DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-75-81

Бактериология, 2024, том 9, №4, с. 75–81
Bacteriology, 2024, volume 9, No 4, p. 75–81

INDEL-типирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

А.А.Ковалевич, А.С.Водопьянов, С.О.Водопьянов, С.Ю.Темякова

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В последние годы широкое практическое применение для внутривидовой характеристики микроорганизмов получили методы молекулярно-генетического анализа, обладающие большей дифференцирующей способностью по сравнению с фенотипическими методами типирования. Целью исследования являлся поиск INDEL-локусов и типирование с их помощью штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Нами были идентифицированы 10 INDEL-локусов, позволяющих проводить внутривидовое типирование *P. aeruginosa*. Генотипирование 268 штаммов, включенных в анализ, по 10 INDEL-локусам позволило выявить 54 уникальных генотипа. По итогам кластерного анализа все генотипы были сгруппированы в 5 кластеров. При этом гомология штаммов по сиквенс-типу или серотипу не влияла на дифференциацию штаммов по генотипам. Установлено, что разработанная схема может как выступать самостоятельным методом типирования, так и дополнять другие методы, такие как серотипирование и MLST-анализ. В последнем случае INDEL-типирование повышает дискриминирующую силу проводимого анализа. INDEL-типирование *P. aeruginosa* является полезным инструментом для изучения молекулярной эпидемиологии и генетики синегнойной инфекции, позволяющим выявлять особенности распространения возбудителя. Показано, что разработанная методика предоставляет возможность проводить внутривидовое генотипирование штаммов *P. aeruginosa* и дифференцировать различные клоны возбудителя, что может быть полезным для эпидемиологического расследования внутрибольничных очагов. Установлена циркуляция различных INDEL-генотипов штаммов *P. aeruginosa* на территории Российской Федерации.
Ключевые слова: INDEL, Pseudomonas aeruginosa, генотипирование, синегнойная палочка, INDEL-типирование

Для цитирования: Ковалевич А.А., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Темякова С.Ю. INDEL-типирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2024; 9(4): 75–81. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-75-81

INDEL-typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains

A.A.Kovalevich, A.S.Vodopyanov, S.O.Vodopyanov, S.U.Temyakova

Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Researsh Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

In recent years, methods of molecular genetic analysis, which have a greater differentiating ability compared with phenotypic typing methods, have been widely used for intraspecific characterization of microorganisms. The aim of the study was to search for INDEL loci and type *Pseudomonas aeruginosa* strains using them. We have identified 10 INDEL loci that allow intraspecific typing of *P. aeruginosa*. Genotyping of 268 strains included in the analysis for 10 INDEL loci revealed 54 unique genotypes. According to the results of the cluster analysis, all genotypes were grouped into 5 clusters. At the same time, the homology of strains by sequence type or serotype did not affect the differentiation of strains into different genotypes. It is established that the developed scheme can act as an independent typing method, and complement other methods such as serotyping and MLST analysis. In the latter case, INDEL typing increases the discriminating power of the analysis performed. INDEL-typing *P. aeruginosa* is a useful tool for studying the molecular epidemiology and genetics of pseudomonas aeruginosa infection, which allows us to identify the features of the spread of the pathogen. It is shown that the developed technique provides an opportunity to carry out intraspecific genotyping of *P. aeruginosa* strains and differentiate different clones of the pathogen, which may be useful for the epidemiological investigation of nosocomial foci. The circulation of various INDEL genotypes of *P. aeruginosa* strains in the territory of the Russian Federation has been established.
Key words: INDEL, Pseudomonas aeruginosa, genotyping, INDEL typing

For citation: Kovalevich A.A., Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Temyakova S.U. INDEL-typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains. Bacteriology. 2024; 9(4): 75–81. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-75-81

Для корреспонденции:

Ковалевич Алексей Александрович, младший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117
Телефон: (863) 240-91-33
E-mail: kovalevich_aa@antiplague.ru

Статья поступила 22.05.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Alexey A. Kovalevich, Junior Researcher, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Researsh Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9133
E-mail: kovalevich_aa@antiplague.ru

The article was received 22.05.2024, accepted for publication 25.12.2024

В последние годы широкое практическое применение для внутривидовой характеристики микроорганизмов получили методы молекулярно-генетического анализа (MLST-, SNP-, VNTR-типирование), обладающие большей дифференцирующей способностью по сравнению с фенотипическими методами типирования.

Важно отметить, что такие методы типирования должны обладать способностью отличать индивидуальные клоны возбудителя. В то же время методы должны быть недорогими, быстрыми, с высокой воспроизводимостью, простыми в применении и интерпретации [1].

На фоне новой коронавирусной инфекции, характеризующейся острым респираторным синдромом, одной из проблем стали бактериальные ко-инфекции, в т.ч. вызванные *Pseudomonas aeruginosa* [2, 3], который является условно-патогенным микроорганизмом, вызывающим внутрибольничные инфекции (пневмония, инфекции мочевыводящих путей, инфекции ожоговых ран), особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, *P. aeruginosa* является одной из значимых причин инвалидности и летального исхода пациентов с муковисцидозом [4].

