

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-374>



Разнообразие CRISPR-локусов штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их ассоциация с факторами патогенности возбудителя

Перетолчина Н.П.^{1,✉}, Воскресенская Е.А.², Кокорина Г.И.², Богумильчик Е.А.²,
Климов В.Т.³, Трухачев А.Л.⁴, Джигоев Ю.П.¹, Злобин В.И.^{1,5}

¹Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия;

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

³Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия;

⁴Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону, Россия;

⁵Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Постоянный обмен наследственной информацией с участием внехромосомных и транспозируемых элементов является одним из факторов существования гетерогенных популяций микроорганизмов. Структуры, контролирующие горизонтальный перенос генов, могут влиять на формирование генетических вариантов патогенов.

Цель работы — изучить молекулярно-генетические характеристики CRISPR-локусов штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, циркулирующих на территории России, и их связь с факторами патогенности возбудителя псевдотуберкулёза.

Материалы и методы. В работе изучены 56 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных в течение 1935–2014 гг. на различных территориях России и других государств из разных источников. Выделение и амплификацию фрагментов ДНК, содержащих CRISPR-локусы, выполняли методом полимеразной цепной реакции. Секвенирование CRISPR-локусов осуществляли по методу Сэнгера. Для каждого штамма определён генотип по наличию основных факторов патогенности: хромосомных генов суперантигена *ypmA/C*, генов, локализованных на «островах патогенности» HPI, YAPI, генов плазмиды pYV, pVM82.

Результаты. В результате анализа CRISPR-локусов штаммов *Y. pseudotuberculosis* установлено, что спейсерный состав локусов различается у штаммов, отличающихся серотипом, набором факторов патогенности, регионом выделения. Наиболее вариабельны локусы YP1 и YP3, локус YP2 однороден. Состав локуса YP1 различается в группах штаммов, отличающихся по наличию плазмиды pVM82. Состав локуса YP3 зависит и от наличия плазмиды pVM82, и от «адгезивного острова патогенности» YAPI.

Заключение. На территории России циркулируют штаммы *Y. pseudotuberculosis* с различным набором детерминант вирулентности и спейсерным составом CRISPR-локусов. Большинство российских штаммов отличаются по данным молекулярным маркерам от штаммов из других стран. Высокая вариабельность штаммов внутри вида определяется способностью приобретать новые генетические элементы путём горизонтального переноса генов. CRISPR-Cas как система «иммунитета» бактерий против мобильных генетических элементов может участвовать в формировании патогенного потенциала штаммов *Y. pseudotuberculosis*.

Ключевые слова: CRISPR-локус, факторы патогенности, *Yersinia pseudotuberculosis*

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Перетолчина Н.П., Воскресенская Е.А., Кокорина Г.И., Богумильчик Е.А., Климов В.Т., Трухачев А.Л., Джигоев Ю.П., Злобин В.И. Разнообразие CRISPR-локусов штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их ассоциация с факторами патогенности возбудителя. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):166–175.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-374>

EDN: <https://www.elibrary.ru/ornkhs>

Diversity of CRISPR loci in *Yersinia pseudotuberculosis* strains and their association with pathogenicity factors

Nadezhda P. Peretolchina^{1✉}, Ekaterina A. Voskresenskaya², Galina I. Kokorina²,
Elena A. Bogumilchik², Valery T. Klimov³, Alexey L. Trukhachev⁴,
Yuri P. Dzhioev¹, Vladimir I. Zlobin^{1,5}

¹Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia;

²St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

³Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia;

⁴Rostov-on-Don Antiplague Institute, Rostov-on-Don, Russia;

⁵National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Heterogeneous microbial populations exist in the nature due to exchange of genetic material containing in extrachromosomal and transposable elements. Structures controlling horizontal gene transfer may affect development of pathogen genetic variants.

The **aim** of the study is to analyze molecular genetic characteristics of CRISPR-loci in *Yersinia pseudotuberculosis* strains circulating in Russia and their association with pathogenicity factors.

Materials and methods. We studied 56 strains of *Y. pseudotuberculosis* isolated from different sources in Russia during 1935–2014 from various sources in different regions of Russian Federation and in other countries. DNA fragments with CRISPR-loci were isolated and amplified by PCR, and subjected to Sanger sequencing. PCR was used to determine chromosomal genes of superantigen *ypmA/C*, pathogenicity islands HPI, YAPI, and plasmids pYV and pVM82.

Results. Analysis of CRISPR-loci in *Y. pseudotuberculosis* showed that spacer content varies in strains depending on serotype, set of pathogenicity factors, and isolation place. The most variable loci are YP1 and YP3, locus YP2 is homogeneous. Locus YP1 varies in strains that differ by presence of plasmid pVM82, while content of locus YP3 depends on presence of plasmid pVM82 and adhesion pathogenicity island YAPI.

Conclusion. Strains of *Y. pseudotuberculosis* circulating in Russia have a huge diversity of pathogenicity factors and CRISPR spacer content. Most of Russian strains differ by molecular markers from strains isolated in other countries. High variability is defined by ability to get new genetic elements in horizontal gene transfer. In bacteria, CRISPR-Cas system provides «immunity» against mobile genetic elements and can participate in formation of *Y. pseudotuberculosis* pathogenic potential.

