

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-31-39>

## Локусный состав CRISPR-Cas системы *Yersinia pseudotuberculosis* различных генетических вариантов

Н. П. Перетолчина<sup>\*1,2</sup>, В. Т. Климов<sup>2</sup>, Е. А. Воскресенская<sup>3</sup>, Г. И. Кокорина<sup>3</sup>,  
Е. А. Богумильчик<sup>3</sup>, А. Л. Трухачев<sup>4</sup>, С. В. Игумнова<sup>2</sup>, Ю. П. Джигоев<sup>1</sup>, В. И. Злобин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России

<sup>2</sup> ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора

<sup>3</sup> ФБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора

<sup>4</sup> ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

### Резюме

**Актуальность.** *Yersinia pseudotuberculosis* – возбудитель псевдотуберкулеза, характеризующегося полиморфизмом клинических проявлений, которые обусловлены наличием специфических факторов вирулентности: плазмиды pVM82, островов патогенности HPI и YAPI и суперантигена YPM. Приобретение новых факторов во многом зависит от горизонтального переноса генов мобильными генетическими элементами, следовательно, системы, осуществляющие регуляцию передачи генетической информации, могут участвовать в эволюции патогенных видов. CRISPR-Cas – адаптивная защитная система прокариот от мобильных генетических элементов. **Цель.** Анализ локусного состава CRISPR-Cas-систем штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории РФ, и определение взаимосвязи длины локусов от наличия факторов вирулентности, которые определяют полиморфизм клинических проявлений псевдотуберкулеза, обладающих различным набором детерминант вирулентности. **Материалы и методы.** Длины локусов CRISPR-систем 167 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории РФ и ряда сопредельных государств, исследованы с помощью ПЦР. **Результаты и обсуждение.** CRISPR-системы 86% исследованных штаммов включают в себя три локуса: YP1, YP2 и YP3. Длина локуса YP3 в наибольшей степени зависит от наличия детерминант патогенности для штаммов *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b. Так штаммы, имеющие основные детерминанты патогенности и вызывающие тяжелую форму псевдотуберкулеза, отличаются более длинным локусом YP3 по сравнению со штаммами без детерминант. **Вывод.** Таким образом, CRISPR-Cas-система *Y. pseudotuberculosis*, регуляция которой осуществляется множественными механизмами, может участвовать в формировании определенного генотипа штамма, что, в свою очередь, определяет клинические проявления псевдотуберкулеза.

**Ключевые слова:** псевдотуберкулез, *Y. pseudotuberculosis*, CRISPR-Cas система, детерминанты патогенности, плазмида вирулентности, ПЦР

Конфликт интересов не заявлен.

**Для цитирования:** 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): 31–39. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-31-39>.

### CRISPR-Cas Loci of *Yersinia pseudotuberculosis* Strains with Different Genetic Determinants

NP Peretolchina<sup>\*1,2</sup>, VT Klimov<sup>2</sup>, EA Voskresenskaya<sup>3</sup>, GI Kokorina<sup>3</sup>, EA Bogumilchik<sup>3</sup>, AL Trukhachev<sup>4</sup>, SV Igumnova<sup>2</sup>, YP Dzhiyev<sup>1</sup>, VI Zlobin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Irkutsk State Medical University, Russian Federation

<sup>2</sup> Irkutsk Research Anti-plague Institute of Siberia and Far East, Russian Federation

<sup>3</sup> Saint-Petersburg Pasteur Institute, Russian Federation

<sup>4</sup> Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Russian Federation

\* Для переписки: Перетолчина Надежда Павловна, младший научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий, Иркутск. +79148706232, nadine1lenz@gmail.com © Перетолчина Н. П. и др.

**Abstract**

**Relevance.** *Yersinia pseudotuberculosis* is a causative agent of pseudotuberculosis, a disease with polymorphism of clinical manifestation that is determined by the presence of specific virulence determinants: plasmid pVM82, pathogenicity islands HPI and YAPI, and superantigen YPM. Occurrence of new determinants depends on horizontal transfer of mobile genetic elements, hence, systems regulating horizontal transfer participate in evolution of pathogenic species. CRISPR-Cas is an adaptive protection system of prokaryotes against mobile genetic elements. Aim. The study analyzed an interaction between CRISPR-loci of *Y. pseudotuberculosis* and virulence determinants. Results. 86% of strains includes three CRISPR-loci: YP1, YP2, and YP3. Length of locus YP3 mostly depends on presence of virulence determinants in strains of *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. Strains with virulence genes are able to cause a severe form of pseudotuberculosis and have longer locus than strains without determinants. Conclusion. Therefore, CRISPR-Cas system of *Y. pseudotuberculosis* may participate in formation of a certain strain genotype that defines clinical manifestation of pseudotuberculosis.

**Key words:** pseudotuberculosis, *Y. pseudotuberculosis*, CRISPR-Cas system, virulence determinants, virulence plasmid, PCR  
No conflict of interest to declare.

**For citation:** Peretolchina NP, Klimov VT, Voskresenskaya EA et al. CRISPR-Cas Loci of *Yersinia pseudotuberculosis* Strains with Different Genetic Determinants Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2020; 19 (2): 31–39 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-31-39>.

**Введение**

Псевдотуберкулез, вызываемый *Yersinia pseudotuberculosis*, характеризуется выраженным полиморфизмом клинических проявлений. Различные патологические изменения обусловлены наличием у возбудителя специфических факторов патогенности, локализованных на хромосоме и плаزمиде. Н. Fukushima с соавт. (2001) в результате изучения штаммов *Y. pseudotuberculosis* из различных регионов мира по наличию хромосомных детерминант вирулентности (острова высокой патогенности HPI и генов, кодирующих суперантигенные токсины YPMa-с) выделили шесть генетических групп (G1-G6) [1,2]. При этом основное значение в патологии человека имеют штаммы двух геногрупп: G2 и G3. Штаммы геногруппы G2 (HPI+YPM-) преимущественно распространены в Европе и вызывают заболевание, протекающее, в основном, в виде гастроэнтерита с лихорадкой и развитием мезентериального лимфаденита. На Дальнем Востоке Российской Федерации, в Японии и Корее наряду с гастроинтестинальными симптомами псевдотуберкулеза, получивший название дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (ДСЛ), проявляется сыпью, шелушением, поражением суставов и др. [3]. Штаммы, выделенные от больных ДСЛ, в своем большинстве относятся к геногруппе G3 (HPI-YPMa+). Было показано, что для этих возбудителей характерно наличие хромосомного адгезивного острова патогенности YAPI, несущего гены пилей IV типа (*pilPQ*) и недавно открытого белка TspYI (*tsp*), участвующего в ингибировании фагоцитоза и способствующего внутриклеточному выживанию микроба [2,4–6]. Известно также, что *Y. pseudotuberculosis*, вызывающие ДСЛ, помимо родоспецифической плазмиды вирулентности rYV, играющей ведущую роль в проявлении патогенных свойств иерсиний, обладают дополнительной плазмидой pVM82. Данная плазмида детерминирует аппарат секреции IVB-типа,

