

DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-181-189

УДК 579.842.23:579.25

К.С. Шевченко, Г.А. Ерошенко

Система MLVA14-типирования *Yersinia pseudotuberculosis* на основе мультилокусного анализа вариабельного числа тандемных повторов

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Бактерия *Yersinia pseudotuberculosis* – этиологический агент псевдотуберкулеза, природно-очагового заболевания, регистрируемого в разных регионах мира. Штаммы псевдотуберкулезного микроба характеризуются значительным генетическим разнообразием и отличаются по патогенности и способности вызывать групповые и спорадические заболевания у человека. С 2022 г. на территории Российской Федерации выявлено 1090 случаев заражения псевдотуберкулезом, однако уровень заболеваемости остается все еще недооцененным. Современный уровень развития молекулярно-генетических технологий способствует разработке высокоэффективных методов детекции и дифференциации штаммов *Y. pseudotuberculosis*. **Цель** исследования – разработка эффективной системы MLVA14-типирования для проведения внутривидовой генетической дифференциации *Y. pseudotuberculosis*, основанной на мультилокусном VNTR-анализе. **Материалы и методы.** Проведен молекулярно-генетический и филогенетический анализ, а также O-генотипирование *in silico* 94 штаммов *Y. pseudotuberculosis* на основе их нуклеотидных последовательностей, депонированных в базе данных NCBI RefSeq. **Результаты и обсуждение.** Установлена серологическая принадлежность, определен набор факторов патогенности и отношение к генетической группе, охарактеризованы филогенетические связи использованных в работе штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Выявлено 14 ранее не описанных VNTR-локусов, отличающихся по свойствам и дискриминационной способности. При помощи веб-сервиса Primer-BLAST для обнаруженных молекулярных мишеней сконструированы фланкирующие праймеры. Методом *in silico* проведено MLVA-типирование штаммов и построена кладограмма родственных связей, показывающая, что разработанный способ MLVA14 дискриминирует близкородственные штаммы *Y. pseudotuberculosis* на те же группы, что и полногеномный SNP-анализ, но при помощи меньшего количества молекулярных мишеней. Разработанный способ MLVA14-типирования имеет высокую эффективность для проведения внутривидовой генетической дифференциации штаммов возбудителя псевдотуберкулеза.

Ключевые слова: возбудитель псевдотуберкулеза, генотипирование, мультилокусный анализ вариабельного числа тандемных повторов.

Корреспондирующий автор: Шевченко Константин Сергеевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Шевченко К.С., Ерошенко Г.А. Система MLVA14-типирования *Yersinia pseudotuberculosis* на основе мультилокусного анализа вариабельного числа тандемных повторов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2026; 2:181–189. DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-181-189

Поступила 07.10.2025. Отправлена на доработку 26.01.2026. Принята к публикации 06.03.2026.

K.S. Shevchenko, G.A. Eroshenko

System of *Yersinia pseudotuberculosis* MLVA14-Typing Based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. *Yersinia pseudotuberculosis* bacterium is the etiologic agent of pseudotuberculosis, a natural-focal disease reported in various regions of the world. Strains of pseudotuberculosis microbe are characterized by significant genetic diversity and differ in pathogenicity and ability to cause group and sporadic diseases in humans. Since 2022, 1,090 cases of pseudotuberculosis infection have been identified in the Russian Federation; however, the incidence remains underestimated. Current advances in molecular-genetic technologies facilitate the development of highly effective methods for detecting and differentiating *Y. pseudotuberculosis* strains. **The aim** of this study was to develop an effective MLVA14 typing system for intraspecific genetic differentiation of *Y. pseudotuberculosis*, based on multilocus VNTR analysis. **Materials and methods.** This study involved molecular-genetic and phylogenetic assessment, as well as *in silico* O-genotyping of 94 *Y. pseudotuberculosis* strains based on their nucleotide sequences deposited in the NCBI RefSeq database. **Results and discussion.** The serological affiliation, pathogenicity factors, and genetic group assignments have been determined. Phylogenetic relationships of the *Y. pseudotuberculosis* strains used in this study have been characterized, fourteen not previously described VNTR loci with distinct properties and discriminatory abilities identified. Flanking primers have been designed for the identified molecular targets using the Primer-BLAST web service. Applying *in silico*, MLVA typing of strains was performed and a cladogram of relationships was constructed, demonstrating that the developed MLVA14 method discriminates closely related *Y. pseudotuberculosis* strains into the same groups as whole-genome SNP analysis, but using a smaller number of molecular targets. The developed MLVA14 typing method is highly effective for intraspecific genetic differentiation of *Y. pseudotuberculosis* strains.

Key words: pseudotuberculosis agent, genotyping, multiple-locus variable-number tandem repeat analysis.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Konstantin S. Shevchenko, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Shevchenko K.S., Eroshenko G.A. System of *Yersinia pseudotuberculosis* MLVA14-Typing Based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2026; 2:181–189. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-181-189
Received 07.10.2025. Revised 26.01.2026. Accepted 06.03.2026.

Shevchenko K.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3170-9827>

Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Бактерия *Yersinia pseudotuberculosis* – этиологический агент псевдотуберкулеза, природно-очагового заболевания, регистрируемого в разных климатических зонах мира. К основным факторам патогенности возбудителя относят липополисахарид (О-антиген), белок инвазин, систему секреции 3-го типа и ее эффекторные белки. На основе вариативности структуры О-антигена внутри вида выделяют 15 серотипов (O:1 – O:15) и 10 подсеротипов (O:1a-c, O:2a-c, O:4a-b, O:5a-b), всего 21 антигенный вариант, определить который можно при помощи диагностических сывороток [1]. Помимо этого, М. Skurnik et al. разработали способ серотипирования штаммов *Y. pseudotuberculosis* посредством сравнительного ПЦР-анализа, основанного на профилировании штаммов по 17 генам биосинтеза О-антигена, характерным для серотипа O:1b [2]. Несколько позже Т. Bogdanovich et al. оптимизировали этот метод, снизив число необходимых ПЦР-реакций с 17 до 9 [3]. Кроме вышеперечисленных факторов патогенности некоторые штаммы *Y. pseudotuberculosis* содержат в геноме варианты гена суперантигена – YPM (*Yersinia pseudotuberculosis* mitogen), вызывающего поликлональную активацию Т-клеток и гиперпродукцию цитокинов; а также остров высокой патогенности HPI (high-pathogenicity island), кодирующий систему утилизации железа [4]. На основании наличия/отсутствия одного из вариантов гена YPM, а также наличия/отсутствия и вариативности структуры HPI Н. Fukushima et al. разделили все штаммы псевдотуберкулезного микроба на 6 генетических групп, характеризующихся своим типом патогенности [5]. В 2011 г. установлено, что штаммы из генетической группы 4 относятся к виду *Y. similis* [6].