Keywords: CRISPR-locus, pathogenicity factors, *Yersinia pseudotuberculosis*

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Peretolchina N.P., Voskresenskaya E.A., Kokorina G.I., Bogumilchik E.A., Klimov V.T., Trukhachev A.L., Dzhioev Yu.P., Zlobin V.I. Diversity of CRISPR loci in *Yersinia pseudotuberculosis* strains and their association with pathogenicity factors. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):166–175.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-374> EDN: <https://www.elibrary.ru/ornkhs>

Введение

Грамотрицательные бактерии вида *Yersinia pseudotuberculosis* относят к факультативным психрофилам, способным вызывать острое сапрозоонозное заболевание — псевдотуберкулёз [1]. Случаи псевдотуберкулёза регистрируют во многих субъектах России, но регионами с наиболее высокой заболеваемостью являются Дальневосточный, Северо-Западный и Сибирский федеральные округа. Классические методы типирования штаммов *Y. pseudotuberculosis* основаны на определении

серотипа [2, 3]. Большинство циркулирующих на территории России штаммов относятся к серотипу O:1, преимущественно O:1b, в сибирском регионе также выявлены представители серотипа O:3, на Дальнем Востоке, кроме перечисленных, встречаются штаммы серотипа O:3, O:4 [4, 5]. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* отличаются высоким разнообразием факторов, определяющих их вирулентность и тяжесть вызываемого ими заболевания. Хромосомные факторы патогенности *Y. pseudotuberculosis*, выявляемые методом полимеразной цепной

реакции (ПЦР) включают гены суперантигена *уртА*, *уртС*, «острова патогенности» НР1 («остров высокой патогенности») и YAP1 («адгезивный остров патогенности»). На плаزمиде рУУV и рVM82 локализованы гены, ассоциированные с факультативным внутриклеточным паразитизмом бактерии: аппарат секреции III типа, адгезины и аппарат секреции IVB типа. Но данные методы типирования не позволяют дифференцировать близкородственные штаммы внутри одного серотипа или генотипа с определёнными факторами патогенности. В зависимости от последующего метода генотипирования, основанного на анализе геномного полиморфизма штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выявляется различное число генотипов, отличающихся серотипом, географией и источником выделения, патогенным потенциалом [6, 7]. Применение нескольких методов генотипирования позволяет получить более информативные результаты.

Постоянный обмен наследственной информацией с участием внехромосомных и транспозируемых элементов является одним из факторов существования гетерогенной популяции микроорганизмов в определённых условиях среды [1]. Некоторые кластеры генов, кодирующие детерминанты патогенности, ассоциированы с интегразами профагов или инсерционными элементами, контролирующими геномные перестройки, следовательно, системы, направленные на регуляцию горизонтального переноса генов, влияют на эволюцию бактерий. К таким структурам относится система CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, короткие палиндромные повторы, разделённые спейсерами), способная специфически узнавать и уничтожать чужеродный генетический материал.

CRISPR-Cas-системы *Y. pseudotuberculosis* относятся к классу 1, типу I и подтипу F (IF), и имеют в своём составе от одного до 3 локусов (YP1, YP2 и YP3), удалённо расположенных относительно друг друга вследствие геномных перестроек. Cas-гены локализованы около одной из кассет (YP1), представленных в геноме иерсиний. Остальные локусы (YP2 и YP3) являются производными локуса YP1 и сохраняют способность функционировать в качестве CRISPR-иммунитета [8, 9]. Ранее К.А. Koskela и соавт., Т. Seechanjan и соавт. обнаружили соответствие между некоторыми сиквенс-типами и спейсерным составом CRISPR-кассет штаммов *Y. pseudotuberculosis* [9, 10].

Но в работах, посвящённых изучению CRISPR-Cas-системе *Y. pseudotuberculosis*, штаммы, изолированные на территории России, представлены в относительно небольших количествах, а также отсутствует информация о месте выделения штамма и другие паспортные данные.

Целью настоящего исследования явилось изучение молекулярно-генетических характеристик CRISPR-локусов штаммов *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих на территории России, и их связи с факторами патогенности.

Материалы и методы

Изучены 56 штаммов *Y. pseudotuberculosis* [11], выделенные в течение 1935–2014 гг. на территории

Восточной и Западной Сибири, Дальнего Востока, Северо-Западного и других регионов России, Монголии, Украины, Беларуси, Туркменистана и Абхазии из различных источников (см. Приложение на сайте журнала).

Штаммы отобраны из коллекций Иркутского НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Ростовско-го-на-Дону научно-исследовательского противочумного института с учётом имеющихся паспортных данных в соответствии с полученными ранее данными о длине CRISPR-локусов [11].

Для выделения ДНК из коллекционных штаммов использовали комплект реагентов «Рибо-сорб» («AmpliSens») и «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ООО «НекстБио»). ПЦР проводили на амплификаторе компании «Applied Biosystems» и на программируемом термостате «Терцик» (ЗАО «ДНК-Технология»). Для выделения и секвенирования CRISPR-локусов использовали праймеры и методику, представленные ранее [11].

Выявление хромосомных генов суперантигена *уртА/С*, генов, локализованных на «островах патогенности» НР1 (*fyuA*, *irp2*), YAP1 (*pilPQ*, *api74*, *tcp*), генов плазмиды рVM82 (*dotO*, *musAB*) проводили методом ПЦР [12].

Серотип исследуемых штаммов определяли по общепринятой методике с диагностическими сыворотками производства ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и методом мультиплексной ПЦР [2, 3].

Секвенирование CRISPR-локусов осуществляли по Сэнгеру на капиллярном секвенаторе «Applied Biosystems 3500» («Thermo Scientific»). Для 10 штаммов провели полногеномное секвенирование на секвенаторе MiSeq («Illumina»). Пробоподготовку и секвенирование проводили в соответствии с инструкциями производителя.

Сборку и анализ фрагментов проводили с помощью программ «Vector NTI Advance 10.3» и «BioEdit 7.2». Сборку до уровня контигов реализовывали с помощью геномного сборщика SPAdes 3.15.4 и инструмента CONTIGuator 2.7.4, осуществляющего финишную сборку на основе референсного генома [13, 14]. Поиск и расшифровку CRISPR-Cas-систем в последовательностях штаммов проводили с использованием программ «CRISPRone»¹, «CRISPRCasFinder»² и «CRISPRDetect»³ [15–17]. Гомологичные протоспейсерные последовательности в геномах бактериофагов и плазмид определяли с помощью алгоритма поиска BLASTn по базам данных GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, RefSeq, онлайн-приложения CRISPRTarget по базам данных GenBank-Phage, RefSeq-Plasmid и Islandviewer [18, 19]. Гомологичные последовательности искали с использованием следующих критериев: наличие 3'-PAM, характерного для CRISPR-систем типа IF — GG, не более 2 несоответствий комплементарных оснований, отсутствие более 2 спаренных нуклеотидов подряд. Профаги в геномах хро-

¹ URL: <https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/>

² URL: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr>

³ URL: <http://brabtools.com/CRISPRDetect>

мосом определяли с использованием онлайн-инструмента PHASTER [20].

