

В.В.Евсеева, М.Е.Платонов, С.В.Дентовская, А.П.Анисимов

**ТИПИРОВАНИЕ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА ВАРИАБЕЛЬНОГО ЧИСЛА ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ**

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии», Оболensk, Российская Федерация

Проведена оценка эффективности используемого для дифференциации и кластеризации штаммов чумного микроба метода MLVA25 в отношении возбудителя псевдотуберкулеза, а также поиск штаммов *Y. pseudotuberculosis* наиболее филогенетически близких *Yersinia pestis* с помощью варианта этого метода с использованием не 25, а 14 VNTR локусов. При сравнительном исследовании 71 изолята *Y. pseudotuberculosis* и пяти штаммов *Y. pestis* вариантами метода MLVA25 и MLVA14 выявлено 75 и 54 генотипа соответственно. Штаммам псевдотуберкулезного микроба отдельных сероваров соответствовали определенные MLVA типы. По данным MLVA14, наиболее близкими к чумному микробу из 221 исследованного штамма *Y. pseudotuberculosis* оказались представители кластеров, включающих изоляты псевдотуберкулезного микроба MLST типов ST19 (серовар O:3) и ST43 (серовар O:1b).

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, VNTR, MLVA, генотипирование.

V.V.Evseeva, M.E.Platonov, S.V.Dentovskaya, A.P.Anisimov

***Yersinia pseudotuberculosis* Typing Using Multi-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis**

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Estimated has been efficacy of MLVA25 method, used for differentiation and clusterization of *Yersinia pestis* strains, in reference to *Yersinia pseudotuberculosis* strains, as well as the search of *Y. pseudotuberculosis* strains mostly closely related to *Y. pestis*. Applied was the reduced version of the technique deploying 14 out of 25 VNTR loci. Comparative study of 71 *Y. pseudotuberculosis* isolates and five *Y. pestis* strains by means of MLVA25 and MLVA14 variants revealed 75 and 54 genotypes, respectively. *Y. pseudotuberculosis* strains of certain serovars corresponded to certain clusters of MLVA types. According to MLVA14 typing of 221 *Y. pseudotuberculosis* isolates the clusters including the strains belonging to MLST types ST19 (serovar O:3) and ST43 (serovar O:1b) were the most closely related to *Y. pestis*.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, VNTR, MLVA, genotyping.

*Y. pseudotuberculosis* – граммотрицательная бактерия, принадлежащая к роду *Yersinia* семейства *Enterobacteriaceae*. Резервуар вызываемой возбудителем псевдотуберкулеза инфекции представлен большим количеством объектов внешней среды и широким кругом хозяев, включая млекопитающих и насекомых, а передача инфекции осуществляется фекально-оральным путем. Различия в строении О-полисахаридных боковых цепей ЛПС позволяют выделить внутри вида *Y. pseudotuberculosis* 15 серотипов (O:1–O:15) и 10 подтипов (O:1a–c, O:2a–c, O:4a–b и O:5a–b) [2].

Из молекулярно-генетических методов для типирования возбудителя псевдотуберкулеза используют анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов плазмид – REAP (Restriction endonuclease analysis of plasmids) [4], риботипирование [15], гель-электрофорез в пульсирующем поле – PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) [9], IS-типирование (Insertion sequence) [10, 14], RAPD-ПЦР (Random amplified polymorphic DNA) [8] и ERIC-ПЦР (Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence) [3]. Однако большинство из них обладают низкой дискриминирующей способностью и могут использоваться для характеристики ограниченного числа штаммов, выделенных на небольших территориях. Для оценки структуры популяций и филогении *Y. pseudotuberculosis* используется метод мультилокусного сиквенса-типирования – MLST (Multiple loci sequence typing) [5]. К сожалению, ис-

