

## ГЕНЕТИКА

Обзорная статья

УДК 579.842.23: 575

doi: 10.17072/1994-9952-2022-1-54-63

### Обзор методов генетической дифференциации штаммов возбудителя псевдотуберкулеза

Мисак Геворгович Мелоян<sup>1✉</sup>, Екатерина Александровна Воскресенская<sup>2</sup>,  
Светлана Александровна Лебедева<sup>3</sup>, Алексей Леонидович Трухачев<sup>4</sup>

<sup>1,3,4</sup> Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия,  
tsenevapasteur@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>

<sup>1✉</sup> meloyan\_mg@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7268-9298>

<sup>3</sup> illang@mail.ru

<sup>4</sup> trukhachev\_al@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>

**Аннотация.** Псевдотуберкулез – инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Yersinia pseudotuberculosis*. Заболевание проявляется в виде спорадических вспышек и наносит существенный урон здоровью населения. Помимо своевременного выявления возбудителя используют различные методы для эффективного определения принадлежности возбудителя к определенному генотипу. В настоящее время для генотипирования штаммов возбудителя псевдотуберкулеза используются различные методы. В обзоре представлены методы генетической дифференциации, наиболее часто используемые в последнее время: MLVA, MLST, IS-RFLP и т.д. Анализ применяемых методов поможет подобрать наиболее эффективный метод для генотипирования возбудителя псевдотуберкулеза, а также выбрать вектор разработки нового подхода.

**Ключевые слова:** возбудитель псевдотуберкулеза, *Yersinia pseudotuberculosis*, обзор, методы, генотипирование, анализ

**Для цитирования:** Обзор методов генетической дифференциации штаммов возбудителя псевдотуберкулеза / М. Г. Мелоян, Е. А. Воскресенская, С. А. Лебедева, А. Л. Трухачев // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2022. Вып. 1. С. 54–63. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-1-54-63>.

## GENETICS

Review article

### Review of the methods of genetic differentiation of pseudotuberculosis pathogen strains

Misak G. Meloyan<sup>1✉</sup>, Ekaterina A. Voskresenskaya<sup>2</sup>, Svetlana A. Lebedeva<sup>3</sup>,  
Aleksei L. Trukhachev<sup>4</sup>

<sup>1,3,4</sup> Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

<sup>2</sup> Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Pasteur, Saint Petersburg, Russia,  
tsenevapasteur@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>

<sup>1✉</sup> meloyan\_mg@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7268-9298>

<sup>3</sup> illang@mail.ru

<sup>4</sup> trukhachev\_al@antiplague.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>

**Abstract.** Pseudotuberculosis is an infectious disease, the causative agent of which is *Yersinia pseudotuberculosis*. The disease appears in the form of sporadic outbreaks and causes significant damage to the health of the population. In addition to timely detection of the pathogen, various methods are used to effectively determine whether the pathogen belongs to a particular strain. Currently, various methods are used for genotyping strains of the causative agent of pseudotuberculosis. The review presents the methods of genetic differentiation most frequently used in recent years: MLVA, MLST, IS-RFLP, etc. The analysis of the applied methods will help to choose the most effective method for genotyping the causative agent of pseudotuberculosis, as well as to choose the vector of development of a new approach.

**Keywords:** causative agent of pseudotuberculosis, *Yersinia pseudotuberculosis*, review, methods, genotyping, analysis

**For citation:** Meloyan M. G., Voskresenskaya E. A., Lebedeva S. A., Trukhachev A. L. [Review of the methods of genetic differentiation of pseudotuberculosis pathogen strains]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 1 (2022): pp. 54-63. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-1-54-63>.

## Введение

Псевдотуберкулез – инфекционное заболевание, вызываемое возбудителем *Yersinia pseudotuberculosis*, относящееся к группе сапрозоонозов. Заболевание регистрируют во всех странах мира, в самых различных регионах и климатических зонах. Совместно с кишечным иерсиниозом в Европе псевдотуберкулез занимает треть от всех зоонозных кишечных инфекций [EFSA and ECDC, 2016]. На территории РФ в течение многих лет сохраняется выраженная вариабельность интенсивности эпидемического процесса псевдотуберкулеза. В нашей стране наиболее высокие показатели заболеваемости псевдотуберкулезом, превышающие федеральный в пять и более раз, отмечаются, в основном, в субъектах СФО, ДФО, а также в отдельных субъектах СЗФО и УФО.

Диапазон клинических проявлений при псевдотуберкулезе у человека широкий – от диспепсий и абдоминальных болей до системных нарушений организма [Бургасова и др., 2009]. Заболевание протекает остро или хронически. Часто при острой инфекции появляются трудноизлечимые аллергические артриты, сопутствующие уретриты, узловатая эритема, конъюнктивиты и даже миокардиты [Шурыгина и др., 2003]. Могут отмечаться изменения в иммунной системе и печени. Абдоминальные жалобы включают боли, тошноту, рвоту при слабых энтеритных проявлениях. Боли в правой подвздошной области иногда приводят к ошибкам диагноза и неоправданным операциям по поводу аппендицита [Бургасова, 2011]. Существуют наблюдения, которые свидетельствуют, что этиологическим агентом при аппендиците может быть возбудитель псевдотуберкулеза [Шестакова и др., 2012]. Для специфической острой формы, носящей название «дальневосточная скарлатино-подобная лихорадка», характерны интоксикация, высокая температура, катарально-респираторные симптомы и экзантема [Amphlett, 2015].

