

DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108746>

Лабораторная диагностика псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза

М.В. Чеснокова¹, В.Т. Климов¹, Т.В. Каримова², Т.Ю. Загоскина¹, А.Л. Панин³¹ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Российская Федерация² Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, Новосибирск, Российская Федерация³ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Энтеропатогенные виды *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* имеют большое значение во всём мире в связи с их способностью выживать и сохранять патогенные свойства в биотической и абиотической окружающей среде. Они способны вызывать заболевания спорадического и вспышечного характера. Именно поэтому крайне важным является использование современных методов диагностики заболеваний, обусловленных этими возбудителями.

В статье проанализированы методы лабораторной диагностики энтеропатогенных иерсиний (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*), включающие бактериологический, серологический и молекулярно-генетический. Приведены современные сведения применения метода полимеразной цепной реакции, масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS), дот-иммуноанализа. Приведена схема оптимального протокола обнаружения и идентификации иерсиний.

Сочетание классического микробиологического и молекулярно-генетического методов оперативно определяет наличие или отсутствие патогена в образце, что позволяет целенаправленно использовать бактериологическое исследование для верификации клинического диагноза, подтверждения факторов передачи и планирования противоэпидемических мероприятий.

Ключевые слова: обзор; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Yersinia enterocolitica*; лабораторная диагностика.

Как цитировать

Чеснокова М.В., Климов В.Т., Каримова Т.В., Загоскина Т.Ю., Панин А.Л. Лабораторная диагностика псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2021. Т. 26, № 5. С. 224–237. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108746>

DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108746>

Laboratory diagnosis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*

Margarita V. Chesnokova¹, Valeriy T. Klimov¹, Tatiana V. Karimova², Tatiana Yu. Zagoskina¹, Alexander L. Panin³

¹ Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

² Administration of Rospotrebnadzor in Novosibirsk Region, Novosibirsk, Russian Federation

³ Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russian Federation

ABSTRACT

Enteropathogenic species *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* are of great importance worldwide due to their ability to survive and preserve pathogenic properties in biotic and abiotic environments. They can cause sporadic and flare-up diseases. Therefore, it is extremely important to use modern methods of diagnosing diseases caused by these pathogens.

The article analyzes the methods of laboratory diagnostics of enteropathogenic *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*), including bacteriological, serological and molecular genetic. Modern data on the use of the polymerase chain reaction method, mass spectrometry (MALDI-TOF MS), dot immunoassay are presented. The scheme of the optimal protocol for the detection and identification of *Yersinia* is given.

The combination of classical microbiological and molecular genetic methods quickly determines the presence or absence of a pathogen in a sample, which allows the bacteriological study to be purposefully used to verify the clinical diagnosis, confirm transmission factors and plan anti-epidemic measures.

Keywords: review; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Yersinia enterocolitica*; laboratory diagnostics.

To cite this article

Chesnokova MV, Klimov VT, Karimova TV, Zagoskina TYu, Panin AL. Laboratory diagnosis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2021;26(5):224–237. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID108746>

Received: 15.06.2022

Accepted: 01.07.2022

Published: 23.07.2022

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИЯХ

Энтеропатогенные иерсинии, относящиеся к семейству Yersiniaceae и роду *Yersinia*, являются возбудителями псевдотуберкулёза (*Yersinia pseudotuberculosis*) и кишечного иерсиниоза (*Yersinia enterocolitica*) [1]. Эти два вида имеют широкое распространение во всём мире, особенно в странах с умеренным и холодным климатом. Иерсиниозы проявляются в виде спорадической, групповой заболеваемости или эпидемических вспышек. Эпидемиология псевдотуберкулёза характеризуется вспышечной заболеваемостью, из них наиболее крупные зарегистрированы в Российской Федерации (Сибирь, Дальний Восток), Японии и Финляндии [2]. Ежегодно в Российской Федерации фиксируется более 800 тыс. случаев заражения, показатель заболеваемости составляет 0,58 на 100 тыс. населения (в промилле, ‰).

В отличие от псевдотуберкулёза, кишечный иерсиниоз более широко распространён в мире, а в европейских странах с высокоразвитой пищевой индустрией занимает третье место после сальмонеллёза и кампилобактериоза, однако чаще всего выявляется в виде спорадических случаев. Так, заболеваемость во Франции составляет 16,0‰ на 100 тыс. населения, в Европе — 1,6‰, в США — 0,3‰ [3], в России — 1,1‰ (данные 2014–2018 гг.), однако эти показатели не отражают истинного положения дел. Начиная с 1972 года в литературе описан ряд эпидемических вспышек кишечного иерсиниоза, зарегистрированных в Японии, США, Индии, Норвегии.

Псевдотуберкулёз и кишечный иерсиниоз классифицируются как природноочаговые сапрозоонозы, резервуаром которых служат мелкие млекопитающие (дикие и синантропные грызуны), сельскохозяйственные и домашние животные (крупный рогатый скот, свиньи, собаки, кошки). Механизм передачи энтеропатогенных иерсиний — фекально-оральный, который при псевдотуберкулёзе реализуется через загрязнённые выделениями грызунов продукты растительного, а при кишечном иерсиниозе — животного происхождения, употребляемых в пищу в сыром или недостаточно термически обработанном виде.

Как психрофильный микроорганизм *Yersinia* способны размножаться при температуре +4...+10°C, накапливаться в продуктах при длительном хранении [4], обуславливая их потенциальную биологическую опасность для человека. Частота обнаружения патогенных *Y. enterocolitica* в свином мясе составляет 15,2%, в свиных субпродуктах — 67–83%, курином мясе — 32,5%, говяжьим мясе и фарше — от 10 до 47%, в овощных салатах и воде — от 3 до 15% [5]. Достоверно установлены факты передачи *Y. enterocolitica* при употреблении молочного шоколадного напитка [6], молока, соевого сыра тофу [7], воды, пахты [8], свиного мяса [9].

В России, в период неблагоприятной эпидемиологической ситуации на Дальнем Востоке, выявлен высокий процент инфицированности *Y. pseudotuberculosis* сырых

овощей — капусты (37,5%), репчатого лука (26,7%), моркови (30,9%), причём возбудитель накапливался на овощах при их хранении с осени до зимы [10]. Показано, что заражение детей псевдотуберкулёзом в 75,6% осуществлялось именно через свежие овощи, употребляемые в виде овощного салата и винегрета, в состав которых чаще всего входили белокочанная капуста и/или репчатый лук. Несмотря на преобладающее выделение псевдотуберкулёзного микроба с овощей и корнеплодов, исследованиями, проведёнными в Эстонии, Латвии и Ленинградской области в период с 2004 по 2007 г., выявлено от 1,5 до 7% инфицированных *Y. pseudotuberculosis* O:3 серовара свиней, что указывало на наличие дополнительного резервуара возбудителя псевдотуберкулёзной инфекции [11].

Вид *Y. pseudotuberculosis* биохимически однороден. Однако установлено, что западноевропейские изоляты возбудителя (Евразия, Северная и Южная Америка, Австралия) не ферментируют мелибиозу, в то время как азиатские штаммы, выделенные в Японии и России, ферментируют указанный дисахарид. В настоящее время известно, что из 21 серологического варианта *Y. pseudotuberculosis* одиннадцать сероваров (O:1a; O:1b; O:1c; O:2a; O:2b; O:2c; O:3; O:4a; O:4b; O:5a; O:5b) имеют значение в патологии человека, а остальные (O:6; O:7; O:8; O:9; O:10; O:11; O:12; O:13; O:14; O:15) выделяются только от мелких млекопитающих и из объектов окружающей среды и никогда не обнаруживаются у больных, в связи с чем эти серовары, по-видимому, могут быть отнесены к сапрофитным формам *Y. pseudotuberculosis* [12].

Установлена генетическая неоднородность штаммов *Y. pseudotuberculosis*, изолированных на территориях Северо-Западного, Сибирского и Дальневосточного регионов России, а также Японии и стран Европы, по наличию суперантигена YPMa, «острова высокой патогенности» HPI, пилей адгезии YAPI и плазмиды pVM 82 MDa, что определяет форму заболевания по тяжести клинического течения с определённым симптомокомплексом [12].

