

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109

УДК 616.98:579.842.23

А.Л. Трухачев¹, М.Г. Мелоян¹, Е.А. Воскресенская², А.С. Водопьянов¹, С.О. Водопьянов¹,
О.Н. Подладчикова¹, Р.В. Писанов¹, М.В. Чеснокова³, В.А. Рыкова¹, Д.А. Кузнецова¹, В.Т. Климов³,
Г.И. Кокорина², Е.А. Богумильчик²

INDEL-типирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

²ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ³ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

Цель исследования – разработка нового способа внутривидовой генетической дифференциации *Yersinia pseudotuberculosis*, основанного на выявлении INDEL-маркеров с помощью ПЦР. **Материалы и методы.** Проведен анализ 308 штаммов из базы данных NCBI и 15 штаммов, секвенированных в настоящем исследовании. Определение нуклеотидных последовательностей штаммов осуществили при использовании технологической платформы MiSeq. Анализ геномов секвенированных штаммов, а также геномов из базы данных NCBI выполнили с помощью ПЦР *in silico* с 7 парами сконструированных праймеров. **Результаты и обсуждение.** В результате сравнения с помощью авторского программного обеспечения (GenExpert) полногеномных последовательностей 22 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI отобрано 7 INDEL-маркеров, позволяющих эффективно различать штаммы возбудителя псевдотуберкулеза. На основе этих маркеров сконструированы и синтезированы 7 пар праймеров для анализа разных штаммов с помощью ПЦР. Анализ 323 штаммов в ПЦР *in silico* и 70 штаммов в ПЦР *in vitro* позволил разделить их на 30 генетических групп. Сопоставление результатов ПЦР *in silico* и *in vitro* подтвердило возможность использования предложенных праймеров для внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis*. На основе полученных данных построена дендрограмма, отражающая филогенетические связи разных штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Выявлен ряд закономерностей при анализе распределения штаммов *Y. pseudotuberculosis* по различным кластерам и генетическим группам. Показано, что предложенный способ INDEL-типирования может быть использован для внутривидовой генетической дифференциации возбудителя псевдотуберкулеза.

Ключевые слова: генотипирование, *Y. pseudotuberculosis*, псевдотуберкулез, INDEL-маркеры.

Корреспондирующий автор: Трухачев Алексей Леонидович, e-mail: trukhachev_al@antiplague.ru.

Для цитирования: Трухачев А.Л., Мелоян М.Г., Воскресенская Е.А., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Подладчикова О.Н., Писанов Р.В., Чеснокова М.В., Рыкова В.А., Кузнецова Д.А., Климов В.Т., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А. INDEL-типирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:102–109. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109

Поступила 14.11.2022. Принята к публ. 28.11.2022.

A.L. Trukhachev¹, M.G. Meloyan¹, E.A. Voskresenskaya², A.S. Vodop'yanov¹, S.O. Vodop'yanov¹,
O.N. Podladchikova¹, R.V. Pisanov¹, M.V. Chesnokova³, V.A. Rykova¹, D.A. Kuznetsova¹, V.T. Klimov³,
G.I. Kokorina², E.A. Bogumil'chik²

INDEL-Typing of *Yersinia pseudotuberculosis* Strains

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Pasteur Saint Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation;

³Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and the Far East, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to develop a new method of intraspecific genetic differentiation of *Yersinia pseudotuberculosis*, based on the detection of INDEL-markers using PCR. **Materials and methods.** Analyzed were 308 strains from the NCBI database and 15 strains sequenced within the frames of this study. The nucleotide sequences of the strains were determined using the MiSeq technology platform. The genomes of the strains sequenced in the work, as well as genomes from the NCBI database, were assessed using *in silico* PCR with 7 pairs of primers designed in the study. As a result of a comparison of genome-wide sequences of 22 *Y. pseudotuberculosis* strains from the NCBI database, using the author's software (GenExpert), 7 INDEL-markers were selected that make it possible to effectively distinguish between strains of the causative agent of pseudotuberculosis. Based on these markers, 7 pairs of primers were designed and synthesized for the analysis of different strains using PCR. Analysis of 323 strains in PCR *in silico* and 70 strains in PCR *in vitro* allowed for dividing them into 30 genetic groups. Comparison of the results of PCR *in silico* and *in vitro* confirmed the possibility of using the proposed primers for intraspecific differentiation of *Y. pseudotuberculosis*. Based on the data obtained, a dendrogram reflecting the phylogenetic relations of different strains of *Y. pseudotuberculosis* was constructed. When analyzing the distribution of *Y. pseudotuberculosis* strains by various clusters and genetic groups, a number of patterns were revealed. Conducted *in silico* and *in vitro* PCR show that the proposed method of INDEL-typing can be used for intraspecific genetic differentiation of the causative agent of pseudotuberculosis.