Резервуар инфекции – её носители, а именно, мышевидные грызуны, домашние и дикие мигрирующие птицы, а также зайцы, свиньи, крупный рогатый скот, лошади, козы и кошки. Источником возбудителя опосредованно являются также контаминированные выделениями больных-носителей, овощи, фрукты, вода, молоко, мясо и другие продукты, инфицированность которых усиливается при длительном хранении в условиях пониженной температуры. Сохраняется патоген также в почве [Каримова, 2017; Ch'ng et al., 2010]. Часто выявляют возбудитель в условиях городов и поселков у серых, черных крыс, домовых и лесных мышей. Среди людей отмечаются спорадические случаи и вспышки заболевания в регионах, в которых выделяют бактерию и из внешней среды. Последняя крупная вспышка зарегистрирована в 2021 г. в г. Красноярске. Было выявлено 114 случаев заболевания псевдотуберкулезом среди школьников из 27 образовательных организаций. Случаи заболеваний регистрировались в период до марта 2021 г. и были связаны с употреблением салатов из сырых овощей в школьных столовых.

Вместе с существенным уроном, наносимым здоровью населения бактериями *Y. pseudotuberculosis*, существуют также трудности выделения культуры от больных. В комплексе эти факторы требуют постоянного контроля над возбудителем, нишами его обитания и перемещением между потенциальными очагами. Кроме того, возбудитель отличается выраженной адаптационной способностью, широким спектром антигенов, плазмидных и хромосомных детерминант вирулентности. Все это в комплексе определяет множественность клинических проявлений. В связи с этим перед лабораторной службой остаются актуальными вопросы эффективной лабораторной диагностики и полноценной молекулярно-генетической характеристики выделяемых штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Важным также является оперативное получение сведений о выделенных штаммах и для прогностического анализа, клинического течения заболевания (серотип, генотип, наличие генов вирулентности; фенотипирование), и для проведения качественного эпидемиологического анализа.

Цель работы – сравнительный анализ методов генотипирования, применяемых для дифференциации штаммов возбудителя псевдотуберкулеза.

## Обзор методов

Существует несколько методов генетического типирования штаммов возбудителя псевдотуберкулеза, которые применяются чаще всего. В основе одной части методов лежит сравнительный анализ отдельных генов и их вариантов. В других методах исследуется распределение в геноме различных генетических маркеров (единичные нуклеотидные замены – SNP, вариабельные tandemные повторы – VNTR, INDEL-маркеры, гены, кодирующие белки рибосом, сайты эндонуклеаз рестрикции, CRISPR последовательности и др.).

Инструменты генотипирования, существующие в настоящее время, позволяют проводить генетическую дифференциацию штаммов *Y. pseudotuberculosis* различными методами, однако остается необходи-

мость продолжения совершенствования имеющихся и разработки новых способов для генотипирования вновь выделенных и уже хранящихся в коллекциях микроорганизмов. Следует иметь в арсенале исследователей спектр методов внутривидовой генетической дифференциации, отличающихся различной дискриминирующей способностью и эффективностью, использование которых позволит оценить генетическое разнообразие изучаемых штаммов и применить эти данные в эпидемиологическом анализе.

Одним из первых методов типирования, который стал использоваться для возбудителя псевдотуберкулеза, является метод серотипирования. Известно, что липополисахарид (ЛПС) во внешнем монослое наружной мембраны является наиболее значимым диагностическим антигенным детерминантом, а вариативность структуры ЛПС связана со специфическими по составу полисахаридными радикалами, отражающими групповые особенности продуцентов. Антигенная активность каждого специфического образца ЛПС индуцирует синтез специфических для группы антител. Именно это позволило разработать метод серотипирования [Thall, Knapp, 1971] и разделить общую мировую популяцию *Y. pseudotuberculosis* на 15 серовариантов (O:1–O:15) и дополнительно ещё на 6 подвариантов (O:1b и O:1c; O:2b и O:2c; o:4b и O:5b) [Kenyon, Sunneen, Reeves, 2017]. Патогенными для людей считаются сероварианты O:1a, O:1b, O:1c, O:2a, O:2b, O:2c, O:3, O:4a: O:4b; O:5a, O:5b. Наиболее часто в России выявляются штаммы сероваров O:1a, O:1b, O:1c, O:3, O:4a: O:4b. Серотипирование штаммов *Y. pseudotuberculosis*, будучи простым и доступным методом исследования, многие годы использовалось в лабораторной диагностике псевдотуберкулеза. В настоящее время перспективным направлением в типировании возбудителей инфекционных заболеваний является метод определения серотипа с помощью ПЦР. Метод O-генотипирования штаммов возбудителя псевдотуберкулеза основан на анализе структуры генов, отвечающих за синтез каждого из вариантов O-антигена [Bogdanovich et al., 2004]. При использовании данного подхода мишенями являются участки ДНК, которые кодируют ферменты, участвующие в сборке O-полисахаридов. Этот метод способен охарактеризовать штаммы *Yersinia pseudotuberculosis* по всем основным серотипам. С его помощью был проведен анализ 117 штаммов псевдотуберкулезного микроба, относящихся к O:1–O:4 серотипам, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке [Климов, Чеснокова, 2007]. В результате было установлено, что доминирующим серотипом в обоих регионах был O:1b.