опосредующий внутриклеточное персистирование возбудителя в эпителиальных клетках, что ведет к развитию генерализованных форм заболевания [1,3,7–9].

Эволюция патогенных видов, появление новых факторов патогенности в популяциях бактерий в значительной степени определяются и контролируются мобильными генетическими элементами (МГЭ) [10]. Следовательно, системы, участвующие в регуляции горизонтального переноса генов, влияют на эволюцию патогенности и вирулентности бактерий.

К структурам прокариотических организмов, способным узнавать и уничтожать чужеродный генетический материал, относится система CRISPR-Cas (от англ. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, короткие палиндромные повторы, разделенные спейсерами). Результатом CRISPR-иммунитета является селекция небольшого фрагмента нуклеиновой кислоты МГЭ (протоспейсера) и его интеграция в геном бактерии со стороны лидерной последовательности CRISPR-локуса [11,12]. Такая направленная интеграция спейсеров в CRISPR-локус со стороны лидерной последовательности и делеция последовательностей, не имеющих функционального назначения в системе, позволяют проследить микроэволюционные процессы, происходящие внутри вида, что использовано при изучении эволюции и распространения штаммов *Y. pestis*, выявляемых на территориях Китая и Бразилии [13–16]. В результате исследования спейсерного состава CRISPR-Cas-систем штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выдвинута гипотеза об образовании изолированных популяций в ходе эволюции посредством действия механизмов, ограничивающих передачу генетического материала внутри вида. В качестве такого механизма может служить CRISPR-система [17]. Выявление различных вариантов течения псевдотуберкулеза в отдельных регионах РФ, их отличие от типичных

**Таблица 1. Последовательность праймеров к локусам CRISPR-Cas системы *Y. pseudotuberculosis***  
**Table 1. Primer sequences to CRISPR-loci of *Y. pseudotuberculosis***

CRISPR-локус CRISPR-locus	Последовательность праймеров Primer sequence
YP1 forward	ACATTGTGGTTATCGGTGGTCT
YP1 reverse	CAGTAATAAAAGATGCCATTCTCCC
YP2 forward	TTGCGCTGCTAAAAGCGTTG
YP2 reverse	CCCATTCTTGTGACCTCT
YP3 forward	GGATTCTTAGCCTATTACACA
YP3 reverse	CGATCTCTGTTTGTGGTGA

для заболевания в европейских странах позволяют предположить возможное разнообразие состава CRISPR-систем штаммов, обнаруживаемых на территории нашей страны.

**Цель настоящего исследования** – анализ локусного состава CRISPR-Cas-систем штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории РФ, и определение взаимосвязи длины локусов от наличия факторов вирулентности, которые определяют полиморфизм клинических проявлений псевдотуберкулеза, обладающих различным набором детерминант вирулентности.

#### Материалы и методы

Изучены 167 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, находящихся в коллекциях Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера и Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института. Штаммы выделены от больных псевдотуберкулезом людей, животных и птиц, смывов с овощей на территориях РФ, ряда сопредельных государств и некоторых других стран в течение последних 80 лет (1935–2014 гг.). Штаммы со среды хранения высевали в пробирки с мясопептонным бульоном, pH 7,1 ± 0,1, выращивали при (26 ± 2) °C в течение 18–24 ч. Бульонные культуры высевали на агар Хоттингера, pH 7,1 ± 0,1, инкубировали при (26 ± 2) °C в течение 24–48 ч.

Серологическую идентификацию исследуемых штаммов выполняли в реакции агглютинации на стекле по общепринятой методике с диагностическими сыворотками производства НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Определение подсеротипов штаммов осуществляли методом мультиплексной ПЦР [18].

Для выделения ДНК из коллекционных штаммов использовали комплект реагентов «Рибосорб» (AmpliSens) и «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ООО «НекстБио», Россия). ПЦР проводили на амплификторе компании Applied Biosystems, США, и на программируемом термостате «Терцик» (ЗАО «ДНК-Технология», Россия).

Для каждого штамма определено наличие основных факторов патогенности: хромосомных генов *ypmA/C*, генов, локализованных на «островах патогенности» HPI (*fyuA*, *irp2*), YAPI (*pilPQ*, *api74*), *tcp* (n = 141), генов плазмид pYV (*yopM*, *yscQ*), pVM82 (*dotO*, *mucAB*) [4–6,19–21]. Финальный объем реакционной смеси для ПЦР составил 50 µl и содержал 1,25 U *Taq* ДНК полимеразы (компания «Fermentas», США) с прилагаемым буфером, MgCl<sub>2</sub> в концентрации 2 mM и по 200 µM каждого из четырех дезоксинуклеозид-трифосфатов. Все праймеры использовали в финальной концентрации 0,3 µM. ПЦР проводили по программе: 1 цикл 94 °C – 3 мин; 30 циклов амплификации 94 °C – 30 сек, 55 °C – 1 мин, 72 °C – 2 мин; 72 °C – 10 мин. Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 1% агарозном геле с окрашиванием этидий бромидом.