Вид *Y. enterocolitica* классифицируется по 6 биохимическим типам (1A; 1B; 2; 3; 4; 5), различающимся по ферментации трегалозы, ксилозы, эскулину/салицину, наличию индола и липазы. Патогенный потенциал возбудителя неоднороден. *Y. enterocolitica* биотипов 1B, 2–5 являются патогенными, в них всегда обнаруживаются ген термостабильного энтеротоксина *ystA*, плаزمиды вирулентности pYV 42–47 MDa и ген адгезии-инвазии *ail*. До сих пор нет однозначного мнения о патогенности *Y. enterocolitica* биотипа 1A. Несмотря на то, что этот микроорганизм не имеет вышеперечисленных маркеров вирулентности, некоторые штаммы *Y. enterocolitica* биотипа 1A способны вызывать случаи диареи у людей и даже небольшие вспышки. Нами показано, что у 81,3% штаммов *Y. enterocolitica* 1A присутствует ген *ystB* термостабильного токсина YSTb, в том числе и у всех штаммов, изолированных от больных с выраженной клинической симптоматикой энтерита и энтероколита. Биотипы *Y. enterocolitica* включают в себя

34 серологических группы, однако заболевание человека вызывает ограниченное число штаммов, относящихся к патогенным *Y. enterocolitica* серотипам/биотипам: O:3/4; O:3/3; O:5; 27/2; O:8/1b; O:9/2 и O:13. В исследованиях ряда авторов показана географическая неоднородность циркуляции патогенных кишечных иерсиний. Самыми распространёнными серотипами в странах Европы (90%) являются O:3 и O:9, в Японии — O:3/3 [12], в США — O:8/1b; O:3/4 и O:5, 27/2, в Сибири и на Дальнем Востоке РФ — O:3 (0,41–5,84%).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИЙ

Для обнаружения *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в настоящее время используются культуральные, серологические и молекулярно-генетические методы. Культуральный (бактериологический) метод является золотым стандартом, поскольку позволяет выделить чистую культуру и изучить её биологические и молекулярно-генетические свойства. Метод включает ряд процедур:

- 1) взятие материала, транспортировку и прямой посев;
- 2) селективное обогащение на жидких питательных средах, или холодное обогащение и щелочную обработку;
- 3) выделение чистой культуры на дифференциально-диагностических средах;
- 4) идентификацию и дифференциацию изолятов с использованием биохимических, серологических и молекулярно-генетических тестов.

Взятие материала, транспортировка и прямой посев

Биологический материал, пробы пищевых продуктов и образцы объектов окружающей среды отбираются согласно стандартным микробиологическим процедурам в герметические контейнеры с забуференным физиологическим раствором (рН 7,6) в соотношении 1:10. Вид исследуемого материала, его количество, сроки и правила взятия регламентируются нормативно-методическим документом (в России МУ 4.2.3019-12¹). Эффективность изоляции иерсиний повышается при увеличении объёма и количества отобранных проб, фильтровании образцов воды через мембранные фильтры.

Прямой высеv исследуемого материала обычно малоэффективен из-за обильного роста посторонней микрофлоры, хотя может иметь положительный эффект при исследовании копрофильнатов больных во время фазы острого гастроэнтерита при кишечном иерсиниозе [13], при исследовании паренхиматозных органов.

Селективное обогащение на жидких питательных средах

В качестве сред накопления используют забуференный физиологический раствор, 1% забуференную пептонную воду, буферно-казеиново-дрожжевую и пептонно-калиевую среду. Последняя превосходит буферно-казеиново-дрожжевую по частоте выделения и скорости накопления иерсиний и хорошо себя зарекомендовала при исследовании не только материала от больных, но и пищевых продуктов, воды и объектов окружающей среды. По данным зарубежных авторов [14], для ускорения процесса роста микроорганизмов в забуференный пептонный раствор добавляют сорбитол/маннит 1% и соли желчных кислот 0,15% (желчный бульон с сорбитом — sorbitol peptone broth and bile salts, PSB).

Некоторые исследователи добивались повышения селективности сред путём специальных добавок к бульонам и высокой температуры инкубации. В частности, бульон с иргазаном, тетрациклином и хлоратом калия (среда irgasan tetracycline and potassium chlorate broth, ITC), модифицированный бульон Раппопорт с малахитовой зеленью, карбенициллином и хлоридом натрия (среда malachite green broth, MRB) использовали специально для изоляции *Y. enterocolitica* O:3/4 в пищевых продуктах, термостатируя исследуемый материал при 25–30°C в течение 2–4 дней [15, 16]. Среда с полимиксином и новобиоцином (бульон триптиказеино-соевый — trypticasein soy broth, TSB) при инкубации в течение 3 дней при 18°C применялась для изоляции *Y. enterocolitica* O:3 из молока [14]. Использование среды с содержанием желчи, оксалатов и сорбозы (bile-oxalate-sorbose, BOS) увеличивало высеваемость *Y. enterocolitica* 1B/O:8 из клинического материала [17, 18]. Н. Fukushima и соавт. (1995) [18] для селективного выделения *Y. pseudotuberculosis* и патогенных *Y. enterocolitica* из проб воды предлагали использовать клетки HeLa, способные адгезировать на своей поверхности патогенные иерсинии, а Е. Koujitan и соавт. (2006) [19] для изоляции *Y. enterocolitica* O:8 применяли метод иммуномагнитного разделения с антииерсиниозными антителами.

Холодовое обогащение и щелочная обработка

В связи с уникальной возможностью *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* размножаться в условиях низких температур на минимальных средах J.S. Peterson и R.A. Cook (1963) предложили для выделения возбудителя использовать метод «холодового обогащения», при котором исследуемый материал выдерживается в накопительной среде в холодильнике при +4...+10°C от 8 дней до 3 нед с периодическими высевами на плотные питательные среды на 3, 7, 14 (материал от больных) и 21-е сут (материал из объектов окружающей среды), что позволяет повысить высеваемость иерсиний [20]. Недостатком данного метода служит значительное размножение непатогенных *Y. enterocolitica* и других психрофильных микроорганизмов в течение длительного (21 день) инкубационного периода,

¹ МУК 4.2.3019-12. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200104594>. Дата обращения: 15.04.2021.

что затрудняет изоляцию энтеропатогенных иерсиний. В связи с этим С.С. Aulisio и соавт. (1980) [21] и Н. Fukushima и соавт. (1985) [22] предлагают непосредственно перед высевом проводить щелочную обработку проб, при которой ввиду резистентности *Yersinia* к щёлочи можно избавиться от посторонней микрофлоры. Щелочная обработка проводится с третьего дня холододового обогащения путём смешивания 0,5 мл исследуемого материала с 0,5 мл 0,72% KOH (гидроокись калия) на 0,54% NaCl (хлорид натрия) в течение 30 сек, в результате чего подавляется рост микроорганизмов, таких как *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*.

Выделение чистой культуры на дифференциально-диагностических средах

Для изоляции *Y. enterocolitica* за рубежом широко используют питательные среды: агар Мак-Конки (MacConkey agar base), цефсулодин-иргазан-новобициновая среда (cefsulodin-irgazan-novobiocin, CIN агар, Difco, Oxoid) и Salmonella-Shigella дезоксихолатный агар (SSDC), которые включены в протоколы Международной организации по стандартизации (International Organization for Standardization, ISO, 10273:2003), Комитета северных стран по анализу пищевых продуктов (Nordic Committee on Food Analysis, NCFCA, 117:1996) и Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA, 2007) [16]. Для дифференциации патогенных и авирулентных *Y. enterocolitica* применяют CIN агар, содержащий 0,1% эфирных масел и 0,05% цитрата железа (VYE агар) [22], или хромогенную среду с целлобиозой (YeCM) [23]. Что касается *Y. pseudotuberculosis*, то наиболее приемлемой питательной средой считают CIN агар и Мак-Конки.

В России в качестве дифференциально-диагностических сред применяют среду Эндо, однако работа с этой средой требует высокого профессионализма бактериолога ввиду обильного роста посторонней микрофлоры и затруднения дифференциации колоний иерсиний от других энтеробактерий, поэтому исследуемый материал рекомендуется подвергать щелочной обработке. Отдельными отечественными авторами [24] проводились исследования по усовершенствованию питательных сред с целью ускорения скорости роста и возможности дифференциации иерсиний, в первую очередь *Y. pseudotuberculosis*, от других бактерий, так как именно этот возбудитель с конца 60-х годов вызывал массовые эпидемические вспышки на Дальнем Востоке. С 1998 года осуществляется промышленный выпуск среды СБТС (Питательная среда для выделения возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза, сухая, производства ГНЦПМ, п. Оболенск), входящей в российский стандарт лабораторной диагностики иерсиниозов МУ 4.2.3019-12².