Анализ данных проводили в среде программирования RStudio 2022.07.1+554 с использованием языка для статистической обработки данных и работы с графикой R 4.2.2 [21]. Пермутационный дисперсионный анализ (PERMANOVA) использовали для поиска статистически значимых различий в строении локусов и их связи с различными характеристиками штаммов в составе пакета vegan 2.6-4 [22]. Кластеризацию штаммов и построение дендрограмм по наличию спейсеров проводили с использованием пакетов pvclust 2.2-0 и ComplexHeatmap 2.14.0 по методу невзвешенного попарного среднего (UPGMA) с бутстрепом 1000 [23].

Регистрационные номера последовательностей 69 нуклеотидных последовательностей CRISPR-локусов штаммов *Y. pseudotuberculosis* депонированы в международную базу GenBank (номера доступа: KX592595–KX592599 и OP245022–OP245086).

Результаты

В результате анализа качества и сборки сиквенсов отобраны 78 фрагментов. Показано, что исследованные штаммы *Y. pseudotuberculosis* содержат CRISPR-Cas-систему, включающую 1–3 локуса: YP1, YP2, YP3. Согласно структуре повторов (5'-GTT CAC TGC CGC ACA GGC AGC TTA GAA A-3') все локусы относятся к типу IF. Общее количество спейсеров составило 1311. В локусе YP1 количество спейсеров варьирует от 3 до 38 (всего 810 спейсеров), в локусе YP3 — от 1 до 44 (всего 466), локус YP2 — короткий и состоит из 1 или 2 спейсеров.

Спейсерный состав CRISPR-локусов

Для анализа спейсерного состава CRISPR-локусов была создана база данных спейсеров штаммов *Y. pseudotuberculosis* (№ 2020622813, зарегистрирована в Государственном реестре баз данных, 25.12.2020).

Статистически достоверно спейсерный состав CRISPR-Cas-систем различается у штаммов, отличаю-

Различия спейсерного состава CRISPR-локусов штаммов *Y. pseudotuberculosis* (при $p < 0,05$)
Differences of spacer content in CRISPR-loci of *Y. pseudotuberculosis* strains ($p < 0,05$)

Характеристика штамма Strain characteristics	Df	MS	Pseudo-F	p
Локус YP1 Locus YP1				
Регион выделения Isolation place	22	0,4668	3,9483	0,001
Серотип Serotype	1	0,6831	5,7779	0,001
Сочетание факторов патогенности Combination of pathogenicity factors	3	0,554	4,6857	0,001
pVM	1	0,4659	3,9408	0,002
YAPI	1	0,2125	1,7976	0,089
Другие факторы Other factors	10	0,1182		
Локус YP2 Locus YP2				
Регион выделения Isolation place	13	0,1869	3,3647	0,215
Серотип Serotype	3	0,0664	1,1944	0,420
Другие факторы Other factors	3	0,0556		
Локус YP3 Locus YP3				
Регион выделения Isolation place	20	0,4439	36,117	0,001
Серотип Serotype	3	0,4352	35,402	0,001
Сочетание факторов патогенности Combination of pathogenicity factors	3	0,5478	44,567	0,001
pVM	1	0,1984	16,145	0,001
YAPI	1	0,3016	24,537	0,001
Другие факторы Other factors	7	0,0123		
Все локусы All loci				
Регион выделения Isolation place	27	0,555	2,6799	0,001
Серотип Serotype	4	0,3906	1,8858	0,001
Сочетание факторов патогенности Combination of pathogenicity factors	3	0,5049	2,4379	0,001
pVM	1	0,5279	2,5487	0,007
YAPI	1	0,2454	1,185	0,276
Другие факторы Other factors	19	0,2071		

Примечание. Df — степени свободы; MS — средний квадрат; Pseudo-F — оценка критерия Фишера; p — оценка уровня значимости.
Note. Df — degree of freedom; MS — mean square; Pseudo-F — Fisher criterion; p — significance level.

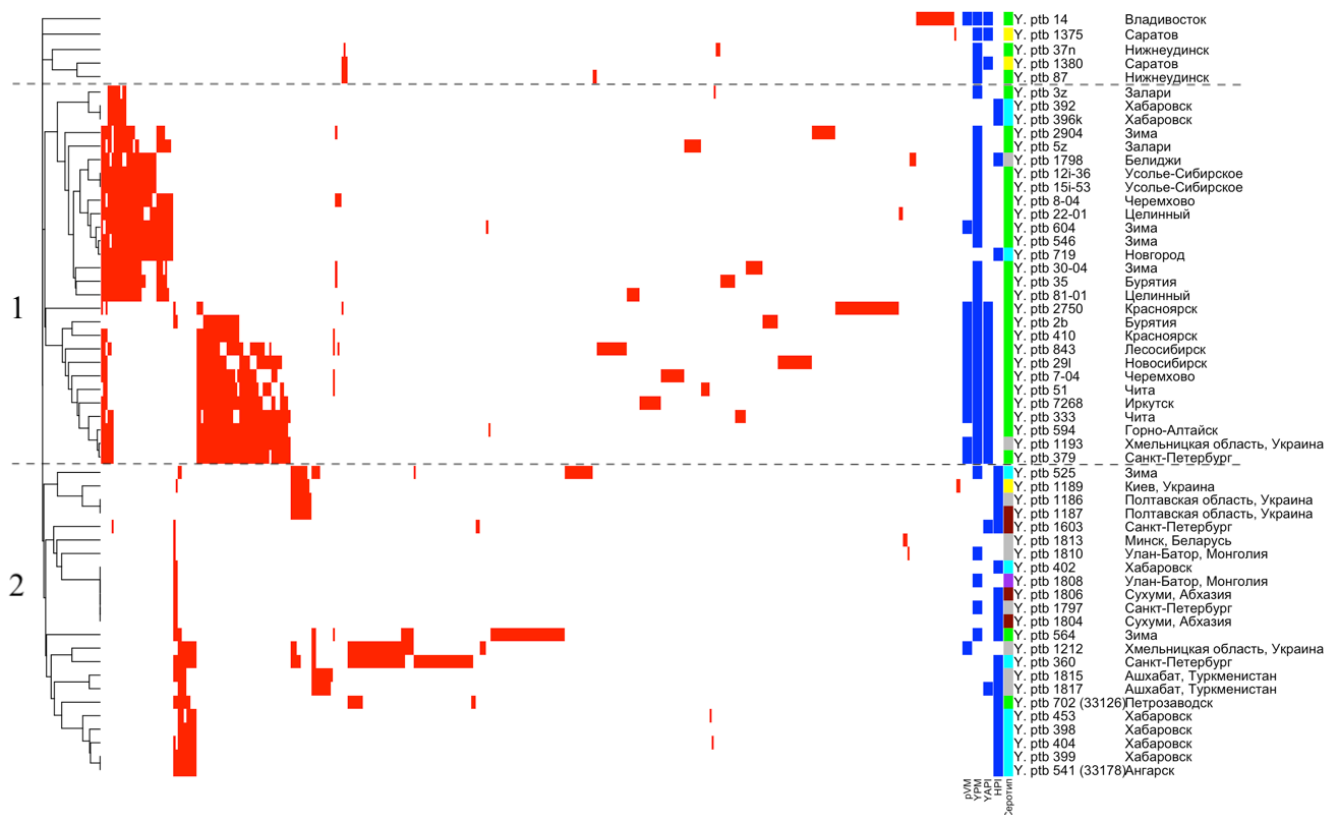


Рис. 1. Кластеризация штаммов *Y. pseudotuberculosis* ($n = 56$) по наличию спейсеров в локусах YP1–YP3.

Условное обозначение по цветам: наличие спейсера — красный; наличие фактора патогенности — синий; серотип 1 — тёмно-красный; серотип 1a — голубой; серотип 1b — зелёный; серотип 3 — жёлтый; серотип 4 — фиолетовый; серотип не определён — серый.

Fig. 1. Clusterization of *Y. pseudotuberculosis* strains ($n = 56$) by presence of spacer in loci YP1–YP3.

Color designations: presence of spacer — red; presence of factor — blue; serotype 1 — darkred; serotype 1a — cyan; serotype 1b — green; serotype 3 — yellow; serotype 4 — violet; serotype is not defined — grey.

щихся серотипом, набором факторов патогенности, выделенных на разных территориях (таблица). При изучении отдельных локусов статистически достоверно различаются составы локусов YP1 и YP3, состав локуса YP2, напротив, достаточно однороден. Спейсерный состав локуса YP1 отличается у штаммов разных серотипов и генотипов, в частности, у штаммов с различным плазмидным составом (pVM82⁺ или pVM82⁻). Состав локуса YP3, в отличие от локуса YP1, достоверно отличается у штаммов, имеющих в составе генома «адгезивный остров патогенности» YAP1 и плазмиду pVM82. Статистически достоверных различий в группах штаммов, отличающихся по остальным факторам патогенности (суперантиген YPM, «остров патогенности» HPI), не выявлено.

Кластерный анализ штаммов, основанный на наличии спейсеров в локусах, позволяет условно разделить штаммы на 2 большие группы (рис. 1).

Кластер 1 включает 28 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных преимущественно на территориях Сибирского федерального округа (86%): 3 штамма серотипа O:1a, 23 штамма серотипа O:1b (для 2 штаммов серотип не определён). Для штаммов характерно наличие суперантигена YPM (89%). При этом внутри кластера происходит разделение штаммов на 2 подкла-

стера по наличию «адгезивного острова патогенности» YAP1 и плазмиды pVM82: подкластер 1–1 (YPM⁺YAP1⁻pVM82⁻) включает 16 (57%) штаммов, подкластер 1–2 (YPM⁺YAP1⁺pVM82⁺) — 12 (43%) штаммов.

Кластер 2 состоит из 23 штаммов *Y. pseudotuberculosis* разных серотипов, практически в равных долях выделенных в различных регионах России (52%) и других государств (48%). Для большинства штаммов характерно наличие «острова патогенности» HPI (83%), 5 (22%) штаммов обладают суперантигеном YPM, 1 (4%) штамм — «адгезивным островом патогенности» YAP1, 1 (4%) штамм — плазмидой pVM82.

Пять (9%) из изученных 56 штаммов (14, 1375, 37п, 1380, 87) находятся вне основных кластеров. Спейсеры, представленные в данных штаммах, практически не встречаются в других CRISPR-системах.

Сравнительный анализ полученных сиквенсов с последовательностями геномов, депонированных в базах данных NCBI (Genbank и RefSeq), показал разделение штаммов на «европейскую» (группа 1) и «азиатскую» (группа 2) клады (рис. 2).

В группу 1 вошли 52 штамма, выделенных преимущественно на территории России и Японии (73%). Также встречаются штаммы (15%), выделенные в различных странах: Германии, Южной Африке, Туркменистане,