Праймеры для амплификации CRISPR-локусов были разработаны с использованием онлайн-приложения NCBI Primer-BLAST на основе 15 полногеномных последовательностей систем штаммов *Y. pseudotuberculosis*, депонированных в базах данных GenBank и RefSeq NCBI (табл. 1) [22]. Идентификацию CRISPR-систем в геномах штаммов *Y. pseudotuberculosis* проводили посредством онлайн-программ «CRISPRone» и «CRISPRfinder» [23,24]

Финальный объем реакционной смеси для ПЦР составил 25 µl и содержал 1,2 U *Taq* ДНК полимеразы (компания «Fermentas», США) с прилагаемым буфером, MgCl<sub>2</sub> в концентрации 2 mM и по 250 µM каждого из четырех дезоксинуклеозид-трифосфатов. Все праймеры использовали в финальной концентрации 0,1 µM. ПЦР проводили по программе: 1 цикл 94 °C – 3 мин; 25 циклов амплификации 94 °C – 45 сек, 48 °C – 45 сек, 72 °C – 4 мин; 72 °C – 10 мин. Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с окрашиванием этидий бромидом.

Статистический анализ длин фрагментов и их связь с наличием факторов патогенности проводили в среде программирования RStudio с использованием языка R. Независимость распределения длин CRISPR-локусов определяли с применением

**Таблица 2. Локусный состав CRISPR-Cas систем штаммов *Y. pseudotuberculosis* различных генетических групп**  
**Table 2. Loci of CRISPR-Cas system of *Y. pseudotuberculosis* strains with different genetic group**

Кол-во и тип CRISPR-локусов Number and type of CRISPR-locus	Кол-во штаммов генетической группы (абс./%) Number of strains with different genetic group (abs./%)				Всего штаммов (абс./%) All strains (abs./%)
	G1	G2	G3	G6	
YP1,2,3	2/50	30/71,4	106/95,5	6/60	144/86,2
YP1,2	–	5/12	–	–	5/3
YP1,3	–	4/9,5	–	–	4/2,4
YP2,3	–	1/2,4	3/2,7	2/20	6/3,6
YP1	–	–	1/0,9	1/10	2/1,2
YP2	2/50	2/4,7	1/0,9	–	5/3
YP3	–	–	–	1/10	1/0,6
Всего штаммов All strains	4	42	111	10	167

критерия  $\chi^2$  при достоверности  $p > 0.05$ . Для расчета коэффициента корреляции использовали пакет polycor. Определение достоверности различий длин фрагментов между группами штаммов, имеющих различные факторы патогенности, проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

### Результаты и обсуждение

#### CRISPR-Cas система *Y. pseudotuberculosis*

В геномах 15 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, депонированных в базах данных GenBank и RefSeq NCBI, обнаружена система CRISPR-Cas первого класса, типа IF. В её состав входит один-три локуса, удаленных друг от друга, и один комплекс *cas*-генов. Локус, расположенный около *cas*-генов, считается первым и обозначается как YP1. Короткий локус с длиной, не превышающей 500 п.н., является вторым (YP2). Третий локус обозначается как YP3. На основе кодирующих и некодирующих последовательностей, фланкирующих CRISPR-локусы штаммов *Y. pseudotuberculosis*, к каждому локусу подобраны пары праймеров, отличающиеся от ранее описанных, большей специфичностью [25].

Проведенное исследование показало, что все изученные штаммы, выделенные на территории РФ и ряда сопредельных государств, обладают CRISPR-Cas системой, включающей от одного до трех локусов. Размер локуса YP1 составляет 400-3500 п.н., локуса YP2 – 250-500 п.н., локуса YP3 – 400–2000 п.н.

#### Локусный состав CRISPR-систем штаммов *Y. pseudotuberculosis*, отличающихся наличием факторов патогенности

Согласно результатам выявления детерминант вирулентности, изученные штаммы *Y. pseudotuberculosis* относятся к 4 геногруппам: G1 (HPI+YPM+) – 4 штамма, G2 (HPI+YPM-) – 42 штамма, G3 (HPI-YPM+) – 111 штаммов, G6 (HPI-YPM-) – 10 штаммов (табл. 2). Большинство

штаммов (86%) характеризуется CRISPR-системой, состоящей из трех локусов (см. табл. 2). При этом, штаммы геногруппы G3 наиболее гомогенны – почти 96% штаммов этой геногруппы имеют три CRISPR-локуса, геногрупп G2 и G6 –, соответственно 71 и 60%.

В CRISPR-Cas системе 9% штаммов состоит из двух локусов (сочетание YP1,2 и YP1,3), что характерно только для штаммов геногруппы G2 (пять и четыре штамма, соответственно), в то время как YP2,3 присутствуют у штаммов геногрупп G2, G3, G6 (один, три, два штамма соответственно).

В геноме остальных 5% штаммов присутствует только один локус: YP1 – 2 штамма (G3, G6), YP2 – 5 штаммов (G1, G2, G3), YP3 – 1 штамм (G6).

Штаммы геногруппы G2 по локусному составу CRISPR-систем наиболее вариабельны – у них выявлено пять комбинаций типов CRISPR-локусов. У штаммов геногрупп G3, G6 идентифицировано по четыре различных сочетания локусов YP1, YP2, YP3. Штаммы, составляющие малочисленную геногруппу G1, имеют в геноме три или один YP2 локус (по два штамма соответственно).