Очевидно, что оперативное расследование вспышек заболеваний невозможно без методов, позволяющих дифференцировать различные клоны возбудителя. Важно отметить, что весьма значимым фактором в условиях санкций против Российской Федерации является зависимость различных методик от импортного оборудования и расходных материалов, что может стать существенной проблемой при применении методов, основанных на секвенировании.

Одним из удобных методов молекулярно-генетического типирования является VNTR-анализ, основанный на определении кратности вариабельных тандемных повторов. Однако его нельзя проводить *in silico* в том случае, если геномы получены по технологии «коротких ридов», что существенно ограничивает возможности по сопоставлению данных, полученных разными группами исследователей.

Мультилокусное сиквенс-типирование (Multilocus sequence typing/MLST) основано на определении нуклеотидных последовательностей участков нескольких генов «домашнего хозяйства» (т.е. генов, кодирующих белки, необходимые для выполнения базовых метаболических функций клетки), локализованных на бактериальной хромосоме (чтобы избежать влияния плазмидного профиля на результаты генотипирования) [5]. Основной принцип заключается в анализе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в 7 хромосомных локусах (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* и *trpE*), используемых в существующей схеме мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) *P. aeruginosa* для определения уникальных комбинаций полиморфизмов. Метод обеспечивает возможность высокопроизводительного типирования изолятов и определения их принадлежности к известным сиквенс-типам (ST) и клональным комплексам (CC), включая так называемые «международные клоны высокого риска» [6].

Это делает актуальным разработку методик, не зависящих от зарубежных поставок и баз данных. В этом плане весьма удобным представляется метод молекулярного INDEL-типирования, основанный на выявлении коротких вставок/делеций (insertion/deletion) нескольких нуклеотидов. Представленная методика широко используется для генотипирования различных микро- и макроорганизмов [7–10]. Однако сведений об использовании приема INDEL-типирования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на модели синегнойной палочки мы не встретили.

Существующие работы по использованию INDEL-маркеров посвящены исследованию парных изолятов от нескольких пациентов и используют не ПЦР, а данные полногеномного секвенирования [11].

В связи с этим **цель** работы состояла в поиске INDEL-маркеров, позволяющих проводить генотипирование как *in silico* (на основе данных секвенирования), так и *in vitro* (с использованием ПЦР), и анализе с их помощью коллекции штаммов *P. aeruginosa*, изолированных из биологического материала и объектов окружающей среды в различных субъектах Российской Федерации.

Материалы и методы

В работе использовали 22 штамма *P. aeruginosa*, полученных из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Штаммы выделены в Ростове-на-Дону, Хабаровске, Мариуполе в период с 2022 по 2023 г. Полногеномное секвенирование проведено в ходе реализации федерального проекта социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 г. «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Для сравнительного анализа использовали 246 полных геномов штаммов, изолированных на территории Российской Федерации в период с 2006 по 2020 г., полученных из международной базы NCBI.

Конструирование праймеров осуществляли с помощью программы Primer3.

Постановку ПЦР проводили с использованием реакционной смеси объемом 10 мкл из расчета: 1,5 мМ MgCl, 0,2 мМ смеси дНТФ, 1,0 мкМ смеси праймеров (по 0,5 мкМ каждого праймера) 25 нг ДНК матрицы, 1 ед. ДНК-полимеразы, оставшийся объем – деионизованная вода, свободная от нуклеаз. В качестве матрицы использовали геномную ДНК (концентрация 3 нг/мкл), полученную из штаммов *P. aeruginosa*. Учет результатов амплификации проводили с помощью электрофореза в 8%-м полиакриламидном геле с использованием маркера молекулярных масс ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере CFX96 (Bio-Rad). Термальный режим начальной денатурации при 94°C в течение 3 мин, затем 39 циклов при соблюдении температурно-временного режима: денатурация при 94°C – 10 с, отжиг праймеров при 63°C в течение 10 с, элонгация при 72°C – 15 с.

Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием авторской программы по методу UPGMA. Для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 [12].

Анализ данных полногеномного секвенирования проводили с помощью пакета программ BLAST и авторской программы (http://antiplague.ru/pseudomonas-analyser) [13]. Идентификация серогруппы была проведена с помощью

программы Pseudomonas Analyser. Анализ ST-типов проводили с использованием авторской программы MLST typer (http://antiplague.ru/mlst-typer) [14].

Результаты исследования и их обсуждение

Первый этап работы состоял в поиске INDEL-маркеров, позволяющих проводить внутривидовое генотипирование штаммов *P. aeruginosa*. С этой целью нами были отобраны 20 случайных геномов и проведен анализ по каждому гену, представленному в референс-геноме PAO1 (NCBI Accession Number GCF_000006765). Это позволило выявить гены, отличающиеся у разных штаммов за счет делеций и вставок. По итогам выравнивания данных генов были разработаны праймеры, фланкирующие выявленные вставки/делеции (таблица), что дало возможность дифференцировать штаммы по размеру получаемого ампликона.

