

Секвенирование как метод новых технологий в диагностике особо опасных и природно-очаговых инфекций на современном этапе

Е.Е.Бжитских, А.А.Оплеухин, С.Б.Такысова, А.Ю.Югушев, Г.Х.Базарова, Е.Н.Рождественский, П.П.Санаров, Е.С.Полковников, А.В.Денисов, А.А.Киреев, Н.Ю.Красавина, И.Л.Григорьева, Н.В.Сапкаускас, Е.И.Филатов

ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, Горно-Алтайск, Республика Алтай, Российская Федерация

Идентификация микроорганизмов является важной задачей для решения вопросов мониторинга природных очагов особо опасных инфекций, эпидемиологических расследований, геномной паспортизации и определения филогенетических связей штаммов микроорганизмов. Алтайской противочумной станцией в 2022–2023 гг. в результате внедрения в практику работы полногеномного секвенирования было проведено секвенирование выделенных в результате работы культур *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*. Полученные результаты позволили максимально точно типировать выделенные штаммы особо опасных и природно-очаговых инфекций и, таким образом, подтвердить результаты эпидемиологического расследования и выявить некоторые особенности циркуляции различных штаммов на территории природного очага чумы.

Ключевые слова: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, секвенирование, филогения

Для цитирования: Бжитских Е.Е., Оплеухин А.А., Такысова С.Б., Югушев А.Ю., Базарова Г.Х., Рождественский Е.Н., Санаров П.П., Полковников Е.С., Денисов А.В., Киреев А.А., Красавина Н.Ю., Григорьева И.Л., Сапкаускас Н.В., Филатов Е.И. Секвенирование как метод новых технологий в диагностике особо опасных и природно-очаговых инфекций на современном этапе. Бактериология. 2025; 10(2): 33–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-33-37

Sequencing as a method of new technologies in the diagnosis of particularly dangerous infections and natural focal infections at the present stage

E.E.Bzhitskikh, A.A.Opleukhin, S.B.Takysova, A.Yu.Yugushev, G.Kh.Bazarova, E.N.Rozhdestvensky, P.P.Sanarov, E.S.Polkovnikov, A.V.Denisov, A.A.Kireev, N.Yu.Krasavina, I.L.Grigorieva, N.V.Sapkauskas, E.I.Filatov

Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор, Gorno-Altaysk, Altai Republic, Russian Federation

The identification of microorganisms is an important task for addressing issues related to monitoring natural foci of infectious diseases, conducting epidemiological investigations, genomic certification, and determining the phylogenetic relationships of microorganism strains. The Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор introduced the practice of whole-genome sequencing in 2022–2023. This led to the sequencing of cultures of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. The results obtained allowed for the most accurate typing of isolated strains of particularly dangerous infections and natural focal infections, thus confirming the results of epidemiological investigations and identifying some features of the circulation of various strains within the territory of the natural plague focus.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, sequencing, phylogeny

For citation: Bzhitskikh E.E., Opleukhin A.A., Takysova S.B., Yugushev A.Yu., Bazarova G.Kh., Rozhdestvensky E.N., Sanarov P.P., Polkovnikov E.S., Denisov A.V., Kireev A.A., Krasavina N.Yu., Grigorieva I.L., Sapkauskas N.V., Filatov E.I. Sequencing as a method of new technologies in the diagnosis of particularly dangerous infections and natural focal infections at the present stage. Bacteriology. 2025; 10(2): 33–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-33-37

Для корреспонденции:

Оплеухин Алексей Александрович, кандидат биологических наук, биолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Адрес: 649002, Республика Алтай, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2

Статья поступила 06.06.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Aleksey A. Opleukhin, PhD in Biological Sciences, biologist of the bacteriological laboratory of the Federal State Institution of Health "Altai Anti-Plague Station" of Rosпотребнадзор

Address: 2 Zavodskaya str., Gorno-Altaysk, Altai Republic, 649002, Russian Federation

The article was received 06.06.2025, accepted for publication 30.06.2025

Идентификация микроорганизмов и определение филогенетических связей между ними являются крайне важными задачами для достижения таких целей, как мониторинг природных очагов особо опасных инфекций (ООИ), эпидемиологические расследования, геномная паспортизация.