Key words: genotyping, *Y. pseudotuberculosis*, pseudotuberculosis, INDEL-markers.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aleksey L. Trukhachev, e-mail: trukhachev_al@antiplague.ru.

Citation: Trukhachev A.L., Meloyan M.G., Voskresenskaya E.A., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Podladchikova O.N., Pisanov R.V., Chesnokova M.V., Rykova V.A., Kuznetsova D.A., Klimov V.T., Kokorina G.I., Bogumil'chik E.A. INDEL-Typing of *Yersinia pseudotuberculosis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 4:102–109. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109
Received 14.11.2022. Accepted 28.11.2022.

Trukhachev A.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>
Meloyan M.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7268-9298>
Voskresenskaya E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>
Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>
Podladchikova O.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7178-2255>
Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Chesnokova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5489-9363>
Rykova V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3484-5100>
Kuznetsova D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4198-0629>
Klimov V.T., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>
Kokorina G.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1973-3138>
Bogumil'chik E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3181-4328>

Псевдотуберкулез – природно-очаговое инфекционное заболевание, которое регистрируют в различных регионах и климатических зонах мира. Этиологическим агентом псевдотуберкулеза является бактерия *Yersinia pseudotuberculosis*, которая вместе с близкородственной бактерией *Y. enterocolitica* относится к энтеропатогенным иерсиниям, ответственным за одну треть всех зоонозных кишечных инфекций в Европе [1]. В нашей стране на разных территориях периодически регистрируют вспышки этого заболевания, преимущественно в возрастной группе детей до 17 лет [2]. Штаммы *Y. pseudotuberculosis*, выделяемые в Российской Федерации и других странах мира, характеризуются генетическим разнообразием и при выделении новых штаммов важным является их генотипирование. Подобная внутривидовая дифференциация *Y. pseudotuberculosis* необходима не только для генетической паспортизации штаммов, но и для эпидемиологического анализа выделяемых культур и определения генетического разнообразия штаммов, выделенных на определенных территориях. В первых работах в этом направлении авторы разделяли исследованные штаммы по наличию хромосомных и плазмидных генов, имеющих отношение к вирулентности [3, 4]. В дальнейшем разными авторами предложено несколько различающихся по дискриминирующей способности методов генотипирования *Y. pseudotuberculosis*, которые могут быть использованы на этапах лабораторного исследования материала до проведения секвенирования. Эти методы включают риботипирование [5], IS-RFLP-типирование [6, 7], а также мультилокусный анализ полиморфизма варибельного числа tandemных повторов (MLVA – multiple loci variable number of tandem repeat polymorphism analysis) [8, 9]. Последний метод включен в Методические указания «Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях» (МУК 4.2.3019-12). Метод MLVA имеет высокую дифференцирующую способность и прост в исполнении. Однако в ряде случаев дифференцировать генотипы с помощью MLVA довольно сложно, так как различия в количестве tandemных повторов у штаммов могут быть минимальны и тогда необходимо использовать другие методы. Эффективное разделение штаммов по генотипам было проведено путем анализа данных их полногеномного секвенирования. При этом результаты секвенирования анализировались с помощью определения однонуклеотидных по-

лиморфизмов (SNP – single-nucleotide polymorphism) [10, 11] и сравнения коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeat) [12, 13]. Альтернативой полногеномному секвенированию для генотипирования *Y. pseudotuberculosis* является метод мультилокусного секвенирования-типирования (MLST – multi-locus sequence typing), основанный на определении структуры главным образом генов «домашнего хозяйства» [14, 15]. Однако в силу экспериментальных сложностей эти методы доступны далеко не всем диагностическим лабораториям. Для решения задачи эффективной внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis* необходима разработка простых и доступных в лабораториях различного уровня методов генетической дифференциации, которые позволят получать важную для специалистов информацию о генетической характеристике выделяемых штаммов возбудителя псевдотуберкулеза. В настоящей работе в геномах штаммов, выделенных в различных географических зонах и имеющих различные серотипы, проведен поиск небольших делеций и инсерций (indel-мутации) и оценка возможности их использования в качестве INDEL-маркеров, характерных для разных групп штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Цель исследования – разработка нового способа внутривидовой генетической дифференциации *Y. pseudotuberculosis*, основанного на выявлении INDEL-маркеров с помощью ПЦР.