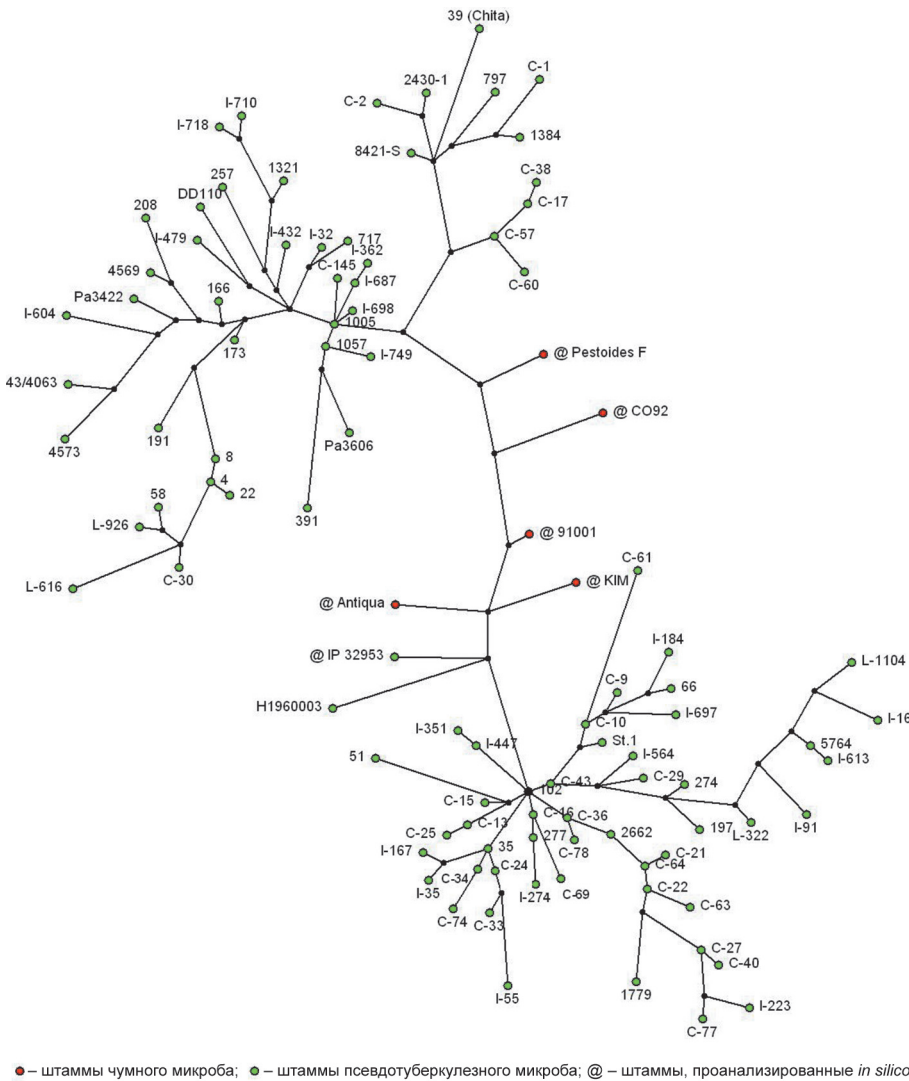
пользование этого метода требует значительных затрат времени и финансов.

Ранее нами показана высокая эффективность мультилокусного анализа полиморфизма варибельного числа тандемных повторов (MLVA – multiple loci variable number of tandem repeat polymorphism analysis) для детального популяционного анализа *Y. pestis* [7, 12]. Адаптация MLVA-типирования для оценки структуры популяций и филогеографии возбудителя псевдотуберкулеза может позволить определить степень микроэволюционной изменчивости *Y. pseudotuberculosis* в отдельных географических регионах и основные отличия между штаммами, выделяемыми на разных территориях с помощью метода, легко воспроизводимого в различных лабораториях и обладающего высоким разрешением и низкой себестоимостью.

Целью работы была оценка эффективности используемого для дифференциации и кластеризации штаммов чумного микроба метода MLVA25 в отношении возбудителя псевдотуберкулеза, а также поиск с помощью этого метода и его варианта с использованием 14 VNTR-локусов штаммов *Y. pseudotuberculosis* наиболее филогенетически близких *Y. pestis*.

