

Определение серотипа *Pseudomonas aeruginosa* на основе данных полногеномного секвенирования

А.А.Ковалевич, Р.В.Писанов, А.С.Водопьянов

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

Определение серотипа (типа О-антигена) – один из способов типирования патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Серотипирование клинических изолятов дает важную информацию при эпидемиологическом расследовании случаев заболевания, особенно при возникновении вспышек и(или) внутрибольничном инфицировании. Вместе с тем применение сывороток не позволяет проводить разделение некоторых серогрупп из-за иммунологического перекреста. Развитие полногеномного секвенирования открывает новые перспективы для установления серотипов, но уже с использованием молекулярно-генетических методов.

Целью исследования был анализ ЛПС-кластера у разных серотипов *P. aeruginosa* и разработка методики определения серотипа на основе данных полногеномного секвенирования.

В работе были использованы нуклеотидные последовательности эталонных О-антигенов *P. aeruginosa*, полученные из международной базы NCBI. По итогам анализа нуклеотидных последовательностей были найдены *wzx* гены для каждой серогруппы. Для валидации использовали 345 геномов из базы NCBI с подтвержденными данными о серогруппе агглютинирующими О-сыворотками. Найдены три новых *wzx* гена О-кластеров *P. aeruginosa*. По итогам проведенного исследования О-кластеров нами было выявлено 13 аллельных вариантов гена *wzx* среди известных 20 серотипов согласно международной системе антигенного типирования. Полученные данные позволили дополнить ранее созданную программу *Pseudomonas Analyser* возможностью проводить анализ серогруппы только по различию в нуклеотидном строении последовательностей гена *wzx* с использованием данных полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, серогруппа, серотипирование, полногеномное секвенирование, синегнойная палочка, *Pseudomonas Analyser*

Для цитирования: Ковалевич А.А., Писанов Р.В., Водопьянов А.С. Определение серотипа *Pseudomonas aeruginosa* на основе данных полногеномного секвенирования. Бактериология. 2025; 10(1): 17–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-17-25

Determination of *Pseudomonas aeruginosa* serotype based on whole-genome sequencing data

A.A.Kovalevich, R.V.Pisanov, A.S.Vodopyanov

Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

Determination of the serotype (type of O-antigen) is one of the ways of typing pathogenic and opportunistic microorganisms. Serotyping of clinical isolates provides important information in the epidemiological investigation of cases of the disease, especially in the event of outbreaks and/or nosocomial infection. At the same time, the use of sera does not allow for the separation of some serogroups due to the immunological overlap. The development of genome-wide sequencing opens up new prospects for establishing serotypes, but using molecular genetic methods.

The aim of the study was to analyze the LPS cluster in different serotypes of *P. aeruginosa* and develop a methodology for determining the serotype based on genome-wide sequencing data. The nucleotide sequences of reference O-antigens of *P. aeruginosa* obtained from the international NCBI database were used in the work. Based on the analysis of nucleotide sequences, *wzx* genes were found for each serogroup. 345 genomes from the NCBI database with confirmed data on serogroup agglutinating O-serum were used for validation. 3 new *wzx* genes of *P. aeruginosa* O clusters were found. Based on the results of the O-cluster study, we identified 13 allelic variants of the *wzx* gene among the known 20 serotypes according to the international antigenic typing system. The data obtained made it possible to supplement the previously created «*Pseudomonas Analyser*» program with the ability to analyze the serogroup only by differences in the nucleotide structure of the *wzx* gene sequences using whole-genome sequencing data.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, serogroup, serotyping, whole-genome sequencing, *Pseudomonas Analyser*

For citation: Kovalevich A.A., Pisanov R.V., Vodopyanov A.S. Determination of *Pseudomonas aeruginosa* serotype based on whole-genome sequencing data. Bacteriology. 2025; 10(1): 17–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-17-25

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) 240-9133
E-mail: kovalevich_aa@antiplague.ru
ORCID: 0000-0001-6926-0239

Статья поступила 19.07.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

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

Address: 117, M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone (863) 240-9133
E-mail: kovalevich_aa@antiplague.ru
ORCID: 0000-0001-6926-0239

The article was received 19.07.2024, accepted for publication 31.03.2025

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – грамотрицательный аэробный условно-патогенный микроорганизм, с которым ассоциировано почти 10% случаев всех внутрибольничных инфекций [1]. Это связано с различными факторами, такими как широкий арсенал факторов патогенности и разнообразие метаболических путей [2]. *P. aeruginosa* также обладает поразительной способностью развивать устойчивость практически ко всем доступным противомикробным препаратам путем либо адаптивных мутаций, либо приобретения мобильных генетических элементов [3].

Одним из основных факторов вирулентности *P. aeruginosa* является липополисахарид (ЛПС), который напрямую взаимодействует с внеклеточной средой [4]. ЛПС является неотъемлемым компонентом оболочки грамотрицательных клеток и состоит из трех доменов: липида А, основного полисахарида, и О-антигена, который, в свою очередь, играет важную роль как в адгезии клеток, так и в защите от фагоцитоза клетками иммунной системы макроорганизма [5–7]. Среди типизируемых изолятов *P. aeruginosa* серотипы О1 и О11 в основном ассоциированы с острыми инфекционными заболеваниями, в то время как изоляты серотипа О4 ассоциированы со случаями летального исхода пациентов. Серотип О6 – наиболее часто типизируемый среди остальных серотипов [8].

Известно, что О-антиген состоит из двух компонентов: общего полисахаридного антигена (CPA или А-группа) – гомополимера, имеющего консервативную структуру и состоящего из повторяющихся звеньев трисахарида d-рамнозы, и О-специфического антигена (OSA или В-группа) – гетерополимера, среди которых выделяют 20 серотипов согласно схеме, предложенной международной системой антигенного типирования (IATS) [9].

Именно на вариабельности OSA основана существующая система серотипирования возбудителя синегнойной инфекции, используемая для установления взаимосвязи между серотипами О-антигена и эпидемической значимостью возбудителя [10]. Помимо этого, О-антигены служат мишенями для разработки противомикробных препаратов, таких как бактериофаги, бактериоцины, например R-, S- и L-пиоцины; и опсонизирующие антитела.

Следовательно, серотипирование клинических изолятов *P. aeruginosa* дает важную информацию при эпидемиологическом расследовании случаев заболевания, особенно при возникновении вспышек и(или) внутрибольничном инфицировании. В свою очередь, в соответствии с действующими нормативными документами для типирования и идентификации возбудителей внебольничных пневмоний, коим является *P. aeruginosa*, могут применяться лабораторные методики, разработанные научно-методическими и референс-центрами, а также проведение секвенирования с целью определения нуклеотидного состава [11].

Вместе с тем известно, что при хроническом течении инфекции ряд штаммов *P. aeruginosa* не серотипируется, что может быть обусловлено модификациями ЛПС вследствие длительного контакта бактерии с клетками макроорганизма, при противодействии клеткам иммунной системы и бактериофагам во внешней среде [12–14]. Исследование, проведенное J.P.Pirnay et al. [15], показало, что 65% всех исследованных изолятов *P. aeruginosa* были либо нетипиру-

емыми, либо мультитипируемыми сыворотками, и поэтому присвоение определенного серотипа этим штаммам затруднено. Несмотря на это, серотипирование продолжает оставаться актуальным, широко используемым методом для типирования штаммов *P. aeruginosa*, и развитие полногеномного секвенирования открывает новые перспективы для установления серотипов, но уже с использованием молекулярно-генетических методов, лишенных недостатков при использовании сывороток, дающих перекресты с некоторыми серогруппами.

Стоит отметить и то, что среди 25 000 геномов *P. aeruginosa* в международной базе NCBI всего у 345 существует информация об их серогруппе (на момент исследования), что свидетельствует о недостаточной разработке этой проблемы.

Кроме того, одной из задач, поставленной перед центрами секвенирования является создание вычислительных алгоритмов и программных средств, позволяющих проводить экспресс-генотипирование возбудителей инфекционных заболеваний [16].

В связи с этим цель исследования состояла в анализе вариабельности ЛПС-кластера у разных серотипов *P. aeruginosa* и разработке методики определения серотипа на основе данных полногеномного секвенирования.

Материалы и методы

В работе были использованы нуклеотидные последовательности О-антигенов *P. aeruginosa*, полученные из международной базы NCBI на основе работы C.K.Raymond et al. (2002) [17]. Для построения и отображения дендрограммы использовали программу pyGenomeViz v.0.2.1 и FigTree v 1.4.3 [<https://github.com/moshi4/pyGenomeViz>, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]. Поиск открытых рамок считывания проводили с помощью программы Glimmer3 [18]. Анализ данных полногеномного секвенирования проводили с помощью пакета программ BLAST (blastn, blastp, rps-blast) и авторской программы (<http://antiplague.ru/pseudomonas-analyser/>) [19]. Собственное программное обеспечение разрабатывали на языке программирования Java. В качестве референс-штаммов были использованы PAO1 [20], PA14 [21]. В качестве референса была использована программа для определения серотипа *P. aeruginosa* по данным полногеномного секвенирования PAST [22].