Методом, который можно отнести к способам генетической дифференциации, является анализ плазмидного состава штаммов *Y. pseudotuberculosis*. С помощью электрофоретического скрининга плазмид оценивался геномный полиморфизм, что позволяло распределить общую популяцию *Y. pseudotuberculosis* на плазмидовары по числу и размерам плазмид. Основными в этих комплексах являются мажорные плазмиды с М.м. 82 и 45–47 МД, так как их связывают с эпидемической опасностью и патогенностью микроба. Дополняют их криптические плазмиды с массой в диапазоне 2–100 МД [Сомова и др., 2016]. Использование данного метода позволило Шубину при исследовании коллекции 2 500 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из РФ выявить 34 плазмидоварианта [Шубин, 1993]. Учет плазмидного состава позволяет определить доминирующие генотипы (плазмидовары) на определенной территории, устанавливать эпидемиологические связи, а также выявлять влияние конкретных плазмид на течение болезни. Однако плазмиды могут утрачиваться бактериями под влиянием факторов внешней среды (в основном при хранении и пересевах). Утрата плазмид приводит к неоднородности и к изменению плазмидного варианта, что влияет на точность и воспроизводимость метода. Вместе с тем наличие плазмид является важным свойством штамма, которое учитывается в различных схемах генотипирования, применяемых в настоящее время.

В последние десятилетия развитие молекулярной биологии способствовало разработке подходов, ориентированных на анализ структуры всего генома и отдельных генов, детерминирующих определенную генетическую информацию.

Использование для анализа детерминант вирулентности позволило Н. Fukushima с соавторами определить генотипы, отличающиеся наличием ряда хромосомных и плазмидных генов, в числе которых кластер генов HPI (high-pathogenicity island – островок высокой патогенности), суперантиген YPM и плазмиды pYV. В своей работе авторы разделили все исследованные штаммы, выделенные из различных регионов, на 6 групп по наличию генов или генетических структур, имеющих отношение к вирулентности. Авторы также попытались связать генотипы с клиническими формами заболевания и его тяжестью. Исследовалось наличие в геноме полного островка патогенности (HPI) и вариантов этого островка (R-HPI). Определялся также тип гена (a, b, c), кодирующего суперантиген YPM [Fukushima et al., 2001].

Активная работа по генотипированию штаммов *Y. pseudotuberculosis* проводилась и отечественными авторами [Кокорина, 2013; Каримова, Климов, Чеснокова, 2016]. Было предложено дополнить алгоритм типирования генами “острова адгезии-патогенности” иерсиний YAPI (*Yersinia Adhesion Pathogenicity Island*) и генами плазмиды pVM82. Анализ различных вариантов локусов HPI, *ypm*, YAPI и pVM82 у разных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории РФ, позволил разделить штаммы на 14 генотипов [Кокорина, 2013]. При этом, самыми распространенными на территории России являются генотипы 3a (*ypmA*<sup>+</sup>), 3b (*ypmA*<sup>+</sup>L-YAPI<sup>+</sup>), 3c (*ypmA*<sup>+</sup>L-YAPI<sup>+</sup>pVM82<sup>+</sup>) – 16,3, 17,6, 60% случаев, соответственно. Другие авторы на основании таких критериев, как наличие HPI, *ypmA* и плазмиды pYV, изучая

штаммы псевдотуберкулеза, выделенные на территории Сибири и Дальнего Востока, разделили их на 4 генетические группы [Каримова, Климов, Чеснокова, 2016]. Оказалось, что более 90% штаммов из Сибири и Дальнего Востока относились к I генетической группе с генотипом HPI-, *ypmA*+, *pYV*+.

Способы молекулярно-генетической внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pseudotuberculosis*, базирующиеся на сравнительном анализе распределения в геноме различных генетических маркеров, также широко представлены в литературе. Одним из таких методов, который успешно применяется и в настоящее время, является риботипирование. В качестве мишеней используются высококонсервативные фрагменты генов из оперонов 16S и 23S РНК, которые обнаруживаются в наборе нуклеотидных последовательностей, представляющих паттерны EcoRI и EcoRV рестрикции хромосом. В одной из работ по комбинациям этих паттернов исследователи получили 27 риботипов среди 80 изолятов [Voskresenskaya et al., 2005]. При анализе связи между рибо- и серотипом было выявлено, что в 6 случаях штаммы одного риботипа относились к разным серотипам, или подсеротипам. Было замечено также, что различные риботипы, относящиеся к одному серотипу, на дендрограмме были часто сгруппированы в одной ветви. Также интересные результаты были получены при анализе связи риботипов и географии изоляции. Штаммы из одного континента или страны могли быть сгруппированы в разные кластеры, а из разных континентов могли войти в один кластер и, иногда, риботип. Также не было выявлено четкой корреляции между источником изолята и риботипом. Возможно, что отсутствие однозначной связи между установленным генотипом и географическим местом выделения отражает свойства популяций штаммов возбудителя псевдотуберкулеза, которые характеризуются «неклональным» типом существования. Такая характеристика отличает *Y. pseudotuberculosis* от близкородственного микроорганизма *Yersinia pestis*, который имеет «клональный» тип популяции.