Материалы и методы

В работе использованы 70 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенные на различных территориях мира. Из 70 штаммов 60 выделены в России, 10 штаммов – в Германии, Франции, Японии.

Для анализа геномов широкого набора штаммов *Y. pseudotuberculosis* использовали нуклеотидные последовательности 308 штаммов различных серотипов, выделенных в разных регионах России и мира и представленных в базе данных NCBI.

Биоинформационный анализ геномов *Y. pseudotuberculosis* и конструирование праймеров для выявления INDEL-маркеров. Анализ INDEL-маркеров среди всех имеющихся в нашем распоряжении нуклеотидных последовательностей секвенированных штаммов проводился с помощью двух авторских компьютерных программ: GenExpert и ContigSearcher. GenExpert позволяет при последо-

вательном фрагментарном анализе всех генов сравниваемых штаммов иерсиний выявлять в них инсерционные и делеционные мутации (indel-мутации). ContigSearcher проводит поиск среди нуклеотидных последовательностей штаммов микроорганизмов, представленных в виде контигов, любых нуклеотидных последовательностей и генов. В результате такого анализа в геномах разных штаммов выявлены участки ДНК, которые использованы в качестве INDEL-маркеров для генотипирования штаммов псевдотуберкулезного микроба.

Конструирование олигонуклеотидных праймеров для выявления INDEL-маркеров в ПЦР проводилось на основе полногеномных нуклеотидных последовательностей разных штаммов с помощью специализированных компьютерных программ Vector NTI9 (Invitrogen) и BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Сконструированные праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия) и ЗАО «Евроген» (Москва, Россия).

Филогенетические связи использованных в работе штаммов *Y. pseudotuberculosis* определены путем построения дендрограмм на основе сравнительного анализа их INDEL-маркеров с помощью авторской программы «Астролябия». Способ распределения штаммов основан на методе UPGMA (метод невзвешенного попарного среднего – unweighted pair-group method using arithmetic averages).

Выделение, секвенирование и ПЦР-анализ ДНК *Y. pseudotuberculosis*. Для секвенирования ДНК 15 имеющихся в нашем распоряжении штаммов из микробных клеток выделяли ДНК, используя набор для выделения ДНК «Проба НК» (ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия). Определение нуклеотидных последовательностей штаммов проводили при использовании технологической платформы MiSeq (Illumina, www.illumina.com). Библиотеки го-

товили с помощью коммерческого набора Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina). Для секвенирования полученных библиотек использовали набор картриджей MiSeq v.2 Reagents Kit 300 Cycles PE (Illumina). Результаты секвенирования представлены в виде набора ридов, содержащих текстовые файлы двух типов (fasta и fastaQ), которые использовали для сборки геномов *de novo* или на референсном штамме *Y. pseudotuberculosis* IP32953.

Анализ геномов секвенированных в работе штаммов, а также геномов из базы данных NCBI проводили методом ПЦР *in silico* с 7 парами сконструированных в работе праймеров. При этом использовали авторскую программу VirtualPCR, разработанную для проведения виртуальной ПЦР. ПЦР проводили в стандартной комплектации реакционной смеси, используя температурный режим, который определен исходя из структуры синтезированных праймеров.

Результаты и обсуждение

С целью поиска инсерционных и делеционных мутаций (indel-мутаций), характерных для разных групп штаммов, проведен анализ полногеномных последовательностей *Y. pseudotuberculosis* с помощью авторской компьютерной программы GenExpert. Сравнительный анализ полных собранных геномов 22 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI позволил отобрать в них 7 генов, в которых содержались indel-мутации, различающиеся у разных штаммов. Вариабельные участки этих генов использованы в настоящем исследовании в качестве INDEL-маркеров различных групп штаммов псевдотуберкулезного микроба. Для выявления этих маркеров сконструированы 7 пар праймеров (табл. 1), обозначенных в соответствии с номерами генов в штамме *Y. pseudotuberculosis* YPIII (ps397, ps866,