Разработанные праймеры были апробированы *in vitro* на штаммах из коллекции ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (рис. 1). Для анализа INDEL-маркеров в геномах *P. aeruginosa in silico* нуклеотидные последовательности сконструированных нами праймеров были внесены в ранее разработанную программу Pseudomonas Analyser. Данные проведенного анализа с помощью программы (*in silico*) и ПЦР-методом (*in vitro*) полностью совпали. Это дает возможность проводить анализ не только *in silico*, используя разработанную программу, но и осуществлять исследования без использования полногеномного секвенирования.

Изученные нами штаммы образовали 54 INDEL-генотипа, которые были сгруппированы в 5 кластеров (A, B, C, D, E). Наиболее представительный кластер A, в свою очередь, был разделен на 3 субкластера (Aa, Ab и Ac) (рис. 2).

Для проведения сравнительного анализа были определены серотипы и MLST (ST) типы изучаемых штаммов на основе их геномов с помощью программ Pseudomonas Analyser и MLST typer.

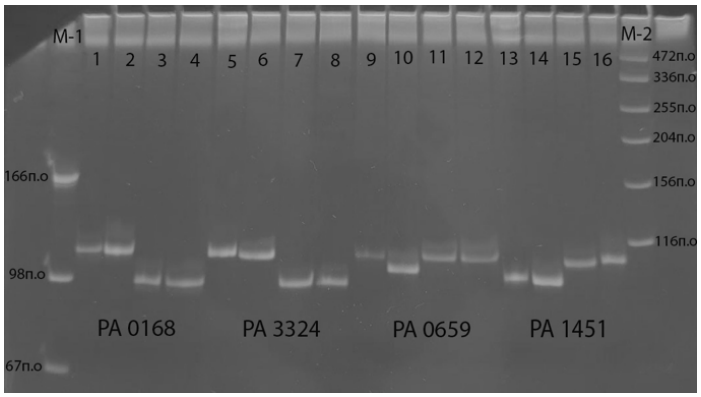


Рис. 1. **Электрофореграмма с примером тестирования продуктов амплификации INDEL-генов: PA0168, PA3324, PA0659, PA1451. M-1 и M-2 – маркеры с обозначениями их молекулярно-массового размера. Нумерация от 1 до 16 соответствует номерам штаммов: 1, 5, 9, 13 – 2308 (Мариуполь), 2, 6, 10, 14 – 2350 (Мариуполь), 3, 7, 11, 15 – 21-122 (Хабаровск), 4, 8, 12, 16 – 21-52 (Хабаровск).**
Fig. 1. ***Electropherogram with an example of testing the amplification products of INDEL genes: PA0168, PA3324, PA0659, PA1451. M-1 and M-2 are markers with designations of their molecular weight size. In Figure 1, the numbering from 1-16 corresponds to the strain numbers: 1, 5, 9, 13 – 2308 (Mariupol), 2, 6, 10, 14 – 2350 (Mariupol), 3, 7, 11, 15 – 21-122 (Khabarovsk), 4, 8, 12, 16 – 21-52 (Khabarovsk).***

Таблица. **INDEL-локусы, специфические праймеры и размер INDEL-аллелей *Pseudomonas aeruginosa***
Table. ***INDEL loci, specific primers and size of INDEL alleles of Pseudomonas aeruginosa***

№	Обозначение / *Designation*	Структура праймеров 3'-5' / *Structure of primers 3'-5'*	Размер ампликона, п.о. / *Amplicon size, bp*
1	PA0168	AGGACATGGACTGCGTGG CCTGCTGCAGGCACTTGG	100/114/0
2	PA3324	GAGTCCCGGATGTGGTAGTC GATCACGCTCCACAGGTTGA	113/99/
3	PA0659	GCGGCATCATCATCGAGAAG CTGGGCGGTGTGTAGGGA	106/112
4	PA1451	CAATTTCAGCGCCGGCGG CGAAGACGAACTGGACGAAC	100/109
5	PA4603	GACAGGAACGCATTGATCGG TCCGGCTGCGTGAGGATC	91/104/0
6	PA0240	CTCTGCGCTTCCCTCTGC GCGGTGCAGGTGGAAATTG	108/123
7	PA2249	GTGGGCGGCGAACTGATC GGCTCCCTTCGGTTTCTCC	102/117/0
8	PA0911	TCATGTTGATCAGTCGTCGC GACGATGGTGATGAGCTGGT	110/143/0
9	PA1351	GGTCGAACTCAACCGCGC CCAGGTGGTAATCGGCCA	110/148/0
10	morA	CTCTACGAGACAGGCATCCC GCGACGTCACTCATCAGGAT	74/80

Субкластер Aa представлен 6 генотипами, в которые входят штаммы с разных территорий Российской Федерации (Москва, Самара, Мариуполь, Хабаровск), выделенные с 2014 по 2023 г. Интересно отметить, что генотипы Aa5 и Aa6 включали в себя штаммы сиквенс-типа ST 395, выделенные в одно и то же время – в январе 2020 г., которые, в свою очередь, являются эпидемическими клонами «высокого риска», одинаковыми по серо- и ST-типу, но разными по INDEL-локусам [15].