По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, с 2022 г. на территории Российской Федерации выявлено 1090 случаев заболевания псевдотуберкулезом, преимущественно у детей [7]. Ранее, в 1959 г., в РФ произошли вспышки дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, вызванной штаммами *Y. pseudotuberculosis*, содержащими плазмиду pVM 82 МДа [8]. В мире в последние годы, по литературным данным, случаи заражения псевдотуберкулезом человека зарегистрированы в Японии, Канаде, Китае и Дании [9–14]. По-видимому, уровень заболеваемости псевдотуберкулезом в мире и РФ остается все еще недооцененным, что требует разработки современных высокоэффективных методов молекулярно-генетической идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pseudotuberculosis* [15]. Для этих целей перспективно применение эффективного метода молекулярного типирования – мультилокусного анализа вариативного

числа tandemных повторов (multiple locus variable number of tandem repeat analysis – MLVA). Метод прост в использовании и обладает высокой дискриминационной способностью. До сих пор для псевдотуберкулезного микроба в научной литературе была описана лишь одна схема MLVA-типирования, состоящая из 7 локусов с вариативным числом tandemных повторов (variable number tandem repeat – VNTR), которая была использована только для анализа штаммов серотипов O:1 и O:3, что ограничивает ее применение для идентификации штаммов с другой серологической принадлежностью [16]. С ее помощью было проведено расследование вспышек псевдотуберкулеза в Финляндии.

Цель исследования – разработка эффективной системы MLVA14-типирования для внутривидовой генетической дифференциации *Y. pseudotuberculosis*, основанной на мультилокусном VNTR-анализе. В настоящей работе на основании анализа нуклеотидных последовательностей штаммов псевдотуберкулезного микроба, с помощью разработанного нами метода установлена их серологическая принадлежность, проведена характеристика факторов патогенности, охарактеризовано филогенетическое родство штаммов, а также выявлены ранее не описанные VNTR-локусы и показана возможность их использования для MLVA-типирования *Y. pseudotuberculosis*.

Материалы и методы

В работе использованы нуклеотидные последовательности 94 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, депонированные в базе данных NCBI RefSeq.

О-генотипирование in silico. Для определения серотипа исследуемых штаммов *Y. pseudotuberculosis* по их нуклеотидным последовательностям нами разработан подход, основанный на составлении промежуточных генетических профилей штаммов по всем серотип-специфичным референсным О-антигенным кластерам и оценке их идентичности. Для этого в качестве серотип-специфичных референсных О-антигенных кластеров, кодирующих структуру О-антигена, мы использовали 18 нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pseudotuberculosis* с известной серологической принадлежностью, депонированных в базе данных NCBI GenBank и описанных в работе J.J. Kenyon et al. [17]. Выбирался один из серотип-специфичных референсных генетических О-антигенных кластеров, который разбивали на гены и для каждого из них генерировали набор псевдопраймеров [18], с помощью которых проводили ПЦР *in silico* с использованием метода amplicon утилиты SeqKit v.2.9.0 (<https://github.com/shenwei356/seqkit>). В случае срабатывания пары праймеров де-

лали вывод о наличии гена в анализируемой нуклеотидной последовательности штамма и добавляли его в промежуточный генетический профиль штамма, а затем переходили к следующему гену у этого штамма, в противном случае брали другую пару псевдопраймеров, перебирая таким образом весь сконструированный набор псевдопраймеров. После анализа всех генов из референсного генетического О-антигенного кластера мы рассчитывали показатель идентичности промежуточного генетического профиля штамма и исходного референсного генетического О-антигенного кластера по формуле:

$$I = \frac{A \cap B}{b} \cdot 100 \%,$$

где I – идентичность; A – множество генов в промежуточном генетическом профиле штамма; B – множество генов в референсном генетическом О-антигенном кластере; b – число генов в множестве B . Таким способом проанализировали все референсные серотип-специфичные генетические О-антигенные кластеры, а затем на основе наибольшего показателя идентичности делали вывод о серологической принадлежности исследуемого штамма.

Определение генетической группы. Для определения принадлежности использованных в работе штаммов *Y. pseudotuberculosis* к генетической группе проводили профилирование генов области HPI и вариантов гена YPM путем ПЦР *in silico*, используя олигонуклеотидные праймеры, опубликованные Н. Fukushima et al. [5]. Полученные профили сравнивали с данными Н. Fukushima.

Филогенетический анализ. Поиск единичных нуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism – SNP) в нуклеотидных последовательностях, а также отбор их коровой фракции осуществляли при помощи утилиты Snippy v.4.6.0 (<https://github.com/tseemann/snippy>). Построение филогенетического дерева на основе матрицы коровых SNPs проводили при помощи утилиты FastTree v.2.1.11 (<https://github.com/morgannprice/fasttree>) с использованием модели GTR с гамма-распределением с 500 бутстреп-репликациями. Визуализацию полученного дерева осуществляли с помощью утилиты FigTree v.1.4.4 (<https://github.com/rambaut/figtree>).