Таблица 1 / Table 1

Праймеры, сконструированные для выявления INDEL-маркеров
Primers designed to identify INDEL-markers

Праймеры Primers		Последовательность праймера Primer sequence	Продукты амплификации (п.н.) Amplification products (b.p.)
ps397	F	GGGGCCACAAAAAGAGAGTT	115/79/97
	R	GTTTTACGCAGGAACCACT	
ps866	F	CACCGCCAGTGTGTGTCTAA	148/124/0
	R	TAACTCGGGCGACTGACAAC	
ps1105	F	CCGAACAGCATGCACAGA	72/81/0
	R	AACCTCTCGGGTGCTATTT	
ps1452	F	GCGAGGAAAATCTGATTGTGA	88/103/0
	R	CAGCGGCTACAATAGGGTGT	
ps1509	F	TGGCCGTGGCTTTTATTTAT	72/90
	R	GCCGGAGAATTCCTATTTT	
ps1779	F	TGGATTGATGGCGGTATCT	71/92
	R	CTGTAAAGGGGTATTGTTTCA	
ps1969	F	CTCCGATATTGATCCATTCCT	114/233/70/92/0
	R	GGTATCAATCGCCATTTCCT	

ps1105, ps1452, ps1509, ps1779, ps1969). Эти праймеры использованы в дальнейшей работе для генотипирования штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью ПЦР *in silico* и *in vitro*. С каждой парой праймеров разные штаммы давали различающиеся по длине ампликоны. При этом анализ структуры ампликонов не выявил в них последовательностей варьируемых тандемных повторов, которые могли бы потенциально обуславливать различие в величине ампликонов.

Сконструированные 7 пар праймеров использованы для тестирования в ПЦР *in silico* полных нуклеотидных последовательностей 323 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, различающихся по серотипу, источнику и месту выделения. Последовательности ДНК 308 штаммов взяты из базы данных NCBI, а 15 штаммов, имеющих в коллекции живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института, секвенированы в настоящем исследовании. В ре-

зультате ПЦР *in silico* с 7 парами праймеров получены различные сочетания фрагментов амплификации, характерные для каждого из исследованных штаммов. Сравнение набора ампликонов, образуемых разными штаммами, позволило распределить их по 30 генетическим группам (табл. 2). При этом каждый из штаммов можно отнести к определенной генетической группе (INDEL-типу). Большинство исследованных штаммов входило в генетические группы 1–5-го INDEL-типа, однако отдельные INDEL-типы представлены единичными штаммами.

Анализ 15 штаммов, секвенированных в данном исследовании, подтвердил идентичность результатов ПЦР *in silico* и *in vitro*, что позволяет сопоставлять результаты, полученные обоими методами. Исследование 70 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из коллекции живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института показало, что резуль-

Таблица 2 / Table 2

INDEL-генотипы 323 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, полученные при анализе результатов ПЦР *in silico*
INDEL-genotypes of 323 *Y. pseudotuberculosis* strains obtained through analyzing the results of *in silico* PCR

Количество штаммов Amount of strains	Размер ампликона с праймерами к INDEL-локусу (п.н.) Amplicon length with primers to INDEL-locus (b.p.)							INDEL-типы INDEL-types
	ps397	ps866	ps1105	ps1452	ps1509	ps1779	ps1969	
47	97	148	72	88	72	92	92	1
66	97	148	81	88	90	92	70	2
15	97	148	72	88	90	92	70	3
26	97	124	81	103	72	92	70	4
31	97	148	81	103	90	92	70	5
2	97	148	72	88	90	71	70	6
18	79	124	81	88	72	92	0	7
3	79	124	81	103	72	92	70	8
4	97	148	72	88	90	71	92	9
13	97	148	72	88	72	71	70	10
1	97	148	81	103	90	92	0	11
1	115	0	72	88	90	71	70	12
2	97	124	72	88	90	92	70	13
8	97	124	81	88	90	92	70	14
6	97	148	72	88	90	92	92	15
1	97	148	72	88	72	92	114	16
21	97	124	81	88	72	92	70	17
20	97	124	72	88	72	92	70	18
20	97	124	72	88	72	71	70	19
2	97	148	81	88	72	92	92	20
2	97	124	72	88	90	92	92	21
1	97	148	0	88	90	92	70	22
1	97	148	72	88	72	92	233	23
2	97	148	81	103	90	92	70	24
1	97	148	81	103	90	92	92	25
1	97	148	81	0	90	92	70	26
1	97	124	72	103	72	92	70	27
1	97	124	81	103	90	92	70	28
2	97	148	72	88	72	92	70	29
5	97	124	72	88	90	71	92	30