В случае возникновения вспышек ООИ большое значение имеют как своевременная диагностика, так и определение конкретного штамма патогена в целях установления источника заражения и реализации необходимых мер защиты, а также устранения опасности дальнейшего распространения инфекции и лечения зараженных людей. Сходные цели стоят и при эпизоотическом обследовании природного очага инфекции: установление источника и масштаба эпизоотии и устранение опасности дальнейшего распространения инфекции и заражения людей.

Наиболее важными показателями метода диагностики является его высокая дифференцирующая способность, позволяющая различать все исследуемые изоляты, высокая скорость получения результата, воспроизводимость, простота в исполнении и интерпретации, низкая себестоимость. Несомненно важны также возможность сопоставления результатов, получаемых разными лабораториями, наличие общедоступных баз данных и международной номенклатуры [1–4]. Долгое время использование полногеномного секвенирования (как наиболее мощного метода дифференциации) в данном контексте встречало проблемы вследствие

его высокой стоимости и сложности проведения. Однако в результате совершенствования технологий и прихода в широкую лабораторную практику сначала технологий NGS (Next-Generation Sequencing), а затем и технологий секвенирования третьего поколения эти сложности при использовании удалось существенно снизить, и в настоящее время возросшая доступность секвенирования позволяет использовать этот метод в практических учреждениях, в т.ч. противочумных станциях.

При внедрении в практику работы Алтайской противочумной станции полногеномного секвенирования стоял вопрос определения значения увеличения точности идентификации при использовании метода для решения практических задач, таких как эпидемиологические расследования и обследования природных очагов инфекций, учитывая по-прежнему сравнительно высокую стоимость и трудозатратность метода по сравнению с методами, традиционно применяемыми в практических учреждениях. Это и стало целью данного исследования.

Материалы и методы

В 2022 г. Алтайской противочумной станцией было проведено секвенирование изолятов особо опасных и природно-очаговых инфекций. Образцы *Yersinia enterocolitica* получены в ходе эпидемиологического расследования, а *Yersinia pestis* – в рамках мониторинга очагов ООИ.