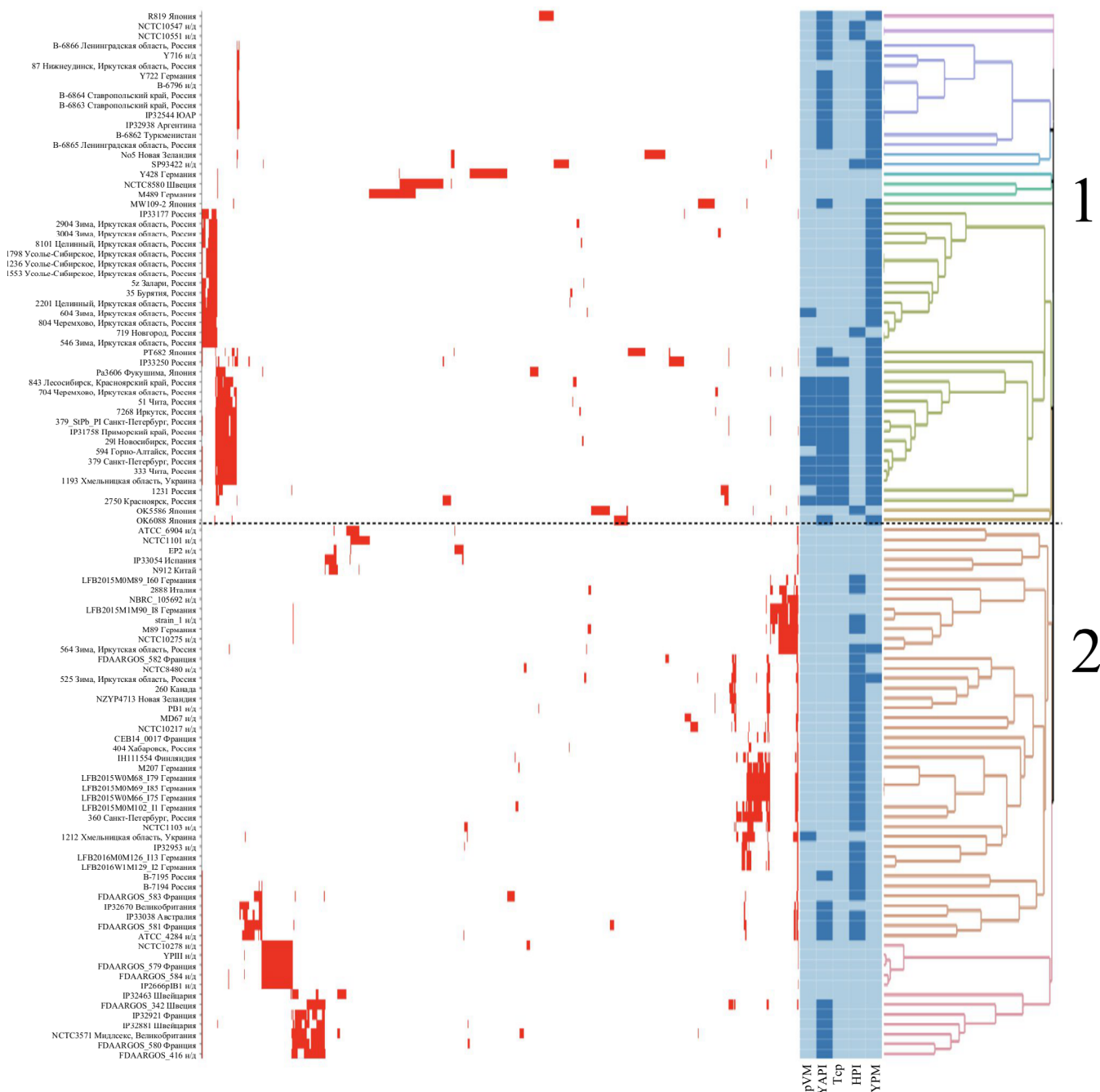


Рис. 2. Кластеризация штаммов *Y. pseudotuberculosis* ($n = 56$) по наличию спейсеров.

Данные секвенирования локусов CRISPR-Cas-систем ($n = 31$) и сиквенсов в NCBI ($n = 75$).

Условное обозначение по цветам: наличие спейсера — красный, наличие фактора патогенности — синий.

Fig. 2. Clusterization of *Y. pseudotuberculosis* strains ($n = 56$) by presence of spacer.

CRISPR-Cas system sequenced data ($n = 31$) and NCBI data ($n = 75$).

Color designations: presence of spacer — red, presence of factor — blue.

Швеции, Украине и Новой Зеландии. Для большинства штаммов данной группы (87%) характерно наличие гена суперантигена *urt*. Около половины штаммов (56%) несут «адгезивный остров патогенности» YAPI (в том числе ген *tcp*), при этом у части штаммов выявлена также плаزمида rVM82 (22%).

Группа 2 включает 54 штамма, выделенных преимущественно в странах Европы (51%), за исключени-

ем 7 (13%) штаммов из других стран (Китай, азиатская часть России, Канада, Новая Зеландия, Австралия). Для большинства штаммов данной группы (59%) характерно наличие «острова патогенности» HPI. Другим преобладающим фактором патогенности является «адгезивный остров патогенности» YAPI (20%).

Таким образом, штаммы *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующие на территории России и ряда других стран,

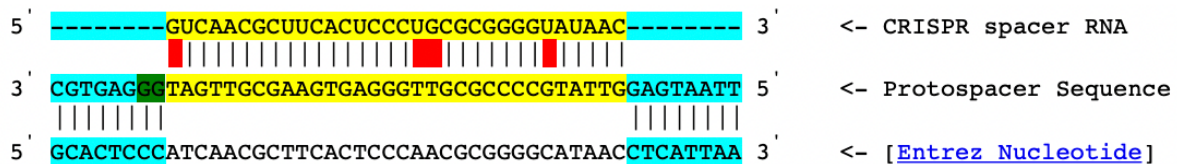


Рис. 3. Протоспейсерная последовательность плазмиды *Y. pseudotuberculosis* IP31758 pVM82 кДа (153 кб) к спейсеру 114 локуса YP3.

Fig. 3. Protospacer sequence of plasmid pVM82 kDa (153 kb) of *Y. pseudotuberculosis* IP31758 to spacer 114 of locus YP3.

нельзя чётко разделить на «азиатскую» и «европейскую» клады в зависимости от типа CRISPR-кластера, что связано с высокой вариабельностью штаммов. Вместе с тем проведённое сопоставление CRISPR-локусов с данными о наличии основных факторов патогенности позволило выявить генетические варианты штаммов *Y. pseudotuberculosis*, доминирующих на отдельных территориях. Можно заключить, что большинство штаммов, циркулирующих на территории России, отличается по данным молекулярным маркерам от штаммов из других стран.

Анализ протоспейсерных последовательностей в геномах фагов и плазмид

Исходя из иммунной функции CRISPR-Cas-системы, произведён поиск гомологичных последовательностей в геномах основных мобильных генетических элементов (МГЭ) — бактериофагах и плаزمидах. Суммарно в CRISPR-системах обнаружено 404 уникальных спейсерных последовательности, которые встречаются в разных штаммах. Анализ протоспейсеров в геномах бактерий, бактериофагов и плазмид выявил только 101 (25%) соответствие спейсеров фрагментам геномов.