таты ПЦР *in vitro* с 7 парами праймеров позволяют отнести каждый из штаммов к определенному INDEL-типу. Большинство исследованных штаммов (60) представлено изолятами, выделенными на территории России из полевого материала и от больных. INDEL-типирование этих штаммов в ПЦР *in vitro* и 12 штаммов из базы данных NCBI в ПЦР *in silico* позволило определить основные генотипы штаммов, циркулирующих на территории России (табл. 3). Исследованные штаммы относились к 1, 2, 3, 4, 5, 9-му INDEL-типам, однако основная часть штаммов, имеющих серотип O:1b, принадлежала к 1-й INDEL-генетической группе. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1a входили в группы 2 и 5 INDEL-типов, а генетическая группа 3 объединяла штаммы серотипа O:3.

Для выяснения филогенетических связей исследованных штаммов полученные в ПЦР результаты проанализированы с помощью авторской программы «Астролябия». Для построения дендрограммы использованы ДНК 75 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, о которых имелась информация о серотипе и месте выделения. Программа построила филогенетическое дерево и распределила все исследованные штаммы по разным кластерам и генетическим группам (рисунок).

Можно отметить ряд закономерностей, выявленных при анализе распределения штаммов *Y. pseudotuberculosis* по различным кластерам и генетическим группам (рисунок). Распределение по генетическим кластерам было связано с серотипом штамма за некоторыми исключениями. Так, штаммы