Для валидации разработанного алгоритма были использованы 345 полных геномов штаммов *P. aeruginosa*, полученных из международной базы NCBI с подтвержденными данными о серогруппе.

Результаты исследования и их обсуждение

Из международной базы NCBI были получены полногеномные последовательности 20 кластеров О-антигенов *P. aeruginosa*, описанные в работе C.K.Raymond et al. (2002) [17].

С целью унификации обозначения генов были проведены поиск открытых рамок считывания и их аннотация, что позволило составить реестр генов О кластеров *P. aeruginosa*, на основании чего была построена дендрограмма, отражаю-

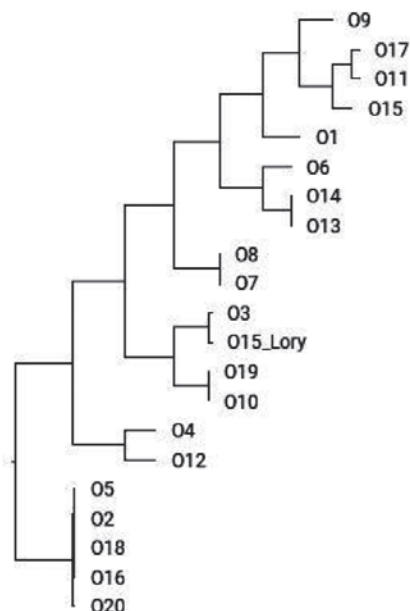


Рис. 1. Дендрограмма, отображающая близость генетического строения О-антигенов *P. aeruginosa*.

Fig. 1. Dendrogram showing the proximity of the genetic structure of O-antigens of *P. aeruginosa*.

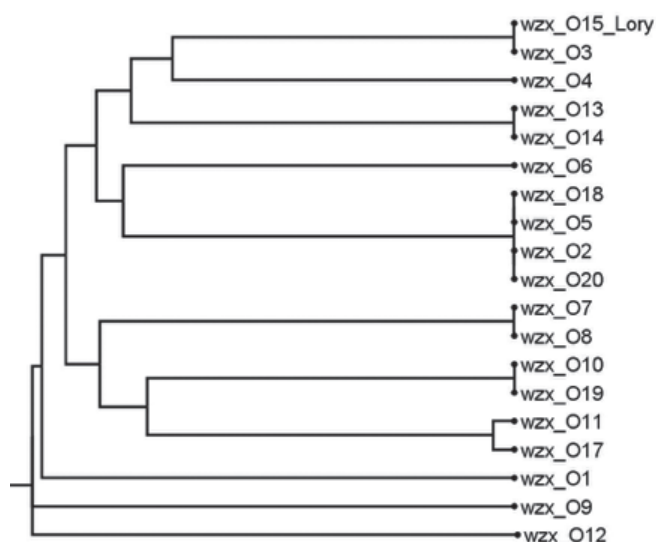


Рис. 2. Дендрограмма, отображающая гомологию строения гена *wzx* О-кластеров *P. aeruginosa*.

Fig. 2. Dendrogram showing the homology of the *wzx* gene structure of O-clusters of *P. aeruginosa*.

щая степень генетической близости 20 кластеров О-антигена, взятых из международной базы NCBI (рис. 1). В результате было обнаружено, что часть серогрупп очень близки по своему генетическому составу. Таким образом, их можно было разделить на 7 групп: 1 – О2, О5, О16, О18, О20, 2 – О4, О12, 3 – О10, О19, 4 – О3, О15-Lory, 5 – О7, О8, 6 – О13, О14, 7 – О11, О17. Поэтому следующей задачей стало повышение дискриминирующей способности и разделение этих групп на максимально возможное число серогрупп, основанное на вариабельности строения гена *wzx* *P. aeruginosa*.

Ген *wzx* является одним из важнейших элементов формирования О-антигенной структуры *P. aeruginosa* [23]. Кроме этого, способ идентификации и дифференциации О-антигенов, основанный на строении гена *wzx*, применен на широко

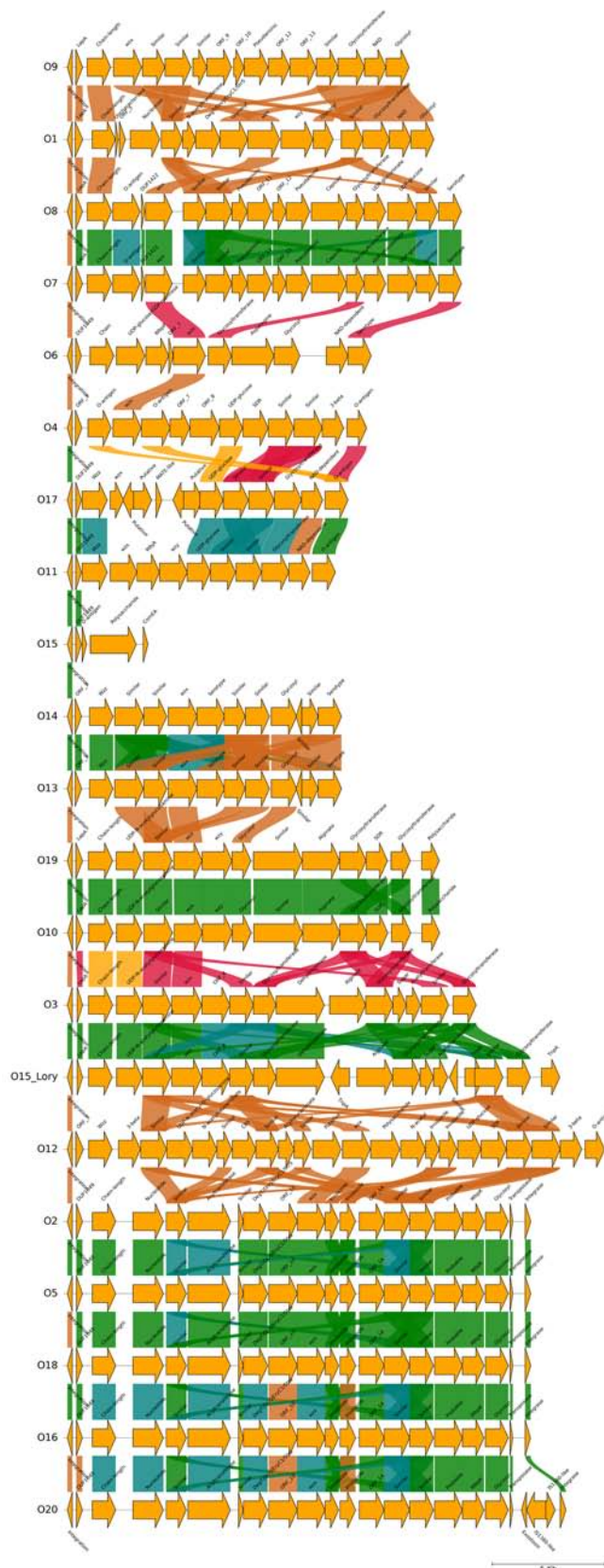


Рис. 3. О-антигенная структура серогрупп *P. aeruginosa*.

Области, отмеченные зеленым цветом, совпадают на 100% по аминокислотной последовательности, зеленовато-голубым – на 99%, коричневым – на 95%, оранжевым – на 90%, бордовым и красным – на 30%.

Fig. 3. O-antigen structure of *P. aeruginosa* serogroups.

The areas marked in green have 100% amino acid sequence identity, greenish-blue 99%, brown 95%, orange 90%, maroon and red 30%.