² МУК 4.2.3019-12. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном

Результативность бактериологического метода зависит от интенсивности эпидемического процесса, периода заболевания, исследуемого биологического субстрата и применяемых питательных сред. Культуры *Y. pseudotuberculosis* чаще (55,4±6,6%) выделяли в период вспышек, в сравнении со спорадическими случаями заболевания (7,5±2,0%) [10]. Значительно легче удавалось изолировать возбудителя от больных и носителей (например, свиней), чем из объектов окружающей среды и пищевых продуктов, поскольку при инфекционном процессе возбудитель псевдотуберкулёза является доминирующим [16]. Максимальное число изолятов регистрировалось при исследовании копрофильтратов в течение всего периода болезни [25]. Н. Fukushima и соавт. (1985) [22] показали, что выделение возбудителя через кишечник отмечалось в течение 10–14 дней в количестве 10⁵–10⁸ м.к./г, затем высеваемость патогена снижалась до 10⁴–10⁶ м.к./г, на 28–30-й дни болезни микроорганизм обнаруживался в копрофильtrate в количестве 10² м.к./г, т.е. бактериологическое исследование сывороток крови целесообразно проводить только в период лихорадки. Г.Я. Ценева и соавт. (1993) [24] показали, что при параллельном высеве материала от больных псевдотуберкулёзом и острыми кишечными заболеваниями на среды Серова, Эндо, Мак-Конки и дезоксихолатный агар, преимущество по выделению иерсиний имеют среда Мак-Конки (4,7%) и дезоксихолатный агар (5,2%), менее эффективны среды Серова (3,8%) и Эндо (3,3%). По данным авторов, при исследовании копрофильтратов больных частота выделения *Y. pseudotuberculosis* на среде с бромтимоловым синим составила 27,2%, при анализе тонких кишечников мелких млекопитающих — 5,6%. Высеваемость возбудителя на указанной среде со смывов с объектов окружающей среды, по данным М.В. Чесноковой и соавт. (1993) [10], составила 0,9%. Изоляция *Y. enterocolitica* из свиных миндалин на CIN агаре установлена в пределах 27,5–65,2%, на среде Мак-Конки — 42,3%, исследование свиного мяса на CIN агаре дало положительный результат в 3,9% случаев [16, 26].

Идентификация и дифференциация чистых культур иерсиний

Yersinia spp. — полиморфные грамтрицательные палочки, при росте на плотных питательных средах обладают типичной морфологией. Оксидазонегативные и уреазоположительные колонии идентифицируют по набору биохимических тестов, основными из которых являются ферментативная активность (сахароза, рамноза, рафиноза, мелибиоза), подвижность, реакция Фогеса–Проскауэра, декарбоксилирование аминокислот (орнитиндекарбоксилаза), дезаминирование фенилаланина и индолообразование. Предложенные тесты позволяют в комплексе чётко провести идентификацию и дифференциацию видов иерсиний (табл. 1).

и федеральном уровнях. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200104594>. Дата обращения: 15.04.2021.

Таблица 1. Основные биохимические свойства бактерий рода *Yersinia* (26 ± 2)°C
Table 1. Main biochemical characteristics of bacteria of the *Yersinia* species (26 ± 2)°C

| Тест или субстрат | <i>Y. pestis</i> | <i>Y. pseudotuberculosis</i> | | | | | | <i>Y. frederiksenii</i> | <i>Y. intermedia</i> | <i>Y. kristensenii</i> | <i>Y. ruckeri</i> | <i>Y. aldovae</i> | <i>Y. rohdei</i> | <i>Y. mollaretii</i> | <i>Y. bercovieri</i> | <i>Y. aleksiciae</i> | <i>Y. wautersii</i> |
|-----------------------------|------------------|------------------------------|----|-----|----|---|---|-------------------------|----------------------|------------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | | <i>Y. enterocolitica</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | Биотипы | | | | | | | | | | | | | | | |
| | IA | IB | II | III | IV | V | | | | | | | | | | | |
| Гидролиз мочевины | - | + | + | + | + | + | + | [+] | [+] | - | [+] | [+] | B | [-] | B | + | + |
| Образование индола | - | + | + | B | - | - | - | + | B | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Подвижность (22 ± 2)°C | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | B | + | + | + | + | + | + |
| (37 ± 1)°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (26 ± 2)°C | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (37 ± 1)°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Реакция Фогеса-Проскауэра | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Фенилаланиндезаминаза | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Орнитиндекарбоксилаза | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | B | + | [+] | [+] | + | + | - |
| Лизиндекарбоксилаза | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Липаза (Твин-80) | - | + | + | - | - | - | - | B | B | B | B | - | - | - | - | - | - |
| Цитрат Симмонса | - | - | - | - | - | - | - | B | B | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Гидролиз эскулина | B | + | + | - | - | - | - | B | B | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Образование кислот: | | | | | | | | [+] | + | - | - | - | - | - | [-] | + | + |
| • из D-ксилозы | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | B | B | B | + | + | + | + |
| • мальтозы | [+] | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | B | + | + | + | + |
| • мелибиозы | [-] | B | - | - | - | - | - | + | + | - | - | B | - | - | - | - | - |
| • L-рамнозы | - | B | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| • рафинозы | - | [-] | - | - | - | - | - | B | B | - | - | B | - | - | - | - | + |
| • салицина | B | [-] | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | [-] | [-] | - | - | - |
| • сахарозы | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | [-] | + | + | + | + | + | - |
| • D-сорбитола | B | - | + | + | + | + | + | + | + | B | B | + | + | + | + | + | - |
| • трегалозы | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Примечание. «+» — положительная реакция у $\geq 90\%$ штаммов; «+» — положительная реакция у 76–89% штаммов; B — положительная реакция у 26–75% штаммов; «-» — отрицательная реакция у $\geq 90\%$ штаммов; «-» — отрицательная реакция у 11–25% штаммов; «-» — отрицательная реакция у 26–75% штаммов.

Note: «+» — positive reaction with more 90% of strains; «+» — positive reaction with 76–89% of strains; B — positive reaction with 26–75% of strains; «-» — negative reaction with more 90% of strains; «-» — negative reaction with 11–25% of strains; «-» — negative reaction with 26–75% of strains.

Таблица 2. Биотипирование *Yersinia enterocolitica* (28°C, 24 ч)

Table 2. Biotyping of *Yersinia enterocolitica* (28°C, 24 h)

| Реакция | Биотипы | | | | | |
|---------------------|---------|----|---|---|---|---|
| | 1А | 1В | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Салицин | + | - | - | - | - | - |
| Лецитиназа (липаза) | + | + | - | - | - | - |
| Индол | + | + | + | - | - | - |
| Ксилоза | + | + | + | + | - | - |
| Трегалоза | + | + | + | + | + | - |

Описаны случаи выделения штаммов *Y. enterocolitica* с отрицательной реакцией Фогеса–Проскауэра и/или не ферментирующие сахарозу [26], а также мелибиоза-негативные штаммы *Y. pseudotuberculosis* [12]. Установлены трудности дифференциации *Y. pseudotuberculosis* от штаммов *Yersinia similis* и *Yersinia pekkanenii* в связи с аналогичными результатами биохимических тестов [27]. В этом случае идентификация может быть проведена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или методом ДНК-гибридизации. Традиционно для идентификации *Y. pseudotuberculosis* и дифференциации его от других энтеробактерий применяют псевдотуберкулёзный бактериофаг. Однако в ряде случаев отмечается отсутствие фаголизиса свежeweделенных штаммов *Y. pseudotuberculosis* на питательных средах с повышенным содержанием NaCl (0,6–0,7%). Наиболее высокая чувствительность псевдотуберкулёзного микроба к специфическому бактериофагу (93,7%) отмечена на среде с содержанием 0,3% NaCl и наличием фосфатно-щелочной буферной системы.