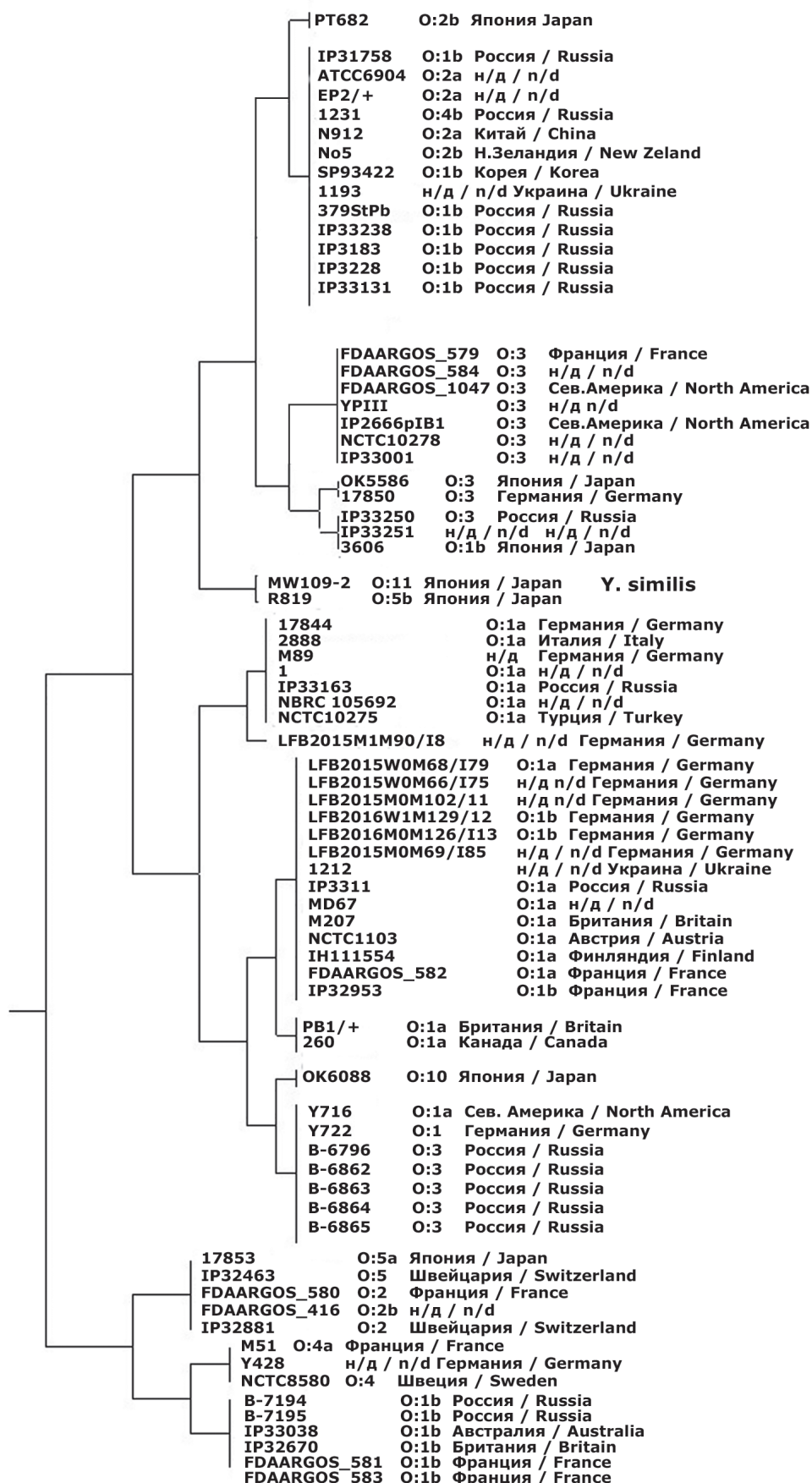
Таблица 3 / Table 3

Результаты INDEL-типирования с помощью ПЦР *in silico* и *in vitro* штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории России
In silico and in vitro PCR results of INDEL-typing of *Y. pseudotuberculosis* strains isolated in Russia

Количество штаммов / название штамма Amount of strains / name of a strain	Серовар Serovar	Место выделения Site of isolation	Год выделения Year of isolation	INDEL-тип INDEL-type
12	O:1b	Россия, Санкт Петербург Russia, Saint-Petersburg	2000	1
1	O:1a	Россия, г. Зима Russia, Zima	1998	5
18	O:1b	Россия, г. Зима Russia, Zima	1999–2000	1
1	O:1b	Россия, Горно-Алтайск Russia, Gorno-Altaysk	1993	1
1	O:1a	Россия, Великий Новгород Russia, Veliky Novgorod	н/д n/d	2
8	O:1b	Россия, Томск Russia, Tomsk	2021	1
9	O:1b	Россия, Красноярск Russia, Krasnoyarsk	2021	1
9	O:1b	Россия, Новый Уренгой Russia, Novy Urengoy	2007	1
3*	O:3	Россия, Ставропольский край Russia, Stavropol Territory	1940–1961	3
2*	O:3	Россия, Ленинградская область Russia, Leningrad Region	1955	3
B-7194*	O:1b	Россия Russia	н/д n/d	4
B-7195*	O:1b	Россия Russia	1975	4
IP33177*	O:1b	Россия Russia	н/д n/d	1
IP33250*	O:3	Россия Russia	н/д n/d	9
1231*	O:4b	Россия Russia	1985	1
IP 31758*	O:1b	Россия Russia	1966	1
379StPbP1*	O:1b	Россия Russia	2000	1

Примечание: *сведения о штаммах из базы данных NCBI; н/д – нет данных.

Note: *information about the strains from NCBI database; n/d – no data.



Дендрограмма филогенетических связей 74 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, построенная на основе данных распределения семи INDEL-маркеров

Dendrogram of phylogenetic relations between 74 *Y. pseudotuberculosis* strains, built on the basis of the data on the distribution of seven INDEL-markers

серотипа O:1b объединялись в большие кластеры, содержащие преимущественно штаммы этого серотипа. Штаммы серотипа O:1a входили в три генетических кластера, а штаммы серотипа O:3 – в четыре кластера, в двух из которых находилось по одному штамму других серотипов. Отмечается тенденция распределения штаммов *Y. pseudotuberculosis* по кластерам также и в зависимости от места выделения штамма, хотя во многих генетических группах присутствуют штаммы, выделенные на различных континентах. Тем не менее штаммы, выделенные в Европе, попадали в кластеры, содержащие преимущественно штаммы из этой же географической зоны. Штаммы, выделенные в Азии, находятся в других кластерах, однако и в «европейской», и в «азиатской» группах присутствуют единичные штаммы, выделенные на других территориях, но сходные по генотипу. Это возможно объяснить заносом штаммов из Азии в Европу и из Европы в Азию. В нашем исследовании есть несколько таких примеров. Один штамм из Украины – *Y. pseudotuberculosis* 1212 – попал в кластер филогенетического дерева вместе со штаммами из Германии, Великобритании, Финляндии, Франции, России и Австрии, а второй штамм из Украины – *Y. pseudotuberculosis* 1193 – оказался в одном кластере со штаммами из Японии, Кореи, России, Китая, Новой Зеландии.

Такая же закономерность прослеживается и в отношении штаммов, выделенных в России. Большинство российских штаммов, выделенных в последние годы от больных и относящихся к серотипу O:1b, принадлежат к одному 1-му INDEL-типу и имеют близкие филогенетические связи с азиатскими штаммами. Штаммы серовара O:1a, выделенные на территории России, попали в генетические кластеры, содержащие европейские штаммы. Помимо одного украинского штамма, к штаммам европейского типа можно отнести российские штаммы IP33111, IP33122, а также штамм IP33163, который попал в другой генетический кластер, содержащий штаммы из Германии, Италии и Турции. Два штамма – R819 и MW109-2 – из Японии, относятся к виду *Y. similis* и входят в одну INDEL-группу и один кластер на дендрограмме.

Таким образом, проведенное исследование 323 штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью ПЦР *in silico* и *in vitro* показало, что предложенный способ INDEL-типирования может быть использован для внутривидовой генетической дифференциации возбудителя псевдотуберкулеза. Этот способ не уступает по разрешающей способности и воспроизводимости более сложным и трудоемким методам генотипирования. В результате исследования установлено, что на территории России выделяются штаммы, относящиеся к 1, 2, 3, 4, 5, 9-му INDEL-типам, которые могут быть отнесены как к азиатским, так и европейским группам штаммов. Распределение штаммов по генотипам и кладам филогенетического дерева, построенного при ана-

лизе результатов INDEL-генотипирования, в большинстве случаев коррелирует с местом выделения и серотипом штаммов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSAJ*. 2016; 14(12):4634. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4634.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2021. 256 с.
3. Воскресенская Е.А., Бургасова О.А. Методы генетического типирования *Yersinia pseudotuberculosis*. *Инфекционные болезни*. 2011; 9(2):81–8.
4. 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 Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2016; 1(3-1):60–4.
5. Voskressenskaya E., Leclercq A., Tseneva G., Carniel E. Evaluation of ribotyping as a tool for molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains of worldwide origin. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(12):6155–60. DOI: 10.1128/JCM.43.12.6155-6160.2005.
6. Torrea G., Chenal-Francisque V., Leclercq A., Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(6):2084–92. DOI: 10.1128/JCM.02618-05.
7. Voskressenskaya 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. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(6):1978–89. DOI: 10.1128/JCM.00397-14.
8. Halkilahti J., Haukka K., Siitonen A. Genotyping of outbreak-associated and sporadic *Yersinia pseudotuberculosis* strains by novel multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). *J. Microbiol. Methods*. 2013; 95(2):245–50. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.09.007.
9. Евсеева В.В., Платонов М.Е., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Типирование *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью мультилокусного анализа варибельного числа тандемных повторов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:55–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-55-57.
10. Zhgenti E., Hu P., Chanturia G., Tsereteli D., Kekelidze M., Chubinidze S., Zangaladze E., Imnadze P., Andersen G., Torok T. Investigation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains from Georgia and neighboring countries in the Caucasus by high-density SNP microarray. *Arch. Microbiol.* 2018; 200(9):1345–55. DOI: 10.1007/s00203-018-1545-8.
11. Джапарова А.К., Ерошенко Г.А., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Альхова Ж.В., Бердиев С.К., Кутырев В.В. Характеристика и филогенетический анализ штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* из Сарыджазского высокогорного очага в Тянь-Шане. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:87–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-87-93.
12. Seecharran T., Kalin-Manttari L., Koskela K., Nikkari S., Dickins B., Corander J., Skurnik M., McNally A. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Genom.* 2017; 3(10):e000133. DOI: 10.1099/mgen.0.000133.
13. Перетолчина Н.П., Климов В.Т., Воскресенская Е.А., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А., Трухачев А.Л., Игумнова С.В., Джигоев Ю.П., Злобин В.И. Локусный состав CRISPR-CAS системы *Yersinia pseudotuberculosis* различных генетических вариантов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020; 19(2):31–9. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-31-39.
14. Hall M., Chattaway M.A., Reuter S., Savin C., Strauch E., Carniel E., Connor T., Van Damme I., Rajakaruna L., Rajendram D., Jenkins C., Thomson N.R., McNally A. Use of whole-genome sequence data to develop a multilocus sequence typing tool that accurately identifies *Yersinia* isolates to the species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(1):35–42. DOI: 10.1128/JCM.02395-14.
15. 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. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(1):20–9. DOI: 10.1128/JCM.02185-13.