Для более точного и подробного разделения штаммов по генотипам был предложен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ряда генов «домашнего хозяйства» возбудителя псевдотуберкулеза. Для реализации этого применяют MLST анализ (Multilocus sequence typing, типирование на основе мультилокусного секвенирования), суть которого заключается в сравнении небольшого числа секвенированных генов [Ch'ng et al., 2010; Duan et al., 2014; Laukkanen-Ninios et al., 2011]. Данный метод был использован R. Duan с соавторами для анализа гомологии патогенных видов рода *Yersinia*. В работе было проанализировано 1 015 штаммов по 7 генам «домашнего хозяйства»: *adh*, *argA*, *aroA*, *glnA*, *thrA*, *tmk*, *trpE*. В результате было выявлено 188 ST (sequence types). Филогенетическое древо позволило исследователям подтвердить предположение о том, что патогенный *Y. pestis* возник от *Y. pseudotuberculosis* [Duan et al., 2014]. В работе R. Laukkanen-Ninios проводилось генотипирование с помощью 7 «housekeeping» генов, как и в работе R. Duan. Однако в данном исследовании использовали 417 штаммов, представляющих четыре популяции комплекса *Y. pseudotuberculosis*: *Y. pseudotuberculosis sensu stricto* (*s.str.*), *Y. pestis*, *Y. similis*, а также недавно выделенная корейская группа. В результате исследователи получили 89 ST и разделили изоляты на три группы. Самой многочисленной являлась группа *Y. pseudotuberculosis s.str.*, вторая включала в себя несколько изолятов *Y. similis*, а третья содержала только штаммы корейской группы. Примечательно, что штаммы *Y. pestis*, образовали один ST и вошли в группу *Y. pseudotuberculosis s.str.* [Laukkanen-Ninios et al., 2011]. В другой работе S.L. Ch'ng с соавторами целевыми последовательностями выступили другие 7 «housekeeping» генов: *mdh*, *gyrB*, *fumC*, *sucA*, *pgi*, *recA*, *aroC*. Мишени должны были отвечать некоторым требованиям: непосредственное участие в метаболизме, равномерное распределение по геному для исключения риска переноса в рамках одного события рекомбинации. В исследовании использовали 79 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, которые представляли различные серотипы. В результате было идентифицировано 62 ST (sequence type, секвенс тип). А при построении филогенетического древа методом «ближайшего соседа» было выявлено два кластера. В кластер А вошли штаммы, которые имели различную географию и были выделены от животных и людей, а в кластер В – штаммы, выделенные на Дальнем Востоке. Кроме того, в кластер А вошли штаммы, патогенные для человека, которые имели в своей последовательности плазмиду *pYV*, суперантиген *YPMa* и неполноценный HPI, тогда как в кластер В – непатогенные штаммы, содержащие суперантиген *YPMb* (Population Structure and Evolution of Pathogenicity). Анализируя представленные результаты, можно отметить, что не всегда прослеживается четкая зависимость распределения по генотипам от свойств штаммов при использовании разнообразных способов генетической дифференциации [Ch'ng et al., 2011].

Были отмечены трудности и в интерпретации результатов генотипирования, выполненных и другими методами с достаточно большой дискриминационной способностью. Одним из таких является метод IS-RFLP (полиморфизм длин рестриционных фрагментов инсерционных последовательностей – insertion sequence restriction fragment length polymorphism). Подход включает в себя разрезание определенной области ДНК, где находятся IS-элементы, а затем разделение фрагментов ДНК электрофорезом на основе агарозного геля и определение количества фрагментов и относительных размеров. Так, исследование с использованием метода, в котором использовался только IS100-элемент в качестве маркера в анализе, было недостаточно информативным, но при применении последовательностей мишеней уже двух элементов – IS285 или/и IS1541, наоборот, типирование было эффективным [Voskresenskaya et al., 2014].

Использование нескольких IS-мишеней значительно повысило дискриминационную способность и позволило разделить 80 штаммов *Y. pseudotuberculosis* на 73 2IS типа. Дендрограмма, построенная на основе полученных результатов, сгруппировала штаммы на 6 кластеров (A1, B1-B5). Причем группы, полученные при построении дендрограммы, согласовывались с географией выделения штаммов и источниками. Полученное древо также позволило проследить путь распространения возбудителя, что может свидетельствовать об эффективности данного метода для эпидемиологического расследования вспышек и спорадических случаев.

Весьма распространенный метод типирования штаммов по генотипам для других возбудителей – MLVA (multi loci variable tandem repeats analysis – мультилокусный анализ переменных тандемных повторов), для возбудителя псевдотуберкулеза использован был не так часто [Le Flèche et al., 2001; Halkilahti, Naukka, Siitonen, 2013; Евсеева и др., 2015; Каримова, 2017]. В данном методе используют переменность, характерную для участков ДНК, содержащих тандемные повторы, что помогает разделять микроорганизмы на генотипы. В пионерской работе Р. Le Flèche использовались всего два штамма *Y. pseudotuberculosis* и подтверждена возможность применения этого метода для межвидовой дифференциации внутри рода [Le Flèche et al., 2001]. Эффективное использование данного подхода продемонстрировано в работе В.В. Евсеевой, где она с соавторами проводила типирование штаммов псевдотуберкулеза по нескольким VNTR-локусам [Евсеева и др., 2015]. Для штаммов *Y. pseudotuberculosis* авторами было решено использовать 25 и 14 локусов. В результате генотипирования 71 изолята исследователи получили 54 генотипа. Достичь этого удалось благодаря использованию 14 локусов. Примечательно, что штаммам отдельных серотипов соответствовали определенные MLVA-типы. Также метод MLVA был использован зарубежными авторами для генотипирования 63 изолятов серотипа O:1 и 44 серотипа O:3. Использование 16 маркеров, расположенных на хромосоме, позволило разделить анализируемые штаммы на 24 MLVA-паттерна, по 12 каждого серотипа. Причем подавляющее большинство полученных генотипов были уникальны и содержали только один изолят [Halkilahti, Naukka, Siitonen, 2013].