**Материалы и методы**

В работе использовали 221 штамм *Y. pseudotuberculosis*, выделенный от людей, млекопитающих, птиц или из объектов внешней среды преимущественно в



Филограмма исследуемых штаммов, построенная методом максимальной экономии (парсимонии, *Maximum Parsimony*)

Кавказском, Сибирском и Дальневосточном регионах России, а также данные о полногеномных сиквенсах пяти штаммов: Antiqua, KIM, CO92, 910001 и Pestoides F, представляющих различные филогенетические группы *Y. pestis*. Пробоподготовку и MLVA25-типирование проводили, как описано ранее. Для MLVA14-типирования использовали локусы ms01, ms04, ms05, ms24, ms25, ms27, ms31, ms35, ms38, ms40, ms41, ms56, ms68, ms74 [7]. Анализ MLVA-профилей и построение дендрограмм кластеризации штаммов осуществляли с помощью программного обеспечения Bionumerics 5.1 (Applied Math NV, Бельгия). Серотипирование штаммов проводили по методике [2].

### Результаты и обсуждение

Так как *Y. pseudotuberculosis* – это вид, включающий большее количество гетерогенных внутривидовых групп, чем *Y. pestis* [5], для его эффективного популяционного анализа из 25 VNTR-локусов, используемых для типирования штаммов чумного микроба [7], мы выбрали 14 генетических маркеров, обладавших наименьшей дискриминационной способностью [6]. Как и следовало ожидать, метод MLVA-типирования по 25 генетическим локусам

обладал большим разрешением. Анализ MLVA25-профилей 71 изолята *Y. pseudotuberculosis* и пяти штаммов *Y. pestis* позволил разделить их на 75 генотипов, а MLVA14 – только на 54.

На следующем этапе наших исследований для выявления филогенетических групп псевдотуберкулезного микроба, наиболее близких *Y. pestis*, мы увеличили количество анализируемых штаммов возбудителя псевдотуберкулеза до 221. По результатам проведенного нами O-генотипирования [2], 74 штамма *Y. pseudotuberculosis* созданной коллекции принадлежали к генотипу O:1a, 95 – к генотипу O:1b, 1 – к генотипу O:2a, 2 – к генотипу O:2b, 1 – к генотипу O:2c, 23 – к генотипу O:3, 5 – к генотипу O:4a, 2 – к генотипу O:4b, 1 – к генотипу O:5a, 1 – к генотипу O:5b, 2 – к генотипу O:6, 1 – к генотипу O:7, 11 – к генотипу O:8. Схему родственных отношений строили на основании данных MLVA14 с использованием принципа максимальной экономии [13]. Штаммы чумного микроба оказались сгруппированы в центре филограммы (рисунок, из 221 исследованных штаммов *Y. pseudotuberculosis* на дендрограмме представлено 96, так как при увеличении их количества данные начинают сливаться). Штаммам отдельных серотипов *Y. pseudotuberculosis* соответствовали определенные MLVA типы псевдотуберкулезного микроба.

Восемь штаммов *Y. pseudotuberculosis*, расположенных на схеме рядом с изолятами *Y. pestis*, отобрали для дальнейшего анализа. Все они были выделены от диких или синантропных грызунов, а штаммы 797 (B-6862), 1384 (B-6863) и 2430 (в ходе лабораторного хранения штамм разделился на две субпопуляции B-6865 и B-6866) при выделении были ошибочно отнесены к виду *Y. pestis*. После проведения черного полногеномного секвенирования [1, 11] оказалось, что данные штаммы формируют две группы: MLST-типа [5] 19 (ST19) и серотипа O:3 – C-2 (B-6796), 797 (B-6862), 1384 (B-6863), 8421-S (B-6864), 2430-1 (B-6865), 2430-2 (B-6866); MLST-типа 43 (ST43) и серотипа O:1b – 58 (B-7194) и L-926 (B-7195). К последней группе штаммов должен относиться, по данным MLST-типирования, и наиболее вероятный предшественник *Y. pestis* [5].

Суммируя результаты нашего исследования, следует отметить, что метод MLVA14 обладает достаточной дискриминирующей способностью для проведения молекулярно-эпидемиологических исследований, а также пригоден для отбора штаммов *Y. pseudotuberculosis* филогенетически наиболее близких чумному микробу.

Работа выполнена в рамках реализации отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (2011–2015 годы).