References

1. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSAJ.* 2016; 14(12):4634. DOI: 10.2903/j.efsaj.2016.4634.
2. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2020: State Report]. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumers Rights Protection and Human Well-being; 2021. 256 p.
3. Voskresenskaya E.A., Burgasova O.A. [Methods of genetic typing of *Yersinia pseudotuberculosis*]. *Infektsionnye Boznyi [Infectious Diseases]*. 2011; 9(2):81–8.
4. Karimova T.V., Klimov V.T., Chesnokova M.V. [Molecular-biological characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* isolated in Siberia and the Far East]. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016; 1(3-1):60–4.
5. Voskresenskaya E., Leclercq A., Tseneva G., Carniel E. Evaluation of ribotyping as a tool for molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains of worldwide origin. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(12):6155–60. DOI: 10.1128/JCM.43.12.6155-6160.2005.
6. Torrea G., Chenal-Francisque V., Leclercq A., Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(6):2084–92. DOI: 10.1128/JCM.02618-05.
7. 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. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(6):1978–89. DOI: 10.1128/JCM.00397-14.
8. Halkilahti J., Haukka K., Siitonen A. Genotyping of outbreak-associated and sporadic *Yersinia pseudotuberculosis* strains by novel multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). *J. Microbiol. Methods*. 2013; 95(2):245–50. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.09.007.
9. Evseeva V.V., Platonov M.E., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [*Yersinia pseudotuberculosis* typing using multi-locus variable-number tandem repeat analysis]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (4):55–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-55-57.
10. Zhgenti E., Hu P., Chanturia G., Tsereteli D., Kekelidze M., Chubinidze S., Zangaladze E., Imnadze P., Andersen G., Torok T. Investigation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains from Georgia and neighboring countries in the Caucasus by high-density SNP microarray. *Arch. Microbiol.* 2018; 200(9):1345–55. DOI: 10.1007/s00203-018-1545-8.
11. Dzhaparova A.K., Eroshenko G.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Al'khova Z.V., Berdiev S.K., Kutyrev V.V. [Characteristics and phylogenetic analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* strains from the

Sarydzhas high-mountain focus in the Tien-Shan]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (2):87–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-87-93.

12. Seecharran T., Kalin-Manttari L., Koskela K., Nikkari S., Dickins B., Corander J., Skurnik M., McNally A. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Genom.* 2017; 3(10):e000133. DOI: 10.1099/mgen.0.000133.
13. Peretolchina N.P., Klimov V.T., Voskresenskaya E.A., Kokorina G.I., Bogumilchik E.A., Trukhachev A.L., Igumnova S.V., Dzhioev Y.P., Zlobin V.I. [CRISPR-CAS loci of *Yersinia pseudotuberculosis* strains with different genetic determinants]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2020; 19(2):31–9. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-31-39.
14. Hall M., Chattaway M.A., Reuter S., Savin C., Strauch E., Carniel E., Connor T., Van Damme I., Rajakaruna L., Rajendram D., Jenkins C., Thomson N.R., McNally A. Use of whole-genome sequence data to develop a multilocus sequence typing tool that accurately identifies *Yersinia* isolates to the species and subspecies levels. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(1):35–42. DOI: 10.1128/JCM.02395-14.
15. 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. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(1):20–9. DOI: 10.1128/JCM.02185-13.

Authors:

Trukhachev A.L., Meloyan M.G., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Podladchikova O.N., Pisanov R.V., Rykova V.A., Kuznetsova D.A. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.
Voskresenskaya E.A., Kokorina G.I., Bogumil'chik E.A. Pasteur Saint Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14, Mira St., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.
Chesnokova M.V., Klimov V.T. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Трухачев А.Л., Мелоян М.Г., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Подладчикова О.Н., Писанов Р.В., Рыкова В.А., Кузнецова Д.А. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.
Воскресенская Е.А., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.
Чеснокова М.В., Климов В.Т. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилессера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.