Таблица. Нуклеотидные последовательности гена *wzx* О-кластеров *P. aeruginosa*
Table. Nucleotide sequences of the *wzx* gene of O-clusters of *P. aeruginosa*

O1	ATGTTTCTCGGAAGATAGCGGTTTTGCTATAGGCTCTATCGGGTGGGCTGTTCTGGTCTGATAACGCTCCCTATAATTACTTGGTTTTATCCGCTGAAGA TGTTGGCCGATTGCAATGCTCAAGTTGCCTCAAACTTCTGTGTTCTCTTTTTGCTAGGGTTGGATCAAGCCTATGTGCGTGAATATCACGAAGAAAA AATCGCTCGGCATTATTGAAATCTTGCTTTTTCCCGGGTTGTTTTGCTTTTTGCTTTGCTTTTTGTTTTTATGATGCATCGATATTTCTGATTTAT GTACGAGAAAGCGATGGTCTACTTGCCTATCTGACAATGCTTTGTTTTGTTTTGCAATTGGTTCTCGCTTCTCCTGATTCTGAGAATGCAGGAAAGAG CTCTTGCCTTCTTTGACTCAGATATCGCCTAAATCTTTTTGATCGTCAATGCTGCTTTTTGTTTTTCCATACCGCGCTTTTGTGAAGTTTATAGT GGCGCAAGCAATATCTATGTTTACGATCATGTCTATTTTGTGGAATACCGTGGTGAATGGAGACCATGGAATGCCTATACGTTGTACAAGACACAGTTTC ATGAGTTGTTGCGTTTCGGTCTACCATAGTTGTGGGCGGAGTGGCGGCATGGGACTGTATGTCATGGATAGACTCTTTTGCCTGCGCTTCTACCTTTTC AGAGTTGGGATATTCAGTAGCGGTGAGTATCGCAGCAGGTGCTGGTATCTTGGAAACATTTTACGACCATATGGTCTCCAACGGCTTCAAATGGGCT GCCGAGGGGTTGATGACCAAGAAAAATTGATGAAATATCGGAGCATGTACTGGCGTGCCTTTTCTATATATTTAATAAGTGGGCTGTTCTCTTGGATGGTTCC ACTTTTTTACCTGAAGCATATCGCCCATACAGTACATGATAACAGTATGTGTGGCTCTCCCTACTTTATGCTCTCTCAGAGGCAACGGCGATCGGCATCA GCATTTCTCGCCGAACCGGCTTTCTATGCTGTCTCTATTTAGCTGCGTTAACTAGCTTCGGTGGTAATATCTGTTGGTTCTCTCTATGGAGCAGCTGGT GCAGCGGTAGCTACTGCTGTTGCGTTTTGGGTTTTCTATTCTCGGAACTGAGTTTCGGTTCGGTGTGGCGTAAGATACCTAGGCTTAAGCTTTATATGG TTACCTTTTCTGCACTTTGACAAAGCTATTGATTCTGCTCGGACAAAAAATCAGGCTCTATCTTGGTTTTCTGGGCATTACTTGGATTGAAAGGAGCT TTCTTTTCCGAAATCTATTGGGCTTCTCTTTCGGTGCTTATTCTCACTATAGGAAAGAAAAACATGTTGA
O6	ATGCTGGGAAACATAGTCTGGTTATTTTTGTTCAAGTCTTTCCGGCAATATTGACTCTTGTGCGTCTTTCCGTTTTACTCGTCTGTTGAGTCCGGGTGA GTATGGAGTCTATTTCGCTGACAATTATAGTTGTTGGCTTCTCAATACGGTTTTCTGCAATGGGTGGCGCTGGGGGTTGGTCGTATCTGCCGTAGTGATG GATGACCAAGCTCGGGCGAGGCTTCTTGGCAGCGCTAGGGCCATTAGCTTCTTCTTCACTCGTTATCATATTCTGCACGTTCTCTGTTGGGAGTGGCGT GAAGAGATAGTTTCTGCTTCTTATATATGTTGCTGGTTTTCTTGGCTGACAGCGCTGGGCGATTTGAATCTGAAGATTCAAATGCGATCTTGCAGCC GCTGACCTACGGGAAATGTTGTTGATCAAGGGGCTGGAAGCTTCTTATCGGTGTTCTCTTGTATTTCGGGTTTGGCGTTGATGGTTTGTCTGCTGGG TACGCTTGTGCTCTGTTACTGGCGACCATTTTCTTCAAGATGCGTGGCGGGAGTCACTTGGCGGTGGTAGACAAGGAGCAGTTAACCAGGTTGTTTG CCTATGGTGACCACTGACGCTTACTTTCTTTTTGCAATCATAGTCAATGCTGCTGATCGCTTCTTATTGGGCGATTCTGGGGGATGCCGCGTAGGTGT CTACTCGGTGTCGCGCGGCTTCTCTGTTGATGAGTGGTTCGTGCTGCTACCTGGCGGCTTTCCGCTGGTGAATGGAAGAACTTCCAAGAGC GGCTTGCCACAGACAGGACCAACTGCGGAAGACCTTTATTTTATCTTTCAGTAGTCTCGCTGCTGCTGTGGTCTGGCCATGGTGGCTCCGGAAT TCAGGATCTATTATGGCGAAGAGTTTCGTGAGGGTGCCTAAAGATAATTCCGTTGATATCCCTTTCCGGCTTTCTGGGGGCTTGAATCTTTTACTTTGA CTACTCTTTCAATTGGCTAGTGTACAGAGTGCAGGTTGTGACAGTGGCGGTGTGCGCAGTGGTTGATGTTGTTTTAATTAATCCTTATCCGAGTTT GGGATAGTGGTGGCGGCTTCTCTGTTATGGCGTTTTCTGCTGCAATTAATAGTATCTTCTTGGGCGAGCTTCTTCCCGCCGCTTCCG GGGAAAGATGCTATGAAATGCGTTGCTGTGCTGTTGATGGCGGTGTCAGTTGCATCTTCACTTGGAGAGTGTCTTTTTTGGTCTGTTGTGAAAGTTG TCTTGGGGGAGGGGCTATTGGCGCAATGATTGCTCTTGATGATCTGGCATGCGTACTTCTGAAGAGCAAGCTAATTCGATGA
O2, O5, O18, O20	ATGAGTGGCGCTTTTATCAACCGTGTGCGACGAGTATTAGTAGGCACCTTGGGAGCACAGCTCATAACGATTGGTGCTACTCTGCTACTGGTTCGTCTGTAT TCTCCTGCTGAAATGGGCGCTTTTCACTGTTTGGCTATCGTTTCGCTACGATTTTTCAGTTGTAAGTACTGGGCGCTATGAGTTGGCTATTTTTCGACTCGA GAAGAGGGCGAACTACAGGCAATCGTCAAGCTGATACCTTCACTGACATATTGCTTTCGTTGCCGTGGCGATTGCTGTTGTTATAGGTAGACATCTGATT GAGTCGATGCCAGTTGTGATCGCGCAATACTGGTTCCGATTTGCGGCTGGCTGCTGCTGGGGTTGGGGATAAATAAGCTAGCTTTGTCGTTACTTACATTTCA ACAATCTTTAATCGGTTGGGAGTTGCTCGTGAAGCCTGGCTGCATGATTGCCGTTGCACAAGTTTCAGCTGCATATTACTGGAGGGCGTATCAGGGCT GATCTATGGCCAGCTGTTTGGTGTGCTGCTAGCCACGGCGCTTGGCGGCTTTGGGTAGGAAAGTCGCTGATTTAAATTTGATCGAGACACCGTGGCGT ATGTCACGACAAGTAGCGGTACAGTACATCAATTTCCGGAAGTTTCTCTGCTCGGATCTGGTCAACACGTTGCCAGTCAAGGTCCGCTGATTTTATTG CGCGCAAGTTTGGTGGAGACAGTGCAGGCTGGTTTGCCTGACTCTGAAGATAAGGAGCTCCCATTTCTTGTGGCTGCTCGGCTGCTCGATGTGT TCAAAGAACAAGCCGCTCGTACTACCGAGAGTTTGGTAATTGCCGAGGTATCTTCTCAAGACTTTCAGGTTGCTTGGCGTCTCGCGCTACCTCCTTTT ATTATATTTTGGTTCATTGGCGAGTGGGCTTTGGGTTAGCTTTTGGCGAAGCGTGGGCTGAGTCCGGGGCGTTATGCTGTATTGATGGTTCCGTTGTTTAT ATGCGTTTCTGGTGAGTCCGCTCAGCTATACAATCTATATTCGCGAGCGGAGATGAGATTGTTGTGGCAGCTAGCCTTGTGCTCTGACGTTTAT TGTTTTACCTTGGCTGACTCTGTGCACTCGGTGTTGTGGTTTTACTCTACAGCATATGCTGTTATGATTTTGTCTATTTCTGGATGTCTTCCAGTGTGCCAA GGGAGATGCCAAGTGA
O16	ATGAGTGGCGCTTTTATCAACCGTGTGCGACGGGTATTAGTAGGCACCTTGGGAGCACAGCTCATAACGATTGGTGCTACTCTGCTACTGGTTCGTCTGTAT TCTCCTGCTGAAATGGGCGCTTTTCACTGTTTGGCTATCGTTTCGCTACGATTTTTCAGTTGTAATTAAGTGGGCGCTATGAGTTGGCTATTTTTCGACTCGA GAAGAGGGCGAACTCCAGGCAATCGTCAAGCTGATACCTTCACTGACATGTTGATTTTCGTTGCCGTGGCGATTGCTGTTGTTATAGGTAGACATCTGATT GAGTCGATGCCAGTTGTGATCGCGCAATACTGGTTCCGATTTGCGGCTGGCTGCTGCTGGGGTTGGGGATAAATAAGCTAGCTTTGTCGTTACTTACATTTCA ACAATCTTTAATCGGTTGGGAGTTGCTCGTGAAGCCTGGCTGCATGATTGCCGTTGCACAAGTTTCAGCTGCATATTACTGGAGGGCGTATCAGGGCT GATCTATGGCCAGCTGTTTGGTGTGCTGCTAGCCACGGCGCTTGGCGGCTTTGGGTAGGAAAGTCGCTGATTTAAATTTGATCGAGACACCGTGGCGT ATAGTACGACAAGTAGCGGTACAGTACATCAATTTCCGGAAGTTTCTCTGCTCGGATCTGGTCAACACGTTGCCAGTCAAGGTCCGCTGATTTTATTG CGCGCAAGTTTGGTGGAGACAGTGCAGGCTGGTTTGCCTGACTCTGAAGATAAGGAGCTCCCATTTCTTGTGGCTGCTCGGCTGCTCGATGTGT TCAAAGAACAAGCCGCTCGTACTACCGAGAGTTTGGTAATTGCCGAGGTATCTTCTCAAGACTTTCAGGTTGCTTGGCGTCTCGCGCTACCTCCTTTT ATTATATTTTGGTTCGTTGGCGAGTGGGCTTTGGGTTAGCTTTTGGCGAAGCGTGGGCTGAGTCCGGGGCGTTATGCTGTATTGATGGTTCCGTTGTTTAT TATGCGTTTCTGGTGAGTCCGCTCAGCTATACAATCTATATTCGCGAGCGGAGATGAGATTGTTGTGGCAGCTAGCCTTGTGCTCTGACGTTTAT CTGTTTTACCTTGGCTGACTCTGTGCACTCGGTGTTGTGGTTTTACTCTACAGCATATGCTGTTATGATTTTGTCTATTTCTGGATGTCTTCCAGTGTGCCAA AGGAGATGCCAAGTGA
O17	ATGGGCAGCAACTATCTTTTGCCTCTTGTGCGATTCTTTTCTCACGAGAACATTGTCAAGCGAAGCGTTTGGCCAATTGGTGATTGCCAGGCCGTGGCT GTCATTCTATGTCAACTGGTAGACTTTGGATTATTCTGGCAGGATCAAGAAAGGCTGCCATTATCGATAACAAAGTTGAAGTGTCTAGTTCTTTTCTGTTGTA CAGAGTGCTAGATTCTTATTGTTGCTGCTTTCACTTTTGTGCTGGCCATTTTGGCTGATCTCTTATTTACCAATCCCTTGTCTGATTGGTTGCGGCTGCT CTTCCGGCAGTAGTTGGAAATTATCTTCAAGCAGTATGGTTCTTTCAGGGAAGAGCGCTTTTGGATGGTTGGCGCTTACCAATTTTTGTCTAAGGATTTTA TTTCCATTGGCTAGTTTTTTGTACGAAAGGATTCTGACCTTGTGCTGGCTTCTGTTGGGTTTGGTTTTTCTATGTCATAGGTGGAAGTCTCTCTGTTGTA TTTTATTTCTATGGGGCGGTTGCGAAGTGAAGTCAACACGGTTACTGGATTGAGGCAGGAGCCTCATGATACGTAG
O11	ATGGGCAGCAACTATCTTTTGCCTCTTGTGCGATTCTTTTCTCACTAGAACATTGTCAAGCGAAGCGTTTGGCCAATTGGTGATTGCCAGGCCGTGGCT GTCATTCTATGTCAACTGGTAGACTTTGGATTATTCTGGCAGGATCAAGAAAGGCTGCCATTATCGATAACAAAGTTGAAGTGTCTAGTTCTTTTCTGTTGTA CAGAGTGCTAGATTCTTATTGTTGCTGCTTTCACTTTTGTGCTGGCCATTTTGGCTGATCTCTTATTTACCAATCCCTTGTCTGATTGGTTGCGGCTGCT CTTCCGGCAGTAGTTGGAAATTATCTTCAAGCAGTATGGTTCTTTCAGGGAAGAGCGCTTTTGGATGGTTGGCGCTTACCAATTTTTGTCTAAGGATTTTA TTTTCTATTGGCTAGTTTTTTGTACGAAAGGATTCTGACCTTGTGCTGGCTTCTGTTGGGTTTGGTTTTTCTATGTCATAGGTGGAAGTCTCTCTGTTGT ATTTCTATTGTCGTTTTTTTTGTACGAAAGGATTCTGACCTTGTACTGGCTTCTGTTGGGTTTGGTTTTTCTATGTCATAGGTGGAAGTCTCTCTGTTGT ATTTTATTTTCTATGGGAATACGGTGGCGCGCGGTTCTCGAGAAAGACAGAAATCTCGATATATTGCGTGACGGTGTCTGATCTTTCTTCTCTGCTTTTCT TAGCTTGCACATGCAAGTGTCTGTTGCGGCGGTTGGTGTGTTGGTGGAACTCCGCGCGCGGAGTGTCTTCTACTGCGGATAAATCCTTCCGCGGATCG CGGCTGCTACTTCAACCCTAGTAGCTAGCTCTATTTCGACATTTTACGAGGATGATGCGAGTGGCGGACCGGAGTGGCGAGTTTAAAGAAAGGAAAGCGTAG GTCTGATGTTACTAATAGCTATTCTAGTTGTTTATTTCTTATTTCTGAATACATTTTCAATCTCTTATTTCCGGAACAGTCCAGAGGGCTAACTGTTGTA ATAAGAATGTTTTCTGATAGTGCAGTGTGTTGCTGTATTGGTGTCTGTATGGAGGGTTGACTCTTGTCTCTGCGGTATGATGGTGTATTTGCGAGCAAT TTTTTTTGGGAATTGGCGGGGATTAACATTTATCTCTTGGCGCTTTGGGGGATGAGTTTTTGGAGCGTGGACGCTAGTCTGTACAGAGGCTCTTT GGGATGGGAATGTTTTTGTGTCGCCACGGTTAAGTTGAGAGAGAAAAGGGGACTTTGA