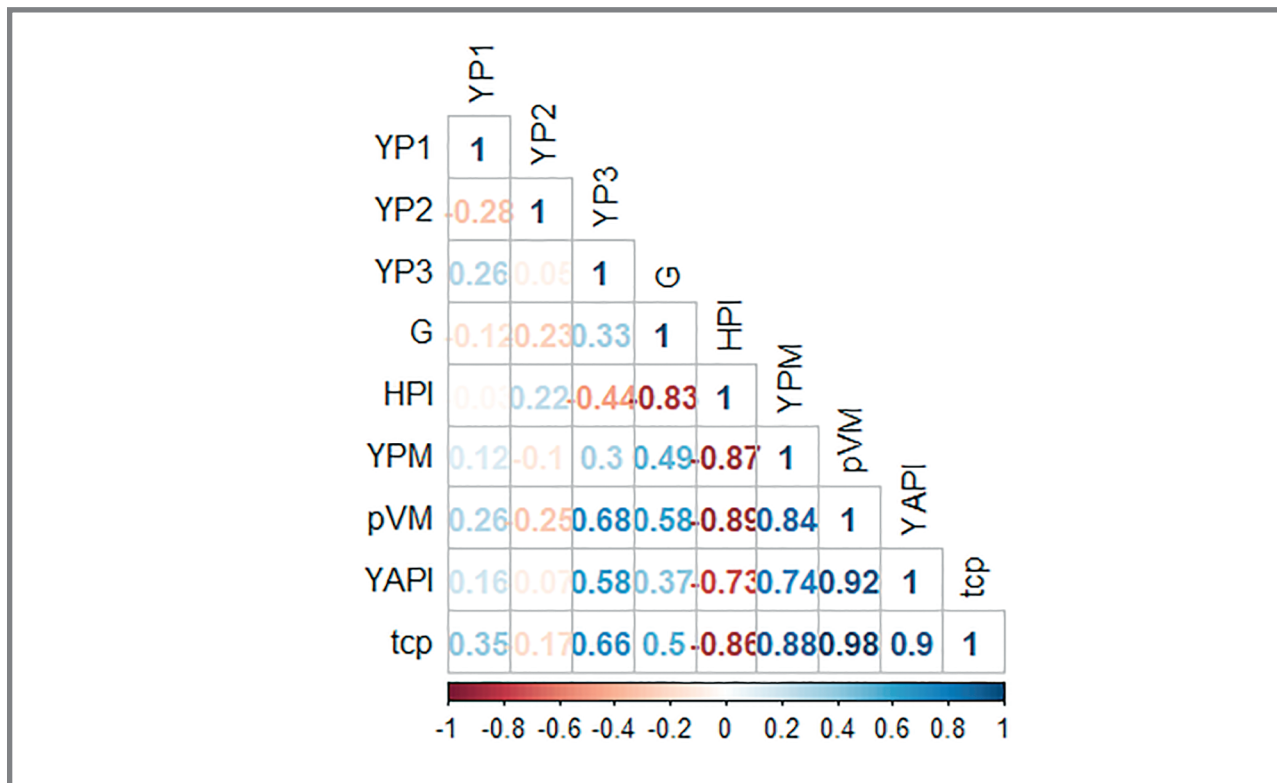
Длина локуса YP3 имеет слабую корреляцию с геногруппой штаммов, которая в свою очередь определяется наличием определенных факторов патогенности. Наиболее выражена корреляция между локусом YP3, генами плазмиды pVM82, «островом патогенности» YAPI и *tcp*, которые не учтены при классификации по геногруппам (рис. 1).

При этом локус YP1 статистически достоверно длиннее у штаммов с плазмидой pVM82 и фактором патогенности *tcp* (рис. 2А). Длина же локуса YP3 статистически достоверно отличается в группах штаммов, имеющих основные факторы патогенности – гены плазмиды pVM82, *tcp*, суперантигена YPM, «островов патогенности» YAPI и HPI. Стоит отметить, что штаммы с HPI отличаются более коротким локусом YP3 в отличие от штаммов без него (рис. 2).



**Рисунок 1. Матрица парных коэффициентов корреляции между длинами CRISPR-локусов YP1, YP2 и YP3 и факторами патогенности ( $p < 0.001$ )**

**Figure 1. Matrix of pair correlation coefficients for CRISPR-loci YP1, YP2 and YP3 and determinants of pathogenicity ( $p < 0.001$ )**



Большинство исследованных штаммов различного происхождения ( $n = 91$ ) выделено на территории Северного федерального округа (СФО) – одного из регионов РФ, где стабильно наиболее высокий уровень заболеваемости псевдотуберкулезом. Для сравнения изучены штаммы из Дальневосточного федерального округа ( $n = 17$ ) и Северо-Западного федерального округа ( $n = 12$ ), где также отмечаются высокие показатели заболеваемости (наша ссылка 9). Показано, что на территории СФО преобладают штаммы серотипа O:1b геногруппы G3 (97%). При этом доминирующими являются штаммы, наряду с геном суперантигена *urt*, содержащие также гены адгезивного острова патогенности YAPI, включая ген белка TcpY (*tcp*), и плазмиду вирулентности pVM82. Для данной группы штаммов характерно их разделение на две подгруппы в зависимости от наличия плазмиды pVM82, острова патогенности YAPI и гена *tcp*. Штаммы с длиной локуса YP3 более 1200 п.н. отличаются наличием основных детерминант патогенности, участвующих в развитии более тяжелой формы псевдотуберкулеза по сравнению со штаммами второй группы (рис. 3).

Состав CRISPR-Cas-систем проанализированных штаммов *Y. pseudotuberculosis* согласуется с ранее опубликованными данными и включает в себя, в основном, три локуса: YP1, YP2 и YP3 [17,25]. Прежде не было обнаружено корреляции между спейсерным составом локусов

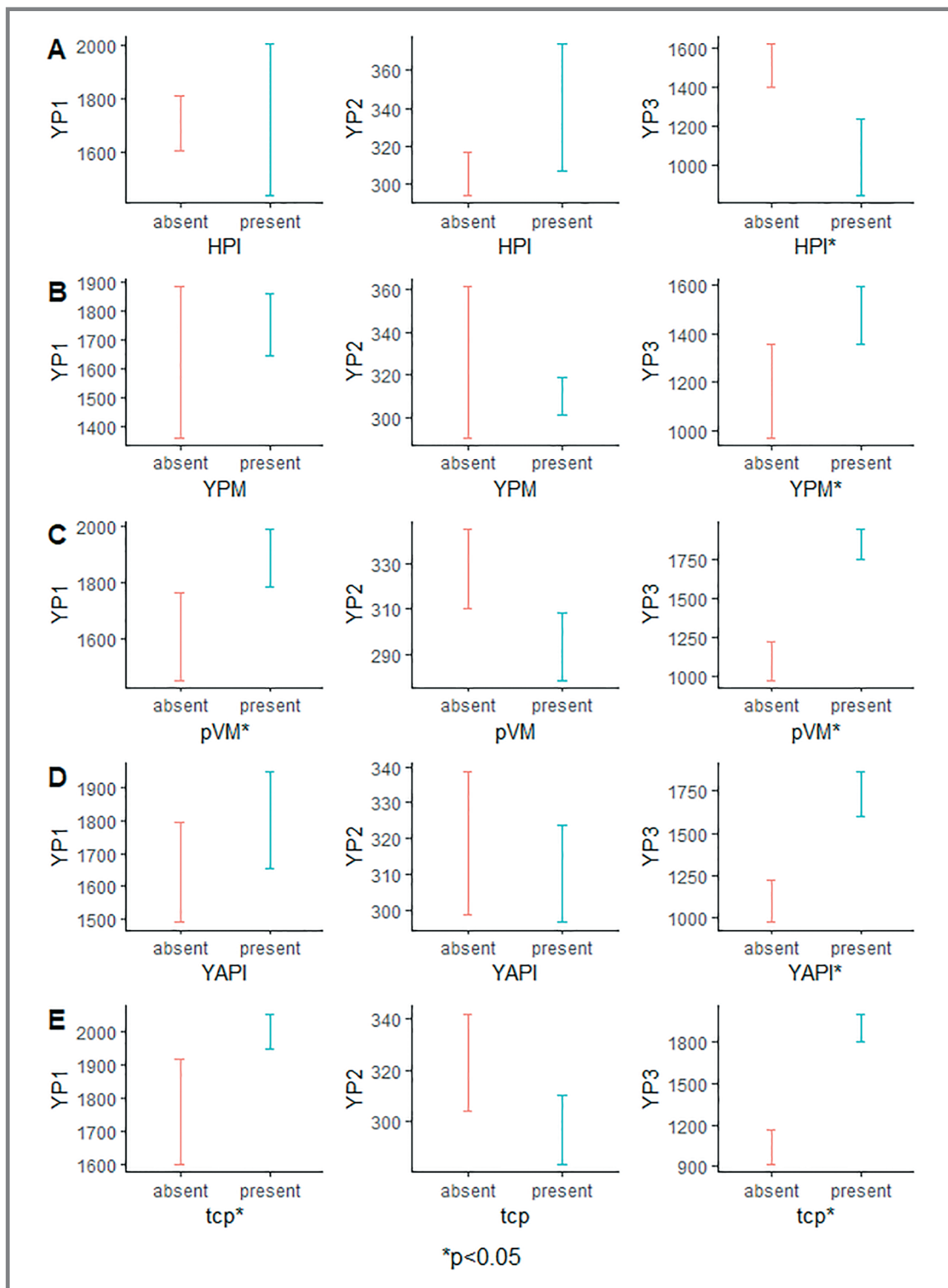
и сиквенс-типом штаммов, но определено четкое географическое разделение штаммов на «азиатскую» и «европейскую» клады в зависимости от типа CRISPR-кластера [17,25]. В результате проведенного нами исследования обнаружено, что связь длины локуса YP3 статистически достоверно коррелирует с наличием основных детерминант патогенности (плазмиды вирулентности pVM82, островов патогенности HPI и YAPI, и гена *tcp*). При этом длина локуса YP3 слабо коррелирует с геновариантом штамма, так как геновариант штаммов определяется наличием только островов патогенности HPI и генами суперантигена YPM.

Статистически достоверные различия в группах штаммов, имеющих ген *tcp* «острова патогенности» YAPI и плазмиду вирулентности pVM82, также подтверждают связь длины CRISPR-локусов и этих детерминант вирулентности штамма. Известно, что гены суперантигена *ypmA*, *tcp*, и плазмиды pVM82, относятся к основным факторам патогенности, определяющим проявления генерализованной формы псевдотуберкулеза, вызываемой штаммами серотипа O:1b [1,4]. Ген *tcp* расположен в пределах «адгезивного острова патогенности» YAPI, который также, как и «остров высокой патогенности» HPI, отличается более высоким GC составом [4,5]. Кроме того, кластеры генов «островов патогенности» YAPI и HPI включают в себя ген интегразы и сайты, гомологичные бактериофагам, что в сумме с неравномерным GC-составом свидетельствует о приобретении

## Original Articles

Рисунок 2. Средние длины фрагментов локусов YP1, YP2 и YP3 в зависимости от наличия основных факторов патогенности

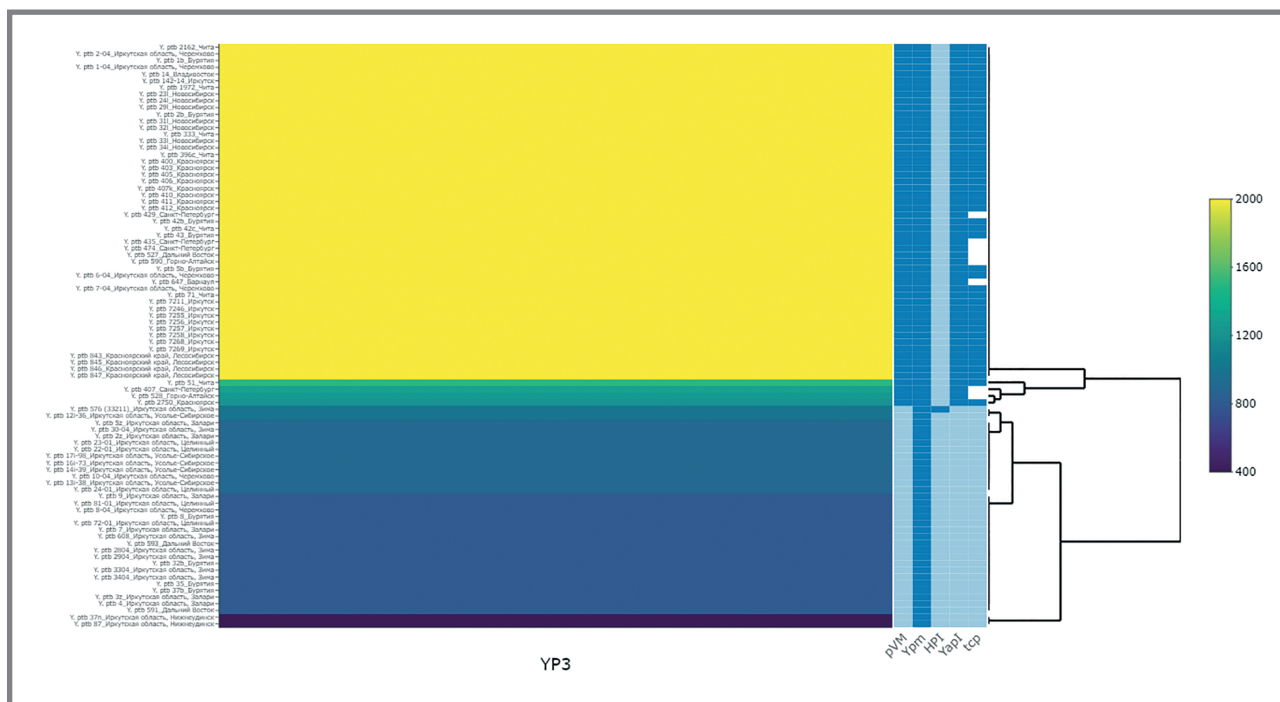
Figure 2. Mean length of loci YP1, YP2 and YP3 depending on the presence of main determinants of pathogenicity