20 спейсерных последовательностей гомологичны фрагментам геномов бактериофагов *Yersinia* YeP3, *Yersinia* YeP2, *Yersinia* YeP1, *Yersinia* vB_YenM, *Yersinia* vB_YenS_P400 и *Klebsiella* 6991. Семьдесят спейсерных последовательностей гомологичны последовательностям хромосом разных видов *Yersinia*: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. similis*, *Y. massiliensis*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae*. Согласно результатам анализа геномов с помощью онлайн-инструмента PHASTER, фрагменты геномов, содержащие протоспейсерные последовательности, соответствуют полноценным профагам [20, 24]. Один и тот же спейсер может быть гомологичен фрагментам генома профагов, обнаруженных в разных штаммах. Кроме того, спейсеры, представленные в одном локусе, способны узнавать разные фрагменты генома одного и того же профага.

Семь спейсеров гомологичны последовательностям генома плазмид *Y. pseudotuberculosis* и *Y. massiliensis*, 4 спейсера гомологичны последовательности крипточеской плазмиды pYptb32953 размером 27,7 kb, которая встречается достаточно редко в штаммах патогенных иерсиний. Основная функция данной плазмиды — участие в конъюгации: в геноме плазмиды расположен

кластер генов, кодирующих белки, необходимые для конъюгации плазмиды. Четыре спейсерных последовательности оказались гомологичны участку генома плазмиды pVM82 штаммов *Y. pseudotuberculosis* IP31758 и *Y. pseudotuberculosis* 598 (номера доступов в NCBI RefSeq: NC_009705 и NZ_CP071946), за исключением 4 нуклеотидов (рис. 3). В геноме плазмид находятся гены фагоподобной интегразы, что может свидетельствовать о приобретении кластера генов *icm/dot* системы секреции IVB-типа через механизмы горизонтального переноса.

Обсуждение

Основная функция CRISPR-Cas-систем — это специфическое узнавание и уничтожение чужеродных генетических элементов, попавших в бактериальную клетку и представляющих потенциальную опасность для существования популяции бактерии [25, 26]. Следовательно, последовательности спейсеров будут гомологичны фрагментам геномов МГЭ, характерных для определённых территорий. Способность приобретать спейсеры в хронологическом порядке и высокая доля полиморфизмов позволяет использовать CRISPR-Cas-системы как инструмент высокоразрешающего молекулярного типирования штаммов, что было продемонстрировано на примере *Streptococcus thermophilus* [27], *Campylobacter jejuni* [26], *Corynebacterium diphtheriae* [28] и *Y. pestis* [29]. Известно, что CRISPR-локусы являются динамической структурой, где новые спейсерные последовательности присоединяются со стороны лидерной последовательности [30]. Часть спейсеров, расположенных в середине кассеты, может быть потеряна в результате делеции во время приобретения новых последовательностей МГЭ. Спейсеры, расположенные около последнего полиморфного повтора, как правило, сохраняются [31].

Так, типирование штаммов по наличию спейсеров, расположенных в конце локусов YP1 и YP3, позволяет условно разделить штаммы, различающиеся набором детерминант вирулентности, на два кластера: «европейский» и «азиатский». Из исследованных 56 штаммов 35 выделены на территориях Дальнего Востока, Восточной и Западной Сибири. При этом происходит разделение на две подгруппы в зависимости от присутствия плазмиды pVM82 (pVM82⁺ и pVM82⁻), детерминирующей аппарат секреции IVB-типа и, наряду с другими факторами патогенности, опосредующей развитие генерализованных

форм псевдотуберкулёза. Штаммы, выделенные в Японии и Корее, также способные вызывать комплекс проявлений системной инфекции, названной дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой, имеют схожий паттерн распределения CRISPR-кассет.

Согласно результатам анализа PERMANOVA, состав локусов YP1 и YP3 зависит от наличия у штаммов таких факторов патогенности, как плазида pVM82 и «адгезивный остров патогенности» YAPI. Полученные результаты согласуются с ранее описанными отличиями длины локуса YP3: штаммы, имеющие данные основные детерминанты патогенности и вызывающие дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку, отличаются более длинным локусом YP3 по сравнению со штаммами, у которых pVM82 и YAPI не обнаружены [11]. К.А. Koskela и соавт. показали, что некоторые сиквенс-типы штаммов коррелируют со спейсерным составом CRISPR-кассет [9]. Ранее проведённый Т. Seecharran и соавт. филогенетический анализ штаммов *Y. pseudotuberculosis* выявил высокую степень разнообразия CRISPR-локусов среди штаммов, выделенных на азиатском континенте [10]. Пангеномный анализ штаммов *Y. pseudotuberculosis* не показал значимых соответствий в паттернах CRISPR-кассет и уникального геномного профиля штаммов [10]. Наиболее выраженные различия кластеров наблюдаются в вариабельном геноме, гены которого часто теряются или приобретаются путём горизонтального переноса.

Высокая вариабельность штаммов внутри вида определяется способностью приобретать новые генетические элементы (геномные острова) путём горизонтального переноса генов с помощью плазмид, бактериофагов, интегронов и транспозонов [32]. CRISPR-Cas как система «иммунитета» бактерий против МГЭ может участвовать в формировании генотипа штаммов *Y. pseudotuberculosis*, определяющего клинические проявления псевдотуберкулёза.

Анализ протоспейсеров в геномах бактерий, бактериофагов и плазмид выявил соответствие спейсеров участку генома плазмиды pVM82 штаммов *Y. pseudotuberculosis* IP31758 и *Y. pseudotuberculosis* 598. Возможно, приобретение данных спейсеров может быть причиной отсутствия плазмиды pVM82 в штаммах, относящихся к «европейскому» кластеру. Спейсер, способный узнавать участок плазмиды, обнаруживается в локусе YP3 штамма *Y. pseudotuberculosis* 2750 серотипа O:1b, содержащего плазмиду pVM82 и кластер генов *icm/dot*. Вероятно, большое количество мутаций в протоспейсерной последовательности препятствует CRISPR-интерференции или данная последовательность может присутствовать в непредставленном в базах данных геноме бактериофага. Кроме того, приобретение спейсеров к собственным последовательностям может служить триггером для возникновения новых мутаций и экспрессии нового фенотипа, проявляющегося в изменении вирулентных свойств микроорганизма [25]. Согласно другой гипотезе спейсеры, узнающие собственные последова-

тельности, являются механизмом селекции штаммов, не содержащих данный фактор [33]. Таким образом, CRISPR-Cas-система может являться одним из факторов, определяющих циркуляцию разнообразных штаммов на одной территории. В сочетании с классическими методами идентификации и типирования возбудителя псевдотуберкулёза анализ CRISPR-локусов может быть использован для филогенетических исследований, мониторинга циркуляции штаммов *Y. pseudotuberculosis* на территориях, эпидемиологического расследования групповых заболеваний.

Метод секвенирования ПЦР-фрагментов по Сэнгеру имеет ряд ограничений, в частности невозможность секвенирования фрагментов длиной более 1000 п.н. Развитие методов секвенирования и накопление данных о бактериальных геномах в будущем позволит провести анализ CRISPR-локусов штаммов, не вошедших в исследованную выборку, а также сравнить полученные результаты с данными других методов типирования (например, MLST-типирования) возбудителя псевдотуберкулёза.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования CRISPR-типирования при мониторинге штаммов *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих на отдельных территориях, и выявления возможной связи структурно-функциональных характеристик сайтов CRISPR-Cas-систем с клиническими проявлениями псевдотуберкулёза. Имеющиеся данные определяют перспективу использования CRISPR-локусов в качестве специфических молекулярных маркеров при изучении внутривидового разнообразия и эволюции *Y. pseudotuberculosis*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М. У истоков экологической микробиологии: история открытия и изучения сапронозов. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2018;(1):55–62. Andryukov B.G., Somova L.M. Transformation of the sapronose representations at the new stage of integration of knowledge about them. *Health, Medical Ecology, Science*. 2018;(1):55–62. DOI: <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1194901> EDN: <https://www.elibrary.ru/yssomm>
2. 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: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003>
3. Климов В.Т., Чеснокова М.В. Молекулярно-генетический мониторинг *Yersinia pseudotuberculosis* на основе ПЦР-О-генотипирования. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2007;(4):14–7. Klimov V.T., Chesnokova M.V. Molecular genetic monitoring of *Yersinia pseudotuberculosis* using PCR O-genotyping. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2007;(4):14–7. EDN: <https://www.elibrary.ru/iccuuj>
4. Кокорина Г.И., Сайнес Т.В., Богумильчик Е.А., Воскресенская Е.А. Особенности эпидемического процесса и лабораторной диагностики иерсиниозов в Российской Федерации в 2016–2018 гг. *Проблемы медицинской микологии*. 2022;24(2):86. Kokorina G.I., Saines T.V., Bogumil'chik E.A.,

- Voskresenskaya E.A. Features of the epidemic process and laboratory diagnosis of Yersinioses in the Russian Federation in 2016-2018. *Problems in Medical Mycology*. 2022;24(2):86. EDN: <https://www.elibrary.ru/qbgywj>
5. Чеснокова М.В., Климов В.Т., Никитин А.Я. и др. Анализ эпидемиологической ситуации по псевдотуберкулезу и кишечному иерсиниозу в России и прогноз заболеваемости на среднесрочную перспективу. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО*. 2018;(9):59–64. Chesnokova M.V., Klimov V.T., Nikitin A.Ya., et al. Analysis of the epidemiological situation on pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis in Russia and forecast of the incidence rate in the medium-term perspective. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2018;(9):59–64. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2018-306-9-59-64> EDN: <https://www.elibrary.ru/vagnaj>
 6. Laukkanen-Ninios R., Didelot X., Jolley K.A., et al. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing: MLST of the *Y. pseudotuberculosis* complex. *Environ. Microbiol.* 2011; 13(12): 3114–27. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02588.x>
 7. Мелоян М.Г., Воскресенская Е.А., Лебедева С.А., Трухачев А.И. Обзор методов генетической дифференциации штаммов возбудителя псевдотуберкулеза. *Вестник Пермского университета. Серия: Биология*. 2022;(1):54–63. Meloyan M.G., Voskresenskaya E.A., Lebedeva S.A., Trukhachev A.L. Review of the methods of genetic differentiation of pseudotuberculosis pathogen strains. *Bulletin of Perm University. Series Biology*. 2022;(1):54–63. DOI: <https://doi.org/10.17072/1994-9952-2022-1-54-63> EDN: <https://www.elibrary.ru/roxmqp>
 8. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:172. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-172>
 9. Koskela K.A., Mattinen L., Kalin-Mänttari L., et al. Generation of a CRISPR database for *Yersinia pseudotuberculosis* complex and role of CRISPR-based immunity in conjugation: *Y. pseudotuberculosis* complex CRISPR database. *Environ. Microbiol.* 2015;17(11):4306–21. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12816>
 10. Seecharran T., Kalin-Manttari L., Koskela K., et al. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Genom.* 2017;3(10):e000133. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000133>
 11. Перетолчина Н.П., Климов В.Т., Воскресенская Е.А. и др. Локусный состав CRISPR-Cas системы *Yersinia pseudotuberculosis* различных генетических вариантов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020;19(2):31–9. Peretolchina N.P., Klimov V.T., Voskresenskaya E.A., et al. CRISPR-Cas loci of *Yersinia pseudotuberculosis* strains with different genetic determinants. *Epidemiology & Vaccinal Prevention*. 2020;19(2):31–9. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-31-39> EDN: <https://www.elibrary.ru/zqepfb>
 12. Кокорина Г.И. Генотипы штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их клинические и диагностическое значение: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб.; 2012. Kokorina G.I. Genotypes of *Yersinia pseudotuberculosis* strains and their clinical and diagnostic significance: Diss. St. Petersburg; 2012.
 13. Galardini M., Biondi E.G., Bazzicalupo M., Mengoni A. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol. Med.* 2011;6:11. <https://doi.org/10.1186/1751-0473-6-11>
 14. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., et al. Using SPAdes de novo assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2020;70(1):e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
 15. Biswas A., Staals R.H.J., Morales S.E., et al. CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC Genomics*. 2016;17:356. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2627-0>
 16. Zhang Q., Ye Y. Not all predicted CRISPR–Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):92. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1512-4>
 17. Couvin D., Bernheim A., Toffano-Nioche C., et al. CRISPRCas-Finder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W246–51. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky425>
 18. McGinnis S., Madden T.L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Issue suppl. 2):W20–5. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
 19. Biswas A., Gagnon J.N., Brouns S.J.J., et al. CRISPRTarget: Bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA Biol.* 2013;10(5):817–27. DOI: <https://doi.org/10.4161/rna.24046>
 20. Arndt D., Grant J.R., Marcu A., et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(W1):W16–21. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
 21. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2021.
 22. Oksanen J., Simpson G., Blanchet G., et al. *Vegan: Community Ecology Package*; 2022. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
 23. Gu Z., Eils R., Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016;32(18):2847–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
 24. Zhou Y., Liang Y., Lynch K.H., et al. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(Suppl.): W347–52. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>
 25. Westra E.R., Buckling A., Fineran P.C. CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014;12(5):317–26. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3241>
 26. Medina-Aparicio L., Dávila S., Rebollar-Flores J.E., et al. The CRISPR-Cas system in *Enterobacteriaceae*. *Pathog. Dis.* 2018;76(1). DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/fty002>
 27. Horvath P., Romero D.A., Coûté-Monvoisin A.C., et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 2008;190(4):1401–12. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01415-07>
 28. Vergnaud G., Zhou D., Platonov M.E., et al. Analysis of the three *Yersinia pestis* CRISPR loci provides new tools for phylogenetic studies and possibly for the investigation of ancient DNA. In: Perry R.D., Fetherston J.D., eds. *The Genus Yersinia*. New York: Springer New York; 2007:327–38. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-72124-8_30
 29. Mokrousov I., Limeschenko E., Vyazovaya A., Narvskaya O. *Corynebacterium diphtheriae* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci. *Biotechnol. J.* 2007;2(7):901–6. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.200700035>
 30. Yosef I., Goren M.G., Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(12):5569–76. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks216>
 31. Garrett S.C. Pruning and tending immune memories: spacer in the CRISPR array. *Front. Microbiol.* 2021;12:664299. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664299>
 32. Bertelli C., Tilley K.E., Brinkman F.S.L. Microbial genomic island discovery, visualization and analysis. *Brief. Bioinform.* 2019;20(5):1685–98. DOI: <https://doi.org/10.1093/bib/bby042>
 33. Wimmer F., Beisel C.L. CRISPR-Cas systems and the paradox of self-targeting spacers. *Front. Microbiol.* 2020;10:3078. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03078>

Информация об авторах

Перетолчина Надежда Павловна[✉] — м.н.с. НИИ биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета, Иркутск, Россия, nadine1lenz@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9426-5197>

Воскресенская Екатерина Александровна — к.б.н., в.н.с. лаб. медицинской бактериологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>

Кокорина Галина Ивановна — к.м.н., с.н.с. лаб. медицинской бактериологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1973-3138>

Богумильчик Елена Александровна — н.с. лаб. медицинской бактериологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3181-4328>

Климов Валерий Тимофеевич — к.м.н., с.н.с. отдела эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>

Трухачев Алексей Леонидович — к.м.н., в.н.с. лаб. микробиологии чумы и других иерсиниозов Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>

Джиоев Юрий Павлович — к.б.н., в.н.с. НИИ биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>

Злобин Владимир Игоревич — д.м.н., профессор, г.н.с. лаб. механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов отдела арбовирусов и экспериментального производства Института вирусологии им. Д.И. Ивановского НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия; профессор каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии Иркутского государственного медицинского университета, Иркутск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>

Участие авторов. *Перетолчина Н.П.* — проведение исследований, подготовка и редактирование текста, проведение статистического анализа, визуализация; *Воскресенская Е.А.* — проведение исследований, подготовка и редактирование текста, ресурсное обеспечение исследования; *Кокорина Г.И.*, *Богумильчик Е.А.* — проведение исследований; *Климов В.Т.*, *Трухачев А.Л.* — ресурсное обеспечение исследования; *Джиоев Ю.П.* — разработка концепции, разработка методологии; *Злобин В.И.* — разработка концепции, утверждение окончательного варианта. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 02.02.2023;
принята к публикации 25.03.2023;
опубликована 28.06.2023

Information about the authors

Nadezhda P. Peretolchina[✉] — junior researcher, Research Institute of Biomedical Technologies, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia, nadine1lenz@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9426-5197>

Ekaterina A. Voskresenskaya — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1973-3138>

Galina I. Kokorina — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>

Elena A. Bogumilchik — researcher, Laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3181-4328>

Valery T. Klimov — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Epidemiology department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>

Alexey L. Trukhachev — Cand. Sci. (Med), leading researcher, Yersinia laboratory, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>

Yuri P. Dzhioev — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Research Institute of Biomedical Technologies, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>

Vladimir I. Zlobin — D. Sci. (Med.), Academician of RAS, Professor, head researcher, Department of arboviruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; Professor, Microbiology, virology, and immunology department, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>

Author contribution. *Peretolchina N.P.* — research, preparation and editing of the text, statistical analysis, visualization; *Voskresenskaya E.A.* — conducting research, preparing and editing the text, resource support for the study; *Kokorina G.I.*, *Bogumilchik E.A.* — researching; *Klimov V.T.*, *Trukhachev A.L.* — resource support for research; *Dzhioev Yu.P.* — concept development, methodology development; *Zlobin V.I.* — development of the concept, approval of the final version. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 02.02.2023;
accepted for publication 25.03.2023;
published 28.06.2023