O10, O19	ATGTTAGTGAAGCTTAATGAAACTCTGTAACGCTTTGTCTTTAGTTGCAATACAGGGCGCAAATGCACTGCTCCATTGTTAGCTTTCCCATATTTGTTTGGC GTATTAGAACAGGGTGCTTTTGGCAGGCTAGTAGTGGCTGAAGCATTAGCTTTTTATGTTTGGCTGTGTCTTTATAGTTTATGATATAAGTGGCGTTCAAGTA ATAGTCGATGCGAAAGAGGAAAGAGAGGTAGAAGCAAAGTTTTTTTTCAATATATTTGCTGCTAGGGTTGGATTATTAATTTTTCTTCTGTTTTTGGTTGGA GGTGGATATCTATTTTGGGGCGCCGATGTGTTGTTGGTAGTTATATGGCTTTTTTGTGTTGGGTATGATTCTTCAGTCTAATTATTAATTTCAAGCAGTTGAA AATAACTGGTTGCTGCAACATTTGTAGTCTCTTCAAGAGTACTGCGGTTTTAGCCGCTATGTGCTTTGTACATAAGGGGACGGATGTTTTCTTGCTTTCCAT CATATTGGCAGGTAGCTTTTGTAGTTTCAAGGGGAGCGGATTTGGAGTTCTACTACTCGTTTTGGTTTGGTGAATTTAAGAGGATTAGAGGTGATGTTGTTG TCTCAATCTGTGGAGTGGTCGTCATCTGTTTCTAGGGAACCTATCAGTTACTTTATTTGCTGGTGCAAATGTTTTAATTTTGGCTGGTGTTCAAATAGTGCTG CTGTTGCAGTTTATGCACTCTCCGAGAAAATAATAAAGTACTCAAGCACTAGCGAGGCCATTGAATCAGTTATTTTGCACAAAGTTGAAAAGCTTGGGCC TCTCTCTGTAACGGGAAACAAACGCGCTTTGCTTTTGTAGCTTCTGGAAGAAATACATATGCTCAAGTATGCTATGTTGTTCTTCCGCTTTTATC TTTCTCTATATTTCTGTTGGGTTTTAGGAGTGATTCGGGTTTTAGTGAGAAAGTTTTCTTCTAATTGATTGATGTCGCCAGCCGATTTTTGGTGTGCT AATTCTATGTTTGGTGAGTAGGGCTGAGTTTAATCGGAGGGCAAACCTACTTTGCTTATCTGTTTCTATCATTGGGGTTGTGCTTTTTGATTCCCTGGTT ATGCTTATCTCTCTCTGATACCGGGGCTGCGATGACTTTTGCTGCTGGCGAGGCTTTGCTTTTATTGCTTTCTCTGTAATATCGTGGGAAGCCAAGAC ATGGATGA
O7, O8	ATGATTTTTGCCCTTTTGGCTGCGTTCATTACGGCGCTCAAGGGCTTTTTTATGCCATCTTTTGGATGAAGTGCAGTATGCCAATGTAAGCTACTACCTTCT CATGCTGGGGGTGGGAGTATTGTTTATTGGCTCTGGGGTATAATACGCTGTCACTGAAATCCGATATTGGCGAAAGAAGAGTCCCTGAGTGTTGAAT GATTTTATACGGCAAGTTAAGGTAACGGGTTTTGTACTGCTACTGCTCTGTACTTTAATCCGCTCGCTAGTTATATGACCGGAATGTCGCTCTCGTTCAA GTGCTCTTGGTTGTTCAAGGTTTTAGTATCTTTTTGTTCACTATTGATCTGATGGTGGTGAAGGACGGCTGGATTTTGTGGTTATGCGAGGCAGTTATTTCT AAGAAATGCTGTCAATGCTGCGGGCTTTTTATTGCGCAATCTTCTGGCTGTGGCTGATTGCGGTTGCGGACGATGATGTTGGGGATGTTTATTTGTTT CTCGTGGGGTCTCTGTTTTTTTTGGATTTTCTGTTTCCGAGTTAACGTTTTTGTAGTAAGTCTATCACTTATATGCTGTTTACTTTAGTTGGAGCGCTTTTCC AGTTTGTGATAGACTGCTAGCCTCTTCTGTGCTGAGAACGAGGAGTTCTCTCGGTTCTCGTACTTTTCTTGTGTCATAATGGCTGGGCTTTCCGTACAGCA GTTGATGAATACTAGGGTGATTACCGTTTTACCAGAAATGTGTGAGAAGGGGGCAAGGGTTGGGTATCGTTATGATGTTAAGATTTCTCTTGTGATGGCGCTA CTCATGCTATTGTCATTGCTGCGGCTTTTTGTTTCCCAATCTTCTGGCTGTGGCTGATTGCGTTGAGATGATGTTGGGGATGTTTATTTGTTT GGTTGCACTAGTTAGATCGGTGGATTTTACTCTTCTTATCTCTTGGTGATGGGGCTAGATTTTTGTTGCTCAAGATTCAGCTCTCTATGCTTTTTCTGTTTG TGAGGGCGCTTAATATTTAAGTGTTCTCTCGAATACAGGGCTTTGGGGTTTTGCTTAAATGGTGCTGTCGGGATTCTGGTGTTTTGGTGCTGCTGATAT TGTCGGCTTGGTTTGAAGTCGTAATAAGATTTTTGTATTTAA
O9	ATGATCCTTGCTCGCTTTTCCGCTGCTGTAATGTGGGGTTGAGGGCTGTAACCTTATCTCGAAGTTCGCTCTTTTGTTTTTCTTGTCTGTTACCTCACGC CTACGGAGCTCGGGCTGTATGGACTTTTGTGGCAGTCGTCGCTATGCTTTGATTTTGTGGCTTCGATTTTATGCATATAGCACGCTGAAATGCTGAA GTCGCCAGAGGCAAGCGTGGGCGTATGTTACGAGATCAGCTGGTTTTGACGGCTATCTATCTGATTTTTCATCCATGCTTTTTGTCGATTTTCAATTTTA ACCTTCTACCGTGGTCTTTTGTCTGGTGGTTTCTGGCGTGTCTGGTGTGGAACATTGGAATCAAGAGGTTATGCGATTGTTGATTGCCTTGTCTGCGCAA CTCTTGCCTGATGAGCATTGTTCTTCCGGTCAGCGGCTTGGGCATTGATTGTAGTTTTTGTGTCATGCTTTTCGATCCGTCGCTAAGGAACCTTCACTTTGTTTT GTTAGGCTGGGTGATGGGTGACGCTTTAGCGCTTTGATCTCAATAAGTAAGTTTGGCGCGCATGATTCCCTTGGATTGGCACATGCGGGTGGAGTGGTTGTG GATATGGAAGGGAATCAGGGTGGCACTGCTCTTGTATTCTGACTTTGCGATGCTGGCGCTTCTTACCTTGGATCGATGCGGTGCAAGCAAAATTTCCGG GCTGGAGGTTCTTGGTGCTTACGTATTGTTGATGGGTATGGCTGCTGCTTGTGGCTTTTCTAGACGCGAGGGTTTTACATTCATATATCCGGGGATGATTA GTAGGTTTCAAGTGTGGAGAAGCGGATTCCTTCAAGACCTTTGGGGCGACGCTGGGCTCCAGACAATAGTTGTATGCTGGTATTAGTGGCTTTGCTCTAT TTCTTGTGCGTCCGCTCATAGCTTTGGCTTGGCAAGGATTTCTATGAGCTGCACTGCGAATGTTTCTTGGGTCTTGGCAGCTATAGTCTATGCAATGCAATGAG CATGATTGCTCATTATGCGCTTTATGCGCAGGGGCGATGACGCTATAAATTTTCACTGATTTCTCGGTTTCTCGGCTTTCTCCCTGTTGTTTTCTGGGGAG GAGAGATCTTGAGATACTCACCGTACCGTAGGGTTGTGTGATGCTTTTCCCTATACTAATGTGGAACCTGATGGCTATTGGCGCTGACGCTAGGCA GTATCGGTTTTTTTTGA