В качестве экспрессных методов идентификации микроорганизмов всё большее применение находят API-тест-системы и биохимические автоматизированные анализаторы. Показано, что при исследовании 105 клинических изолятов *Yersinia* spp., инкубированных при 28°C, процент совпадений пробирочных биохимических тестов с идентификацией в тест-системе API 20E составил 93%. Исследование 212 изолятов 10 видов *Yersinia* с помощью автоматизированной системы для биохимической идентификации Vitek GNI позволило подтвердить правильность идентификации до рода в 96,3%, до вида — в 57,4% изолятов от входящих в базу данных Vitek GNI [28, 29].

БИО- И СЕРОТИПИРОВАНИЕ ИЕРСИНИЙ

Биотипирование *Y. enterocolitica* определяют с помощью обычных биохимических тестов, представленных в табл. 2.

Серологическое типирование изолятов, связанных с заболеваниями человека, проводят с помощью реакции агглютинации на стекле с использованием коммерческих

типоспецифических O-антисывороток к наиболее распространённым серотипам O:3; O:5; O:9 и O:8 для *Y. enterocolitica* (Denka Seiken, Токио, Япония) и O:1–O:6 для *Y. pseudotuberculosis* (Denka Seiken) [20]. В России эти сыворотки выпускает Санкт-Петербургский институт имени Пастера. Альтернативным серотипированию *Y. pseudotuberculosis* методом считается O-генотипирование 21 сероварианта этого возбудителя с использованием схемы на основе ПЦР [30].

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННОСТИ ИЕРСИНИЙ

Для оценки патогенности необходимо учитывать, что все *Y. pseudotuberculosis*, но не все *Y. enterocolitica* считаются потенциально патогенными. В связи с этим определение маркеров вирулентности позволяет провести дифференциацию вирулентных *Y. enterocolitica*, имеющих эпидемиологическое значение, от авирулентных. Вирулентные иерсинии содержат родоспецифическую плазмиду вирулентности pYV 42–48 MDa, кодирующую белки наружной мембраны Yad A, способствующие адгезии и инвазии бактерий, а также белки Yops, которые участвуют в подавлении фагоцитарной активности клеток иммунной системы хозяина, размножении бактерий в пейеровых бляшках и лимфоидной ткани. Плазмиды pYV 42–48 MDa имеется у всех свежeweделенных штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, относящихся к биотипам 1В-5. Наличие плазмиды ассоциируется с выявлением маркеров патогенности: аутоагглютинацией на бульоне Хоттингера при 35–37°C [31], ограниченным ростом на средах с дефицитом кальция при 35–37°C и связыванием конго красного или кристаллического фиолетового при 35–37°C [32]; способностью вызывать гнойный кератоконъюнктивит у морских свинок (тест Sereny) через 48–72 ч после инфицирования глаз [33], летальностью для биопробных мышей при оральном, внутрибрюшинном или внутривенном пути заражения. Для оценки вирулентных свойств иерсиний представляет интерес пиразинаминазный тест, позволяющий по отсутствию пиразин-карбоксилазной активности дифференцировать патогенные *Y. enterocolitica*. Вместе

с тем в практических лабораториях для выявления белков наружной мембраны (Yad A), детерминированных плазмидой pYV, используется реакция агглютинации на стекле с диагностической сывороткой к вирулентным иерсиниям, выпускаемой НИИЗМ имени Пастера.

ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ИЕРСИНИЙ

В 80–90-е годы в Российской Федерации проводились широкие научные исследования по разработке и апробации ряда диагностических тест-систем: гемагглютинационных (РНГА, РТНГА), агглютинационных (реакции коагглютинации и латекс-агглютинации) и твердофазных иммунохимических (иммуоферментный анализ), обладающих определённой эффективностью, но не нашедших широкого практического применения ввиду отсутствия сертифицированных тест-систем.

В настоящее время для экспрессного выявления и последующей идентификации возбудителей энтеропатогенных иерсиний используют метод флуоресцирующих антител и ПЦР. Чувствительность метода флуоресцирующих антител составляет 10^5 – 10^6 м.к./мл, время постановки — 1,5–2 ч. Оптимальные сроки исследования всех видов материала от больных — первые 3–5 дней болезни, трупов мелких млекопитающих — первые часы после гибели, смывов из объектов окружающей среды — по эпидпоказателям. Для проведения анализа необходимо иметь люминесцентный микроскоп и лиофилизат для диагностических целей (Иммуноглобулины диагностические псевдотуберкулёзные люминесцирующие; РосНИПЧИ «Микроб», Саратов).

ПЦР — быстрому и надёжному методу обнаружения энтеропатогенных иерсиний в клиническом материале, пищевых продуктах и в воде [34, 35] — отводится первоочередное значение, поскольку данный метод отличается высокой чувствительностью (10^2 – 10^3 м.к./мл), специфичностью и экспрессивностью (5–6 ч). ПЦР позволяет выявлять специфические генетические детерминанты патогенности иерсиний. Все вирулентные энтеропатогенные иерсинии содержат гены *virF* и *yadA*, локализованные на плазмиде [36]. Существенным хромосомным фактором вирулентности для *Y. pseudotuberculosis* служат гены инвазивности *inv* [37], *ail* [38] или *lcrF*, для *Y. enterocolitica* — гены *ail* [39], энтеротоксин *ystA* и *rfbC* [40].

Используя мишеневые гены, в настоящее время разработаны несколько вариантов ПЦР для детекции *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в клиническом материале, объектах окружающей среды, пищевых продуктах: однопраймерная ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации [41], вложенная ПЦР (nested PCR) [42], ПЦР в режиме реального времени (real-time TaqMan и SYBR Green) [38, 43], мультиплексная ПЦР в режиме реального времени с одновременной детекцией в одной пробирке двух патогенов

(*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) [43, 44]. ПЦР в режиме реального времени (real-time Tag-man, SYBR Green) наиболее предпочтительна из-за более быстрого получения ответа, отсутствия ряда этапов обработки и подготовки проб с целью их концентрирования, и т.д. Этот метод позволяет не только идентифицировать возбудителя, но и определять его количество в пробе. При реализации мультиплексной ПЦР с использованием комбинации праймеров на плазмидные и хромосомные гены следует учитывать возможность одновременного обнаружения в материале энтеропатогенных иерсиний, имеющих и не имеющих плазмиду pYV (pYV+ и pYV-). Элиминация этой плазмиды легко происходит на питательных средах под влиянием антибиотиков (новобиоцина) и повышения температуры инкубирования до 37°C. W.J. Wannet и соавт. [41] предложили использовать праймеры на ген *16S* РНК, определяющий видоспецифичность *Y. enterocolitica*, и на ген *ail*, определяющий механизм прикрепления (инвазии) микроба к клеткам лимфоидной ткани тонкого кишечника. Мультиплексная ПЦР в таком варианте определяет как патогенные (ампликоны 425 нуклеотидных пар для *ail* и 330 нуклеотидных пар для *16S* РНК), так и непатогенные (один ампликон размером 330 нуклеотидных пар для гена *16S* РНК) *Y. enterocolitica*.

Несмотря на то, что чувствительность метода ПЦР исключительно высока при анализе чистых культур, она снижается при исследовании проб из объектов окружающей среды, клинического материала, пищевых продуктов; кроме того, возможна регистрация ложноотрицательных результатов при наличии в образце ингибиторов реакции (биологические агенты деградации тканей, ферменты, полисахариды и другие компоненты исследуемого материала) [45]. Именно поэтому для успешной ПЦР-диагностики обязательным условием является предварительная подготовка материала, направленная на получение тотальной ДНК и удаление или нейтрализацию ингибиторов.