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blouin Y., Platonov M.E., Pourcel C., Evseeva V.V., Afanas'ev M.V., Balakhonov S.V., Anisimov A.P., Vergnaud G. Draft genome sequences of two *Yersinia pseudotuberculosis* ST43 (O:1b) strains, B-7194 and B-7195. *Genome Announc.* 2013; 1(4):e00510–13. DOI: 10.1128/genomeA.00510-13.
- Bogdanovich T. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:5103–12.
- Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 1991; 5(4):825–34.
- Ishiguro N., Nakaoka Y., Sato G., Tsubokura M. Plasmid DNA relatedness among different serogroups of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 21(4):662–5.
- 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.
- Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoed 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 Microbiol.* 2001; 1:2.
- Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Yang R., Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS ONE.* 2009; 4(6):e6000.
- Makino S., Okada Y., Maruyama T., Kaneko S., Sasakawa C. PCR-based random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(1):65–9.
- Niskanen T., Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H. *Yersinia pseudotuberculosis* with limited genetic diversity is a common find-

ing in tonsils of fattening pigs. *J. Food Prot.* 2002; 65(3):540–5.

10. Odaert M., Berche P., Simonet M. Molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* by using an IS200-like element. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(9):2231–5.

11. Platonov M.E., Blouin Y., Evseeva V.V., Afanas'ev M.V., Pourcel C., Balakhonov S.V., Vergnaud G., Anisimov A.P. Draft genome sequences of five *Yersinia pseudotuberculosis* ST19 isolates and one isolate variant. *Genome Announc.* 2013; 1(2):e0012213. DOI: 10.1128/genomeA.00122-13.

12. Platonov M.E., Evseeva V.V., Svetoch T.E., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. Phylogeography of *Yersinia pestis* vole strains isolated from natural foci of the Caucasus and South Caucasus. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(3):108–11.

13. Stewart C.-B. The powers and pitfalls of parsimony. *Nature.* 1993; 361(6413):603–7.

14. 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.

15. 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.

#### References

- Blouin Y., Platonov M.E., Pourcel C., Evseeva V.V., Afanas'ev M.V., Balakhonov S.V., Anisimov A.P., Vergnaud G. Draft genome sequences of two *Yersinia pseudotuberculosis* ST43 (O:1b) strains, B-7194 and B-7195. *Genome Announc.* 2013; 1(4):e00510–13. DOI: 10.1128/genomeA.00510-13.
- Bogdanovich T. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:5103–12.
- Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 1991; 5(4):825–34.
- Ishiguro N., Nakaoka Y., Sato G., Tsubokura M. Plasmid DNA relatedness among different serogroups of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 21(4):662–5.
- 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.
- Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoed F., Ramisse V., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001; 1:2.
- Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Yang R., Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS ONE.* 2009; 4(6):e6000.
- Makino S., Okada Y., Maruyama T., Kaneko S., Sasakawa C. PCR-based random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(1):65–9.
- Niskanen T., Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H. *Yersinia pseudotuberculosis* with limited genetic diversity is a common finding in tonsils of fattening pigs. *J. Food Prot.* 2002; 65(3):540–5.
- Odaert M., Berche P., Simonet M. Molecular typing of *Yersinia pseudotuberculosis* by using an IS200-like element. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(9):2231–5.
- Platonov M.E., Blouin Y., Evseeva V.V., Afanas'ev M.V., Pourcel C., Balakhonov S.V., Vergnaud G., Anisimov A.P. Draft genome sequences of five *Yersinia pseudotuberculosis* ST19 isolates and one isolate variant. *Genome Announc.* 2013; 1(2):e0012213. DOI: 10.1128/genomeA.00122-13.
- Platonov M.E., Evseeva V.V., Svetoch T.E., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. Phylogeography of *Yersinia pestis* vole strains isolated from natural foci of the Caucasus and South Caucasus. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(3):108–11.
- Stewart C.-B. The powers and pitfalls of parsimony. *Nature.* 1993; 361(6413):603–7.
- 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.
- 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.

#### Authors:

Evseeva V.V., Platonov M.E., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

#### Об авторах:

Евсеева В.В., Платонов М.Е., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 15.12.14