Ранее нами успешно был применен метод INDEL-типирования для разделения видов *V. cholerae* и *Y. pestis* на отдельные генетические группы [Водопьянов и др., 2014, 2017]. С помощью INDEL-маркеров нами было проведено генотипирование штаммов *Y. pseudotuberculosis* [Пат. RU2736649C1 ..., 2020]. Регистрация результатов в случае использования 7 пар праймеров для детекции INDEL-маркеров в штаммах *Y. pseudotuberculosis* осуществлялась при проведении ПЦП с разработанным набором реагентов. Сконструированные праймеры ps397, ps866, ps1105, ps1452, ps1509, ps1969, ps1779 дифференцировали штаммы *Y. pseudotuberculosis* по генам, детерминирующим белок системы VI типа секреции и белок, связанный с инвазией в клетки млекопитающих, а также гены «домашнего хозяйства», кодирующие каталитическую трансглюкозилазу и белки, связанные с метаболизмом железа и окислением жирных кислот.

Генетическая дифференциация штаммов *Y. pseudotuberculosis* происходит при получении набора амплификатов для каждого штамма и их сравнительном анализе. В результате ПЦП позволяет выявить индивидуальную генотипическую характеристику на основе семи маркерных INDEL-локусов. Совокупность амплифицированных фрагментов в ПЦП у штаммов, используемых в работе, составляет самостоятельный INDEL-тип. Тестируя 60 различных по своим характеристикам штаммов возбудителя псевдотуберкулеза, нами было выявлено 16 INDEL-типов.

Работы по генотипированию штаммов *Y. pseudotuberculosis* свидетельствуют о том, что в зависимости от критериев, положенных в основу молекулярного типирования штаммов и дискриминирующей способности метода можно выявить различное число генотипов. Определенные закономерности в распределении штаммов по генотипам сохраняются, однако разнообразных генотипов выявляется достаточно большое количество. В большинстве случаев распределение штаммов по генотипам имеет связь с серотипами штаммов и с географией выделения штамма, но есть и исключения. Отмечается и корреляция с тяжестью течения заболевания, особенно в том случае, когда способы генотипирования основаны на скрининге генов вирулентности. Вместе с тем, во время проведения генетической дифференциации выявляются случаи, когда отдельные штаммы или группы штаммов *Y. pseudotuberculosis* не попадают в потенциальную генетическую группу, которая объединяет штаммы по общему серотипу или месту выделения, но при этом они объединяются с изолятами, не имеющими, на первый взгляд, общих характеристик. Также возможно выявление генетической группы, представленной всего лишь единственным штаммом [Bogdanovich et al, 2003]. Некоторые авторы с целью получения более информативных результатов молекулярного типирования применяли несколько методов одновременно [Niskanen et al., 2009; Souza et al., 2013; Savin et al, 2014]. И, по-видимому, такой алгоритм генетической дифференциации наиболее удачный.

Нами проведен анализ 22 генотипов штаммов *Y. pseudotuberculosis*, полученных при использовании трех методов генетической дифференциации. Он показывает, что из 22 штаммов только 7 имеют совпадающие генотипы, выявленные всеми тремя методами. Еще 7 штаммов имели частичное совпадение генотипов, когда из трех методических подходов совпадение генетических групп наблюдалось только в

двух случаях. Следовательно, из 22 штаммов, 14 имели полное либо частичное совпадение набора генотипов. Результаты сравнения представлены в таблице.

**Генотипы штаммов различных серовариантов и различного происхождения при использовании трех методов генетической дифференциации**

**[Strain genotypes of different serovariants and different origins under three methods of genetic differentiation]**

№	Штамм <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Серо-тип	Страна	Генотип			Совпадение
				Согласно Н. Fukushima	ST*	INDEL-тип	
1.	IP32953	O:1b	Франция, 1990	2	42	II	Полное (1, 20)
2.	Pa3606	O:1b	Япония	3	2	X	Частичное (2, 3)
3.	1231	O:4b	Россия	3	2	I	Частичное (2, 3)
4.	IP32544	O:3	Южная Африка	3	19	IIb	Частичное (4, 22)
5.	IP33038	O:1b	Австралия	2	43	IV	Нет
6.	IP33177	O:1b	Россия	3	26	I	Частичное (3, 6)
7.	MW109-2	O:11	Япония	4	71	VI	Частичное (7, 8)
8.	R819	O:5b	Япония	4	75	VI	Частичное (7, 8)
9.	N912	O:2b	Китай	6	14	I	Полное (9, 11)
10.	2888	O:1a	Италия	2	85	VIII	Нет
11.	IP33054	O:2a	Испания	6	14	I	Полное (9, 11)
12.	OK5586	O:3	Япония	2	62	Xa	Нет
13.	IP32463	O:5a	Швейцария	6	16	VII	Полное (13, 17, 18)
14.	IP32670	O:1b	Великобритания	2	43	IX	Нет
15.	SP93422	O:15	Корея	1	1	I	Нет
16.	IP32938	O:3	Аргентина	5	19	III	Нет
17.	IP32921	O:2b	Франция	6	16	VII	Полное (13, 17, 18)
18.	IP32881	O:2b	Швейцария	6	16	VII	Полное (13, 17, 18)
19.	PT682	O:2b	Япония	3	52	IIIa	Нет
20.	260	O:1a	Канада	2	42	IIa	Полное (1, 20)
21.	IP33250	O:3	Россия	-	32	X	Нет
22.	OK6088	O:10	Япония	3	18	IIb	Частичное (4, 22)

\*ST – sequence type, тип последовательности.