Пробоподготовка может включать обогащение, разбавление, фильтрацию, центрифугирование, адсорбцию, седиментацию, флотацию анализируемого материала. Обогащение используется всегда на первом этапе обработки пробы для увеличения количества живых иерсиний. Испражнения, образцы пищевых продуктов, почвы необходимо суспендировать в забуференном физиологическом растворе или жидких средах для уменьшения действия ингибиторов и ДНК фоновых микроорганизмов. Центрифугирование на малых оборотах обычно используют для удаления грубых частиц (матрикса) с пищевых продуктов, испражнений, почвы и т.п., тогда как высокоскоростное (>5000 об/мин) центрифугирование необходимо для концентрации живых клеток и удаления ингибиторных компонентов. Фильтрация может быть использована для концентрации энтеропатогенных иерсиний из водных образцов. Для подготовки проб испражнений и смывов с объектов окружающей среды

разработан способ, основанный на использовании щелочной обработки материала, при которой большая часть индигенной микрофлоры погибает и удаляется в виде супернатанта при центрифугировании, а относительно устойчивые к щелочи иерсинии выживают. При исследовании бактериальных взвесей чаще всего используется ДНК-экстракция образца в форме простого прогревания при 100°C. В литературе описаны методы пробоподготовки крови, мочи, воды, почвы [37], основанные на лизисе бактериальных клеток (обычно в растворе 7М гуанидин-изотиоционата или 2% растворе натрия додецилсульфата), с последующей сорбцией ДНК на носителе (суспензия SiO₂), отмывкой от ингибирующих компонентов и элюцией ДНК. Выпускаемые в России коммерческие наборы «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Москва), наборы для выделения ДНК ООО «Лаборатория Медиген» (Новосибирск) работают по этому принципу и позволяют получать препарат ДНК микроорганизмов из различных субстратов высокой степени чистоты, пригодный не только для ПЦР, но и для других молекулярно-генетических манипуляций.

Н. Fukushima и соавт. (2011) [20] приводят типовой протокол для быстрого разделения и концентрации патогенных микроорганизмов в образцах пищевых продуктов с использованием фильтрации, центрифугирования в градиенте плавучей плотности. Показано, что такая пробоподготовка приводит к концентрации микробной массы в 250 раз в течение 2 ч.

В России для постановки ПЦР используют тест-систему «Амплисенс *Yersinia pseudotuberculosis* / *Yersinia enterocolitica*-FL» — вариант с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва).

Накоплен опыт по конструированию тест-систем для дот-иммуноанализа на основе антител, меченных наночастицами коллоидных металлов, в частности золота и серебра, для экспресс-детекции возбудителя псевдотуберкулеза. Дот-иммуноанализ имеет достаточно выигрышные позиции: простота постановки, миниатюризация (объем исследуемых образцов — 1 мкл), экспрессивность (общее время проведения анализа ~2 ч), отсутствие потребности в ридерах и других дорогостоящих приборах, достаточно высокие специфичность и чувствительность (сравнимая по своей эффективности с ПЦР) делают его перспективным методом индикации *Y. pseudotuberculosis*, особенно в режиме чрезвычайных ситуаций.

Использование времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией (matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, MALDI-TOF MS) позволяет провести индикацию и идентификацию возбудителя в течение нескольких минут после внесения образца в рабочую зону прибора. Сущность метода заключается в сравнении специфических белковых спектров (прямое белковое профилирование) подозрительных колоний со спектрами возбудителей из баз данных [46].

УНИФИЦИРОВАННЫЙ АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЭНТЕРОПАТОГЕННЫЕ ИЕРСИНИИ

На основе многолетних мониторинговых исследований нами предлагается унифицированный алгоритм лабораторного исследования на энтеропатогенные иерсинии с учётом использования ПЦР и масс-спектрометрии. Работу целесообразно проводить по оптимизированной нами схеме: холодное обогащение материала при +4...+ 6°C в течение 2–7 дней; использование метода ПЦР в реальном времени с сертифицированным набором «Амплисенс *Yersinia enterocolitica* / *Yersinia pseudotuberculosis*-FL» с гибридационно-флуоресцентной детекцией; посев на среду с бромтимоловым синим с инкубацией в течение 48 ч при +37°C и последующим визуальным отбором характерных колоний для детекции на MALDI-TOF MS. В случае положительного результата на *Yersinia* рекомендуются посевы на КД-агар (кормовые дрожжи) с инкубацией в течение 24 ч при +28°C; дифференциально-диагностические тесты и расширенная идентификация выделенных штаммов (ПЦР O-серогенотипирование *Y. pseudotuberculosis*); определение факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis* (inv, HPI, YAPI, pYV, ypm) и *Y. enterocolitica* (ail, ystA, ystB); био- и серотипирование *Y. enterocolitica*; изучение плазмидного спектра штаммов; генотипирование выделенных штаммов (VNTR, PFGE, секвенирование и др.). При положительной ПЦР и отрицательных результатах бактериологического исследования необходимо проведение второго (на 2–3-е сут), а в некоторых случаях — третьего (на 5–7-е сут) высева. При двукратном отрицательном анализе ПЦР дальнейшее бактериологическое исследование нецелесообразно. Предложенный алгоритм лабораторной диагностики позволяет увеличить частоту и спектр выделения патогенных иерсиний при микробиологическом мониторинге природных и антропоургических очагов иерсиниозов в системе эпидемиологического надзора. Проведение ПЦР на этапе экспресс-индикации/идентификации подозрительных колоний позволяет проводить типирование микроба по основным генным детерминантам (серотип, способность к адгезии-инвазии, наличие генов суперантигена энтеротоксинов, островов патогенности); рисунок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Энтеропатогенные виды *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* являются объектом интенсивного изучения в лабораториях мира и России в связи с их удивительной пластичностью выживания и сохранением патогенных свойств в биотической и абиотической окружающей среде, эпидемически неожиданным проявлением заболеваний спорадического и вспышечного характера. В последние годы лабораторная диагностика иерсиний претерпела существенные изменения: в практику внедрены

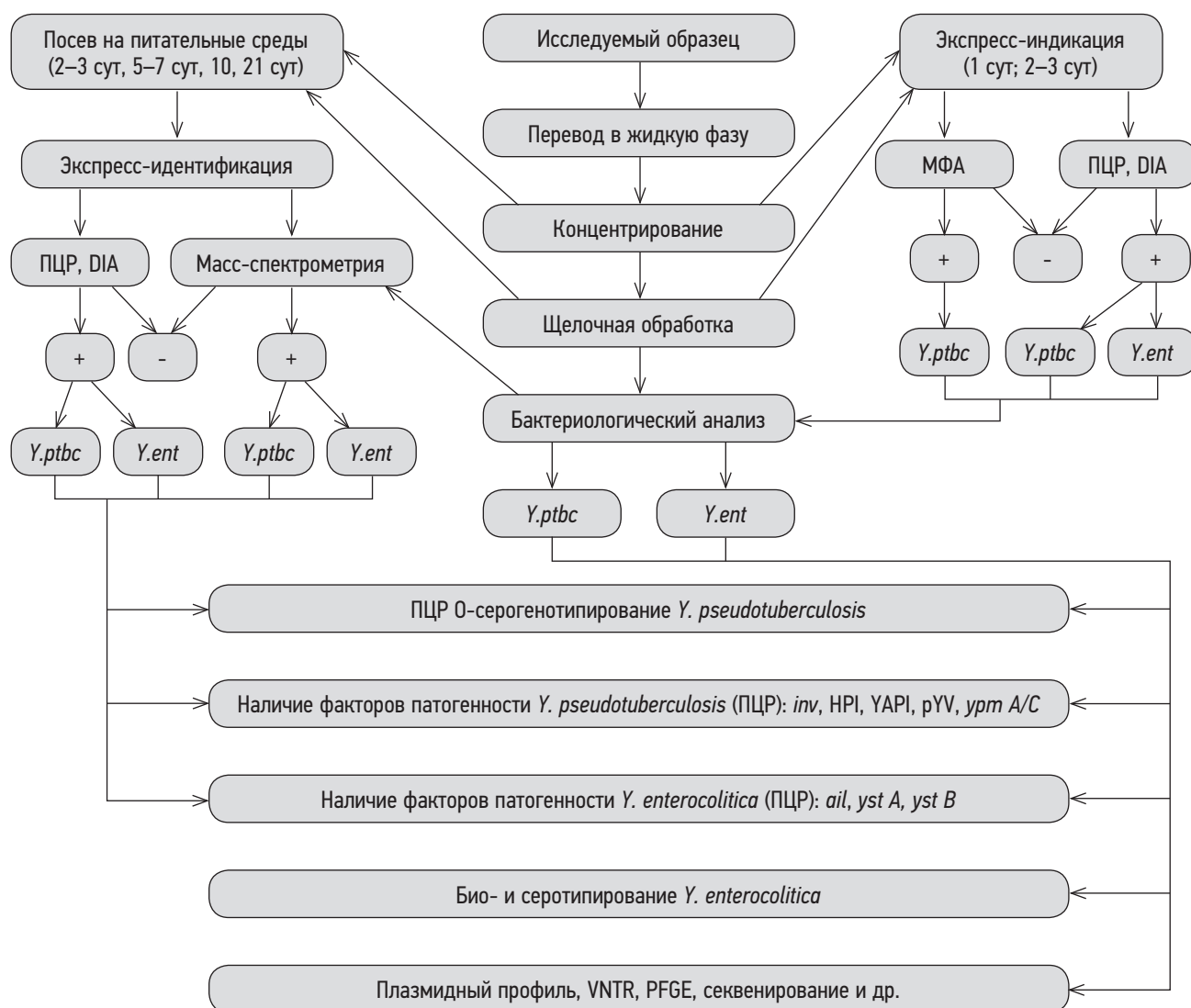


Рис. Схема выявления и идентификации энтеропатогенных иерсиний.