Субкластеры Ab и Ac являются самыми крупными по числу включаемых генотипов. Субкластер Ab включает 10 генотипов, часть из которых представлена единичными уникальными штаммами: Ab1, Ab5, Ab9 (рис. 2). Штаммы, представленные этими генотипами, были выделены в Ростове-на-Дону в 2022 г., Мариуполе – в 2023 г., Владивостоке – в 2015 г. Интересно отметить и то, что штамм *P. aeruginosa* PAEM, выделенный во Владивостоке в 2015 г. из продуктов питания (мясо), имел уникальный INDEL-генотип (Ab9) и сиквенс-тип (2502), но при этом входил в общий субкластер со штаммами, выделенными от человека, что свидетельствует о широком распространении данной генетической линии.

Штаммы, имеющие генотип Ab4, выделялись в пределах довольно широкого промежутка времени (с 2016 по 2023 г.) и были представлены различными ST- и серотипами. Также стоит отметить и то, что среди этих штаммов были те, которые относились к сиквенс-типу ST 111 и считаются приуроченными к эпидемическим клонам «высокого риска» [16].

В противовес этому штаммы с генотипом Ab10 демонстрируют свою гомологию как по ST-типу (ST 155), так и по

INDEL-профилю, поскольку все представленные штаммы этого генотипа были получены от одного референтного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, что демонстрируют данные базы NCBI.

Субкластер Ac представлен в основном штаммами, выделенными в Москве в период с 2014 по 2020 г. Некоторые генотипы, такие как Ac6, Ac7, Ac13, включали штаммы из Ростова-на-Дону и Самары. Примечательно и то, что генотипы Ac2, Ac3, Ac5 включали штаммы с сиквенс-типом ST2592, который является эпидемически значимым [17]. В кластере Ac фигурировали уникальные единичные генотипы Ac8, Ac9, Ac10, Ac11, Ac12, которые были представлены штаммами, выделенными в Москве в 2017–2020 гг.

Интересно отметить, что в составе генотипов Ac9 и Ac11 штаммы имеют общий сиквенс-тип (ST233) и серотип (O6), но при этом данные штаммы не были объединены в единый генотип, имея гомологию по серо- и сиквенс-типу. Эти результаты свидетельствуют, что систему типирования по INDEL-локусам можно использовать как инструмент для определения генетического родства штаммов при отсутствии возможности проводить MLST- и серотипирование.

Небольшой кластер B образован штаммами, каждый из которых образует свой уникальный генотип (B1, B2, B3, B4): 2 штамма из Москвы (B1, B2), 1 из Самары (B3) и 1 из Московской области (B4). Интерес представляет штамм генотипа B1, выделенный в 2012 г. в Московской области. Данный штамм исследовался в работе R.Recio et al. (2020), имеет сиквенс-тип ST235, демонстрирующий высокий уровень лекарственной устойчивости и эпидемического распространения [18]. Остальные штаммы сиквенс-типа ST235, выделенные в Москве, распределились между генотипами C1-C6.

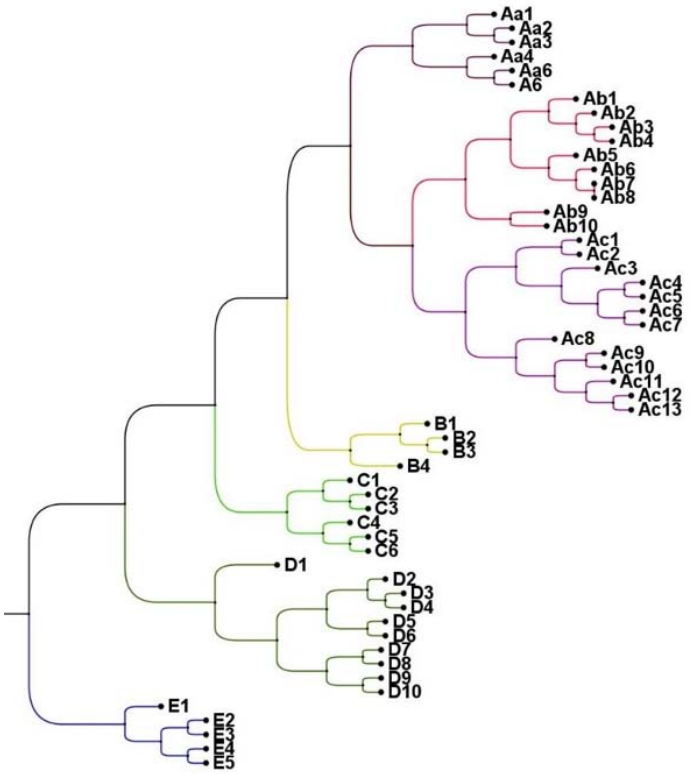


Рис. 2. **Дендрограмма, отражающая филогенетические связи между различными INDEL-генотипами *P. aeruginosa*.**
Fig. 2. ***Dendrogram showing phylogenetic relationships between different INDEL genotypes of P. aeruginosa.***

Кластер C представлен преимущественно штаммами из Москвы, Самары и Нижнего Новгорода, выделенными с 2012 по 2020 г. и имеющими в основном сиквенс-тип ST235. Однако штаммы распределены по различным генотипам – от C1 до C6. Штаммы, выделенные в Москве (2012–2013 гг.), имеют генотипы C2 и C3, при общем сиквенс- и серотипе со штаммом из генотипа B1, но при этом штаммы генотипа B1 не вошли в кластеры C2 и C3. Данный факт показывает, что выбранный нами метод позволяет идентифицировать генетическую вариабельность микроорганизма внутри одного сиквенс- и серотипа.

Стоит отметить и несколько генотипов кластера D. Так, например, генотипы D1 и D2 включают штаммы синегнойной палочки, выделенные в Мариуполе в 2023 г., но при этом имеют общий серотип O1 со штаммом генотипа D3, выделенным в Самаре в 2020 г. Необходимо отметить, что генотип D9 также включает штамм, полученный в Мариуполе в 2023 г., и имеет общий сиквенс-тип со штаммом ST845, выделенным в Москве в 2020 г., однако другие штаммы данного генотипа отличаются как по сиквенс-типу, так и по месту и времени их выделения (Самара – 2020 г., Москва – 2017 и 2020 гг.). Аналогичную ситуацию можно отметить со штаммами генотипа D10: в него входит штамм, также выделенный в Мариуполе в 2023 г., который имеет сиквенс-тип ST685, как и штамм, изолированный в Самаре в 2020 г. Вместе с тем другой штамм, входящий в генотип D10, также выделенный в 2020 г. в Самаре, характеризуется другим сиквенс-типом (ST3768). При этом все эти штаммы имеют идентичные полиморфные варианты INDEL-локусов, что демонстрирует их генетическое родство.

Кластер E был в основном представлен штаммами с сиквенс-типом ST654. Отметим также, что большое количество штаммов в этом кластере было выделено в Москве в 2017–2020 гг. Интересно и то, что данные штаммы были серотипированы M.Tyumentseva et al. (2021) и принадлежали к серотипу O4, но встречались представители серогруппы O11 [19]. Также было установлено, что другие штаммы, выделенные в Нижнем Новгороде в 2018 г. и в Хабаровске в 2022 г., были типированы и отнесены к серогруппе O4 с помощью программы Pseudomonas Analyser. Генотипы E1, E2, E3, E4 включали штаммы микроорганизмов, выделенные исключительно в Москве. Вместе с тем генотипы E4 и E5 содержали штамм, принадлежавший к серогруппе O11, кроме того, E5 генотип включал штаммы, выделенные в Нижнем Новгороде в 2018 г. и в Хабаровске в 2022 г. (рис. 2). Таким образом, с помощью системы INDEL-типирования удалось разделить на генотипы не только штаммы, принадлежащие к одному клональному комплексу, но и схожие серогруппы, что, в свою очередь, помогает совершенствовать системы поиска клонов среди клинических штаммов.

Таким образом, регистрируемые случаи заболеваний в лечебных учреждениях могут быть обусловлены как одним клоном, так и разными, но при этом не имеющими территориальных ассоциаций, что коррелирует с данными других авторов [20–23]. Поэтому для выяснения источника и путей распространения штамма из одного отделения в другое, от медицинского персонала или от ранее инфицированного

пациента необходимы методы идентификации возбудителя, которые могут выявлять его клональные связи.

В рамках настоящего исследования разработана система INDEL-типирования, включающая сконструированные праймеры к 10 INDEL-локусам, с помощью которых можно провести внутривидовую дифференциацию штаммов как *in vitro* (в ПЦР), так и *in silico* (на основе данных полногеномного секвенирования).

Данный метод хорошо сочетается с MLST- или серотипированием для комплексной оценки генетического профиля возбудителя инфекции, однако при отсутствии методик секвенирования оценивается как независимый метод генотипирования.

Использование данного варианта INDEL-типирования не требует внедрения особых лабораторных приемов при анализе большого количества данных с большой дискриминирующей способностью. Этот вопрос остается актуальным как раньше (2015 г.), так и сейчас, в связи с продлением экономических санкций в отношении Российской Федерации со стороны США, стран Евросоюза и ряда других стран. Импортозамещение становится одной из стратегических задач, поскольку в условиях, когда доступ к зарубежным технологиям, а также иностранным банкам данных затруднен, России необходимо замещать зарубежные технологии отечественными разработками [24].

Заключение

На основе сравнительного анализа геномов возбудителя синегнойной инфекции разработан новый метод внутривидовой дифференциации с помощью INDEL-маркеров. Показано, что INDEL-типирование *P. aeruginosa* является полезным инструментом, позволяющим выявлять особенности распределения отдельных генотипов изучаемого микроорганизма.

Разработанная схема INDEL-типирования может как выступать самостоятельным методом типирования, так и дополнять другие методы, такие как серотипирование и MLST-анализ. В последнем случае INDEL-типирование повышает дискриминирующую силу проводимого анализа.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о циркуляции различных INDEL-генотипов штаммов *P. aeruginosa* на территории Российской Федерации в течение длительного времени.

Источник финансирования

Полногеномное секвенирование проведено в рамках федеральной программы «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Funding source

Genome-wide sequencing was carried out within the framework of the federal program "Sanitary shield – health safety (prevention, detection, response)".

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Babenko D, Turmuhambetova A, Sandle T, Pestrea SA, Moraru D, Cheşcă A. In silico comparison of different types of MLVA with PFGE based on *Pseudomonas aeruginosa* genomes. Acta Medica. 2017;33:347.
2. Shiralizadeh S, Keramat F, Hashemi SH, Majzoobi MM, Azimzadeh M, Alikhani MS, et al. Investigation of antimicrobial resistance patterns and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates among Coronavirus disease-19 patients. BMC Microbiol. 2023 Mar 29;23(1):84. DOI: 10.1186/s12866-023-02825-w
3. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. J Infect. 2020 Aug;81(2):266-275. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.046
4. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* – pathogenesis and pathogenic mechanisms. International Journal of Biology. 2015;7(2):44.
5. Гончарова ЮО, Бахтеева ИВ, Миронова РИ, Богун АГ, Хлопова КВ, Тимофеев ВС. Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов сибиреязвенного микроба, выделенных на территории России и сопредельных государств. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;1:95-102. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-95-102
6. Эйдельштейн МВ, Шек ЕА, Сухорукова МВ, Склеенова ЕЮ, Иванчик НВ, Шайдуллина ЭР, и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон 2015–2016». Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019;21(2):160-170. DOI: 10.36488/cmac.2019.2.160-170
7. Водопьянов АС, Водопьянов СО, Олейников ИП, Мишанькин БН. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017;22(4):195-200. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200
8. Sorokin VM, Vodopyanov AS, Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Differentiation of the *Francsella tularensis* subspecies by the INDEL typing method. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2022;99(2):193-202.
9. Kizil S, Basak M, Guden B, Tosun HS, Uzun B, Yol E. Genome-Wide Discovery of InDel Markers in Sesame (*Sesamum indicum* L.) Using ddRADSeq. Plants (Basel). 2020 Sep 24;9(10):1262. DOI: 10.3390/plants9101262
10. Jin R, Cui W, Fang Y, Jin X, Wang H, Lan Q, et al. A Novel Panel of 43 Insertion/Deletion Loci for Human Identifications of Forensic Degraded DNA Samples: Development and Validation. Front Genet. 2021 Mar 11;12:610540. DOI: 10.3389/fgene.2021.610540
11. Chung JC, Becq J, Fraser L, Schulz-Trieglaff O, Bond NJ, Foweraker J, et al. Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically infected cystic fibrosis patients. J Bacteriol. 2012 Sep;194(18):4857-66. DOI: 10.1128/JB.01050-12
12. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 Oct;28(10):2731-9. DOI: 10.1093/molbev/msr121
13. Ковалевич АА, Водопьянов АС, Писанов РВ. Программа для ЭВМ «Pseudomonas Analyser – программа для анализа данных полногеномного секвенирования возбудителя синегнойной инфекции». Свидетельство о государственной регистрации №2023667063 от 09.08.2023.
14. ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора: [сайт]. 26.06.2023. Режим доступа: http://antiplague.ru/mlst-typer (дата обращения: 21.11.2023). Текст: электронный.
15. Virieux-Petit M, Hammer-Dedet F, Aujoulat F, Jumas-Bilak E, Romano-Bertrand S. From Copper Tolerance to Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* towards Patho-Adaptation and Hospital Success. Genes (Basel). 2022 Feb 4;13(2):301. DOI: 10.3390/genes13020301
16. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin Microbiol Infect. 2018 Mar;24(3):258-266. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.06.018

17. Савинова ТА, Лазарева АВ, Шамина ОВ, Крыжановская ОА, Чеботарь ИВ, Маянский НА. Генотипы и носительство металло-бета-лактамаз среди карбапенеморезистентных *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у детей в г. Москве. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018;20(4):370-374.
18. Recio R, Sánchez-Diener I, Viedma E, Meléndez-Carmona MÁ, Villa J, Orellana MÁ, et al. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Apr;39(4):671-678. DOI: 10.1007/s10096-019-03780-z
19. Tyumentseva M, Mikhaylova Y, Prelovskaya A, Karbyshev K, Tyumentsev A, Petrova L, et al. CRISPR Element Patterns vs. Pathoadaptability of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Medical Center in Moscow, Russia. Antibiotics (Basel). 2021 Oct 26;10(11):1301. DOI: 10.3390/antibiotics10111301
20. Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, et al. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. BMC Infect Dis. 2011 Oct 13;11:272. DOI: 10.1186/1471-2334-11-272
21. Angeletti S, Cella E, Prosperi M, Spoto S, Fogolari M, De Florio L, et al. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains: Molecular epidemiology and evolution. Microb Pathog. 2018 Oct;123:233-241. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.07.020
22. Аветисян ЛР, Шагинян ИА, Чернуха МЮ, Бурмистров ЕМ, Медведева ОС, Русакова ЕВ, и др. Эпидемиологический надзор за хроническими инфекциями легких, вызванными бактериями *Burkholderia cepacia* complex, бактериями рода *Achromobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* и метициллинрезистентным *Staphylococcus aureus*, у больных муковисцидозом. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2020;19(1):14-23. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-14-23
23. Pulusu CP, Manivannan B, Raman SS, Singh S, Khamari B, Lama M, et al. Localized outbreaks of *Pseudomonas aeruginosa* belonging to international high-risk clones in a south Indian hospital. J Med Microbiol. 2022 Mar;71(3). DOI: 10.1099/jmm.0.001500
24. Дятлов ИА, Миронов АЮ, Шепелин АП, Алешкин ВА. Состояние и тенденция развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(80):61-5.