O12	GTGAGCCGAATTTTGAATATCGGTTTGGCTGGTCTAATCTATTAAATAAATTTCTTTTGTAGTCTTTTCTGGCACATTTTATGAATGCCGAGGATGTTGGCATT TATGGCTTGTGGCTGCGCATATTGGTTATGGAGTGATATAGTCGGATTTGAATCTATAATTAATCTAATCGTAGTATGCTGCTCCACAGCTGGAATGG TTACCTTGTATAGCAGATCAATTTCTCTATATCTCTAATATATGATGACTATTTGCTTTTTATTGTTTACAGTCTTTTTGGGGTGAATGGCTTCTTGGCCATG TTTTCAATTTTTGTGACTCTTTTGTACTTTGAACATATTGCCAAGAGTTCAATAGAATATTGGTTGCTGCTCGAAGCAATTTTGGCAAGCGTGGTTCTTTTTG TTCGTAGCGGAATCTGGTGCTTAGTAGTTATTCTATGATGTGGTTCGATCCAGTTTTTTCGATCGCTACAGTTCACTTTCTATAGCTGGATTATATCTTGTCTGTT CGCATGTATTATAGCGATTATCAAATCTTTCGCTTAGGTAATTCGCTGGCAGCCGCCAGTAAATTTGGACTTGGATACGAAACGGGATTAAGTGGCTTTAC CATTTTGTCTCGTAGCTTAGCCATACGCGGGGATCTATACATGCAATAAATTTTGGATAGTATTTCAAATCTCAAGGTATTTAGGTGCGATACGATCTTTGT AGGTATGGCTACCGCTGCTCTATCTTTTTGGATGCAAGGATTTTTGTTTTCTATATTCTCGGCTAATAAGGTCGCTAAGAATGAATCGACGCATGACTTTC AGAAAGTGATGCGTGAGTTAACTATTAATACTGTGATTGTAATATTTTCTTTTCTGTTCTCTGTTGTTTTCGCTGGAATCCTTATAGTACTTGGCTTTCTTACC TGTTTTATAAAGAAAACCTAGATATGTTGACTGGCTACTTTTCCGCGAGTCTCTTATGGGCTCAGCAGATACCTCATCTAGGTTTGTATGCTTATGGTCGAGA TAGCCAATATTACCATTTCCCAATTATGCGGTTTTGTGCTTTCTATCTGCTCTGCTTATCTTCTCTTCTGGGGAGTAAGCTCTATTGCACTCTCAATGGCT ATTTCAATTTTTTTATCTTGTCTTGGAAAACATCTGCATATTTTCTTTTGTAAAGGATGCAATAATTTAA
O3, O15	GTGGGTTTGTAGCCTTTTAAAGAATCTTCTCCAACCTGATTGGCTCAGCTCTTCCGCTGTGGTGCATTGCCGGCGCTGGGGTATATGGCGCGGGAGCTG GAGACAGCCCTTTTGGAGCTGCAATGCTGATATGGGCTTTGGTTGGGTACGCAAGTATTTTCGATGCTGGGCTCGGTAAGTCAAGTGAAGCAAAATGCCA TCTCTTACGCGGAGCTGAAAAACGAGGACCGATCCTAGGCTCTTCCCTGCTGTTTGTCTTCTCTCGGGGGGGCTGGCGGCTGCATTGGTCCACTTTTTTG CGGAATATTTGGTTGATATATTTCAAGGTTGATCGTTCTCTATGAGGATGCTTACGCGGAACCTGAGTGGCGGCGCTGTGATTCCCTCTTTTGTAGCAT CCTTGGTATTAACAGGTTATCTCGAGGGGGTGGAGGATTTTTATTCTTTTAAAGATATAGGGCTCTATCAGGAACCTTACTTATCTTCTCCGGTAGCCTTTTTA CTATTTGAGAAGACCTTTTCTTATGATCTATGGGCTGCTTTTTGCGCGGGCTGGTCTTGTCTTCTGATTGCAATTAATGTTTTCGCGTGGTTGTCAGTTTGG ACGTGGCGGTGGGATGTTAAGGCTTTTAAACGCTTATAAGCTTTTGGTAGTTGGCTGACTATTACAATAATAATAGTCCGTGTCATGGCTATATGGAATAATTC TGATAGCAAGAATTACGGGTGCAGGAGAACTTGCAATATATGCTGCACCATCCGAGTTGATAAATCGTATGCTATTCTGCTGTAGCTATTACGCGTGCAGTATT TCTCGTTTTATCTGCTTTGGGGGGGCGAGGATCTGCTCTGTGAAGAGACAGGCTCTCCTTTAATCTGGAGGATGGTTCTACCTATAATTTATTTCTATTTTT TGAGCGCCTTGGGGTTTGGGCATATGGTTGGGTCCAGAGTACTCGGGACGGCTGCTCAGGTTTTCCAGATCATGCTTGTAGGTTATTTGTTCAATTCGATTG CACTAGTTCCATATAAATCTCCAGGCGAAGGGATATTCTCGGACAACAGCAATGGTGATCTCTTGGAGGTGCTTCTTATTTGATGCTGATGTACTTTTCGG TTCAGCAATGGGGGTTGTGCGAGCGGCATCCATCTGGTCTTAAGGATGGCTGTGGACTGCATTTTGTGGCTTATCTGGACTCGAAGTGA
O4	TTGCTTGGAGGATATGGCTTGAGCTTGGCTAGGAATACTTTTGAACCTTTTGGGGTACTGATTCTTCTTGGCGGCGTGGCTGCTATCGGTTATCTGG CCAGAGTTTTGGGGTTCGAGAAATTTGGGCTTCTGACCTTTGTCTTTTGGCCATTTGGATGATGCCAGTATATTCTGAGGTTTATCCAGAGCTGTTATCAGG GAGGTGGCTCTGAGTTCAGATAAAGGTTCCGAAGTCAACAAGGCTGTTGGGACTTCTCTGTAGTAGTTACTATTGCGGGTTTACCTGTGCCTTGTCTTGT TACTTCAATAGCGAAGCTTAGCCTCGCTGTTGGGAGTAACGCGGGGAACTGGCCAGAGCTGGTATTGGGGCTCAACTACCTTAGTTTTGCAATAGTCCCC TTGCTATTGAGTACGGCTGTTCTCTTTTTTGAAGGCGCTGGGGATTTAGGAACCTGAATTTCTAAAAATTTATTTCTGGTTTGGCTGTTGCTATCATTTCC TGCCGCTTGGGTTTTGGAATAGTGGGGACGAAACGTTTTCTGTGGCATCTGGGCTGATAGCTGAGGCTCTCGTATATCTGCTGCTGGGCTGCTGTTTTT GTGTGCTCCGTTTCGGACTTCGAGTGCACGTTTTTGATTATTTTACTTTCAAGCGTCTGATCAACTATGGCGGCTGGATTACTGTTAGTAATTTTATAGCCCT GTAATGGTCTATTTGATAGGTTCTTATTTCCAGCCATCTGGGGGCGGCAACTGTTGCCTTGTACTAGCCCCCTCCGAGGTGATTGGAAGGGTTGCCCTTC GTTCCACGTCATATCCCGGGTCAATTTTCAAGCTTTTGGTCTGATTTCTGATAGTATCAAAACAGAGTTGCCCTATAAGATGACCTTCGTTGATGTGG CTTATCTTCAGCTCTTATTTTGGTAGTGACATTTCTTCTGTATGCTTCTGGGTAAAGTATCTGGGGAGGCTCTTGTCTCCCAAAATCTTGTCTGT TGGCTTTTTGTTCAATTTCTGCGCGAAATACCTTTTGCACAAATCAAGCTGAAGGTAATTCAGGTTGACAGCTATTTTACATATTTTCAAGGTGCTCCCAT TCTGGCTTTGTTGATTTTCTAGTTCTACATTTCTCCATAGTGGGGGCGGCAATAGCTTGGACTGTCAGGGTGCTGTCGACTTCTGCTGTTGGAATATTTCT CCAGGAAATAG