Примечание: А) острова высокой патогенности HPI; В) генов суперантигена YPM; С) плазмиды вирулентности pVM82; D) генов «адгезивного острова патогенности» YAPI, в том числе E) гена tcp.

Note: A) high pathogenicity island HPI; B) superantigen genes YPM; C) virulence plasmid pVM82; D) genes of adhesive pathogenicity island YAPI including E) gene tcp.

**Рисунок 3. Распределение длин локуса YP3 в зависимости от наличия основных детерминант патогенности: плазмиды вирулентности pVM82, гена суперантигена YPM, островов патогенности HPI и YAPI, в том числе гена tcp**  
**Figure 3. Length of YP3 locus depending on the presence of main determinants of pathogenicity: virulence plasmid pVM82, gene of superantigen YPM, pathogenicity islands HPI and YAPI including gene tcp**



островов патогенности в результате горизонтального генетического обмена [1,26]. Вместе с тем, в состав YAPI также входит оперон *piI*, кодирующий образование пилей IV типа, участвующих в конъюгации [27]. Ген *upt* также отличается низким содержанием GC по сравнению с геномом и располагается в непосредственной близости от гена интегразы бактериофага [28]. В непосредственной близости от кластера генов *icm/dot* системы секреции IVB типа плазмиды pVM82 находится ген фаговой интегразы, также свидетельствующий о приобретении данного участка в результате горизонтального переноса генов [21].

Таким образом, из этих данных следует, что ряд хромосомных генов и плазида pVM82, детерминирующие факторы вирулентности *Y. pseudotuberculosis* приобретены в результате горизонтального переноса. Кроме

того, существование различных филогенетических групп на одной территории предполагает наличие в популяции механизмов, ограничивающих передачу генетического материала (ферменты рестрикции-модификации, система CRISPR-Cas) [17]. CRISPR-Cas-система *Y. pseudotuberculosis*, регуляция которой осуществляется множественными механизмами, может участвовать в формировании определенного генотипа штамма, что, в свою очередь, определяет клинические проявления псевдотуберкулеза [29,30].

Учитывая разнообразие геновариантов штаммов и клинических форм псевдотуберкулеза на территории РФ, последующее секвенирование CRISPR-локусов и сравнение их спейсерного состава позволит определить роль адаптивной защитной системы в эволюции вида.

## Литература

1. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen Yersinia pseudotuberculosis-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among Yersinia pseudotuberculosis strains. // Journal of clinical microbiology. 2001. Vol. 39, N10. P. 3541–3547.
2. Amphlett A. Far East scarlet-like fever: a review of the epidemiology, symptomatology, and role of superantigenic toxin: Yersinia pseudotuberculosis-derived mitogen A // Open forum infectious diseases. 2016. Vol. 3, N 1.
3. Сомов Г.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (псевдотуберкулез человека) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1976. Т. 53, № 4. С. 103.
4. Nörenberg D., Wieser A., Magistro G., et al. Molecular analysis of a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain containing virulence protein of Y. pseudotuberculosis among Far East scarlet-like fever serotype I strains // International Journal of Medical Microbiology. 2013. Vol. 303, N8. P. 583–594.
5. Collyn F., Billault A., Mullet C., et al. YAP1, a new Yersinia pseudotuberculosis pathogenicity island // Infection and immunity. 2004. Vol. 72, N8. P. 4784–4790.
6. Collyn F., Fukushima H., Carnoy C., et al. Linkage of the horizontally acquired ypm and pil genes in Yersinia pseudotuberculosis. // Infection and immunity. 2005. Vol. 73, N4. P. 2556–2558.
7. Шурыгина И.А., Малов И.В., Шурыгин М.Г. Современные представления о факторах патогенности Yersinia pseudotuberculosis. // Acta Biomedica Scientifica. 2005. № 6. С. 208–214.
8. Воронцов А.В., Шурыгина И.А., Климов В.Т., и др. Иммуносупрессивные свойства плазмиды pVM82 Yersinia pseudotuberculosis // Acta Biomedica Scientifica. 2002. № 4–2. С. 49–51.
9. Timchenko NF, Adgamov RR, Popov AF, et al. Far East Scarlet-like fever caused by a few related genotypes of Yersinia pseudotuberculosis, Russia // Emerging infectious diseases. 2016. Vol. 22, N3. P. 503–506.

## Original Articles

10. Mojica FJ, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // *Journal of molecular evolution*. 2005. Vol. 60, N2. P. 174–182.
11. Jiang F, Doudna J. The structural biology of CRISPR-Cas systems // *Current opinion in structural biology*. 2015. Vol. 30. P. 100–111.
12. Sternberg SH, Richter H, Charpentier E, et al. Adaptation in CRISPR-Cas systems // *Molecular cell*. 2016. Vol. 61, N6. P. 797–808.
13. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies // *Microbiology*. 2005. Vol. 151, N3. P. 653–663.
14. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Ефременко Д.В., и др. Внутривидовая принадлежность рамнозопозитивных штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов чумы Монголии // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2015. Т. 33, №1. С. 23–28.
15. Cui Y, Li Y, Gorgé O, et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats // *PLoS one*. 2008. Vol. 3, N 7. P. e2652.
16. Barros M.P.S., França C.T., Lins R.H.F., et al. Dynamics of CRISPR loci in microevolutionary process of *Yersinia pestis* strains // *PLoS one*. 2014. Vol. 9, N 9. P. e108353.
17. Seecharran T, Kalin-Manttari L, Koskela K., et al. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis* // *Microbial genomics*. 2017. Vol. 3, N10. P. e000133.
18. Bogdanovich T, Carniel E, Fukushima H., et al. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* // *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. Vol. 41, N11. P. 5103–5112.
19. Ito Y, Abe J, Yoshino K.I., et al. Sequence analysis of the gene for a novel superantigen produced by *Yersinia pseudotuberculosis* and expression of the recombinant protein // *The Journal of Immunology*. 1995. Vol. 154, N11. P. 5896–5906.
20. Schubert S., Rakin A., Karch H., et al. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans // *Infection and immunity*. 1998. Vol. 66, N2. P. 480–485.
21. Eppinger M., Rosovitz M.J., Fricke W.F., et al. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever // *PLoS genetics*. 2007. Vol. 3, N 8. P. e142.
22. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC bioinformatics*. 2012. Vol. 13, N1. P. 134.
23. Zhang Q., Ye Y. Not all predicted CRISPR–Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements // *BMC bioinformatics*. 2017. Vol. 18, N1. P. 92.
24. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats // *Nucleic acids research*. 2007. Vol. 35. Suppl 2. P. W52–W57.
25. Koskela K.A., Mattinen L., Kalin-Manttari L., et al. Generation of a CRISPR database for *Yersinia pseudotuberculosis* complex and role of CRISPR-based immunity in conjugation // *Environmental microbiology*. 2015. Vol. 17, N11. P. 4306–4321.
26. Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island // *Microbes and infection*. 2001. Vol. 3, N7. P. 561–569.
27. Collin F., Léty M.A., Nair S., et al. *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity // *Infection and immunity*. 2002. Vol. 70, N11. P. 6196–6205.
28. Carnoy C., Floquet S., Marceau M., et al. The superantigen gene *ypm* is located in an unstable chromosomal locus of *Yersinia pseudotuberculosis* // *Journal of Bacteriology*. 2002. Vol. 184, N16. P. 4489–4499.
29. Patterson A.G., Jackson S.A., Taylor C., et al. Quorum sensing controls adaptive immunity through the regulation of multiple CRISPR-Cas systems // *Molecular cell*. 2016. Vol. 64, N6. P. 1102–1108.
30. Makarova K.S., Anantharaman V., Aravind L., et al. Live virus-free or die: coupling of antiviral immunity and programmed suicide or dormancy in prokaryotes // *Biology direct*. 2012. Vol. 7, N1. P. 40

## References

1. Fukushima H, Matsuda Y, Seki R, et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Journal of clinical microbiology*. 2001; 39(10): 3541–7. doi: 10.1128/JCM.39.10.3541-3547.2001
2. Amphlett A. Far East scarlet-like fever: a review of the epidemiology, symptomatology, and role of superantigenic toxin: *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen A. *Open forum infectious diseases*. 2016; 3 (1): ofv202. doi: 10.1093/ofid/ofv202
3. Somov GP. Dalnevostochnaya skarlatinopodobnaya likhoradka (pseudotuberculez cheloveka). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1976; 53 (4): 103 (In Russ).
4. Nörenberg D, Wieser A, Magistro G, et al. Molecular analysis of a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain containing virulence protein of *Y. pseudotuberculosis* among Far East scarlet-like fever serotype I strains. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013; 303 (8): 583–94. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.08.002
5. Collin F, Billault A, Mullet C, et al. YAP1, a new *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenicity island. *Infection and immunity*. 2004; 72 (8): 4784–90. doi: 10.1128/IAI.72.8.4784-4790.2004
6. Collin F, Fukushima H, Carnoy C, et al. Linkage of the horizontally acquired *ypm* and *pil* genes in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and immunity*. 2005; 73 (4): 2556–8. doi: 10.1128/IAI.73.4.2556-2558.2005
7. Shurygina IA, Malov IV, Shurygin MG. Modern concept of *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenicity factors. *Acta Biomedica Scientifica*. 2005;6:208-14. (In Russ).
8. Voropaev AV, Shurygina IA, Klimov VT, et al. Immunosuppressivnye svoystva plazmidy pVM82 *Yersinia pseudotuberculosis*. *Acta Biomedica Scientifica*. 2002; 4–2: 49–51 (In Russ).
9. Timchenko NF, Adgamon RR, Popov AF, et al. Far East Scarlet-like fever caused by a few related genotypes of *Yersinia pseudotuberculosis*, Russia. *Emerging infectious diseases*. 2016; 22 (3): 503–6. doi: 10.3201/eid2203.150552
10. Mojica FJ, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*. 2005; 60 (2): 174–82. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3
11. Jiang F, Doudna J. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in structural biology*. 2015; 30: 100–11. doi: 10.1016/j.sbi.2015.02.002
12. Sternberg SH, Richter H, Charpentier E, et al. Adaptation in CRISPR-Cas systems. *Molecular cell*. 2016; 61 (6): 797–808. doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.030
13. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005; 151 (3): 653–63. doi: 10.1099/mic.0.27437-0
14. Platonov ME, Evseeva VV, Efremenko DV, et al. Intraspecies belonging of the rhamnose-fermentation-positive *Yersinia pestis* isolates from the mongolian natural plague foci. *Molecular genetics, microbiology and virology*. 2015; 33 (1): 23–8 (In Russ).
15. Cui Y, Li Y, Gorgé O, et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS one*. 2008; 3(7): e2652. doi: 10.1371/journal.pone.0002652
16. Barros MPS, França CT, Lins RHF, et al. Dynamics of CRISPR loci in microevolutionary process of *Yersinia pestis* strains. *PLoS one*. 2014;9(9):e108353. doi: 10.1371/journal.pone.0108353
17. Seecharran T, Kalin-Manttari L, Koskela K, et al. Phylogeographic separation and formation of sexually discrete lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbial genomics*. 2017; 3 (10): e000133. doi: 10.1099/mgen.0.000133
18. Bogdanovich T, Carniel E, Fukushima H, et al. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(11):5103–12. doi: 10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003
19. Ito Y, Abe J, Yoshino KI, et al. Sequence analysis of the gene for a novel superantigen produced by *Yersinia pseudotuberculosis* and expression of the recombinant protein. *The Journal of Immunology*. 1995;154(11): 5896–906.
20. Schubert S, Rakin A, Karch H, et al. Prevalence of the «high-pathogenicity island» of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and immunity*. 1998; 66 (2): 480–5.
21. Eppinger M, Rosovitz MJ, Fricke WF, et al. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS genetics*. 2007; 3(8): e142. doi: 10.1371/journal.pgen.0030142
22. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. 2012; 13 (1): 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
23. 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: 10.1186/s12859-017-1512-4
24. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic acids research*. 2007; 35 (Suppl 2):W52–7. doi: 10.1093/nar/gkm360
25. Koskela KA, Mattinen L, Kalin-Manttari L, et al. Generation of a CRISPR database for *Yersinia pseudotuberculosis* complex and role of CRISPR-based immunity in conjugation. *Environmental microbiology*. 2015; 17 (11): 4306–21. doi: 10.1111/1462-2920.12816
26. Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes and infection*. 2001; 3(7): 561–9. doi: 10.1016/S1286-4579(01)01412-5
27. Collin F, Léty MA, Nair S, et al. *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity. *Infection and immunity*. 2002; 70 (11): 6196–205. doi: 10.1128/IAI.70.11.6196-6205.2002
28. Carnoy C, Floquet S, Marceau M, et al. The superantigen gene *ypm* is located in an unstable chromosomal locus of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Bacteriology*.



2002; 184 (16): 4489–99. doi: 0.1128/JB.184.16.4489-4499.2002

29. Patterson A.G., Jackson S.A., Taylor C., et al. Quorum sensing controls adaptive immunity through the regulation of multiple CRISPR-Cas systems. *Molecular cell*. 2016; 64 (6): 1102–8. doi: 10.1016/j.molcel.2016.11.012
30. Makarova KS, Anantharaman V, Aravind L, et al. Live virus-free or die: coupling of antiviral immunity and programmed suicide or dormancy in prokaryotes. *Biology direct*. 2012; 7 (1): 40. doi: 10.1186/1745-6150-7-40.

## Об авторах

- **Надежда Павловна Перетолчина** – младший научный сотрудник научно-исследовательского института биомедицинских технологий, Иркутского государственного медицинского университета; научный сотрудник отдела эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока. +7(3952)220143, nadine1lenz@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9426-5197>.
- **Валерий Тимофеевич Климов** – к. м. н., старший научный сотрудник отдела эпидемиологии, Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока. +7(3952)220143, 41klimov@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>.
- **Екатерина Александровна Воскресенская** – к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. +7 (812) 232-94-85, tsenevapasteur@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>.
- **Галина Ивановна Кокорина** – к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. +7 (812) 232-94-85, tsenevapasteur@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1973-3138>.
- **Елена Александровна Богумильчик** – научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. +7 (812) 232-94-85, tsenevapasteur@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3181-4328>.
- **Алексей Леонидович Трухачев** – к. м. н., заведующий лабораторией микробиологии чумы и других иерсиниозов Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института. +7 (863) 240-91-22, trukhachev\_al@antiplague.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>.
- **Светлана Викторовна Игумнова** – врач-эпидемиолог, Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, +7(3952)220143, fantik200707@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0785-686X>
- **Юрий Павлович Джигоев** – ведущий научный сотрудник научно-исследовательского института биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета. +7 (3952) 24-29-86, alanir07@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>.
- **Владимир Игоревич Злобин** – академик, д. м. н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, директор научно-исследовательского института биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета, +7 (3952) 24-30-16. vizlobin@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>

Поступила: 04.02.2020. Принята к печати: 16.04.2020.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

## About the Authors

- **Nadezhda P. Peretolchina** – junior researcher of Research Institute of Biomedical Technologies of Irkutsk of State Medical University, researcher of Epidemiology Department of Irkutsk Research Antiplague Institute of Siberia and Far East. +7 9148706232, nadine1lenz@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9426-5197>.
- **Valery T. Klimov** – Cand. Sci. (Med.), senior researcher of Epidemiology Department of Irkutsk Research Antiplague Institute of Siberia and Far East, +7(3952)220143, 41klimov@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>.
- **Ekaterina A. Voskresenskaya** – Cand. Sci. (Biol.), leading researcher of Medical Bacteriology Laboratory of Saint-Petersburg Pasteur Institute, +7 (812) 232-94-85, tsenevapasteur@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6380-1153>.
- **Galina I. Kokorina** – Cand. Sci. (Med.), senior researcher of Medical Bacteriology laboratory of Saint-Petersburg Pasteur Institute, +7 (812) 232-94-85, tsenevapasteur@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1973-3138>.
- **Elena A. Bogumilchik** – researcher of Medical Bacteriology laboratory of Saint-Petersburg Pasteur Institute, +7 (812) 232-94-85; tsenevapasteur@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3181-4328>.
- **Aleksey L. Trukhachev** – Cand. Sci. (Med.), head of laboratory of Plague and other Yersiniosis Microbiology of Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, +7 (863) 240-91-22, trukhachev\_al@antiplague.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>.
- **Svetlana V. Igumnova** – epidemiologist of Irkutsk Research Antiplague Institute of Siberia and Far East, +7(3952)220143, fantik200707@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0785-686X>.
- **Yuri P. Dzhigoev** – leading researcher of Research Institute of Biomedical Technologies of Irkutsk State Medical University. +7 (3952) 24-29-86, alanir07@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5410-5113>.
- **Vladimir I. Zlobin** – academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Head of Research Institute of Biomedical Technologies of Irkutsk State Medical University, +7 (3952) 24-30-16; vizlobin@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>

Received: 04.02.2020. Accepted: 16.04.2020.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.