References

1. Babenko D, Turmuhambetova A, Sandle T, Pestrea SA, Moraru D, Cheşcă A. In silico comparison of different types of MLVA with PFGE based on *Pseudomonas aeruginosa* genomes. Acta Medica. 2017;33:347.
2. Shiralizadeh S, Keramat F, Hashemi SH, Majzoobi MM, Azimzadeh M, Alikhani MS, et al. Investigation of antimicrobial resistance patterns and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates among Coronavirus disease-19 patients. BMC Microbiol. 2023 Mar 29;23(1):84. DOI: 10.1186/s12866-023-02825-w
3. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. J Infect. 2020 Aug;81(2):266-275. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.046
4. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* – pathogenesis and pathogenic mechanisms. International Journal of Biology. 2015;7(2):44.
5. Goncharova YuO, Bakhteeva IV, Mironova RI, Bogun AG, Khlopova KV, Timofeev VS. Multilocus Sequence-Typing of Anthrax Microbe Strains Isolated in Russia and Neighboring Countries. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2021;1:95-102. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-95-102 (In Russian).
6. Edelstein MV, Shek EA, Sukhorukova MV, Skleenova EYu, Ivanchik NV, Shajdullina ER, et al. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "Marathon 2015–2016". Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2019;21(2):160-170. DOI: 10.36488/cmac.2019.2.160-170 (In Russian).
7. Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Oleinikov IP, Mishankin BN. INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. Epidemiology and Infectious Diseases. 2017;22(4):195-200. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200 (In Russian).
8. Sorokin VM, Vodopyanov AS, Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Differentiation of the *Francsella tularensis* subspecies by the INDEL typing method. Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. 2022;99(2):193-202.
9. Kizil S, Basak M, Guden B, Tosun HS, Uzun B, Yol E. Genome-Wide Discovery of InDel Markers in Sesame (*Sesamum indicum* L.) Using ddRADSeq. Plants (Basel). 2020 Sep 24;9(10):1262. DOI: 10.3390/plants9101262
10. Jin R, Cui W, Fang Y, Jin X, Wang H, Lan Q, et al. A Novel Panel of 43 Insertion/Deletion Loci for Human Identifications of Forensic Degraded DNA Samples: Development and Validation. Front Genet. 2021 Mar 11;12:610540. DOI: 10.3389/fgene.2021.610540
11. Chung JC, Becq J, Fraser L, Schulz-Trieglaff O, Bond NJ, Foweraker J, et al. Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically infected cystic fibrosis patients. J Bacteriol. 2012 Sep;194(18):4857-66. DOI: 10.1128/JB.01050-12
12. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 Oct;28(10):2731-9. DOI: 10.1093/molbev/msr121
13. Kovalevich AA, Vodopyanov AS, Pisanov RV. Computer program "Pseudomonas Analyser – a program for analyzing the data of whole – genome sequencing of the causative agent of pseudomonas infection". Certificate of state registration No 2023667063 dated 08/09/2023. (In Russian).
14. Rostov-on-Don Antiplague Scientific Researsh Institute Rospotrebnadzor: [website]. 26.06.2023. Available at: http://antiplague.ru/mlst-typer (accessed: 21.11.2023). Text: electronic. (In Russian).
15. Virieux-Petit M, Hammer-Dedet F, Aujoulat F, Jumas-Bilak E, Romano-Bertrand S. From Copper Tolerance to Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* towards Patho-Adaptation and Hospital Success. Genes (Basel). 2022 Feb 4;13(2):301. DOI: 10.3390/genes13020301
16. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin Microbiol Infect. 2018 Mar;24(3):258-266. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.06.018
17. Savinova TA, Lazareva AV, Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Chebotar IV, Mayanskiy NA. Genotypes and metallo-beta-lactamases carriage in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children in Moscow. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2018;20(4):370-374. (In Russian).
18. Recio R, Sánchez-Diener I, Viedma E, Meléndez-Carmona MÁ, Villa J, Orellana MÁ, et al. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Apr;39(4):671-678. DOI: 10.1007/s10096-019-03780-z
19. Tyumentseva M, Mikhaylova Y, Prelovskaya A, Karbyshev K, Tyumentsev A, Petrova L, et al. CRISPR Element Patterns vs. Pathoadaptability of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Medical Center in Moscow, Russia. Antibiotics (Basel). 2021 Oct 26;10(11):1301. DOI: 10.3390/antibiotics10111301
20. Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, et al. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. BMC Infect Dis. 2011 Oct 13;11:272. DOI: 10.1186/1471-2334-11-272
21. Angeletti S, Cella E, Prosperi M, Spoto S, Fogolari M, De Florio L, et al. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains: Molecular epidemiology and evolution. Microb Pathog. 2018 Oct;123:233-241. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.07.020
22. Avetisyan LR, Shaginyan IA, Chernukha MYu, Burmistrov EM, Medvedeva OS, Rusakova EV, et al. Directions of epidemiological surveillance of chronic lung

infections caused by *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2020;19(1):14-23. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-14-23 (In Russian).

23. Pulusu CP, Manivannan B, Raman SS, Singh S, Khamari B, Lama M, et al. Localized outbreaks of *Pseudomonas aeruginosa* belonging to international high-risk clones in a south Indian hospital. J Med Microbiol. 2022 Mar;71(3). DOI: 10.1099/jmm.0.001500
24. Dyatlov IA, Mironov AYu, Shepelin AP, Aleshkin VA. The condition and tendencies of development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and problem of import substitution. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2015;60(80):61-5. (In Russian).

Информация о соавторах:

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Темякова Светлана Юрьевна, младший научный сотрудник, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

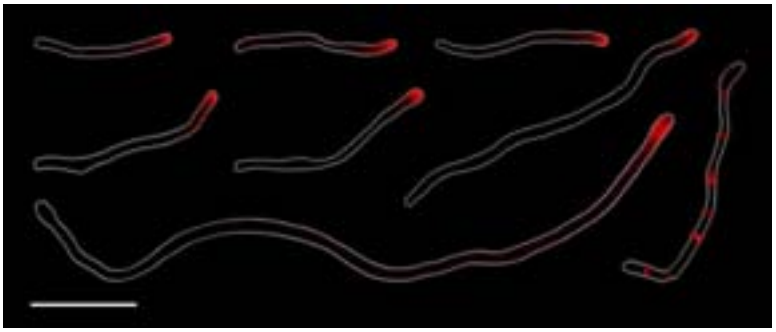
Information about co-authors:

Alexey S. Vodopyanov, MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Researsh Institute of Rospotrebnadzor

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, Chief Researcher department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Researsh Institute of Rospotrebnadzor

Svetlana U. Temyakova, Junior Researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Researsh Institute of Rospotrebnadzor

Бактерии ротовой полости человека размножаются посредством редкой формы деления клеток



Форма бактериальных клеток и способ, которым бактерии поддерживают свою форму посредством клеточного размножения, являются фундаментальными биологическими характеристиками, которые связывают форму, физиологию и окружающую среду в микробном мире. В то время как большинство бактерий делятся бинарным делением, обнаружен замечательный пример одновременного множественного деления у нитчатой бактерии, которая играет ключевую структурную роль в человеческом зубном налете. Это исследование расширяет понимание микробиома полости рта, где сотни видов бактерий конкурируют за пространство и питательные вещества, образуя биопленки, которые оказывают прямое влияние на здоровье человека. И эти выводы выходят за рамки микробиома полости рта, раскрывая уникальный цикл бактериальных клеток и пример того, как морфология клеток и репродуктивная стратегия могут влиять на пространственную организацию микробных сообществ.

Организмы демонстрируют огромное разнообразие форм, размеров и репродуктивных стратегий. В микроскопических масштабах морфология бактериальных клеток и динамика роста являются адаптивными чертами, которые влияют на пространственную организацию микробных сообществ. В одном из таких сообществ – биопленке зубного налета человека – сеть нитевидных клеток *Corynebacterium matruchotii* образует ядро бактериальных консорциумов, известных как ежи, но процессы, которые генерируют эти структуры, неясны. Используя покадровую микроскопию живых клеток и флуоресцентные D-аминокислоты для отслеживания биосинтеза пептидогликана, сообщается о необычном примере одновременного множественного деления в домене Бактерии. Показано, что клетки *C. matruchotii* удлиняются на одном полюсе за счет удлинения кончика, аналогично стратегии роста бактерий Streptomyces, обитающих в почве. Нити удлиняются быстро, со скоростью, более чем в пять раз превышающей скорость других близкородственных видов бактерий. После удлинения одновременно формируется множество перегородок, и каждая клетка делится на 3–14 дочерних клеток в зависимости от длины материнской нити. Затем дочерние клетки зарождают отростки новых более тонких вегетативных нитей, создавая классическую морфологию «ручки хлыста» этого таксона. Эти результаты расширяют известное разнообразие бактериальных клеточных циклов и помогают объяснить, как эта нитчатая бактерия может конкурировать за пространство, получать доступ к питательным веществам и формировать важные межвидовые взаимодействия в зубном налете.

Chimileski S, Borisy GG, Dewhirst FE, Mark Welch JL.
Tip extension and simultaneous multiple fission in a filamentous bacterium.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2024 Sep 10;121(37):e2408654121. DOI: 10.1073/pnas.2408654121