Окончание таблицы.

O13, O14	ATGAATCCAAAAATATATTTTGAATCTGCTGGGATTAGGGCTTCCTTAATTATTGCCGCTCTGACAGTGCCACATCTCATTGCCACTGTAGGAGTTGAAAG GTTTGGCTTTCTTGCTCTGTCATGGGGGCTTATTGGCTATGCCGGAATACTTGATCTGGGGATAGGTCGAGCTGTTACTCAGAACTCTCCTCTATTTCGTGGC TCTGATGAGGAGATGAATTCATACACAATAATGAGTACAGCTATTCGATCACCAGCATTGTTGGTGGGCTGGGCTTTCCCTGATTATCATATTTGGCCTCCT GGGGGGCGGAGAATTTTTTCCCATAAGATGTCAGTTCGCTTGAGCTAGAATTCTCTGTTTACTATTGGCTTTTGCCTTACCTTTGCAAGCTATAAGTGCTA CCTATAGAGGGGTGAATGAGGCGTATCTCAACTTCAAAGGGATCAACCTCTTACGTATCTTTCTTGGGCGACTAATTTGGTGGTCTTTTCTAGTTTCTTTC TATGCAAAGGATCTTCATTATCTTGTAACTACCCCTTGCTGCTCGGGCTTTGGCTTTCTTTATATTCCGGCGTTTAGCTCATGGAGTACTCAAAGAAACACTG GTGGAGAGAAGTTGCAATATGATCGGCGTCAGGCTGTTGAGTTGTTCCGATTGGTGGTGGGTCAGTGAAGTAGTATAATAATCCTTTTCTTGTTCAGTC CGATAGGTTTTTATTGGTGTATTGCTGCTGTCAGCGGTAACCTCTTATGTAATCCATATGAAATCACTATTCAGTCGATGATCCTTGTGGGTGCTGTTTT CACCGTTGCCCTTCCGTCTATATCAAAATTAATTCGCACTTCTTTGCTGAAGCTCTGGAGTGTTTAATAAATGGCTCTTGCCTGTGCTGTTGATAATGGGAG GAGGGATGCTTTGCCCTGGCTTTTCTTTGGCCTTATTTGAAGTTGTGGGTGGGGGATTATATAGGGGACGACTCTATCAGTGTAGGAAGGATCCTTTGTCT TGGAGTGTTTTCAATGCGTTGGGTGCTATGTTCTATTCTTTCTGCATGCCAACGCCAAGGTGAAAGAACTGCAATTTGCACTCCATAGAGCTACCAATAT TTATCCTCATTTTGATTATCTGATTCCACGGCATGGGATCGTGGGGCGGCTGTGCGTGGTTCGCTGAGAACATTGGCGGATACCATAGTGCTTGCTGTTTT GAGCTATTTTTCAGGCTGGAGAGTGAAATTTGCTAACTGCTAG
----------	---

известном патогене *Salmonella* spp. [24]. При аннотации 20 кластеров О-антигена *P. aeruginosa* из международной базы NCBI ген *wzx* был обнаружен в 17 из 20 последовательностей О-антигена. Остальные гены *wzx* идентифицированы с помощью биоинформатического анализа с помощью программы rps-blast на основе данных белковых доменов синегнойной палочки из международной базы NCBI. По итогам выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *wzx* построена дендрограмма, отражающая степень гомологии его строения внутри 20 О-антигенных структур *P. aeruginosa* (рис. 2).

На наш взгляд, идентифицированные аллельные варианты гена *wzx* могут быть использованы для дифференциации типов О-кластера *P. aeruginosa*, что, в свою очередь, позволяет определять принадлежность к той или иной серогруппе *in silico* (таблица). С этой целью в ранее разработанную программу Pseudomonas Analyser была добавлена возможность поиска выявленных нами аллелей гена *wzx*, что обеспечивает типирование возбудителя синегнойной инфекции по 13 антигенным группам, используя для этого разницу в нуклеотидном строении гена *wzx*.

Стоит отметить, что в широко используемой программе PAST предусмотрено типирование по таким же 13 антигенным группам, которое осуществляется алгоритмическим сопоставлением строения 20 кластеров О-антигена из международной базы NCBI с О-антигеном в анализируемом геноме [22]. Таким образом, определение 13 групп О-кластеров *in silico* происходит только по наличию гена *wzx*, а не по всему набору генов О-антигена *P. aeruginosa*.

