Полученные данные позволили сделать предположение о возможности возникновения эпидемических вспышек холеры, вызванных вибрионами не O1/не O139, обладающих патогенным потенциалом [39].

Результаты исследований метода электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) показали его высокую разрешающую способность и его преимущество по сравнению с другими генотипическими методами [21, 28], поскольку он позволяет выяснять географи-

ческое происхождение штамма. Тем не менее, несмотря на явные достоинства, этот метод пока не нашел широкого применения в практике отечественного здравоохранения не только из-за высокой стоимости оборудования и сложности исследования.

Одними из наиболее простых методов типирования *V. cholerae* являются методы, основанные на ПЦР с использованием различных олигонуклеотидных праймеров, ориентированных как на конкретные ДНК-мишени (REP-ПЦР, ERIC-ПЦР, ISSR-ПЦР), так и на случайные участки ДНК (RAPD-ПЦР). В 1995 г. I.G.Rivera *et al.* впервые применили ERIC-ПЦР для изучения генетических связей между штаммами холерных вибрионов, показав, что токсигенные вибрионы эльтор и *V. cholerae* O139 серогруппы, выделенные от больных и из воды открытых водоемов в разные годы, имели один вариант распределения ПЦР-фрагментов, отличающийся от молекулярного «типа» авирулентных вибрионов O1 серогруппы. Между тем, у 36 изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 выявлено 15 различных ERIC-профилей [51]. Аналогичные результаты получены при ПЦР-типировании клинических и «водных» штаммов *V. cholerae* 17 неэпидемических серогрупп, выделенных в Калькутте в 1997–1998 гг., с использованием «универсальных» олигонуклеотидных праймеров. Обнаружено, что исследуемые штаммы отличаются по ПЦР-фингерпринтам как от вирулентных вибрионов O1 и O139 серогрупп, так и между собой, причем не имелось корреляции между источником, местом выделения и серогруппой [20]. Следует отметить, что ERIC- и RAPD-ПЦР широко используются для выявления генетического родства между штаммами *V. cholerae* [8, 46, 48].

Метод MLVA успешно применяется для изучения генома возбудителя холеры [4]. С помощью MLVA показана возможность выявлять географическое происхождение клонов *V. cholerae* [29, 54]. В работе J.S.Olsen *et al.* (2009) описаны мультиплексные ПЦР системы для проведения MLVA, использование которых позволяет через 5 ч получить окончательные данные [45].

Широкое применение при изучении геномного полиморфизма *V. cholerae* нашел метод типирования, основанный на мультилокусном секвенировании отдельных фрагментов генома. Использование метода MLST позволяет не только определять вид, биовар, но также филогенетическое родство штаммов *V. cholerae*, выделенных на разных территориях и в разное время. Так, в исследованиях S.S.Mohapatra *et al.* показано, что токсигенные и некоторые нетоксигенные штаммы *V. cholerae* имеют различное происхождение. В то же время выявлены нетоксигенные штаммы, генетически тесно связанные с токсигенными. Эти данные дают ключ к пониманию механизмов формирования токсигенных штаммов из нетоксигенных путем приобретения кластеров генов вирулентности [41]. На основании данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей шести

генов «домашнего хозяйства» (*asd*, *cadA*, *epd*, *idh-II*, *lap*, *mdh*) показано существование у 29 изолятов *V. cholerae* O139, по крайней мере, трех разных клонов, один из которых действительно имеет генотипическое родство с вибрионами эльтор [26].

На основе анализа литературных и собственных данных предложен комплексный алгоритм оценки генетического разнообразия природных штаммов *V. cholerae*, который включает 4 этапа: определение видовой принадлежности, серогруппы и биовара с помощью микробиологических и серологических методов и мультилокусных ПЦР; выяснение распространенности основных генов, связанных с вирулентностью, персистенцией, пандемичностью и антибиотикорезистентностью на основе моно- и мультилокусных ПЦР; оценка параметров структурной изменчивости генома природных штаммов *V. cholerae*, выделенных на различных территориях, с использованием мультилокусной ПЦР и секвенирования ключевых ДНК-мишеней; определение генетических связей между природными штаммами, выделенными на разных территориях, для выяснения их происхождения с помощью методов мультилокусного секвенирования генов жизнеобеспечения и вирулентности, VNTR-анализа и риботипирования.

Использование предложенного алгоритма обеспечит: идентификацию возбудителя холеры, включая его серогруппу и/или биовар; получение сведений о распространенности основных генов, определяющих вирулентность, персистентность, резистентность к антибиотикам и пандемический потенциал; генетические связи между штаммами различного происхождения. Эти сведения создадут базу данных генотипов возбудителя, которая необходима для определения направления эволюции его патогенности, а также совершенствования системы молекулярно-эпидемиологического мониторинга.

Предлагаемый алгоритм соответствует современным требованиям к молекулярной диагностике и генотипированию *Y. pestis* и *V. cholerae*. Он является высокоэффективным, позволяет определять видовую и внутривидовую принадлежность штаммов, устанавливать происхождение и географическую приуроченность изолята, в том числе с атипичными свойствами. Возможна стандартизация и унификация получаемых результатов. Разработанный алгоритм позволяет проводить широкомасштабные исследования геномов штаммов чумного микроба и холерного вибриона. Использование предложенного комплекса методов анализа генетического разнообразия штаммов чумы и холеры не ограничивает числа используемых для генодиагностического анализа ДНК мишеней, а быстрые темпы развития этих технологий и усовершенствования используемой приборной базы способствует ускорению темпов проведения исследований.

При накоплении большого массива информации, использование алгоритма даст возможность, во-первых, повысить эффективность мониторинга

чумы и холеры, во-вторых, с использованием специализированных компьютерных программ создать базы данных молекулярных портретов штаммов этих возбудителей.

Работа выполнена по Государственному контракту № 111-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю. Изучение информативности различных модификаций ПЦР с универсальными праймерами при характеристике геномного полиморфизма *Yersinia pestis*. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2004; 1:34–8.
2. Бобров А.Г., Филиппов А.А. Распространенность IS285 и IS100 в геномах *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1997; 2:36–40.
3. Брюханов А.Ф., Жаринова Н.В., Брюханова Г.Д. и др. Генетическое типирование штаммов *Yersinia pestis* Центрального Кавказа. В кн.: Генодиагностика инфекционных заболеваний. Тез. докл. 4-й Всерос. науч.-практ. конф. М.; 2002; 263–5.
4. Водопьянов С.О., Олейников И.П., Гончаров Е.К. и др. Вариативный tandemный повтор *Vca Vibrio cholerae*. Мол. биология. 2002; 36(6):1074–9.
5. Горшков О.В., Савостина Е.П., Попов Ю.А., Плотников О.П. Сравнительное изучение структуры некоторых генетических зондов, используемых для типирования штаммов *Yersinia pestis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1999; 4:29–33.
6. Ерошенко Г.А., Осина А.В., Смирнова Н.И. Риботипирование штаммов *Vibrio cholerae* O139, полученных из различных источников. Пробл. особо опасных инф. 2002; 1:80–5.
7. Ерошенко Г.А., Павлова А.И., Куклева Л.М. и др. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis* на основе вариативности генов биосинтеза рРНК. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:6–10.
8. Мишанькин Б.Н., Романова Л.В., Ломов Ю.М. и др. *Vibrio cholerae* O139, выделенные от людей и из воды открытых водоемов: сравнительное генотипирование. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 3:3–7.
9. Савостина Е.П., Попов Ю.А., Каушанова Т.Н., Яшечкин Ю.И. Анализ геномного полиморфизма типовых и атипичных штаммов возбудителя чумы с использованием полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 1:22–6.
10. Смирнова Н.И. Возбудитель холеры новой O139-серогруппы: молекулярно-генетические особенности и происхождение. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 3:23–33.
11. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Сравнительный анализ молекулярно-генетических особенностей генома и их эволюционных преобразований у возбудителей холеры, чумы и сибирской язвы. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2006; 2:9–19.
12. Сучков И.Ю., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. и др. Мультилокусный VNTR-анализ в изучении популяционной структуры *Yersinia pestis* в природных очагах. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 4:19–28.
13. Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О. и др. Генотипирование *Yersinia pestis*: вариативность локуса (CAAA)_n у природных штаммов, выделенных на территории бывшего СССР. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 4:18–21.
14. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций. Клин. микроб. и антимикроб. терапия. 2000; 3(2):82–95.
15. Achtman M., Morelli G., Zhu P. et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. PNAS. 2004; 101:17837–432.
16. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guisoye A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1999; 96(24):14043–8.
17. Adair D., Worsham P., Hill K. et al. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:1516–9.
18. Anisimov A.P., Lindler L., Pier G. Intraspecies Diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17(2):434–64.
19. Byun R., Elbourne L. D., Lan R. et al. Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes. Infect. Immun. 1999; 67(3):1116–1124.
20. Chakraborty S., Garg P., Ramamurthy T. et al. Comparison of antibiogram, virulence genes, ribotypes and DNA fingerprints of *Vibrio cholerae* of matching serogroups isolated from hospitalized diarrhea cases and from the environment during 1997–1998 in Calcutta,

- India. J. Med. Microbiol. 2001;50(10):879–88.
21. Chatterjee S., Ghosh K., Raychoudhuri A. et al. Phenotypic and genotypic traits and epidemiological implication of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in India during 2003. J. Med. Microbiol. 2007; 56(6):824–32.
22. Ciannaruconi A., Grassi S., Riccardo De Santis et al. Fieldable genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* based on 25-loci Multi Locus VNTR Analysis. BMC Microbiol. 2008; 8:21.
23. Cui Y., Li Y., Gorge et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustering regularly interspaced short palindromic repeats. PLoS ONE. 2008; 3(7):e2652.
24. Dalsgaard A., Echeverria P., Larsen J.L. et al. Application of ribotyping for differentiating *Vibrio cholerae* non-O1 isolates from shrimp farms in Thailand. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61(1):245–51.
25. Dziejman M., Balon E., Boyd D. et al. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99(3):1556–61.
26. Farfán M., Miñana-Galbis D., Fusté M.C., Lorén J.G. Allelic diversity and population structure in *Vibrio cholerae* O139 Bengal based on nucleotide sequence analysis. J. Bacteriol. 2002; 184(5):1304–13.
27. Filippov A.A., Solodovnicov N.S., Kukleva L.M., Protsenko O.A. Plasmid composition of *Yersinia pestis* strains of different origin. FEMS Microbiol. Lett. 1990; 67:45–8.
28. Fraga S.G., Villagra De Trejo A., Pichel M. et al. Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea. Revista Argentina de Microbiología. 2009; 41:11–9.
29. Ghosh R., Nair G.B., Tang L. et al. Epidemiological study of *Vibrio cholerae* using variable number of tandem repeats. FEMS Microbiol. Lett. 2008; 288(2):196–201.
30. Guiyole A., Grimont F., Itean I. et al. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. J. Clin. Microbiol. 1994; 32(3):634–41.
31. Guiyole A., Rasoamanana A., Buchrieser C. et al. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. J. Clin. Microbiol. 1997; 35(11):2826–33.
32. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature. 2000; 406:477–83.
33. Kingston J.J., Urmil Tuteja, Minakshi Kapil et al. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs. Antonie van Leeuwenhoek. 2009; 96(3):303–12.
34. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P., Wong J., Keim P. Identification and Characterization of Variable-Number Tandem Repeats in the *Yersinia pestis* Genome. J. Clin. Microbiol. 2001; 39(9):3179–85.
35. Kotetishvili M., Kreger A., Wauters G. et al. Multilocus Sequence Typing for Studying Genetic Relationships among *Yersinia* Species. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(6):2674–84.
36. Lan R., Reeves P.R. Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. Microbiology. 1998; 144(5):1213–21.
37. Leclercq F., Torrea G., Chenal-Francisque V., Carniel E. 3IS-RFLP a powerful tool for geographical clustering of global isolates of *Yersinia pestis*. Adv. Exp. Med. Biol. 2007; 603:322–6.
38. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L., Priour A. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001; 1:2.
39. Li M., Shimada T., Morris J. G. et al. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. Infect. Immun. 2002; 70(5):2441–53.
40. Lowell J.L., Zhansarina A., Yockey B. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Yersinia pestis* isolates from Kazakhstan and adjacent regions. Microbiology. 2007; 153:169–77.
41. Mohapatra S.S., Ramachandran D., Mantri C.K. et al. Determination of relationships among non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains from housekeeping gene sequences and ribotype patterns. Res. Microbiol. 2009; 160(1):57–62.
42. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J. et al. Genetic Variability of *Yersinia pestis* Isolates as Predicted by PCR-based IS-100 Genotyping and Analysis of Structural Genes Encoding Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (glpD). J. Bacteriol. 2002; 184(4):1019–27.
43. Mukhopadhyay A.K., Garg S., Nair G.B. et al. Biotype traits and antibiotic susceptibility of *Vibrio cholerae* serogroup O1 before, during and after the emergence of the O139 serogroup. Epidemiol. Infect. 1995; 115(3):427–34.
44. Olive D.M., Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. J. Clin. Microb. 1999; 37(6):1661–9.
45. Olsen J.S., Aarskaug T., Skogan G. et al. Evaluation of a highly discriminating multiplex multi-locus variable-number of tandem-repeats (MLVA) analysis for *Vibrio cholerae*. J. Microbiol. Methods. 2009; 78(3):271–85.
46. Pichel M., Rivas M., Chinen I. et al. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(1):124–34.
47. Pourcel C., Andre-Mazeaud F., Neubauer H. et al. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 2004; 4:22.
48. Pugliese N., Maimone F., Scarscia M. et al. SXT-related integrating conjugative element and IncC plasmids in *Vibrio cholerae* O1 strains in Eastern Africa. J. Antimicrob. Chemother. 2009; 63(3):438–42.
49. Qu M., Xu J., Ding Y. et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O139 in China: polymorphism of ribotypes and CTX elements. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(6):2306–10.
50. Revazishvili T., Rajanna C., Bacanidze L. Characterization 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; 14(5):429–36.
51. Rivera I.G., Chowdhury M.A.R., Huq A. et al. Enterobacterial repetitive Intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61(8):2898–904.
52. Shivaji S., Bhanu N.V., Aggarwal R.K. Identification of *Yersinia pestis* as causative organism of plague in India as determined by 16S rDNA sequencing and RAPD-based genomic fingerprinting. FEMS Microbiol. Lett. 2000; 189:247–52.
53. Singh A., Goering R.V., Simjee S. et al. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. Clin. Microb. Rev. 2006; 19(3):512–31.
54. Stine O.C., Alam M., Tang L. et al. Seasonal cholera from multiple small outbreaks, rural Bangladesh. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14(5):831–3.
55. Torrea G., Chenal-Francisque V., Leclercq F. et al. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. J. Clin. Microbiol. 2006; 44:2084–92.
56. Touchman J. W., Wanger D.M., Hao J. et al. A North American *Yersinia pestis* draft genome sequence: SNPs and phylogenetic analysis. PLoS ONE. 2007; 2(2):e220.
57. Vergnaud G., Li Y., Gorge O. 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.
58. World Health Organization. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/index.htm>. Accessed April 18. Plague. 2006; Fact sheets 267.

Об авторах:

Попов Ю.А., Ерошенко Г.А., Булгакова Е.Г., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Yu.A. Popov, G.A. Eroshenko, E.G. Bulgakova, N.I. Smirnova

Development of Complex Genotyping Algorithm and Methods of Evaluation of the Genetic Diversity of Plague and Cholera Agents Natural Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Present review summarizes the literary data on applying the modern molecular genetic methods to analyze the diversity of natural strains of plague and cholera agents. Chosen was the complex of most perspective methods on the basis of which was developed the algorithm of gene-diagnostic analysis of *Yersinia pestis* and *Vibrio cholerae* strains.

Key words: plague and cholera agents, genetic diversity, genotyping algorithm.

Authors:

Popov Yu.A., Eroshenko G.A., Bulgakova E.G., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 13.10.09.