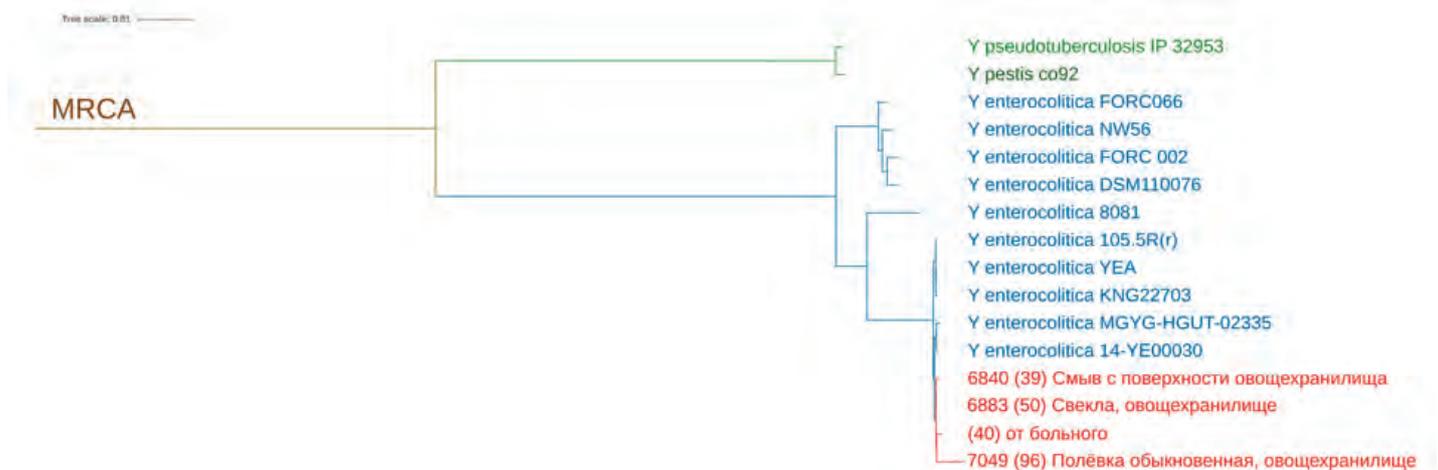


Рис. 1. Филогенетическое дерево выделенных штаммов *Y. enterocolitica*.
 Fig. 1. Phylogenetic tree of isolated *Y. enterocolitica* strains.

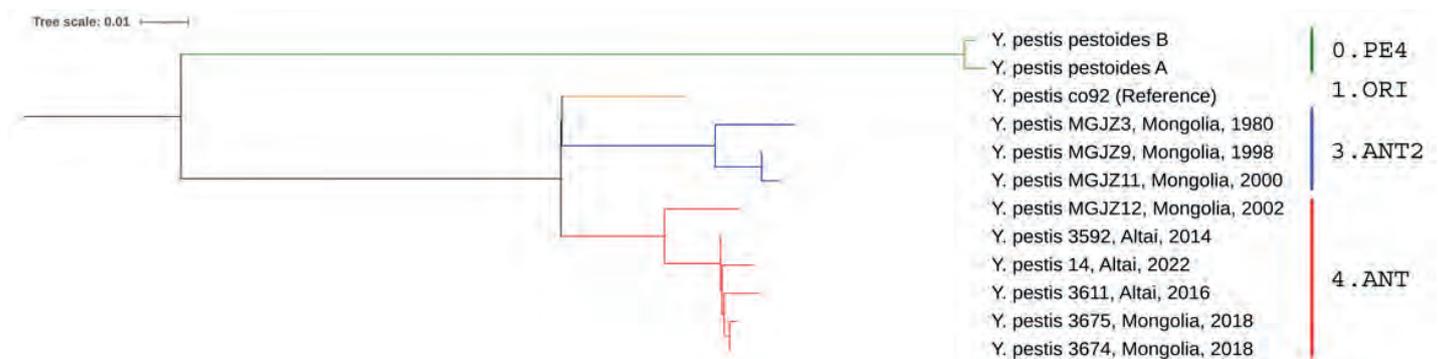


Рис. 2. Филогенетическое дерево выделенного штамма *Y. pestis* (2022 г.).
 Fig. 2. Phylogenetic tree of the isolated strain of *Y. pestis* (2022).