### Заключение

Таким образом, сравнение результатов генотипирования показывает, что генетическая дифференциация различными методами дает близкие результаты, но не всегда совпадающие между собой. Это свидетельствует о необходимости совершенствования подходов к генотипированию штаммов *Y. pseudotuberculosis* различного происхождения и о необходимости применения для этих целей разнообразных, с различной дискриминирующей способностью методов анализа одновременно.

### Список источников

1. Бургасова О.А. Клинико-патогенетические аспекты поражений суставов возбудителями бактериальной природы, совершенствование лабораторной диагностики, подходы к терапии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2011. 41 с.
2. Бургасова О.А. и др. Влияние факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis* на развитие поражений опорно-двигательного аппарата в виде реактивных артритов // Инфекционные болезни. 2009. Т. 7, № 4. С. 33–36.
3. Водопянов А.С. и др. Разработка метода дифференцировки *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* на основе INDEL-маркеров // Современные аспекты изучения особо опасных и других инфекционных заболеваний: материалы науч.-практ. конф. Ростов-на-Дону, 2014. С. 147–150.
4. Водопянов А.С. и др. Indel-типирование штаммов *Vibrio cholerae* // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. № 4. С. 195–200.
5. Евсева В.В. и др. Типирование *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью мультилокусного анализа переменного числа тандемных повторов // Проблемы особо опасных инфекций. 2015. № 4. С. 55–57.

6. Каримова Т.В. Энтеропатогенные иерсинии: микробиологический мониторинг, молекулярно-биологические особенности, алгоритм лабораторной диагностики: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Иркутск, 2017. 22 с.
7. Каримова Т.В., Климов В.Т., Чеснокова М.В. Молекулярно-биологическая характеристика *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке // Бюллетень ВСНЦ СО РАМ. 2016, Т. 1, № 3 (109). Ч. 1. С. 60–64.
8. Климов В.Т., Чеснокова М.В. Молекулярно-генетический мониторинг на основе ПЦР О-генотипирования // Молекулярная генетика. 2007. № 4. С. 14–17.
9. Кокорина Г.И. Генотипы штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их клиническое и диагностическое значение: дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2013. 142 с.
10. Пат. RU2736649С1 Российская Федерация, МПК С12N1/00, С12Q1/68. Способ генетической дифференциации штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* путем молекулярно-генетического типирования / А.Л. Трухачев, М.Г. Мелоян, А.С. Водопьянов и др.; заявитель и патентообладатель ФКУЗ "Ростовский-на-Дону ордена трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт". № 2019145645; заявл. 30.12.2019; опубл. 19.11.2020.
11. Сомова Л.М. и др. Плазмид-ассоциированная вирулентность *Yersinia pseudotuberculosis* и инфекционный процесс // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 6. С. 74–85.
12. Шестакова М.Д. и др. Диагностическая и лечебная тактика при абдоминальной форме иерсиниозов у детей // Педиатрия. 2012. № 4. С. 37–42.
13. Шубин Ф.Н. Экологические и молекулярно-биологические аспекты эпидемиологии псевдотуберкулеза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1993. 40 с.
14. Шурыгина И.А. и др. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.
15. Amphlett A. Far East Scarlet-Like Fever: A Review of the Epidemiology, Symptomatology, and Role of Superantigenic Toxin: *Yersinia pseudotuberculosis*-Derived Mitogen A. // Open Forum Infect Dis. 2015. Vol. 3: ofv202.
16. Bogdanovich T. et al. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. // Journal of Clinical Microbiology. 2003. Vol. 41. P. 5103–5112.
17. Ch'ng S.L. et al. Population structure and evolution of pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. // Applied and Environmental Microbiology. 2011. Vol. 77. P. 768–775.
18. Duan R. et al. Homology analysis of pathogenic *Yersinia* species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing // Journal of Clinical Microbiology. 2014. Vol. 52(1). P. 20–29.
19. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 // EFSA Journal. 2016. Vol. 14. 231 p.
20. Fukushima H. et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains // Journal of Clinical Microbiology. 2001. Vol. 39(10) P. 3541–3547.
21. Halkilahti J., Haukka K., Siitonen A. Genotyping of outbreak-associated and sporadic *Yersinia pseudotuberculosis* strains by novel multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) // Journal of Microbiological Methods. 2013. Vol. 95(2). P. 245–250.
22. Kenyon J.J., Cunneen M.M., Reeves P.R. Genetics and evolution of *Yersinia pseudotuberculosis* O-specific polysaccharides: a novel pattern of O-antigen diversity // FEMS microbiology reviews. 2017. Vol. 41(2). P. 200–217.
23. Laukkanen-Ninios R. et al. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing // Environmental Microbiology. 2011. Vol. 13. P. 3114–3127.
24. Le Flèche P. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* // BMC Microbiology. 2001. 1:2.
25. Niskanen T. et al. Characterization of non-pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis*-like strains isolated from food and environmental samples // International Journal of Food Microbiology. 2009. Vol. 129. P. 150–156.
26. Savin C. et al. The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii* // International Journal of Food Microbiology. 2014. Vol. 304. P. 452–463.
27. Souza R.A. et al. Molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from livestock in Brazil // Genetics and Molecular Research. 2013. Vol. 12. P. 4869–4878.
28. Thal E., Knapp W. A revised antigenic scheme of *Yersinia pseudotuberculosis* // Progress in Immunologic Standardization. 1971. Vol. 15. P. 219–222.

29. Voskresenskaya E. et al. Evaluation of ribotyping as a tool for molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains of worldwide origin // *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. Vol. 43. P. 6155–6160.

30. Voskresenskaya E. et al. Typing and clustering of *Yersinia pseudotuberculosis* isolates by restriction fragment length polymorphism analysis using insertion sequences. // *Journal of Clinical Microbiology*. 2014. Vol. 52. P. 1978–1989.

## References

1. Burgasova O.A. *Kliniko-patogenetičeskie aspekty poraženij sustavov vozбудiteljami bakterial'noj prirody, soveršenstvovanie laboratornoj diagnostiki, podchody k terapii*. Avtoref. dis. dok. med. nauk [Clinical and pathogenetic aspects of joint lesions by bacterial pathogens, improving laboratory diagnostics, approaches to therapy/ Abstract. Doc. Diss. Med.]. Moscow, 2011. 41 p. (In Russ.).

2. Burgasova OA, Voskresenskaja EA, Tseneva T.Ya. et al. [Influence of pathogenicity factors of *Y. pseudotuberculosis* on the development of lesions of the musculoskeletal system in the form of reactive arthritis]. *Infekcionnye bolezni*. V. 7, No 4 (2009): pp. 33-36. (In Russ.).

3. Vodop'janov A.S. Vodop'janov S.O., Truchačev A.L., Olejnikov I.P., Demidova G.V., Mišan'kin, B.N. [Development of a method for differentiation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* on based on INDEL markers]. *Sovremennye aspekty izučeniya osobo opasnykh i drugih infekcionnykh zabozevanij* [Modern aspects of the study of especially dangerous and other infectious diseases: materials of scientific and practical conference]. Rostov-on-Don, 2014, pp. 147-150. (In Russ.).

4. Vodop'janov A.S., Vodop'janov S.O., Olejnikov I.P., Mišan'kin B.N. [Indel typing of *Vibrio cholerae* strains]. *Epidemiologija i infekcionnye bolezni*. No 4 (2017): pp. 195-200. (In Russ.).

5. Evseeva V.V., Platonov M.E., Dentovskaja S.V., Anisimov A.P. [Typing of *Yersinia pseudotuberculosis* by multilocus tandem repeat variable number assay]. *Problemy osobo opasnykh infekcij*. No 4 (2015): pp. 55-57. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-55-57>. (In Russ.).

6. Karimova T.V. *Enteropatogennyye iersinii: mikrobiologičeskij monitoring, molekularno-biologičeskie osobennosti, algoritm laboratornoj diagnostiki*. Avtoref. dis. kand. med. nauk. [Enteropathogenic yersinia: microbiological monitoring, molecular biological features, laboratory diagnostic algorithm. Abstract of the thesis. Diss. Cand. Med. Sciences]. Irkutsk, 2017, p. 22. (In Russ.).

7. Karimova T.V., Klimov V.T., Česnokova M.V. [Molecular biological characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* isolated in Siberia and the Far East]. *Bjulleten' VSNC SO RAM*, V. 1, No 3 (109), Part 1 (2016): pp. 60-64. (In Russ.).

8. Klimov V.T., Česnokova M.V. [Molecular genetic monitoring based on PCR O-genotyping]. *Molekuljarnaja genetika*. No 4 (2007): pp. 14-17. (In Russ.).

9. Kokorina G.I. *Genotipy štammov Yersinia pseudotuberculosis i ich kliničeskoe i diagnostičeskoe značenie*. Dis. kand. med. nauk [Genotypes of *Yersinia pseudotuberculosis* strains and their clinical and diagnostic significance. Kand. Diss. Med.]. St-Peterburg, 2013. 142 p. (In Russ.).

10. Truchačev A.L., Melojan M.G., Vodop'janov A.S., Pisanov R.V., Voskresenskaja E.A., Česnokova M.V., Vodop'janov S.O., Kokokrina G.I., Bogumil'čik E.A. «*Sposob genetičeskoj differenciacii štammov Yersinia pseudotuberculosis putem molekularno-genetičeskogo tipirovanija*» [Method for genetic differentiation of yersinia pseudotuberculosis strains by molecular genetic typing]. Patent RU 2736649C1 Russian Federation, 19.11.2020. (In Russ.).

11. Somova L.M., Šubin F.N., Drobot E.I., Plechova N.G., Ljapun I.N. [Plasmid-associated virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* and the infectious process]. *Žurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. No 6 (2016): pp. 74-85. (In Russ.).

12. Šestakova M.D., Voskresenskaja E.A., Kokorina G.I., Burgasova O.A., Ceneva G.Ja. [Diagnostic and therapeutic tactics for abdominal yersiniosis in children]. *Pediatrics*. No 4 (2012): pp. 37-42. (In Russ.).

13. Šubin F.N. *Ėkologičeskie i molekularno-biologičeskie aspekty epidemiologii psevdotuberkuleza*: Avtoref. dis. dok. med. nauk. [Ecological and molecular biological aspects of the epidemiology of pseudotuberculosis: Abstract diss. doc. med.]. Moscow, 1993. 40 p. (In Russ.).

14. Šurygina, I.A., Česnokova M.V., Klimov V.T., Malov I.V., Maramovič A.S. *Psevdotuberkulez* [Pseudotuberculosis]. Novosibirsk, Nauka Publ., 2003. 320 p. (In Russ.).