В естественной среде ЛПС *P. aeruginosa* характеризуется более разнообразным набором О-антигенов (20), несмотря на одинаковый набор генов. Поэтому мы решили изучить О-антигены более детально (рис. 3). Исходя из анализа данных, было установлено, что часть серотипов имеет большую степень сходства по нуклеотидному составу, но присутствуют минорные отличия в структуре генов О-антигена. Так, к примеру, если сравнить последовательности О5 и О2 серогрупп, то отличия их последовательностей заключаются лишь в полиморфизмах единичных нуклеотидов (SNP) гена *wzy*, на что и была нацелена программа PAST. При этом нами установлено, что часть генов при их трансляции в аминокислотную последовательность имела стоп-кодны, в результате чего белковый продукт был укорочен на 70% от его нормальной аминокислотной последовательности. Это приводило к изменению структуры ЛПС, как следствие, к изменению эпитопов. Так, например, в генном кластере ЛПС *Vibrio cholerae* инактивация гена *wbeT* в результате мутации

приводит к изменению антигенной структуры с биотипа Огава на биотип Инаба [25, 26].

В своем исследовании мы исходили из того, что при полногеномном секвенировании, несмотря на большой прогресс в этой технологии, случаются ошибки прочтений, что ведет за собой выпадение части нуклеотидов или какого-то небольшого участка нуклеотидной последовательности. Поэтому, чтобы повысить возможность типирования большего количества штаммов, мы основывались на вариативности аллелей гена *wzx* для каждого О-антигена или же для группы родственных по своему нуклеотидному составу О-антигенов. Алгоритмы программы PAST дополнительно используют для разделения сходных серогрупп SNP-полиморфизмы, а также сопоставление всего О-кластера, что, как мы считаем, может привести к ошибке при определении серотипа штамма.

Подобранный в нашем исследовании метод позволил увеличить количество типлируемых по серогруппе штаммов *P. aeruginosa*, а также повысить точность и исключить ошибки при секвенировании, что, по нашему мнению, является более надежным методом определения серогруппы.

Для валидации разработанного нами алгоритма использовано 345 геномов из базы NCBI с известными данными о серогруппе, полученными исследователями в ходе типирования штаммов агглютинирующими О-сыворотками.

В ходе сравнения было установлено, что результаты, полученные с помощью программы Pseudomonas Analyser, на 96% совпадают с информацией из базы данных NCBI. Результаты агглютинации О-сыворотками не совпали с результатами серотипирования по *wzx* гену у 15 штаммов из 345. Независимым инструментом для проверки этих 15 штаммов выступила программа PAST, также позволяющая определять серотип, исходя из данных полногеномного секвенирования. В результате проверки геномов выбранных штаммов программой PAST было установлено, что результаты программы PAST совпали с данными из NCBI у 4 штаммов, у 10 штаммов совпали с данными Pseudomonas Analyser, но не с данными NCBI, 1 штамм по результатам не совпал ни с данными PAST, ни с данными из NCBI.

Проанализировать все 345 штаммов с помощью программы PAST, рабочая версия которой находится на сайте «Центра Геномной Эпидемиологии» (<https://cge.food.dtu.dk/services/PAST/>), не представляется возможным ввиду отсутствия возможности пакетной обработки, работы только в онлайн-режиме и усложненной процедуры получения ответа для каждого генома индивидуально. Кроме того, время ответа для

каждого запроса может составлять от 5 до 15 минут. Эти аспекты мы постарались учесть для того, чтобы была возможность проведения оперативного анализа неограниченного числа штаммов.

Таким образом, разработанный нами способ позволяет проводить серотипирование штаммов *P. aeruginosa in silico*, используя данные полногеномного секвенирования на основе выявления различий в строении гена *wzx* внутри О-кластера. Разработанное программное обеспечение является кроссплатформенным, что упрощает анализ и предоставляет возможность неограниченного изучения баз данных, содержащих информацию о полногеномных данных *P. aeruginosa*.

Заключение

В ходе проведенного исследования был проведен анализ О-кластеров различных серогрупп, что позволило выявить среди известных 20 серотипов 13 аллельных вариантов гена *wzx* – одного из ключевых факторов синтеза ЛПС. Найдено 3 новых *wzx* гена О-кластера *P. aeruginosa*. В результате был предложен способ дифференциации серотипов *P. aeruginosa* на основе данных полногеномного секвенирования. По итогам работы ранее созданная программа дополнена возможностью проводить анализ серогруппы по различию в нуклеотидном строении последовательностей гена *wzx* с использованием данных полногеномного секвенирования.

Информация о финансировании

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

Financial support

Whole-genome 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 interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World Health Organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS – J Med Soc.* 2018;32(1):76-77. DOI: 10.4103/jms.jms_25_17
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015 Jul-Aug;21-22:41-59. DOI: 10.1016/j.drug.2015.08.002
- Valero A, Rodríguez-Gascón A, Isla A, Barrasa H, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Susceptibility in Spain: Antimicrobial Activity and Resistance Suppression Evaluation by PK/PD Analysis. *Pharmaceutics.* 2021 Nov 8;13(11):1899. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111899
- Huszczynski SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens.* 2019 Dec 19;9(1):6. DOI: 10.3390/pathogens9010006
- Rocchetta HL, Burrows LL, Lam JS. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63:523-553. DOI: 10.1128/MMBR.63.3.523-553.1999
- Cryz SJ Jr, Pitt TL, Fürer E, Germanier R. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 1984;44:508-513. DOI: 10.1128/iai.44.2.508-513.1984
- Makin SA, Beveridge TJ. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology.* 1996;142 (Pt 2):299-307. DOI: 10.1099/13500872-142-2-299
- Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):2158-60. DOI: 10.1128/JCM.41.5.2158-2160.2003
- Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocincová D. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front Microbiol.* 2011 Jun 1;2:118. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00118
- Liu PV, Wang S. Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 1990 May;28(5):922-5. DOI: 10.1128/jcm.28.5.922-925.1990
- Методические указания: Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями: МУ 3.1.2/4.2.3973-23 (утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю.Поповой 28 декабря 2023), 2023;12,17.
- Penketh A, Pitt T, Roberts D, Hodson ME, Batten JC. The relationship of phenotype changes in *Pseudomonas aeruginosa* to the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1983 May;127(5):605-8. DOI: 10.1164/arrd.1983.127.5.605
- Ojienyi B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. *APMIS Suppl.* 1994;46:1-44.
- Li H, Du Y, Qian C, Li L, Jiang L, Jiang X, et al. Establishment of a suspension array for *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotyping. *J Microbiol Methods.* 2018 Dec;155:59-64. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.11.006
- Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One.* 2009 Nov 13;4(11):e7740. DOI: 10.1371/journal.pone.0007740
- Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 N 1116 (ред. от 15.04.2024) «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» – официальный текст документа [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://e-ecolog.ru/docs/OLqF39eUDURxbJPjFaxud?ysclid=m7ubzuxppu654169838&utm_referrer=https%3A%2F%2Fyandex.ru%2F (дата обращения: 01.07.2024).
- Raymond CK, Sims EH, Kas A, Spencer DH, Kutayav TV, Ivey RG, Zhou Y, Kaul R, Clendenning JB, Olson MV. Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2002 Jul;184(13):3614-22. DOI: 10.1128/JB.184.13.3614-3622.2002
- Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics.* 2007 Mar 15;23(6):673-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm009
- 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 г.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 2000 Aug 31;406(6799):959-64. DOI: 10.1038/35023079
- Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 2006;7(10):R90. DOI: 10.1186/gb-2006-7-10-r90

22. Thrane SW, Taylor VL, Lund O, Lam JS, Jelsbak L. Application of Whole-Genome Sequencing Data for O-Specific Antigen Analysis and In Silico Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. J Clin Microbiol. 2016 Jul;54(7):1782-1788. DOI: 10.1128/JCM.00349-16
23. Islam ST, Fieldhouse RJ, Anderson EM, Taylor VL, Keates RA, Ford RC, et al. A cationic lumen in the Wzx flippase mediates anionic O-antigen subunit translocation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol Microbiol. 2012 Jun;84(6):1165-76. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08084.x
24. Sundaresan S, Rathinavelan T. SSP: An In Silico Tool for Salmonella Species Serotyping Using the Sequences of O-Antigen Biosynthesis Proteins and H-Antigen Filament Proteins. J Mol Biol. 2023 Jul 15;435(14):168046. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.168046
25. Karlsson SL, Ax E, Nygren E, Källgård S, Blomquist M, Ekman A, et al. Development of stable *Vibrio cholerae* O1 Hikojima type vaccine strains co-expressing the Inaba and Ogawa lipopolysaccharide antigens. PLoS One. 2014 Nov 14;9(11):e108521. DOI: 10.1371/journal.pone.0108521
26. Karlsson SL, Thomson N, Mutreja A, Connor T, Sur D, Ali M, et al. Retrospective Analysis of Serotype Switching of *Vibrio cholerae* O1 in a Cholera Endemic Region Shows It Is a Non-random Process. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 5;10(10):e0005044. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005044
27. Thrane SW, Taylor VL, Lund O, Lam JS, Jelsbak L. Application of Whole-Genome Sequencing Data for O-Specific Antigen Analysis and In Silico Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. J Clin Microbiol. 2016 Jul;54(7):1782-1788. DOI: 10.1128/JCM.00349-16
28. Islam ST, Fieldhouse RJ, Anderson EM, Taylor VL, Keates RA, Ford RC, et al. A cationic lumen in the Wzx flippase mediates anionic O-antigen subunit translocation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol Microbiol. 2012 Jun;84(6):1165-76. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08084.x
29. Sundaresan S, Rathinavelan T. SSP: An In Silico Tool for Salmonella Species Serotyping Using the Sequences of O-Antigen Biosynthesis Proteins and H-Antigen Filament Proteins. J Mol Biol. 2023 Jul 15;435(14):168046. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.168046
30. Karlsson SL, Ax E, Nygren E, Källgård S, Blomquist M, Ekman A, et al. Development of stable *Vibrio cholerae* O1 Hikojima type vaccine strains co-expressing the Inaba and Ogawa lipopolysaccharide antigens. PLoS One. 2014 Nov 14;9(11):e108521. DOI: 10.1371/journal.pone.0108521
31. Karlsson SL, Thomson N, Mutreja A, Connor T, Sur D, Ali M, et al. Retrospective Analysis of Serotype Switching of *Vibrio cholerae* O1 in a Cholera Endemic Region Shows It Is a Non-random Process. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 5;10(10):e0005044. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005044
32. sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelei i blagopoluchiya cheloveka, Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom Rossiiskoi Federatsii A.Yu. Popovoi 28 dekabrya 2023), 2023;12,17. (In Russian).
33. Penketh A, Pitt T, Roberts D, Hodson ME, Batten JC. The relationship of phenotype changes in *Pseudomonas aeruginosa* to the clinical condition of patients with cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis. 1983 May;127(5):605-8. DOI: 10.1164/arrd.1983.127.5.605
34. Ojienyi B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. APMIS Suppl. 1994;46:1-44.
35. Li H, Du Y, Qian C, Li L, Jiang L, Jiang X, et al. Establishment of a suspension array for *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotyping. J Microbiol Methods. 2018 Dec;155:59-64. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.11.006
36. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. PLoS One. 2009 Nov 13;4(11):e7740. DOI: 10.1371/journal.pone.0007740
37. Prikaz Rospotrebnadzora ot 01.12.2017 N 1116 (red. ot 15.04.2024) «O sovershenstvovanii sistemy monitoringa, laboratornoy diagnostiki infektsionnykh i parazitarnykh bolezney i indikatsii PBA v Rossiyskoy Federatsii» – ofitsial'nyy tekst dokumenta [Electronic resource]. Available at: https://e-ecolog.ru/docs/OLqF39eUDURxbJPjFaxud?ysclid=m7ubzuoppu654169838&utm_referrer=https%3A%2F%2Fyandex.ru%2F (accessed 01.07.2024). (In Russian).
38. Raymond CK, Sims EH, Kas A, Spencer DH, Kutayav TV, Ivey RG, Zhou Y, Kaul R, Clendenning JB, Olson MV. Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2002 Jul;184(13):3614-22. DOI: 10.1128/JB.184.13.3614-3622.2002
39. Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. Bioinformatics. 2007 Mar 15;23(6):673-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm009
40. Kovalevich AA, Vodopyanov AS, Pisanov RV. Computer program «Pseudomonas Analyser» – a program for analyzing the data of whole – genome se-quencing of the causative agent of pseudomonas infection. Certificate of state registration No. 2023667063 dated 08/09/2023. (In Russian).
41. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000 Aug 31;406(6799):959-64. DOI: 10.1038/35023079
42. Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol. 2006;7(10):R90. DOI: 10.1186/gb-2006-7-10-r90
43. Thrane SW, Taylor VL, Lund O, Lam JS, Jelsbak L. Application of Whole-Genome Sequencing Data for O-Specific Antigen Analysis and In Silico Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. J Clin Microbiol. 2016 Jul;54(7):1782-1788. DOI: 10.1128/JCM.00349-16
44. Islam ST, Fieldhouse RJ, Anderson EM, Taylor VL, Keates RA, Ford RC, et al. A cationic lumen in the Wzx flippase mediates anionic O-antigen subunit translocation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol Microbiol. 2012 Jun;84(6):1165-76. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08084.x
45. Sundaresan S, Rathinavelan T. SSP: An In Silico Tool for Salmonella Species Serotyping Using the Sequences of O-Antigen Biosynthesis Proteins and H-Antigen Filament Proteins. J Mol Biol. 2023 Jul 15;435(14):168046. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.168046
46. Karlsson SL, Ax E, Nygren E, Källgård S, Blomquist M, Ekman A, et al. Development of stable *Vibrio cholerae* O1 Hikojima type vaccine strains co-expressing the Inaba and Ogawa lipopolysaccharide antigens. PLoS One. 2014 Nov 14;9(11):e108521. DOI: 10.1371/journal.pone.0108521
47. Karlsson SL, Thomson N, Mutreja A, Connor T, Sur D, Ali M, et al. Retrospective Analysis of Serotype Switching of *Vibrio cholerae* O1 in a Cholera Endemic Region Shows It Is a Non-random Process. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 5;10(10):e0005044. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005044
48. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World Health Organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. JMS – J Med Soc. 2018;32(1):76-77. DOI: 10.4103/jms.jms_25_17
49. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat. 2015 Jul-Aug;21-22:41-59. DOI: 10.1016/j.drug.2015.08.002
50. Valero A, Rodríguez-Gascón A, Isla A, Barrasa H, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Susceptibility in Spain: Antimicrobial Activity and Resistance Suppression Evaluation by PK/PD Analysis. Pharmaceutics. 2021 Nov 8;13(11):1899. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111899
51. Husczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. Pathogens. 2019 Dec 19;9(1):6. DOI: 10.3390/pathogens9010006
52. Rocchetta HL, Burrows LL, Lam JS. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev. 1999;63:523-553. DOI: 10.1128/MMBR.63.3.523-553.1999
53. Cryz SJ Jr, Pitt TL, Fürer E, Germanier R. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 1984;44:508-513. DOI: 10.1128/iai.44.2.508-513.1984
54. Makin SA, Beveridge TJ. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. Microbiology. 1996;142 (Pt 2):299-307. DOI: 10.1099/13500872-142-2-299
55. Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2003 May;41(5):2158-60. DOI: 10.1128/JCM.41.5.2158-2160.2003
56. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocincová D. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. Front Microbiol. 2011 Jun 1;2:118. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00118
57. Liu PV, Wang S. Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 1990 May;28(5):922-5. DOI: 10.1128/jcm.28.5.922-925.1990
58. Metodicheskie ukazaniya: Epidemiologicheskii nadzor za vnebol'nichnymi pnevmoniyami: MU 3.1.2/4.2.3973-23 (utverzhdeny rukovoditelem Federal'noi

Информация о соавторах:

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7178-8021

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
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Information about co-authors:

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, leading researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7178-8021

Alexey S. Vodopyanov, PhD, MD, leading researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9056-3231

НОВОСТИ НАУКИ

Растущая угроза туляремии в центральной части США

Ученые из Центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) изучили демографические закономерности, географическое распределение и тенденции заболеваемости туляремией, вызываемым *Francisella tularensis*.

В исследовании использовались данные надзора за туляремией, с 2011 по 2022 год.

Анализ географического распределения включал картографирование на уровне округов, в то время как демографические данные были сосредоточены на возрасте, поле, расе и этнической принадлежности.

Исследование показало, что заболеваемость туляремией в США выросла на 56% в период с 2011 по 2022 год по сравнению с предыдущим десятилетием. Всего за этот период было зарегистрировано 2462 случая, из которых 40% были классифицированы как подтвержденные, а 60% как вероятные. Увеличение вероятных случаев частично объясняется достижениями в диагностических методах, такими как переход на иммуноферментный анализ (ИФА), который более чувствителен, но менее специфичен, чем более ранние тесты на агглютинацию.

Годовые показатели заболеваемости варьировались от 0,041 до 0,064 на 100 000 населения, с заметными географическими и демографическими различиями. На четыре центральных штата – Арканзас, Миссури, Канзас и Оклахома – пришлось половина всех случаев, что указывает на концентрацию инфекций в этих регионах. Дети в возрасте от 5 до 9 лет и мужчины в возрасте от 65 до 84 лет продемонстрировали самые высокие показатели заболеваемости по возрасту.

У американских индейцев или коренных жителей Аляски показатели были примерно в пять раз выше, чем у белых, что указывает на значительные различия в состоянии здоровья.



Rich SN, Hinckley AF, Earley A, Petersen JM, Mead PS, Kugeler KJ.
Tularemia – United States, 2011–2022.

MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2025 Jan 2;73(5152):1152–1156. DOI: 10.15585/mmwr.mm735152a1