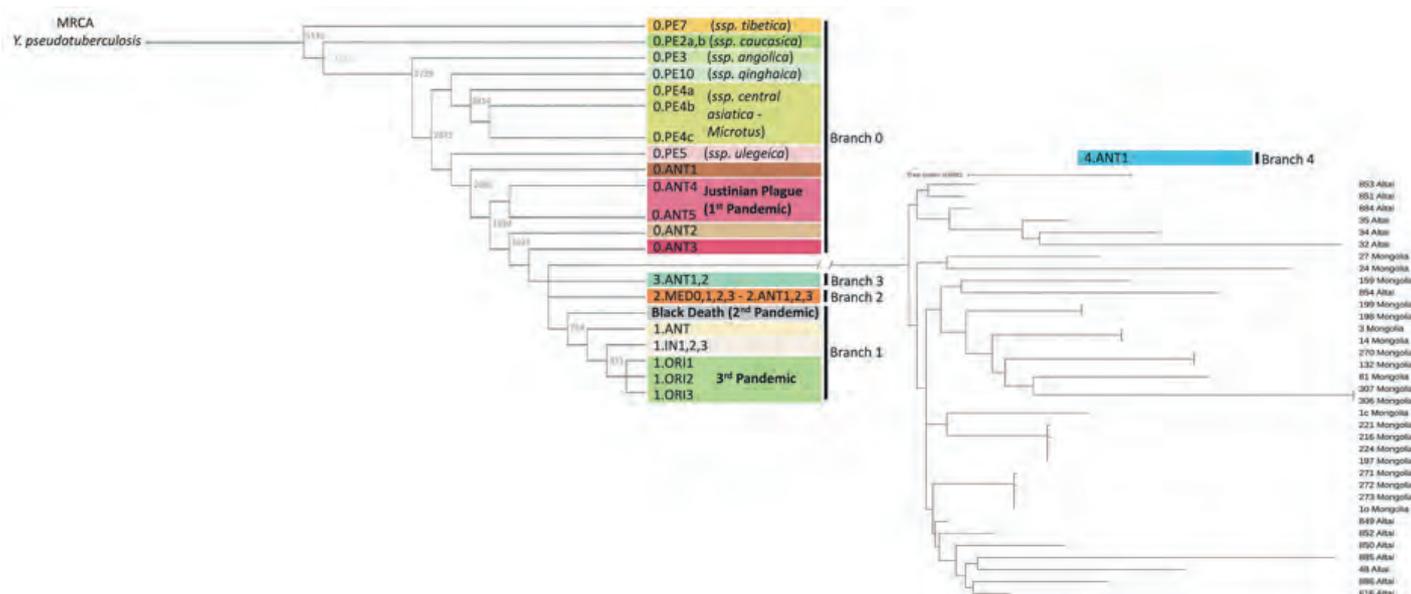


Рис. 3. Филогенетическое дерево выделенных в 2023 г. штаммов *Y. pestis*. Деревья дивергенции филогенетических групп [14] и выделенных штаммов имеют разный масштаб дистанций.

Fig. 3. Phylogenetic tree of *Y. pestis* strains isolated in 2023. The divergence tree of phylogenetic groups [14] and isolated strains have different distance scales.