Примечание. ПЦР — полимеразная цепная реакция, DIA — дот-иммуноанализ, *Y.ptbc* — *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y.ent* — *Yersinia enterocolitica*, МФА — метод флюоресцирующих антител, *inv* — ген инвазивности, HPI — остров высокой патогенности иерсиний, YAPI — адгезивный остров патогенности иерсиний, pYV — плазмида вирулентности *Y. pseudotuberculosis*, *ypm* — ген токсина суперантигена A/C *Y. pseudotuberculosis*, *ail* — ген адгезии-инвазии *Y. enterocolitica*, *yst A* — ген энтеротоксина A, *yst B* — ген энтеротоксина B, VNTR — переменное число тандемных повторов, PFGE — электрофорез в пульсирующем поле.

Fig. Scheme of *Yersinia*'s detection and identification.

Note: PCR — polymerase chain reaction, DIA — Dot immunoassay, *Y.ptbc* — *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y.ent* — *Yersinia enterocolitica*, МФА — Fluorescent antibody method, *inv* — invasiveness gene, HPI — High Pathogenicity Island, YAPI — *Yersinia* Adhesion Pathogenicity Island, pYV — Plasmid associated with *Yersinia* Virulence *Y. pseudotuberculosis*, *ypm* A/C — gene *Y. pseudotuberculosis*-derived Mitogen A/C, *ail* — gene of adhesion-invasion *Y. enterocolitica*, *yst A* — gene *Y. enterocolitica* stable Toxin A, *yst B* — gene *Y. enterocolitica* stable Toxin B, VNTR — Variable Number of Tandem Repeat, PFGE — Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

высокоспецифичный и чувствительный ПЦР-анализ, позволяющий в течение нескольких часов обнаруживать патогенные иерсинии; масс-спектрометрия, являясь эффективным методом ускоренной идентификации выделенных микроорганизмов, сокращает сроки определения их таксономической принадлежности. Сочетание классического микробиологического и молекулярно-генетического методов оперативно определяет наличие или отсутствие патогена в образце, что позволяет целенаправленно

использовать бактериологическое исследование для выделения культуры с целью верификации клинического диагноза, подтверждения факторов передачи и планирования противоэпидемических мероприятий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Поисково-аналитическая работа проведена на личные средства авторского коллектива.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с проведением поисково-аналитической работы и публикацией статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: М.В. Чеснокова — дизайн научного обзора, анализ литературы, написание обзорной статьи; В.Т. Климов — поисково-аналитическая работа при написании обзорной статьи, написание раздела «Изучение патогенности иерсиний», «Экспресс-методы индикации и идентификации иерсиний», редактирование текста статьи; Т.В. Каримова — анализ литературы; Т.Ю. Загоскина — анализ и обобщение данных литературы, доработка рукописи, направление статьи на публикацию; А.Л. Панин — сбор литературных источников, редактирование статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

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

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. M.V. Chesnokova — design of the scientific review, the literature analyzing, writing a review article; V.T. Klimov — search and analytical work when writing a review article, writing the section “Studying the pathogenicity of Yersinia”, “Express methods for Yersinia’s indicating and identifying”, editing the text of the article; T.V. Karimova — literature analysis; T.Yu. Zagoskina — analysis and generalization of literature data, revision of the manuscript, submission of the article for publication; A.L. Panin — collection of literary sources, editing of the article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov // *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016. Vol. 66, N 12. P. 5575–5599. doi: 10.1099/ijsem.0.001485
2. Сомова Л.М., Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Псарева Е.К. Псевдотуберкулез как персистентная инфекция: этиопатогенетические предпосылки // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019. № 2. С. 110–119. doi: 10.36233/0372-9311-2019-2-110-119
3. Savin C., Frangeul L., Ma L., et al. Draft genome sequence of a clinical strain of yersinia enterocolitica (ip10393) of bioserotype 4/O:3 from France // *Genome Announc*. 2013. Vol. 1, N 1. P. e00150-12. doi: 10.1128/genomeA.00150-12
4. Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. и др. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.
5. Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H. Low occurrence of pathogenic Yersinia enterocolitica in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem // *Clin Microbiol Rev*. 2003. Vol. 16, N 2. P. 220–229. doi: 10.1128/CMR.16.2.220-229.2003
6. Black R.E., Jackson R.J., Tsai T., et al. Epidemic Yersinia enterocolitica infection due to contaminated chocolate milk // *N Engl J Med*. 1978. Vol. 298, N 2. P. 76–79. doi: 10.1056/NEJM197801122980204
7. Tacket C.O., Ballard J., Harris N., et al. An outbreak of Yersinia enterocolitica infections caused by contaminated tofu (soybean curd) // *Am J Epidemiol*. 1985. Vol. 121, N 5. P. 705–711. doi: 10.1093/aje/121.5.705
8. Abraham M., Pai M., Kang G., et al. An outbreak of food poisoning in Tamil Nadu associated with Yersinia enterocolitica // *Indian J Med Res*. 1997. Vol. 106. P. 465–468.
9. Swaminathan B., Harmon M.C., Mehlman I.J. Yersinia enterocolitica // *J Appl Bacteriol*. 1982. Vol. 52, N 2. P. 151–183. doi: 10.1111/j.1365-2672.1982.tb04838.x
10. Чеснокова М.В. Псевдотуберкулез в Сибири: теоретические и прикладные аспекты эпидемиологии, лабораторной диагнос-

тики и профилактики: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Иркутск, 2004. 42 с.

11. Martínez P.O., Fredriksson-Ahomaa M., Sokolova Y., et al. Prevalence of enteropathogenic Yersinia in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad region) pigs // *Foodborne Pathog Dis*. 2009. Vol. 6, N 6. P. 719–724. doi: 10.1089/fpd.2008.0251
12. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen Yersinia pseudotuberculosis-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among Yersinia pseudotuberculosis strains // *J Clin Microbiol*. 2001. Vol. 39, N 10. P. 3541–3547. doi: 10.1128/JCM.39.10.3541-3547.2001
13. Niléhn B. Studies on Yersinia enterocolitica with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease, 1969 // *APMIS*. 2007. Vol. 115, N 5. P. 578–588; discussion 589–591. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_725.x
14. Landgraf M., Iaria S.T., Falcão D.P. An improved enrichment procedure for the isolation of Yersinia enterocolitica and related species from milk // *J Food Prot*. 1993. Vol. 56, N 5. P. 447–450. doi: 10.4315/0362-028X-56.5.447
15. Fondrevez M., Labbé A., Houard E., et al. A simplified method for detecting pathogenic Yersinia enterocolitica in slaughtered pig tonsils // *J Microbiol Methods*. 2010. Vol. 83, N 2. P. 244–249. doi: 10.1016/j.mimet.2010.09.012
16. Fredriksson-Ahomaa M. Isolation of enteropathogenic Yersinia from non-human sources // *Adv Exp Med Biol*. 2012. N 954. P. 97–105. doi: 10.1007/978-1-4614-3561-7_12
17. Carniel E. The Yersinia high-pathogenicity island // *Int Microbiol*. 1999. Vol. 2, N 3. P. 161–167.
18. Fukushima H., Gomyoda M., Tsubokura M., Aleksić S. Isolation of Yersinia pseudotuberculosis from river waters in Japan and Germany using direct KOH and HeLa cell treatments // *Zentralbl Bakteriol*. 1995. Vol. 282, N 1. P. 40–49. doi: 10.1016/s0934-8840(11)80795-4
19. Koujiti E., Horisaka T., Nomura Y., et al. Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the isolation of freeze-injured Yersinia enterocolitica O:8 from water // *J Vet Med Sci*. 2006. Vol. 68, N 3. P. 195–199. doi: 10.1292/jvms.68.195

20. Fukushima H., Shimizu S., Inatsu Y. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* detection in foods // *J Pathog.* 2011. Vol. 2011. P. 735308. doi: 10.4061/2011/735308
21. Aulisio C.C., Mehlman I.J., Sanders A.C. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods // *Appl Environ Microbiol.* 1980. Vol. 39, N 1. P. 135–140. doi: 10.1128/aem.39.1.135-140.1980
22. Fukushima H., Tsubokura M., Otsuki K., et al. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* infections in Shimane Prefecture, Japan // *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg B.* 1985. Vol. 180, N 5–6. P. 515–527.
23. Weagant S.D. A new chromogenic agar medium for detection of potentially virulent *Yersinia enterocolitica* // *J Microbiol Methods.* 2008. Vol. 72, N 2. P. 185–190. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.019
24. Ценева Г.Я., Мессорош В.Г., Куляшова Л.Б., и др. Эффективность применения питательных сред для выделения иерсиний // *Клиническая лабораторная диагностика.* 1993. № 3. С. 73–74.
25. Ito T., Suzuki T., Kawase J., et al. *Yersinia enterocolitica* bacteremia and enterocolitis in a previously healthy 20-month-old girl // *J Infect Chemother.* 2012. Vol. 18, N 5. P. 756–759. doi: 10.1007/s10156-011-0353-8
26. Van Damme I., Berkvens D., de Zutter L. Effect of sampling and short isolation methodologies on the recovery of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig tonsils // *Foodborne Pathog Dis.* 2012. Vol. 9, N 7. P. 600–606. doi: 10.1089/fpd.2012.1128
27. Niskanen T., Laukkanen R., Murros A., et al. Characterisation of non-pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis*-like strains isolated from food and environmental samples // *Int J Food Microbiol.* 2009. Vol. 129, N 2. P. 150–156. doi: 10.1016/j.jifoodmicro.2008.11.015
28. Sharma N.K., Doyle P.W., Gerbasi S.A., Jessop J.H. Identification of *Yersinia* species by the API 20E // *J Clin Microbiol.* 1990. Vol. 28, N 6. P. 1443–1444. doi: 10.1128/jcm.28.6.1443-1444.1990
29. Linde H.J., Neubauer H., Meyer H., et al. Identification of *Yersinia* species by the Vitek GNI card // *J Clin Microbiol.* 1999. Vol. 37, N 1. P. 211–214. doi: 10.1128/JCM.37.1.211-214.1999
30. Bogdanovich T., Carniel E., Fukushima H., Skurnik M. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* // *J Clin Microbiol.* 2003. Vol. 41, N 11. P. 5103–5112. doi: 10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003
31. Laird W.J., Cavanaugh D.C. Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae // *J Clin Microbiol.* 1980. Vol. 11, N 4. P. 430–432. doi: 10.1128/jcm.11.4.430-432.1980
32. Bhaduri S., Turner-Jones C., Lachica R.V. Convenient agarose medium for simultaneous determination of the low-calcium response and Congo red binding by virulent strains of *Yersinia enterocolitica* // *J Clin Microbiol.* 1991. Vol. 29, N 10. P. 2341–2344. doi: 10.1128/jcm.29.10.2341-2344.1991
33. Zink D.L., Feeley J.C., Wells J.G., et al. Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica* // *Nature.* 1980. Vol. 283, N 5743. P. 224–226. doi: 10.1038/283224a0
34. Kapperud G. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene // *Int J Food Microbiol.* 1991. Vol. 12, N 1. P. 53–65. doi: 10.1016/0168-1605(91)90047-s
35. Kapperud G., Vardund T. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food, water, and feces by nested polymerase chain reactions and immunomagnetic separation // *Contrib Microbiol Immunol.* 1995. Vol. 13. P. 130–133.
36. Skurnik M., Wolf-Watz H. Analysis of the YopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp // *Mol Microbiol.* 1989. Vol. 3, N 4. P. 517–529. doi: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb00198.x
37. Wang R.F., Cao W.W., Cerniglia C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods // *J Appl Microbiol.* 1997. Vol. 83, N 6. P. 727–736. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00300.x
38. Lambertz S.T., Nilsson C., Hallanvuo S. TaqMan-based real-time PCR method for detection of *Yersinia pseudotuberculosis* in food // *Appl Environ Microbiol.* 2008. Vol. 74, N 20. P. 6465–6469. doi: 10.1128/AEM.01459-08
39. Wren B.W., Tabaqchali S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction // *Lancet.* 1990. Vol. 336, N 8716. P. 693. doi: 10.1016/0140-6736(90)92191-j
40. Vishnubhatla A., Fung D.Y., Oberst R.D., et al. Rapid 5' nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* // *Appl Environ Microbiol.* 2000. Vol. 66, N 9. P. 4131–4135. doi: 10.1128/AEM.66.9.4131-4135.2000
41. Wannet W.J., Reessink M., Brunings H.A., Maas H.M. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay // *J Clin Microbiol.* 2001. Vol. 39, N 12. P. 4483–4486. doi: 10.1128/JCM.39.12.4483-4486.2001
42. Sandery M., Stinear T., Kaucner C. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental waters by PCR // *J Appl Bacteriol.* 1996. Vol. 80, N 3. P. 327–332. doi: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03227.x
43. Fukushima H., Tsunomori Y., Seki R. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools // *J Clin Microbiol.* 2003. Vol. 41, N 11. P. 5134–5146. doi: 10.1128/JCM.41.11.5134-5146.2003
44. Thisted Lambertz S., Danielsson-Tham M.L. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis // *Appl Environ Microbiol.* 2005. Vol. 71, N 7. P. 3674–3681. doi: 10.1128/AEM.71.7.3674-3681.2005
45. Rossen L., Nørskov P., Holmstrøm K., Rasmussen O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions // *Int J Food Microbiol.* 1992. Vol. 17, N 1. P. 37–45. doi: 10.1016/0168-1605(92)90017-w
46. Stephan R., Cernela N., Ziegler D., et al. Rapid species identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry // *J Microbiol Methods.* 2011. Vol. 87, N 2. P. 150–153. doi: 10.1016/j.mimet.2011.08.016

REFERENCES

1. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(12):5575–5599. doi: 10.1099/ijsem.0.001485
2. Somova LM, Andriukov BG, Timchenko NF, Psareva EK. Pseudotuberculosis as a persistent infection: etiopathogenetic prerequisites. *J Microbiol Epidemiology Immunobiology.* 2019;(2):110–119. (In Russ). doi: 10.36233/0372-9311-2019-2-110-119
3. Savin C, Frangeul L, Ma L, et al. Draft genome sequence of a clinical strain of *Yersinia enterocolitica* (ip10393) of bioserotype

- 4/O:3 from France. *Genome Announc.* 2013;1(1):e00150-12. doi: 10.1128/genomeA.00150-12
4. Shurygina IA, Chesnokova MV, Klimov VT, et al. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka; 2003. 320 p. (In Russ).
5. Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(2):220-229. doi: 10.1128/CMR.16.2.220-229.2003
6. Black RE, Jackson RJ, Tsai T, et al. Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N Engl J Med.* 1978;298(2):76-79. doi: 10.1056/NEJM197801122980204
7. Tacket CO, Ballard J, Harris N, et al. An outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections caused by contaminated tofu (soybean curd). *Am J Epidemiol.* 1985;121(5):705-711. doi: 10.1093/aje/121.5.705
8. Abraham M, Pai M, Kang G, et al. An outbreak of food poisoning in Tamil Nadu associated with *Yersinia enterocolitica*. *Indian J Med Res.* 1997;106:465-468.
9. Swaminathan B, Harmon MC, Mehlman IJ. *Yersinia enterocolitica*. *J Appl Bacteriol.* 1982;52(2):151-183. doi: 10.1111/j.1365-2672.1982.tb04838.x
10. Chesnokova MV. Pseudotuberculosis in Siberia: Theoretical and applied aspects of epidemiology, laboratory diagnostics and prevention [dissertation abstract]. Irkutsk; 2004. 42 p. (In Russ).
11. Martínez PO, Fredriksson-Ahomaa M, Sokolova Y, et al. Prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad region) pigs. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6(6):719-724. doi: 10.1089/fpd.2008.0251
12. Fukushima H, Matsuda Y, Seki R, et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3541-3547. doi: 10.1128/JCM.39.10.3541-3547.2001
13. Niléhn B. Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease, 1969. *APMIS.* 2007;115(5):578-588; discussion 589-591. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_725.x
14. Landgraf M, Iaria ST, Falcão DP. An improved enrichment procedure for the Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from milk. *J Food Prot.* 1993;56(5):447-450. doi: 10.4315/0362-028X-56.5.447
15. Fondrevez M, Labbé A, Houard E, et al. A simplified method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pig tonsils. *J Microbiol Methods.* 2010;83(2):244-249. doi: 10.1016/j.mimet.2010.09.012
16. Fredriksson-Ahomaa M. Isolation of enteropathogenic *Yersinia* from non-human sources. *Adv Exp Med Biol.* 2012;954:97-105. doi: 10.1007/978-1-4614-3561-7_12
17. Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int Microbiol.* 1999;2(3):161-167.
18. Fukushima H, Gomyoda M, Tsubokura M, Aleksic S. Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from river waters in Japan and Germany using direct KOH and HeLa cell treatments. *Zentralbl Bakteriol.* 1995;282(1):40-49. doi: 10.1016/s0934-8840(11)80795-4
19. Koujitani E, Horisaka T, Nomura Y, et al. Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the isolation of freeze-injured *Yersinia enterocolitica* O:8 from water. *J Vet Med Sci.* 2006;68(3):195-199. doi: 10.1292/jvms.68.195
20. Fukushima H, Shimizu S, Inatsu Y. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* detection in foods. *J Pathog.* 2011;2011:735308. doi: 10.4061/2011/735308
21. Aulisio CC, Mehlman IJ, Sanders AC. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. *Appl Environ Microbiol.* 1980;39(1):135-140. doi: 10.1128/aem.39.1.135-140.1980
22. Fukushima H, Tsubokura M, Otsuki K, et al. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* infections in Shimane Prefecture, Japan. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B.* 1985;180(5-6):515-527.
23. Weagant SD. A new chromogenic agar medium for detection of potentially virulent *Yersinia enterocolitica*. *J Microbiol Methods.* 2008;72(2):185-190. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.019
24. Tseneva GY, Messorosh VG, Kulyashova LB, et al. The effectiveness of the use of nutrient media for the isolation of *Yersinia*. *Clin Lab Diagnostics.* 1993;(3):73-74. (In Russ).
25. Ito T, Suzuki T, Kawase J, et al. *Yersinia enterocolitica* bacteremia and enterocolitis in a previously healthy 20-month-old girl. *J Infect Chemother.* 2012;18(5):756-759. doi: 10.1007/s10156-011-0353-8
26. Van Damme I, Berkvens D, de Zutter L. Effect of sampling and short isolation methodologies on the recovery of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig tonsils. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9(7):600-606. doi: 10.1089/fpd.2012.1128
27. Niskanen T, Laukkanen R, Murros A, et al. Characterisation of non-pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis*-like strains isolated from food and environmental samples. *Int J Food Microbiol.* 2009;129(2):150-156. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.015
28. Sharma NK, Doyle PW, Gerbasi SA, Jessop JH. Identification of *Yersinia* species by the API 20E. *J Clin Microbiol.* 1990;28(6):1443-1444. doi: 10.1128/jcm.28.6.1443-1444.1990
29. Linde HJ, Neubauer H, Meyer H, et al. Identification of *Yersinia* species by the Vitek GNI card. *J Clin Microbiol.* 1999;37(1):211-214. doi: 10.1128/JCM.37.1.211-214.1999
30. Bogdanovich T, Carniel E, Fukushima H, Skurnik M. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5103-5112. doi: 10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003
31. Laird WJ, Cavanaugh DC. Correlation of autoagglutination and virulence of *Yersinia*. *J Clin Microbiol.* 1980;11(4):430-432. doi: 10.1128/jcm.11.4.430-432.1980
32. Bhaduri S, Turner-Jones C, Lachica RV. Convenient agarose medium for simultaneous determination of the low-calcium response and Congo red binding by virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol.* 1991;29(10):2341-2344. doi: 10.1128/jcm.29.10.2341-2344.1991
33. Zink DL, Feeley JC, Wells JG, et al. Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. *Nature.* 1980;283(5743):224-226. doi: 10.1038/283224a0
34. Kapperud G. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int J Food Microbiol.* 1991;12(1):53-65. doi: 10.1016/0168-1605(91)90047-s
35. Kapperud G, Vardund T. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food, water, and feces by nested polymerase chain reactions and immunomagnetic separation. *Contrib Microbiol Immunol.* 1995;13:130-133.
36. Skurnik M, Wolf-Watz H. Analysis of the YopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol.* 1989;3(4):517-529. doi: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb00198.x

- 37.** Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J Appl Microbiol.* 1997;83(6):727–736. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00300.x
- 38.** Lambertz ST, Nilsson C, Hallanvuo S. TaqMan-based real-time PCR method for detection of *Yersinia pseudotuberculosis* in food. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(20):6465–6469. doi: 10.1128/AEM.01459-08
- 39.** Wren BW, Tabaqchali S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. *Lancet.* 1990; 336(8716):693. doi: 10.1016/0140-6736(90)92191-j
- 40.** Vishnubhatla A, Fung DY, Oberst RD, et al. Rapid 5' nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(9):4131–4135. doi: 10.1128/AEM.66.9.4131-4135.2000
- 41.** Wannet WJ, Reessink M, Brunings HA, Maas HM. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4483–4486. doi: 10.1128/JCM.39.12.4483-4486.2001
- 42.** Sandery M, Stinear T, Kaucner C. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental waters by PCR. *J Appl Bacteriol.* 1996;80(3):327–332. doi: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03227.x
- 43.** Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5134–5146. doi: 10.1128/JCM.41.11.5134-5146.2003
- 44.** Thisted Lambertz S, Danielsson-Tham ML. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):3674–3681. doi: 10.1128/AEM.71.7.3674-3681.2005
- 45.** Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol.* 1992;17(1):37–45. doi: 10.1016/0168-1605(92)90017-w
- 46.** Stephan R, Cernela N, Ziegler D, et al. Rapid species identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2011;87(2):150–153. doi: 10.1016/j.mimet.2011.08.016

ОБ АВТОРАХ

* **Чеснокова Маргарита Валентиновна**, д.м.н., профессор; адрес: Россия, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, д. 78; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5489-9363>; eLibrary SPIN: 2005-4321; e-mail: mar_chumin@mail.ru

Климов Валерий Тимофеевич, к.м.н., с.н.с.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>; eLibrary SPIN: 1382-9190; e-mail: 41vklimov@yandex.ru

Каримова Татьяна Викторовна, к.м.н.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9099-3621>; eLibrary SPIN: 7101-4016; e-mail: tatianakarimova357@gmail.com

Загоскина Татьяна Юрьевна, д.м.н.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9302-7143>; eLibrary SPIN: 5891-7130; e-mail: t_y_z_@mail.ru

Панин Александр Леонидович, м.н.с.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6411-0274>; eLibrary SPIN: 4690-3587; e-mail: alp.1952@mail.ru

AUTHORS' INFO

* **Margarita V. Chesnokova**, MD, Dr. Sci. (Med), Professor; address: 78, Trilissera street, Irkutsk, 664047, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5489-9363>; eLibrary SPIN: 2005-4321; e-mail: mar_chumin@mail.ru

Valeriy T. Klimov, MD, Cand. Sci. (Med), Senior Research Assistant; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0036-0017>; eLibrary SPIN: 1382-9190; e-mail: 41vklimov@yandex.ru

Tatiana V. Karimova, MD, Cand. Sci. (Med.); ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9099-3621>; eLibrary SPIN: 7101-4016; e-mail: tatianakarimova357@gmail.com

Tatiana Yu. Zagoskina, MD, Dr. Sci. (Med.); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9302-7143>; eLibrary SPIN: 5891-7130; e-mail: t_y_z_@mail.ru

Alexander L. Panin, Junior Research Assistant; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6411-0274>; eLibrary SPIN: 4690-3587; e-mail: alp.1952@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author