Поиск VNTR-локусов. Первоначально мы генерировали локальную базу данных нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов при помощи метода makeblastdb в составе пакета программ Blast+. Далее с помощью Blastn осуществляли поиск гомологичных последовательностей генов и межгенных участков, используя в качестве референсов аналогичные участки генома штамма IP32953 (GCF_000834295.1). Извлечение найденных последовательностей и отбор их коровой фракции проводили при помощи языка программирования python v.3.10.8 и библиотеки Biopython v.1.84. Далее в отобранных последовательностях при помощи утилиты TRF v.4.09.1 ([Lab/TRF\) осуществляли скрининг tandemных повторов. В случае выявления наличия VNTR-локуса в последовательности межгенного участка мы увеличивали его размер, отступая с обоих концов последовательности по 500 нуклеотидов, чтобы определить его локализацию \(межгенный участок или участок перекрытия гена и межгенного участка\). Отбор идентифицированных VNTR-локусов проводили на основании двух основных критериев: присутствие локуса у всех штаммов и наличие в нем более одного аллеля.](https://github.com/Benson-Genomics-
</p>
</div>
<div data-bbox=)

Подбор праймеров для ПЦР *in silico*. Конструирование олигонуклеотидных праймеров осуществляли с использованием веб-сервиса Primer-BLAST на основе референсного штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953. Оценку эффективности подобранных праймеров проводили посредством ПЦР *in silico* с использованием метода amplicon утилиты SeqKit v.2.9.0 (<https://github.com/shenwei356/seqkit>).

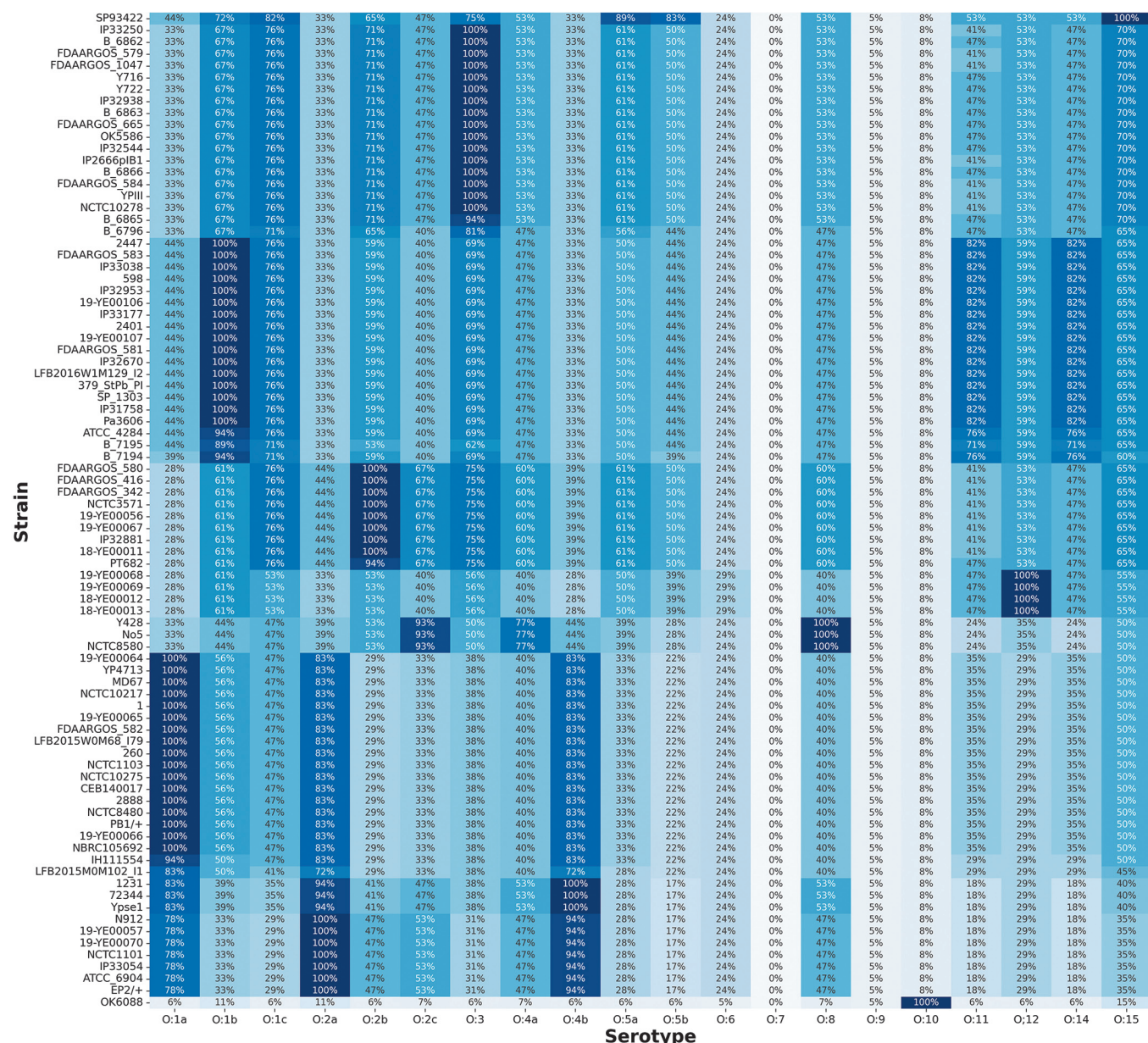
Кластерный анализ. Подбор оптимальной метрики и метода иерархической кластеризации осуществляли на основе агломеративного индекса, расчет которого проводили при помощи метода agnes в составе пакета cluster для среды разработки R. Построение дерева родства также выполняли при помощи этого метода.

Статистический анализ. Расчет индекса аллельного полиморфизма (h) [19] и индекса разнообразия Хантера – Гастона (Hunter-Gaston diversity index – HGDI) [20], а также построение теплокарт проводили с использованием языка программирования python v.3.10.8 и библиотек pandas v.2.2.2, numpy v.2.0.1 и seaborn v.0.13.2.