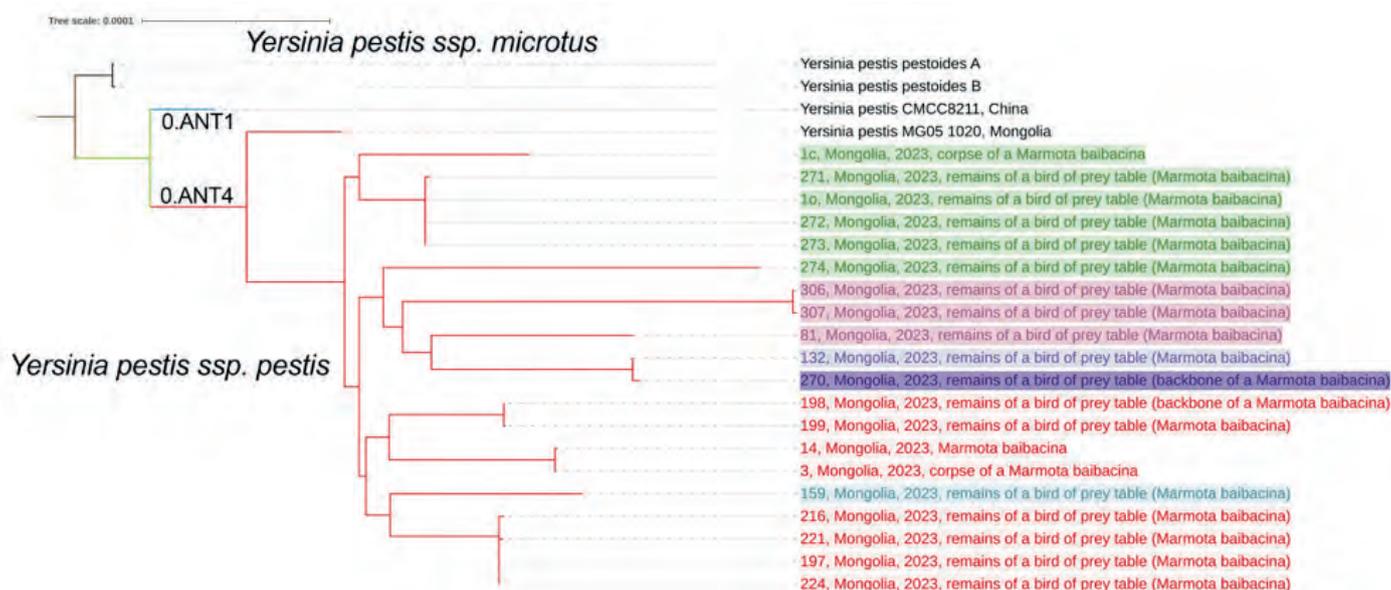


Рис. 4. Филогенетическое дерево выделенных на монгольской части Сайлюгемского природного очага чумы в 2023 г. штаммов *Y. pestis*. Цветами показаны аймаки, на территории которых был найден материал выделения культур.

Fig. 4. Phylogenetic tree of *Y. pestis* strains isolated in the Mongolian part of the Saylyugem natural plague focus in 2023. The aimags in which the culture material was found are shown in colors.

Культура *Y. pestis* была выделена из остатков стола хищной птицы. Возбудитель иерсиниоза был выделен из смывов с полок овощехранилища, из свеклы и полевки обыкновенной (*Microtus arvalis*), а также из клинического материала.

В 2023 г. было выделено 38 культур *Y. pestis* – 18 из них получены на российской территории Сайлюгемского природного очага чумы, из которых 4 были от длиннохвостых сусликов (*Urocyon undulatus*) и 14 – от сурков (*Marmota baibacina*), 20 образцов культур были получены на монгольской части Сайлюгемского очага исключительно от сурков, в основном из остатков стола хищных птиц.

Секвенирование проводилось на приборе MinION Mk 1B (Oxford Nanopore Technologies, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии).

Выявление отличий последовательностей ДНК, полученных в результате полногеномного секвенирования от корового генома для *Y. enterocolitica* и культур *Y. pestis*, выделенных в 2023 г., проходило в пакете прикладных команд Roary [5]. Для штамма *Y. pestis*, выделенного в 2022 г., были выявлены SNP относительно референсного генома с помощью пакета прикладных программ Snippy. Построение деревьев осуществлялось в программе Fasttree (ML). Данные о нуклеотидных последовательностях штаммов, использованных для

построения деревьев, кроме выделенных, были получены из GenBank NCBI.

Результаты исследования и их обсуждение

Культуры *Y. enterocolitica* были выделены в результате эпидемиологического расследования вспышки иерсиниоза в Шебалинском районе, и филогенетические связи выделенных штаммов должны были подтвердить или опровергнуть выводы, полученные в ходе расследования. Было проведено секвенирование полученных изолятов *Y. enterocolitica*. Построенное филогенетическое дерево *Y. enterocolitica* (рис. 1) показало, что все выделенные из разных источников культуры генетически единообразны (так как они объединены в одну ветвь), и, следовательно, мы можем утверждать, что источником заражения, очевидно, послужили продукты, размещенные в овощехранилище.

Филогенетическое дерево выделенного в 2022 г. штамма *Y. pestis* (рис. 2) позволило определить его как принадлежащий к филогруппе 4.ANT основного подвида, близкий к другим штаммам, выделенным на этой территории [6].

Все выделенные в 2023 г. штаммы принадлежали к филогруппе 4.ANT основного подвида [7–13]. Филогенетическое дерево позволило установить степень их родства (рис. 3) и показать, что на монгольской и российских частях очага могут циркулировать близкородственные штаммы (854) и, напротив, на одной территории могут циркулировать штаммы из разных ветвей (рис. 4).