15. Amphlett A. Far East Scarlet-Like Fever: A Review of the Epidemiology, Symptomatology, and Role of Superantigenic Toxin: *Yersinia pseudotuberculosis*-Derived Mitogen A. *Open Forum Infect Dis*. V. 3:ofv202 (2015).

16. Bogdanovich T., Carniel E., Fukushima H., Skurnik M. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 41 (2003): pp. 5103-5112.

17. Ch'ng S.L., Octavia S., Xia Q., Duong A., Tanaka M.M., Fukushima H., Lan R. Population structure and evolution of pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 77 (2011): pp. 768-75.

18. Duan R., Liang J., Shi G., Cui Z., Hai R., Wang P., Xiao Y., Li K., Qiu H., Gu W., Du X., Jing H., Wang X. Homology analysis of pathogenic *Yersinia* species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 52 (2014): pp. 20-29.
19. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*. V. 14 (2016): pp. 1-231
20. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R. et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 39 (2005): pp. 3541-3547.
21. Halkilahti J., Haukka K., Siitonen A. Genotyping of outbreak-associated and sporadic *Yersinia pseudotuberculosis* strains by novel multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). *Journal of Microbiological Methods*. V. 95(2) (2013): pp. 245-250.
22. Kenyon J. J., Cunneen M.M., Reeves P.R. Genetics and evolution of *Yersinia pseudotuberculosis* O-specific polysaccharides: a novel pattern of O-antigen diversity. *FEMS microbiology reviews*. V. 41(2) (2017): pp. 200-217.
23. Laukkanen-Ninios R., Didelot X., Jolley K.A., Morelli G., Sangal V., Kristo P., Brehony C., Imori P.F., Fukushima H., Siitonen A., Tseneva G., Voskresenskaya E., Falcao J.P., Korkeala H., Maiden M.C., Mazzoni C., Carniel E., Skurnik M., Achtman M. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing. *Environmental Microbiology*. V. 13 (2011): pp. 3114-3127.
24. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiology*. 1:2 (2001).
25. Niskanen T., Laukkanen R., Murros A., Björkroth J., Skurnik M., Korkeala H., Fredriksson-Ahomaa M. Characterization of non-pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis*-like strains isolated from food and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*. V. 129 (2009): pp. 150-156.
26. Savin C., Martin L., Bouchier C., Filali S., Chenau J., Zhou Z., Becher F., Fukushima H., Thomson N.R., Scholz H.C., Carniel E. The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. *International Journal of Food Microbiology*. V. 304 (2014): pp. 452-463.
27. Souza R.A., Imori P.F.M., Passaglia J., Pitondo-Silva A. and Falcão J.P. Molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from livestock in Brazil. *Genetics and Molecular Research*. V. 12 (2013): pp. 4869-4878.
28. Thal E., Knapp W. A revised antigenic scheme of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Progress in Immunologic Standardization*. V. 15 (1971): pp. 219-222.
29. Voskresenskaya E., Leclercq A., Tseneva G.Y. Carniel E. Evaluation of ribotyping as a tool for molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains of worldwide origin. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 43 (2005): pp. 6155-6160.
30. Voskresenskaya E., Savin C., Leclercq A., Tseneva G., Carniel E. Typing and clustering of *Yersinia pseudotuberculosis* isolates by restriction fragment length polymorphism analysis using insertion sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 52 (2014): pp. 1978-1989.

Статья поступила в редакцию 17.12.2021; одобрена после рецензирования 10.02.2022; принята к публикации 14.03.2022.

The article was submitted 17.12.2021; approved after reviewing 10.02.2022; accepted for publication 14.03.2022.

#### Информация об авторах

М. Г. Мелоян – младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций;

Е. А. Воскресенская – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии, руководитель Российского Референс-центра по мониторингу иерсиниозов;

С. А. Лебедева – д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы и других иерсиниозов;

А. Л. Трухачев – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатория молекулярной биологии, природно-очаговых и зоонозных инфекций.

#### Information about the authors

M. G. Meloyan – junior researcher of the laboratory of natural focal and zoonotic infections;

E. A. Voskresenskaya – candidate of biological sciences, leading researcher of the laboratory of medical bacteriology, head of the Russian reference centre for yersiniosis monitoring;

S. A. Lebedeva –doctor of medical sciences, professor, leading researcher of the laboratory of microbiology of plague and other yersinioses;

A. L. Trukhachev – candidate of medical sciences, leading researcher of the laboratory of molecular biology, natural focal and zoonotic infections.

**Вклад авторов:**

Мелоян М. Г. – анализ литературы; написание исходного текста; итоговые выводы; сравнительный анализ результатов генотипирования различных исследований.

Воскресенская Е. А. – предоставление полных данных о результатах; итоговые выводы; сравнительный анализ результатов генотипирования различных исследований.

Лебедева С. А. – подбор литературы; доработка текста.

Трухачев А. Л. – научное руководство; концепция исследования; доработка текста.

**Contribution of the authors:**

Meloyan M. G. – literature analysis; writing of the source text; final conclusions; comparative analysis of the results of genotyping of various studies.

Voskresenskaya E. A. – providing complete data on the results; final conclusions; comparative analysis of the results of genotyping of various studies.

Lebedeva S. A. – selection of literature; revision of the text.

Trukhachev A. L. – scientific guidance; research concept; revision of the text.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.