Результаты и обсуждение

О-генотипирование. Поскольку серологическая принадлежность является важной характеристикой штаммов возбудителя псевдотуберкулеза, но эти данные отсутствуют у большинства депонированных в базе данных NCBI RefSeq штаммов, нами разработан методический подход и проведено *in silico* О-генотипирование штаммов. Для повышения числа возможных пар псевдопраймеров и их специфичности мы генерировали псевдопраймеры длиной (m) 25 п.н. с отступом (n) в 1 нуклеотид.

По результатам проведенного генопрофилирования *in silico* в отношении каждого штамма построено 18 серотип-специфичных генетических профилей и рассчитан показатель идентичности. Для упрощения дальнейшего анализа и визуализации полученные показатели идентичности сведены в матрицу (рис. 1). По полученным данным серологическую принадлежность удалось установить для 84 штаммов, в то время как для 10 других штаммов максимальный показатель идентичности был ниже выбранного нами порогового значения в 80 % (наименьший максимальный показатель идентичности, при котором установленная нами серологическая

Рис. 1. Тепловая карта серологической принадлежности изученных штаммов *Y. pseudotuberculosis*Fig. 1. Heat map of serologic affiliation of the studied *Y. pseudotuberculosis* strains

принадлежность штамма совпала с заявленной), из-за чего они были исключены из дальнейшего анализа. По итогам проведенного О-генотипирования получены следующие результаты:

1. У 21 штамма (OK6088, SP93422, 1, 260, 2888, IH111554, 2401, 2447, 379_StPb_PI, IP31758, SP_1303, FDAARGOS_416, PT682, FDAARGOS_579, FDAARGOS_584, IP32544, IP32938, IP33250, OK5586, YPIII, 1231) заявленный в базе данных NCBI RefSeq серотип совпал с установленным нами.

2. Для 12 штаммов (FDAARGOS_582 (O:1 – O:1a), MD67 (O:1 – O:1a), PB1/+ (O:1 – O:1a), FDAARGOS_581 (O:1 – O:1b), FDAARGOS_583 (O:1 – O:1b), IP32670 (O:1 – O:1b), IP32953 (O:1 – O:1b), IP33038 (O:1 – O:1b), IP33177 (O:1 – O:1b), IP33054 (O:2 – O:2a), FDAARGOS_580 (O:2 – O:2b),

IP32881 (O:2 – O:2b)) уточнена принадлежность к подсеротипу.

3. Для 4 штаммов (N912 (O:2b – O:2a), Y716 (O:1a – O:3), Y722 (O:1 – O:3), No5 (O:2b – O:4a)) пересмотрена принадлежность к серотипу в связи с ее несоответствием с установленным генетическим профилем.

4. Для 47 штаммов серотип установлен нами.

Определение группы патогенности. В зависимости от наличия в геноме вариантов гена YPM и структуры HPI штаммы возбудителя псевдотуберкулеза подразделяются на 5 генетических групп (genetic group – GG), характеризующихся своим типом патогенности. Используемые в работе штаммы *Y. pseudotuberculosis* разделились на все 5 генетических групп. Наиболее многочисленной (32 штамма)

оказалась группа GG2 (европейский гастроэнтерический тип – по российской классификации псевдотуберкулеза штаммы, вызывающие гастроинтестинальные проявления заболевания), в которую вошли все представители серотипа O:12, а также часть штаммов O:1a, O:1b и O:3. Далее по численности идут GG6 (24 штамма, патогенный тип – вызывает генерализованную инфекцию) и GG3 (15 штаммов, системный тип), образованные представителями сразу 6 серотипов. В то же время GG1 (1 штамм, патогенный тип)

и GG5 (10 штаммов, европейский низкопатогенный тип) образованы исключительно представителями серотипов O:15 и O:3 соответственно.

Филогенетический анализ. По результатам картирования контигов использованных штаммов на референсный геном IP32953 получена матрица коровых SNP, состоящая из 73 250 строк. На ее основе методом приближенного максимального правдоподобия (approximately-maximum-likelihood) построено филогенетическое дерево родства (рис. 2). На