Использование секвенирования в практике Алтайской противочумной станции позволило максимально точно типировать выделенные в 2022–2023 гг. в ходе работы штаммы особо опасных и природно-очаговых инфекций, что, в свою очередь, позволило как подтвердить результаты эпидемиологического расследования, однозначно определив источник заражения, так и получить дополнительную информацию о особенностях эпизоотического процесса путем выяснения родства циркулирующих на разных территориях штаммов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Бондарева ОС, Савченко СС, Ткаченко ГА, Абуева АИ, Муратова ЮО, Антонов ВА. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014;19(1):34–44.
2. Ерошенко ГА, Краснов ЯМ, Носов НЮ, Куклева ЛМ, Никифоров КА, Оглодин ЕГ, и др. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из

России и сопредельных государств. Проблемы особо опасных инфекций. 2015;4:58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64

3. Еременко ЕИ, Рязанова АГ, Писаренко СВ, Аксенова ЛЮ, Семенова ОВ, Котенева ЕА, и др. Сравнительный анализ методов генетического типирования *Bacillus anthracis*. Генетика. 2019;55(1):40–51. DOI: 10.1134/S0016675819010065
4. Pightling AW, Pettengill JB, Luo Y, Baugher JD, Rand H, Strain E. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. Front Microbiol. 2018 Jul 10;9:1482. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01482
5. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. Bioinformatics. 2015 Nov 15;31(22):3691–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421
6. Балахонов СВ, Ярыгина МБ, Гладких АС, Миронова ЛВ, Феранчук СИ, Бочалгин НО, и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2019;3:34–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42
7. Ерошенко ГА, Куклева ЛМ, Кутырев ВВ. Исторические и современные классификации возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;4:14–22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22
8. Kutyrev VV, Eroshenko GA, Motin VL, Nosov NY, Krasnov JM, Kukleva LM, et al. Phylogeny and Classification of *Yersinia pestis* Through the Lens of Strains From the Plague Foci of Commonwealth of Independent States. Front Microbiol. 2018 May 25;9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106
9. Кисличкина АА, Платонов МЕ, Вагайская АС, Богун АГ, Дентовская СВ, Анисимов АП. Рациональная таксономия *Yersinia pestis*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019;37(2):76–82. DOI: 10.17116/molgen20193702176
10. Suntsov VV. Molecular phylogenies of the plague microbe *Yersinia pestis*: an environmental assessment. AIMS Microbiol. 2023 Oct 16;9(4):712–723. DOI: 10.3934/microbiol.2023036
11. Платонов МЕ, Евсеева ВВ, Дентовская В, Анисимов АП. Молекулярное типирование *Yersinia pestis*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013;2:3–12.
12. Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 21;101(51):17837–42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101
13. Eaton K, Featherstone L, Duchene S, Carmichael AG, Varlik N, Golding GB, et al. Plagued by a cryptic clock: insight and issues from the global phylogeny of *Yersinia pestis*. Commun Biol. 2023 Jan 19;6(1):23. DOI: 10.1038/s42003-022-04394-6
14. Demeure CE, Dussurget O, Mas Fiol G, Le Guern AS, Savin C, Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. Microbes Infect. 2019;21(5-6):202–12. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.06.007

References

1. Bondareva OS, Savchenko SS, Tkachenko GA, Abueva AI, Muratova YuO, Antonov VA. Modern approaches to genotyping of causative agents of particularly dangerous infections. Epidemiology and Infectious Diseases. 2014;19(1):34–44. (In Russian).
2. Eroshenko GA, Krasnov YaM, Nosov NYu, Kukleva LM, Nikiforov KA, Oglodin EG, et al. Updating of intra-specific *Yersinia pestis* classification, based on the results of whole-genome sequencing of the strains from the Russian Federation and the neighboring states. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2015;4:58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64 (In Russian).
3. Eremenko EI, Ryazanova AG, Pisarenko SV, Aksanova LY, Semenova OV, Koteneva EA, et al. Comparative analysis of genotyping methods for *Bacillus*