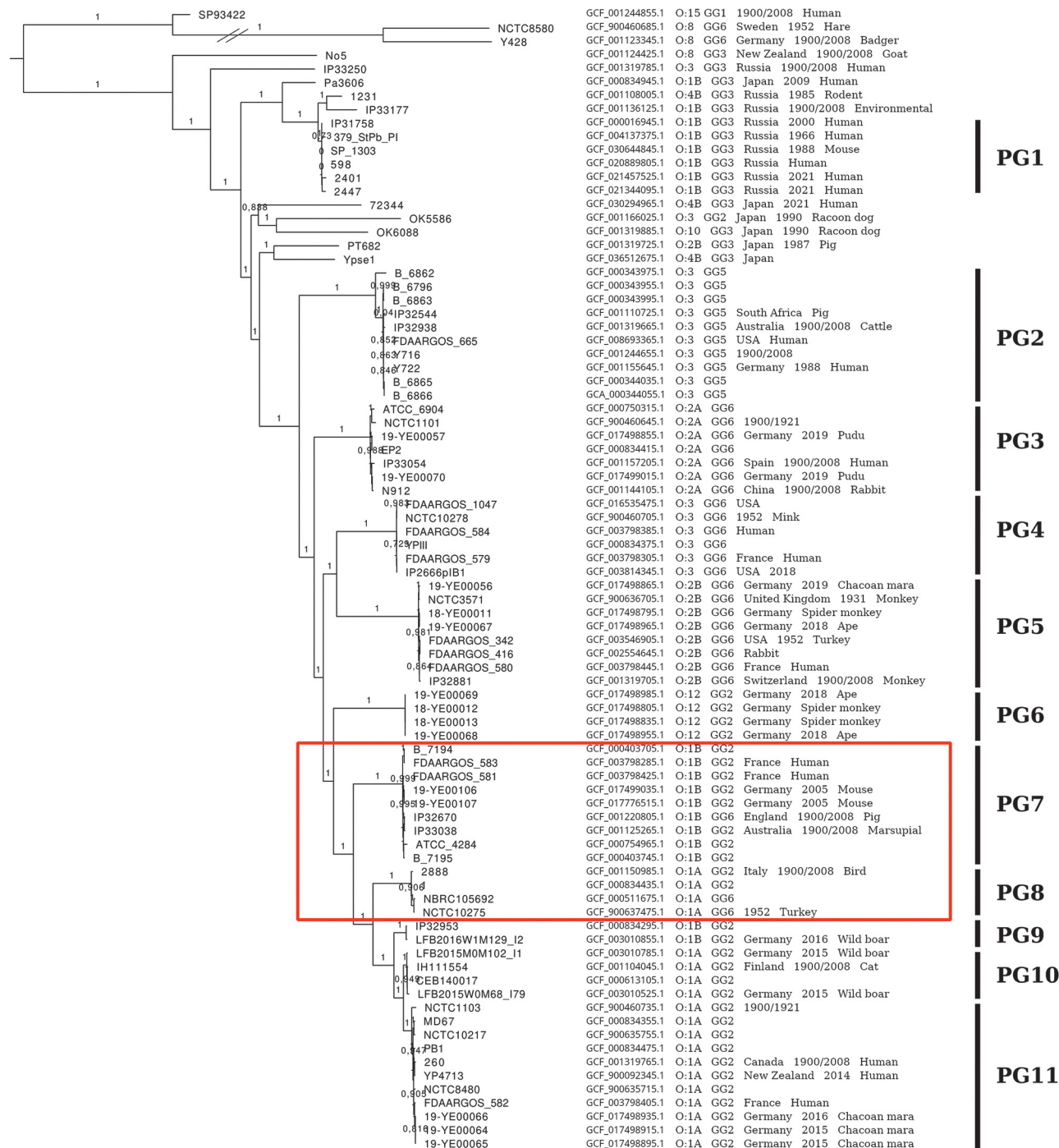


Рис. 2. Филогенетическое дерево использованных в работе штаммов *Y. pseudotuberculosis*, построенное методом приближенного максимального правдоподобия на основании 73 250 коровых SNPs с использованием модели GTR с гамма-распределением с 500 бутстреп-репликами

Fig. 2. Phylogenetic tree of *Y. pseudotuberculosis* strains used in this work, constructed applying the approximate maximum likelihood method based on 73,250 core SNPs and the GTR model with gamma distribution with 500 bootstrap replicates

полученной дендрограмме видна четкая дифференциация штаммов по степени генетического родства на 11 обособленных филогрупп (phylogroup – PG) (HGDI = 0,905), образованных исключительно представителями одного и того же серотипа. Подобная тенденция к разделению штаммов уже была отмечена ранее [21]. Характер дифференциации штаммов также согласуется и с их принадлежностью к генетической группе, но в менее выраженной форме. Исключение составили группы PG7 и PG8 (выделены на рис. 2 красным), образованные одновременно патогенными и европейскими гастроэнтерическими штаммами, но кластеризованные по серологической принадлежности (O:1b и O:1a соответственно).

Интересно, что из исследованных 84 штаммов близкородственными оказались только 71, в то время как оставшиеся 13 образовывали отдельные одиночно лежащие ветви, что указывает на их высокую эволюционную обособленность. В связи с этим данные штаммы были исключены из дальнейшего анализа.

Поиск VNTR-локусов. Изначально для поиска VNTR-локусов при помощи утилиты blastn и рефе-

ренсных последовательностей штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 мы провели поиск последовательностей генов и межгенных участков в локальной базе данных нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов. По его итогам выявлено 4004 последовательности генов и 2475 последовательностей межгенных участков, из которых для дальнейшего исследования взята лишь коровая часть, включающая 2404 и 1407 последовательностей соответственно. Далее при помощи библиотеки Biopython найденные последовательности были извлечены и проанализированы при помощи программы TRF. По результатам проведенного анализа обнаружено 18 VNTR-локусов, удовлетворяющих искомым критериям (присутствие локуса у всех штаммов, а также наличие в нем более одного аллеля), 4 из них исключены из дальнейшего анализа в связи с невозможностью подобрать пару фланкирующих праймеров с эффективностью более 95 % в ПЦР *in silico*, что может быть обусловлено наличием генетических мутаций либо плохой сборкой участков, фланкирующих выявленные VNTR-локусы (таблица). Выбранные

Характеристика VNTR-локусов и последовательности праймеров, использованных для генотипирования *Y. pseudotuberculosis*

Characterization of VNTR-loci and primer sequences used for genotyping of *Y. pseudotuberculosis*

Локус Locus	Праймер Primer	Последовательность праймера Primer sequence	Консенсусный повтор Consensus pattern	Аллели Alleles	Локализация Localization	Позиция локуса в геноме IP32953 Locus position in IP32953	h
ypt1	ypt1F	GACGCGGCCAGTAAAGAGAA	AACACAATACCTTTTCGTA	1, 2, 3, 4, 5, 6	Межгенный Intergenic	2286352-2286458	0,75
	ypt1R	CCGCGTTTGAATTCACGG					
ypt2	ypt2F	GTTATCGCCCCGAGTTTTCG	ATTGTAAGTAACTAATAG	3, 4, 5, 6	Ген Gene	2096234-2096328	0,52
	ypt2R	TATGTCGCTGCGATGGTGT					
ypt3	ypt3F	CCTGGCATGTCTGAAGGTTCA	TAACCTCGATTACCACACAA	5, 7	Перекрытие Overlap	1655688-1655829	0,5
	ypt3R	AACGGAACATTGAGCGTGGT					
ypt4	ypt4F	AAGAAATCGAGTGGGCCGTC	TCAGTTTTATACAA	4, 5, 6	Межгенный Intergenic	334160-334222	0,53
	ypt4R	CACCCATCTGGATCACCGTT					
ypt5	ypt5F	TAGGTTACAGCGAGCAACGG	ATTAACCAATAATGC	4, 5, 7	Ген Gene	4073055-4073114	0,49
	ypt5R	CCAACATACCAACGGCCAGA					
ypt6	ypt6F	GCCAATAACAGCGAAGCGAA	TAGAAGAAAAACAGG	3, 4, 5, 6	Межгенный Intergenic	3501975-3502053	0,42
	ypt6R	ATGAAGCATGCGCTAGGTCT					
ypt7	ypt7F	CCGGGAGCTGATTTTAACGC	GGTAAATGTAAACA	2, 3, 5	Межгенный Intergenic	4120384-4120426	0,5
	ypt7R	ACGCCGTTTTATGCCGAGA					
ypt8	ypt8F	ATTTCCGTGATACCGGCC	AAAATAGCTAGGTGACA	1, 2, 3, 4, 5	Межгенный Intergenic	4198147-4198238	0,65
	ypt8R	GCGGTCACACCAGTAACAAC					
ypt9	ypt9F	TGTCCTTTGGGGTTGATGCT	TAGTTGTATTGA	1, 4, 5, 6, 7	Межгенный Intergenic	204169-204215	0,62
	ypt9R	AAATCGCCAAGTTAACCCGC					
ypt10	ypt10F	ACCGCGAGCGTAAACTGATT	TAACACGGCATAATGTG	2, 3	Перекрытие Overlap	2016073-2016114	0,18
	ypt10R	CTAACCCTTCCCGCCTTGA					
ypt11	ypt11F	TGGCAAGACTTCTCGCACAT	TTGATCATCGATACTG	3, 5, 6	Межгенный Intergenic	3889624-3889703	0,015
	ypt11R	CACCAGAACAGCAAGATGCG					
ypt12	ypt12F	CGAGGGATCGTGTAATCGGG	ATGTTGGCGACAAATAA	2, 3	Межгенный Intergenic	2519297-2519331	0,13
	ypt12R	CAGCTTTGTGGTTCCAACGG					
ypt13	ypt13F	CGCCTTCCAACCTGCTTCTG	ATTTATAAAAAACCTACAAC	1, 2, 3	Межгенный Intergenic	3589843-3589897	0,37
	ypt13R	CCAGGCGATACGCACCATAA					
ypt14	ypt14F	GTGAAATCACGATCTGCGGC	TTATGTTCAACA GAC	4, 5, 8	Межгенный Intergenic	3860456-3860531	0,11
	ypt14R	AGCGGGGATTTCCTTGAGTG					

Примечание: межгенный – межгенный участок; перекрытие – участок генома, находящийся на перекрытии гена и межгенной области; h – индекс аллельного полиморфизма.

Note: intergenic – intergenic region; overlap – region of the genome located at the overlap of a gene and an intergenic region; h – allelic polymorphism index.

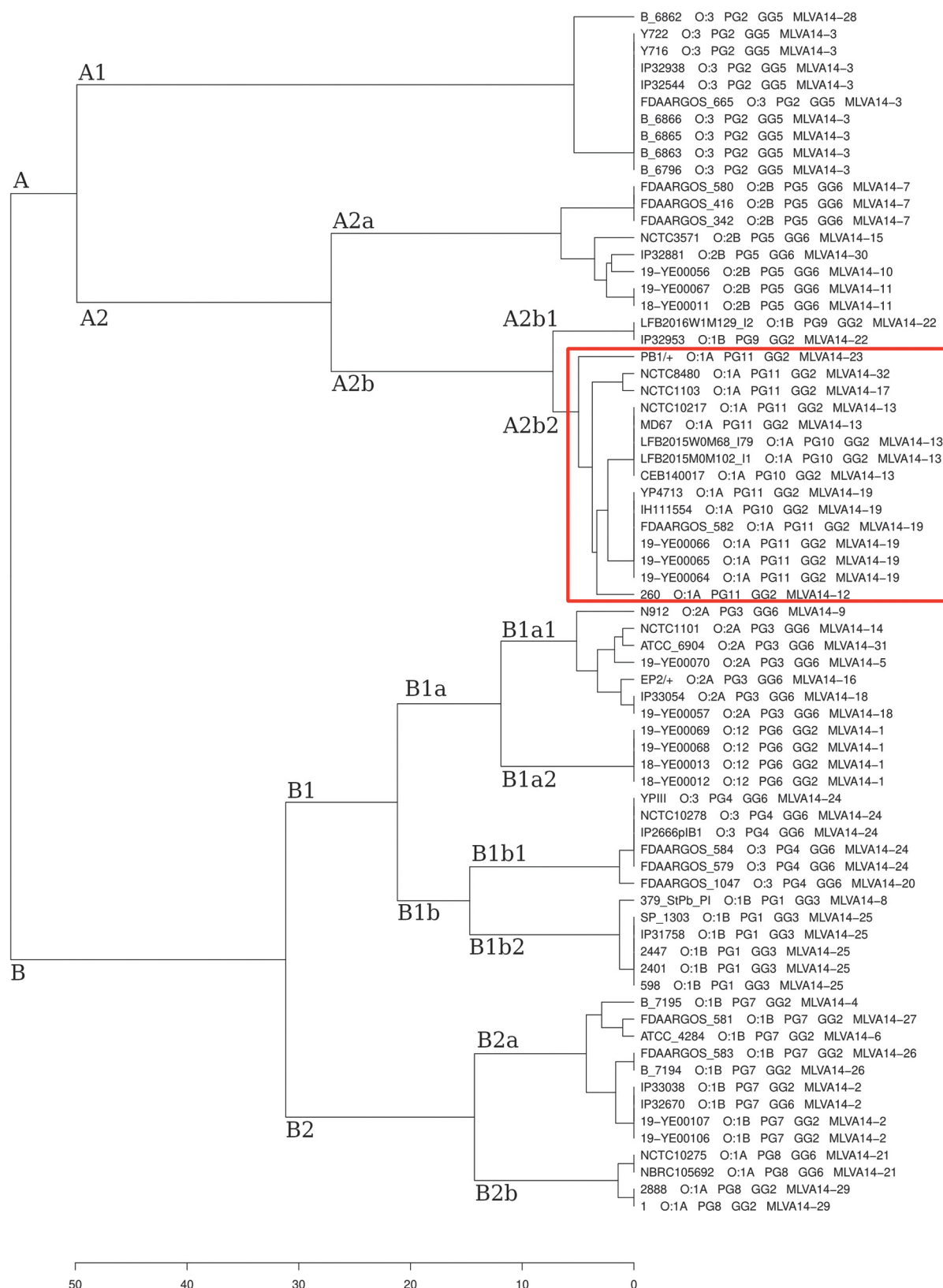


Рис. 3. Кладограмма родственных связей использованных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, построенная по результатам применения разработанной схемы MLVA14-анализа

Fig. 3. Cladogram of relatedness of the used *Y. pseudotuberculosis* strains, constructed according to the results of the developed MLVA14-analysis scheme

локусы находятся в генах (2 локуса), межгенных участках (10 локусов) и на перекрытии межгенных участков с генами (2 локуса).

В ходе анализа аллельного полиморфизма установлено, что выявленные VNTR-маркеры по своей разрешающей способности можно разделить на три группы: низковариабельные (h от 0 до 0,2), средне-вариабельные (h от 0,2 до 0,5) и высокополиморфные ($h = 0,5$ и выше). Посредством фильтрации выявленных VNTR-профилей исследуемых штаммов *Y. pseudotuberculosis* установлено их разделение на 32 серотип-специфических аллельных сочетания – MLVA14-генотипа (HGDI = 0,959). Из них 19 были уникальны (выявлены у единичных штаммов), в то время как оставшиеся 13 объединили от 2 до 11 штаммов.

Далее на основе полученных MLVA-генотипов проведен иерархический кластерный анализ для определения родственности изучаемых штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Для этого в качестве метрики для построения матрицы дистанций использовано манхэттенское расстояние, а в качестве метода кластеризации – метод Варда [22].

По результатам анализа получена кладограмма, состоящая из двух крупных клад – А и В (рис. 3). Далее клада А делится на кластеры А1 и А2. Кластер А1 представлен европейскими низкопатогенными штаммами серотипа О:3, относящимися к PG2. В свою очередь кластер А2 подразделяется на генетически однородный подкластер А2а (патогенные штаммы из PG5 серотипа О:2b) и гетерогенный подкластер А2b, имеющий сложную внутреннюю структуру (рис. 3, выделен красным). Последний во-брал в себя наиболее эволюционно молодые группы PG10 и PG11, образованные штаммами серотипа О:1а европейского гастроэнтерического типа. По-видимому, данные штаммы накопили в своем геноме недостаточно генетических отличий на уровне VNTR, чтобы разделить их на группы, аналогичные филогенетическим.

В то же время клада В дихотомически делится на кластеры В1 и В2. Последний образован штаммами серотипа О:1, преимущественно относящимися к европейскому гастроэнтерическому типу, за исключением патогенного штамма IP32670. Внутри данного кластера можно выделить два подкластера, по своему составу совпадающих с PG7 и PG8. В свою очередь кластер В1 в дальнейшем распадается на 4 гомогенных подкластера низшего ранга, состав которых полностью совпадает с PG3, PG6, PG4 и PG1.

Таким образом, можно сделать вывод, что предложенный способ MLVA14-анализа дискриминирует близкородственные штаммы *Y. pseudotuberculosis* на те же самые группы, что и полногеномный SNP-анализ, за исключением эволюционно молодых штаммов, наиболее удаленных от корня филогенетического дерева.

В результате исследования разработана новая система MLVA14-анализа *Y. pseudotuberculosis*,

включающая 14 VNTR-локусов и статистически значимо дискриминирующая штаммы на группы, состав которых совпадает с их филогенетической принадлежностью. Данный способ может быть использован для внутривидовой генетической дифференциации возбудителя псевдотуберкулеза, а также для быстрой идентификации штаммов в рамках эпидемиологического расследования вспышек псевдотуберкулеза и при проведении молекулярно-эпидемиологического мониторинга этого заболевания.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
2. Skurnik M., Peippo A., Ervelä E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol. Microbiol.* 2000; 37(2):316–30. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01993.x.
3. Bogdanovich T., Carniel E., Fukushima H., Skurnik M. Use of O-antigen gene cluster-specific PCR for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(11):5103–12. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003.
4. 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(3):768–75. DOI: 10.1128/AEM.01993-10.
5. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., Tsubokura M., Takeda N., Shubin F.N., Paik I.K., Zheng X.B. 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. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(10):3541–7. DOI: 10.1128/JCM.39.10.3541-3547.2001.
6. 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., Voskressenskaya 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. *Environ. Microbiol.* 2011; 13(12):3114–27. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02588.x.
7. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2024 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2025. 424 с.
8. Тимченко Н.Ф., Попов А.Ф., Андрюков Б.Г. Актуальные вопросы микробиологии, клиники и диагностики дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, вызванной *Yersinia pseudotuberculosis*. *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* 2015; (2):94–100.
9. Dudina M., Søgaard K.K., Deleuran T., Joensen K.G., Frøkjær J.B., Nielsen H.L. A rare Danish case of *Yersinia pseudotuberculosis* pyogenic liver abscess. *Clin. Case Rep.* 2022; 10(10):e6464. DOI: 10.1002/ccr3.6464.
10. Zewude R.T., Stefanovic A., Alem Z. *Yersinia pseudotuberculosis* bacteraemia with splenic abscesses: a case report. *Access Microbiol.* 2023; 5(9):000525.v3. DOI: 10.1099/acmi.0.000525.v3.
11. Wang Y., Xiang Y., Lei C., Zheng X., Wu W., Zhang Z., Qu X. Liver abscess and splenic infarction due to *Yersinia pseudotuberculosis* bloodstream infection: a case report. *BMC Inf. Dis.* 2024; 24(1):1415. DOI: 10.1186/s12879-024-10325-z.
12. Ohnishi T., Nakazawa M., Wada N., Abe J., Kamimaki I. *Yersinia pseudotuberculosis* infection accompanied by intussusception and incomplete Kawasaki disease in a 7-year-old girl. *Keio J. Med.* 2022; 71(2):50–2. DOI: 10.2302/kjm.2021-0002-CR.
13. Ebrahimi K., Nabilou P., Steineck I.I.K. [Far East scarlet-like fever in a Caucasian man with *Yersinia pseudotuberculosis* bacteraemia]. *Ugeskr. Laeger.* 2022; 184(1):V06210523.

14. Yokoyama K., Sakabe M., Mamada M. A case of refractory Kawasaki disease with *Yersinia pseudotuberculosis* infection successfully treated with cefotaxime following immunosuppressive therapy. *Cureus*. 2024; 16(11):e73866. DOI: 10.7759/cureus.73866.
15. 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):102–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109.
16. 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.
17. 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 Microbiol. Rev.* 2017; 41(2):200–17. DOI: 10.1093/femsre/fux002.
18. Buza K., Wilczynski B., Dojer N. RECORD: reference-assisted genome assembly for closely related genomes. *Int. J. Genomics*. 2015; 2015:563482. DOI: 10.1155/2015/563482.
19. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 51(5):873–84. DOI: 10.1128/aem.51.5.873-884.1986.
20. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
21. Ерошенко Г.А., Джапарова А.К., Никифоров К.А., Сидорин А.С., Куклева Л.М., Червякова Н.С., Краснов Я.М. Филогения и свойства штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* из Аксайского высокогорного и Прибалхашского пустынного очагов чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; (3):96–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-96-102.
22. Ward Jr J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 1963; 58(301):236–44. DOI: 10.1080/01621459.1963.10500845.
8. Timchenko N.F., Popov A.F., Andryukov B.G. [Current issues of microbiology, clinical presentation and diagnostics of Far Eastern scarlet fever-like fever caused by *Yersinia pseudotuberculosis*]. *Zdorovie. Meditsinskaya Ekologiya. Nauka [Health. Medical Ecology. Science]*. 2015; (2):94–100.
9. Dudina M., Søgaard K.K., Deleuran T., Joensen K.G., Frøkjær J.B., Nielsen H.L. A rare Danish case of *Yersinia pseudotuberculosis* pyogenic liver abscess. *Clin. Case Rep.* 2022; 10(10):e6464. DOI: 10.1002/ccr3.6464.
10. Zewude R.T., Stefanovic A., Alem Z. *Yersinia pseudotuberculosis* bacteraemia with splenic abscesses: a case report. *Access Microbiol.* 2023; 5(9):000525.v3. DOI: 10.1099/acmi.0.000525.v3.
11. Wang Y., Xiang Y., Lei C., Zheng X., Wu W., Zhang Z., Qu X. Liver abscess and splenic infarction due to *Yersinia pseudotuberculosis* bloodstream infection: a case report. *BMC Inf. Dis.* 2024; 24(1):1415. DOI: 10.1186/s12879-024-10325-z.
12. Ohnishi T., Nakazawa M., Wada N., Abe J., Kamimaki I. *Yersinia pseudotuberculosis* infection accompanied by intussusception and incomplete Kawasaki disease in a 7-year-old girl. *Keio J. Med.* 2022; 71(2):50–2. DOI: 10.2302/kjm.2021-0002-CR.
13. Ebrahimi K., Nabilou P., Steineck I.I.K. [Far East scarlet-like fever in a Caucasian man with *Yersinia pseudotuberculosis* bacteraemia]. *Ugeskr. Laeger.* 2022; 184(1):V06210523.
14. Yokoyama K., Sakabe M., Mamada M. A case of refractory Kawasaki disease with *Yersinia pseudotuberculosis* infection successfully treated with cefotaxime following immunosuppressive therapy. *Cureus*. 2024; 16(11):e73866. DOI: 10.7759/cureus.73866.
15. 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-typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (4):102–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-102-109.
16. 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.
17. 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 Microbiol. Rev.* 2017; 41(2):200–17. DOI: 10.1093/femsre/fux002.
18. Buza K., Wilczynski B., Dojer N. RECORD: reference-assisted genome assembly for closely related genomes. *Int. J. Genomics*. 2015; 2015:563482. DOI: 10.1155/2015/563482.
19. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 51(5):873–84. DOI: 10.1128/aem.51.5.873-884.1986.
20. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
21. Eroshenko G.A., Dzharapova A.K., Nikiforov K.A., Sidorin A.S., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Krasnov Ya.M. [Phylogeny and characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* strains from the Aksai high-mountain and Balkhash desert foci of plague]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; (3):96–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-96-102.
22. Ward Jr J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 1963; 58(301):236–44. DOI: 10.1080/01621459.1963.10500845.

References

1. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases: Practice Guidelines]. 2nd edition, revised and updated. Moscow: "Shiko"; 2013. 560 p.
2. Skurnik M., Peippo A., Ervelä E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol. Microbiol.* 2000; 37(2):316–30. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01993.x.
3. 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*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(11):5103–12. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003.
4. 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(3):768–75. DOI: 10.1128/AEM.01993-10.
5. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., Tsubokura M., Takeda N., Shubin F.N., Paik I.K., Zheng X.B. 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. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(10):3541–7. DOI: 10.1128/JCM.39.10.3541-3547.2001.
6. 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., Voskressenskaya 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. *Environ. Microbiol.* 2011; 13(12):3114–27. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02588.x.
7. [On the State of Sanitary-Epidemiological Well-Being of the Population in the Russian Federation in 2024: State Report]. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumers Rights Protection and Human Wellbeing; 2025. 424 p.

Authors:

Shevchenko K.S., Eroshenko G.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Шевченко К.С., Ерошенко Г.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.