- anthracis*. Russian Journal of Genetics. 2019;55(1): 40-51. DOI: 10.1134/S0016675819010065 (In Russian).
4. Pightling AW, Pettengill JB, Luo Y, Baugher JD, Rand H, Strain E. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. *Front Microbiol*. 2018 Jul 10;9:1482. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01482
 5. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015 Nov 15;31(22):3691-3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421
 6. Balakhonov SV, Yarygina MB, Gladkikh AS, Mironova LV, Feranchuk SI, Bochalgin NO, et al. Molecular-Genetic Characteristics of *Yersinia pestis* Strains Isolated in the Mongolian Territory of Transboundary Sailyugem Natural Plague Focus. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;3:34-42. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42 (In Russian).
 7. Eroshenko GA, Kukleva LM, Kutyrev VV. Historical and Modern Classifications of the Plague Agent. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2022;4:14-22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-14-22 (In Russian).
 8. Kutyrev VV, Eroshenko GA, Motin VL, Nosov NY, Krasnov JM, Kukleva LM, et al. Phylogeny and Classification of *Yersinia pestis* Through the Lens of Strains From the Plague Foci of Commonwealth of Independent States. *Front Microbiol*. 2018 May 25;9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106
 9. Kislichkina AA, Platonov ME, Vagaiskaya AS, Bogun AG, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Rational taxonomy of *Yersinia pestis*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2019;37(2):76-82. DOI: 10.17116/molgen20193702176 (In Russian).
 10. Suntsov VV. Molecular phylogenies of the plague microbe *Yersinia pestis*: an environmental assessment. *AIMS Microbiol*. 2023 Oct 16;9(4):712-723. DOI: 10.3934/microbiol.2023036
 11. Platonov ME, Evseeva VV, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Molecular typing of *Yersinia pestis*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2013;2:3-12. (In Russian).
 12. Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 21;101(51):17837-42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101
 13. Eaton K, Featherstone L, Duchene S, Carmichael AG, Varlik N, Golding GB, et al. Plagued by a cryptic clock: insight and issues from the global phylogeny of *Yersinia pestis*. *Commun Biol*. 2023 Jan 19;6(1):23. DOI: 10.1038/s42003-022-04394-6
 14. Demeure CE, Dussurget O, Mas Fiol G, Le Guern AS, Savin C, Pizarro-Cerdá J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Microbes Infect*. 2019;21(5-6):202-12. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.06.007

Информация о соавторах:

Бжитских Екатерина Евгеньевна, врач-бактериолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Такысова Солоны Борисовна, биолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Югушев Арчин Юрьевич, врач-бактериолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Базарова Галина Хамроевна, кандидат медицинских наук, заведующая бактериологической лабораторией, врач-бактериолог высшей квалификационной категории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Рождественский Евгений Николаевич, директор ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Санаров Павел Петрович, зоолог зоологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Полковников Евгений Сергеевич, зоолог зоологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Денисов Алексей Васильевич, кандидат биологических наук, заведующий зоологической лабораторией ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Киреев Александр Александрович, медицинский лабораторный техник 1-й категории бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Красавина Наталья Юрьевна, лаборант бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Григорьева Ирина Леонидовна, старший медицинский лабораторный техник 2-й категории бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Сапкаускас Никита Викторович, медицинский лабораторный техник бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Филатов Егор Иванович, зоолог зоологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Ekaterina E. Bzhitskikh, bacteriologist of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Solony B. Takysova, biologist of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Archin Yu. Yugushev, bacteriologist of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Galina Kh. Bazarova, MD, PhD, head of the bacteriological laboratory, bacteriologist of the highest qualification category, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Evgeny N. Rozhdestvensky, Director of the Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Pavel P. Sanarov, zoologist of the zoological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Evgeny S. Polkovnikov, zoologist of the zoological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Aleksey V. Denisov, candidate of biological sciences, head of the zoological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Aleksandr A. Kireev, medical laboratory technician of the 1st category of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Natalya Yu. Krasavina, laboratory assistant of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Irina L. Grigorieva, senior medical laboratory technician of the 2nd category of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Nikita V. Sapkauskas, medical laboratory technician of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Egor I. Filatov, zoologist of the zoological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор