

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

NO AUGU IZCELSMES PĀRTIKAS PRODUKTIEM IZOLĒTU *YERSINIA*
ENTEROCOLITICA ĢENĒTISKĀ DAUDZVEIDĪBA UN VIRULENCES
POTENCIĀLS

Bakalaura darbs

Autors: Tatjana Kiseļova

Stud. apl. Nr.: tk19027

Darba vadītājs: Mg. biol. Juris Ķibilds

RĪGA 2022

KOPSAVILKUMS

Yersinia enterocolitica ir ievērojams pārtikas patogēns ar lielu ģenētisko daudzveidību. Virulences gēnu noteikšana celmiem no daudzveidīgiem avotiem var palīdzēt izvērtēt jersiniozes riskus sabiedrības veselībai. Darba mērķis bija raksturot no augu valsts izcelsmes produktiem iegūto *Y. enterocolitica* izolātu virulences potenciālu un ģenētisko daudzveidību, veicot pilna genoma sekvenēšanu. Darbā iekļauti 66 celmi no svaigiem dārzeņiem un salātiem. Iegūtās sekvenēs konstatēja *ail* (4,6%), *inv* (95,4%) un *ystB* (98,5%) virulences gēnu klātbūtni. Visi izpētītie *Y. enterocolitica* izolāti pieder pie nosacīti nepatogēna biotipa 1A. Izmantojot *cgMLST*, noteikts, ka izolāti nav ģenētiski saistīti savā starpā.

Atslēgvārdi: *Yersinia enterocolitica*, virulences potenciāls, pārtikas drošība, augu valsts izcelsmes pārtika, pilna genoma sekvenēšana, *cgMLST*.

SUMMARY

Title: Genetic diversity and virulence potential of *Yersinia enterocolitica* isolated from plant-based foods

Yersinia enterocolitica is a considerable food pathogen with great genetic diversity. Determination of virulence genes for strains from various sources may help evaluate the risk of yersiniosis for public health. The aim of the study was to describe virulence potential and genetic diversity of isolates from plant-based foods by performing whole genome sequencing. 66 strains from fresh vegetables and salads are included in the study. *ail* (4,6%), *inv* (95,4%) un *ystB* (98,5%) virulence genes were found in obtained sequences. All studied *Y. enterocolitica* strains belong to relatively non-pathogenic biotype 1A. Using *cgMLST* it was determined that isolates are not genetically connected with each other.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, virulence potential, food safety, plant-based foods, whole genome sequencing, *cgMLST*.

DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

PBS – *phosphate-buffered saline* - fosfāta sāls buferšķīdums

Tris - tris-hidroksimetil aminometāns

EFSA – *European Food Safety authority* - Eiropas pārtikas nekaitīguma iestāde

ECDC – *European Center of Disease prevention and Control* - Eiropas Slimību profilakses un kontroles centrs

SPKC – Slimību profilakses un kontroles centrs

ES – Eiropas Savienība

dH₂O – destilēts ūdens

PCR – *polymerase chain reaction* – polimerāzes ķēdes reakcija

bp – bāžu pāri

ISO – *International Organization for Standardization* - Starptautiskā Standartizācijas organizācija

dsDNA – *double-stranded DNA* – divpavediena DNS

RPM - *revolutions per minute* - apgriezieni minūtē

T3SS – trešā tipa sekrēcijas sistēma

LPS – lipopolisaharīds

MLST - *multilocus sequence typing* – multilokusu sekvenču tipēšana

cgMLST – *core genome multilocus sequence typing* – kodola genoma multilokusu sekvenču tipēšana

MST – *minimum spanning tree* – minimālo attālumu dendrogramma

SATURS

Kopsavilkums	2
Summary.....	3
Darbā izmantotie saīsinājumi	4
Saturs	5
Ievads.....	6
1. Literatūras apskats.....	8
1.1. <i>Y. enterocolitica</i> raksturojums	8
1.2. <i>Y. enterocolitica</i> izplatība	8
1.3. <i>Y. enterocolitica</i> detektēšanas metodes	9
1.4. <i>Y. enterocolitica</i> galvenie virulences faktori un to kodējošie gēni	11
1.5. Jersinioze	14
1.6. <i>Y. enterocolitica</i> augu valsts produktos	17
2. Materiāli un metodes.....	19
2.1. Darbā izmantotie materiāli, reaģenti un iekārtas	19
2.2. Darba metodes	21
2.2.1. Paraugu ievākšana	21
2.2.2. DNS izdalīšana.....	22
2.2.3. DNS koncentrācijas nomērīšana	23
2.2.4. Sekvenēšana	23
2.2.4.1. Bibliotēku konstruēšana	23
2.2.4.2. Bibliotēku kvalitātes pārbaude	26
2.2.4.3. Bibliotēku normalizēšana un apvienošana	26
2.2.4.4. Sekvenatora uzstādīšana	27
2.2.5. Datu apstrāde.....	27
3. Rezultāti un diskusija	29
3.1. Sekvenču kvalitātes un taksonomiskās piederības novērtējums.....	29
3.2. <i>Y. enterocolitica</i> virulences gēnu identificēšana.....	30
3.3. Augu izcelsmes pārtikas izolātu ģenētiskā daudzveidība	35
3.4. <i>Y. enterocolitica</i> izolātu no augu valsts izcelsmes produktiem virulences potenciāls 39	
4. Secinājumi.....	41
5. Pateicības.....	42
6. Literatūras saraksts.....	43
Pielikumi.....	52

IEVADS

Augu izcelsmes produkti ir viena no svarīgākām veselīga uztura sastāvdaļām. Visā pasaulē, tai skaitā Eiropas Savienībā, pieaug pieprasījums pēc svaigiem dārzeņiem, augļiem un salātiem. Līdz ar to pieaug arī zoonotisko infekciju skaits, kas tiek saistīts ar šo produktu grupu (Machado-Moreira et al., 2019). Eiropas pārtikas nekaitīguma iestādes 2014. gada atskaite uzsver, ka šobrīd nav atrasts pietiekami efektīvs risinājums, kas garantētu augu izcelsmes produktu mikrobioloģisko nekaitīgumu (EFSA, 2014).

Jersinioze ir trešā visbiežāk konstatēta zoonoze Eiropas Savienībā (EFSA & ECDC, 2021). Tās galvenais izraisītājs - baktērija *Yersinia enterocolitica* - ir plaši sastopama dažādās vidēs, un tiek bieži izolēta no pārtikas produktiem. Atšķirībā no citiem enteropatogēniem, *Y. enterocolitica* spēj izdzīvot zemākās temperatūrās un nezaudē vairošanas spēju pat sasaldētā pārtikā, kas būtiski palielina inficēšanas riskus termiski neapstrādāto pārtikas produktu lietošanas gadījumā (Bottone, 2015).

Kaut gan *Y. enterocolitica* infekcijas tiek tradicionāli asociētas ar gaļas produktiem (it īpaši - cūkgaļu), pēdējo sešu gadu laikā vismaz trīs jersiniozes uzliesmojumi Eiropas Savienībā bija saistīti tieši ar augu izcelsmes pārtikas produktu lietošanu (EFSA & ECDC, 2021). Neskatoties uz acīmredzamiem riskiem sabiedrības veselībai, pētījumu par *Yersinia* sastopamību šajā produktu grupā ir ļoti maz. Līdz šim brīdim nav pieejami dati par augu valsts produktos sastopamajām *Y. enterocolitica* Latvijā.

Eiropas Savienībā nav izstrādāta vienota jersiniozes monitoringa programma. Paraugu ņemšana tiek veikta attiecīgi epidemioloģiskai situācijai konkrētā valstī, līdz ar to pieejami dati par *Y. enterocolitica* izplatību un infekcijām ir haotiski un grūti salīdzināmi (EFSA & ECDC, 2021). *Y. enterocolitica* ir augsti heterogēna suga, tāpēc izolātu patogenitātes noteikšanai ir nepieciešami papildus izmeklējumi. Sistemātiskie pārtikas diagnostiskie pētījumi ar jaunāko metožu pielietojumu ir svarīgs un nepieciešams solis uz jersiniozes gadījumu samazināšanu Eiropas Savienībā. Viena no efektīvākām pieejām ir virulences gēnu klātbūtnes pārbaude ar dažādām molekulārās bioloģijas metodēm (Petsios et al., 2016).

Darba mērķis: raksturot no augu valsts izcelsmes produktiem iegūtiem *Yersinia enterocolitica* izolātu virulences potenciālu un ģenētisko daudzveidību.

Darba uzdevumi:

1. Veikt pilna genoma sekvenēšanu no augu valsts izcelsmes produktiem iegūtiem *Y. enterocolitica* izolātiem un pārlicināties par sekvenču kvalitāti, kā arī apstiprināt to taksonomisko piederību.
2. Novērtēt izolātu virulences potenciālu, nosakot tiem dažādu virulences gēnu klātbūtni.

3. Noskaidrot izolātu savstarpējo līdzību, izmantojot *cgMLST* pieeju.
4. Salīdzināt izolātu ģenētisko profilu ar citiem Latvijā iegūtiem pārtikas celmiem, kā arī ar citiem *Y. enterocolitica* izolātiem no dažādiem avotiem.

Darbs ir izstrādāts Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā "BIOR" laika posmā no 2022. gada marta līdz 2022. gada maijam.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. *Y. enterocolitica* raksturojums

Yersinia enterocolitica ir 1-3 µm liela Gram-negatīva, fakultatīvi anaeroba nūjiņveida baktēriju suga no *Yersiniaceae* dzimtas. Tā ir motila pie temperatūras 25 °C ar peritrihām flagellām, zaudē motilitāti pie normālās cilvēka ķermeņa temperatūras (Bottone et al., 2015). *Y. enterocolitica* ir psihrotrofa un, atšķirībā no citiem enteropatogēnajiem *Enterobacteriaceae* pārstāvjiem, var izdzīvot pie zemām temperatūrām, tai skaitā saldētos pārtikas produktos (Bottone, 2015).

Atkarībā no bioķīmiskām pazīmēm *Y. enterocolitica* tiek klasificēta sešos biotipos (1A, 1B, 2, 3, 4, 5), savukārt, balstoties uz lipopolisaharīdu O virsmas antigēnu variācijām - vairāk nekā 70 O serogrupās (Bancerz-Kisiel et al., 2015). Pieci no biotipiem – 1B, 2-5 - tiek uzskatīti par patogēnajiem, turklāt, 1B tiek uzskatīts par augsti patogēno. Visbiežāk sastopamie jersiniozes izraisītie celmi ir 2/O:9, 4/O:3, 2/O:5,27, 3/O:3, un 1B/O:8 (Fredriksson-Ahomaa & Korkeala, 2003). Eiropas Savienībā jersiniozi cilvēkiem pārsvarā izraisa 4/O:3 un 2/O:9 bioserotipi (EFSA & ECDC, 2021; Skorek et al., 2013).

Biotips 1A tiek uzskatīts par nepatogēno. Tam ir novērojams vairāku nozīmīgu virulences gēnu trūkums – hromosomālu *ail*, *ystA* un *myfA*, kā arī 70-kb plazmīdas pYV (Tennant et al., 2003) (informācijas par virulences gēniem ir apkopota nodaļā 1.4). Vairāki moderni pētījumi apstrīd šādu uzskatu. Piemin gan 1A biotipa celmu enteropatogenitāti, gan to spēju izraisīt jersiniozes klīniskus simptomus. Dažiem 1A biotipa pārstāvjiem atklāj *ail*, *yst* un *myf* virulences gēniem homologas sekvences, kas turklāt apstiprina tā potenciālu patogenitāti (Batzilla et al., 2011; Bhagat & Viridi, 2007; Platt-Samoraj et al., 2017). Jaunākie *Y. enterocolitica* pētījumi akcentē nepieciešamību pārskatīt tradicionālās klīniskās diagnostikas metodes, kas balstās uz mikrobioloģiskām metodēm un bioķīmiskām reakcijām, uzsverot, ka tas nenorāda uz konkrēta celma patogenitāti (Peruzy et al., 2020; Petsios et al., 2016). Mūsdienu molekulārās bioloģijas metodes (tādas kā polimerāzes ķēdes reakcija) ļauj noteikt konkrēto virulences gēnu klātbūtni un izdarīt precīzāku secinājumu par izolāta virulences potenciālu (Fredriksson-Ahomaa & Korkeala, 2003; Peruzy et al., 2019).

1.2. *Y. enterocolitica* izplatība

Y. enterocolitica ir plaši izplatīta visā pasaulē, it īpaši auksta un mērena klimata reģionos. Baktērija ir atrodama dažādā vidē. Tā tiek izolēta no dzīvniekiem: gan savvaļas, gan mājdzīvniekiem (Bottone, 2015). Cūkas tiek uzskatītas par galveno *Y. enterocolitica*

rezervuāru. Visbiežāk baktēriju izdodas izolēt no dzīvnieku limfādiem un fekāliju paraugiem. Liellopiem *Y. enterocolitica* tiek atklāta retāk (Lucero Estrada et al., 2012; Peruzzy et al., 2020).

Visbiežākais *Y. enterocolitica* inficēšanas avots ir kontaminēti pārtikas produkti. Eiropas Savienībā, tai skaitā Latvijā, nav noteikts obligāts pārtikas monitorings uz *Y. enterocolitica*, un tas tiek veikts atbilstoši epidemioloģiskajai situācijai katrā valstī. Eiropas pārtikas nekaitīguma iestādes atskaitēs ir iekļauti dati no 15 Eiropas Savienības valstīm, dati par Latviju nav pieejami (EFSA & ECDC, 2021).

Galvenais pārtikas *Y. enterocolitica* inficēšanās avots ir cūkgaļa. ES baktērijas klātbūtne tiek konstatēta vidēji 8,3% svaigas gaļas paraugos (EFSA & ECDC, 2021), taču Latvijā šis rādītājs ir vairāk nekā divreiz augstāks – 19% (Terentjeva et al., 2021). *Y. enterocolitica* tiek atklāta arī liellopu un jēru gaļā (Jaballah et al., 2022). Pastāv ziņojumi par nepasterizētu vai nepareizi pasterizētu govju pienu kā vienu no inficēšanas avotiem (Bonardi et al., 2018).

Augu izcelsmes produktos *Y. enterocolitica* ir sastopama daudz retāk – Eiropas Savienībā šis rādītājs ir 2,4% (EFSA & ECDC, 2021). Pēc datiem no Verbikova et al., 2018, Čehijā šis rādītājs ir 5,8% (visi izolēti celmi pieder pie 1A biotipa), Dienvidkorejā – 2,7% (Lee et al., 2004), Grieķijā – 7,7% (Xanthopoulos et al., 2010). Ir svarīgi pieminēt, ka *Y. enterocolitica* detektēšana šajos rakstos tika veikta ar dažādām mikrobioloģijas un molekulārās bioloģijas metodēm, kas var nopietni ietekmēt rezultātu ticamību (tupmāk aprakstīts nodaļā 1.3) (Fredriksson-Ahomaa & Korkeala, 2003).

1.3. *Y. enterocolitica* detektēšanas metodes

Modernā klīniskā praksē *Y. enterocolitica* diagnostikai visbiežāk pielieto baktērijas tiešu izolēšanu no fekāliju paraugiem. Standarts protokols ietver CIN (cefsulodīn-irgazanovobiocīns) barotnes izmantošanu ar iepriekšēju bagātināšanu pusšķidrā barotnē. Salīdzinot ar citām enterobaktērijām, *Yersinia* ģints pārstāvji aug lēnāk un zemākajās temperatūras (optimālā augšanas temperatūra 28 °C, nevis 37 °C kā citām enterobaktērijām) (Savin et al., 2012).

Tiešā *Y. enterocolitica* izolēšana no pārtikas produktiem parasti nedod vēlamo rezultātu baktēriju zemāka daudzuma dēļ. Analizējot pārtiku, visbiežāk izmanto aukstās bagātināšanas metodi: kultūras audzē 4 °C 14-21 dienas uz dažādām neselektīvām barotnēm (visplašāk pielieto PBS un TSB (*tryptone soya agar* – triptona sojas agars) barotnes). Pēc veiksmīgas izolācijas koloniju taksonomisko piederību pie konkrētās sugas nosaka ar bioķīmiskajiem testiem. *Yersinia* baktērijas ir katalāzes pozitīvas, oksidāzes negatīvas un fermentē glikozi. Ģints pārstāvjus var atšķirt pēc saharozes, L-ramnozes un melibiozes fermentācijas: *Y. enterocolitica* ir saharozi fermentējoša, bet ne ramnozi un melibiozi. Veicot testus, ir svarīgi

ievērot temperatūru, pie kuras baktērijas bioķīmiskā aktivitāte ir vislielākā (Bottone et al., 2015). Testēšanā plaši pielieto komerciāli pieejamas bioķīmisko reakciju paneļu sistēmas - API 20E un 50CH (bioMérieux) (Laporte et al., 2015).

Y. enterocolitica ir augsti heterogēnā suga ar vairākiem biotipiem. To noteikšana ir būtiska konkrēta celma patogenitātē un tiek ieteikta vairākos *Y. enterocolitica* diagnostikas protokolos. Biotipu noteikšana tiek panākta ar papildus bioķīmiskajām analīzēm. Tie ietver lipāzes testu, eskulīna hidrolīzi, skābes producēšanu no salicīna, ksilozes un trehalozes testus, indola producēšanās testu, nitrātu redukcijas testu un pirazinamidāzes testu (Petsios et al., 2016). Serotipu noteikšana ar koloniju seroaglutināciju neatrada tik plašu pielietojumu diagnostikā, jo serotips ne vienmēr atspoguļo konkrētā celma patogenitāti (Fredriksson-Ahomaa & Korkeala, 2003).

Vairākas publikācijas uzsver mikrobioloģisko *Y. enterocolitica* metožu nopietnus trūkumus. Visām diagnostikas procedūrām ir nepieciešams ilgs laiks – līdz 7 dienām un pat vairāk, ja runa ir par pārtikas paraugiem. Veiksmīgai *Y. enterocolitica* izolēšanai var būt nepieciešami vairāki bagātināšanas posmi, kas pagarina diagnostikas laiku un palielina izmaksas (Fredriksson-Ahomaa & Korkeala, 2003; Petsios et al., 2016). Nelielas baktēriju koncentrācijas dēļ pārtikas un vides paraugos ir iespējami viltus negatīvi rezultāti, kas ir konstatējami, salīdzinot analīžu rezultātus ar jutīgāko molekulārās bioloģijas metožu rezultātiem. Pirazinamidāzes tests, kas tiek plaši pielietots patogēno biotipu noteikšanai, salīdzinot ar PCR virulences gēnu noteikšanu, dod gan viltus negatīvus, gan viltus pozitīvus rezultātus (Thoerner et al., 2003). Šis fakts apstiprina vairākos rakstos izteikto pieņēmumu, ka biotips ne vienmēr apstiprina celma patogenitāti (Batzilla et al., 2011; Kraushaar et al., 2011; Tennant et al., 2003). Daudzveidīgas metožu nepilnības noved pie viltus rezultātiem un neļauj izvērtēt *Y. enterocolitica* prevalenci pārtikas produktos (Petsios et al., 2016).

Molekulārās bioloģijas metodes ir ātrs, ērti pielietojams un jutīgs *Y. enterocolitica* noteikšanas veids, ko plaši pielieto gan klīniskajā diagnostikā, gan pārtikas, vides un dzīvnieku skrīningā (Fredriksson-Ahomaa & Korkeala, 2003). Polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) ir visizplatītākā molekulārās bioloģijas metode baktērijas noteikšanai. Tā ir vērsta uz dažādu virulences gēnu klātbūtnes noteikšanu izolātos (hromosomālo gēnu *ail*, *inv* un *yst*, plazmīdas gēnu *virF* un *yadA*) (Petsios et al., 2016). Ir izstrādāti vairāki standartizēti protokoli *Yersinia* baktēriju noteikšanai pārtikā, izmantojot PCR (ISO, 2015; Rusak et al., 2018). Metodes īstenošanai ir nepieciešama kultūru izolēšana ar bagātināšanas posmu, lai novērstu reakcijas inhibēšanu. Kontaminācija var parādīties manuālos PCR posmos, kas var novest pie viltus pozitīviem rezultātiem. Nepietiekama praimeru selektivitāte arī var novest pie viltus pozitīviem rezultātiem, it īpaši, ja tiek pielietotas zemas piesaistīšanās temperatūras. Analīzes no pārtikas

paraugiem var izrādīties viltus negatīvi inhibējošo vielu klātbūtnes dēļ paraugos vai barotnēs. Ne visās klīniskajās laboratorijās pieejamas PCR nepieciešamās iekārtas, un to iegāde un personāla apmācība ir saistītas ar ievērojamām izmaksām (Fredriksson-Ahomaa & Korkeala, 2003).

Sekvenēšanas tehnoloģiju attīstība ļauj izmantot šo metodi kā rīku epidemioloģiskos izmeklējumos un monitoringā. Pilna genoma sekvenēšana sniedz visaptverošu informāciju par baktērijas virulences potenciālu, nosakot virulences gēnus. Izmantojot datu apstrādes programmas, var noteikt arī dažādu izolātu radniecību un atrast saistības vairākiem saslimšanas gadījumiem. Sekvenēšanas izmantošanas diagnostikas procedūrās galvenais trūkums ir ievērojamas izmaksas un apmācīta personāla nepieciešamība (Hall et al., 2015).

1.4. *Y. enterocolitica* galvenie virulences faktori un to kodējošie gēni

Y. enterocolitica patogenitāti ietekmē vairāki virulences gēni, kas ir lokalizēti gan hromosomāli, gan plazmīdā (pYV – *plasmid for Yersinia virulence*). Tajos iekodētie proteīni ļauj baktērijai iekļūt saimniekorganismā, nomākt tā imūno atbildi un izdzīvot nelabvēlīgos apstākļos (Galindo et al., 2011).

Dažādi vides faktori - temperatūra, osmolaritāte, kalcija un dzelzs jonu koncentrācija – var aktivēt vai inhibēt virulences gēnu transkripciju (Horne & Prüß, 2006; Sabina et al., 2011). Tie gēni, kas ir nepieciešami baktērijas iekļūšanai saimniekšūnā (piemēram, *invA*), tiek visaktīvāk ekspressēti pie 30 °C, savukārt plazmīdas gēni – pie 37 °C (Horne & Prüß, 2006).

Virulences gēnu ekspresiju ietekmē vairāki regulatori, no kuriem svarīgākais ir *virF*, kas kodē *Yersinia* virulences regulona transkripcijas aktivatoru VirF. Tas ir nepieciešams *yop* un *yadA* gēnu transkripcijai (de Rouvrou et al., 1992). Hromosomālo gēnu regulators ir *ymoA* (*Yersinia*-modulating protein – *Yersinia*-modulējošs proteīns), kas kodē proteīnu YmoA. Tas inhibē vairāku hromosomālo gēnu transkripciju (tostarp *inv* un *ystA*) (Platt-Samoraj et al., 2017).

Daži no hromosomāliem *Y. enterocolitica* virulences gēniem ir:

- *ail* (*attachment and invasion locus* – piesaistes un invāzijas lokuss). *Ail* veicina piesaisti un uzbrukumu saimniekšūnām. Proteīns piešķir baktērijai seruma rezistenci, piesaistoties pie C4bp komplimenta komponenta un nobloķējot komplimenta alternatīvo aktivācijas mehānismu (Felek & Krukoniš, 2009). *ail* plaši izmanto kā *Y. enterocolitica* patogenitātes marķieri molekulārās bioloģijas analīzēs (ISO, 2015), kaut arī pastāv vairāki ziņojumi par 1A biotipa celmiem, kas satur šo gēnu vai tām homologas sekvences (Kraushaar et al., 2011).

- *invA* (invazīns). Primārais internalizācijas faktors invazīns InvA ir būtisks baktērijas pārvietošanai uz M šūnām un Peijera plātnišu kolonizācijai (Schmid et al., 2004). Proteīns piesaistās pie integrīniem, kas veicina aktīva citoskeleta remodelēšanu un, tādejādi, noved pie baktērijas nokļūšanas epitēlija šūnās. Šis mehānisms atļauj transportēt Yop proteīnus saimniekšūnu citosolā (Mikula et al., 2013). Nefunkcionāls *inv* variants ir sastopams arī 1A biotipam (Pierson & Falkow, 1990). Gēns tiek ekspresēts pie vides temperatūrām, taču O:3 serotipam – arī pie augstākām, kas palielina tā patogenitāti (Uliczka et al., 2011).
- *myfA* (*mucoïd Yersinia factor* – mukoīds *Yersinia* faktors). Mukoīds *Yersinia* faktors MyfA nodrošina baktērijas adhēziju pie enterocītiem. Ir svarīgs infekcijas sākumā (Rastawicki & Gierczyński, 2009).
- *hreP* (*host-responsive element* – saimniek-reaģējošs elements). Proteāze HreP ir viens no pēdējiem atklātiem *Y. enterocolitica* hromosomālajiem virulences faktoriem. Ir svarīgs veiksmīga uzbrukuma saimniekšūnām nodrošināšanā. Netiek ekspresēts laboratorijas apstākļos, tāpēc maz izpētīts (Heusipp et al., 2001).
- *yst* (*Yersinia-stable toxin* – *Yersinia*-stabils toksīns). YstIA proteīns (kodē gēna variants *ystA*) izraisa jersiniozes klīniskos simptomus, t.sk. diareju. 1A biotipam atklāj *ystB* gēna variantu, retāk – *ystC*. YstIB enterotoksīnam arī piemīt bioloģiskā aktivitāte (Ramamurthy et al., 1997). Visi klīniskie *Y. enterocolitica* izolāti spēj sintezēt YstI enterotoksīnu, taču daži avoti noliedz tā lomu simptomu izraisīšana, norādot, ka tas tiek sintezēts tikai pie 30 °C (Bancerz-Kisiel et al., 2018). Citi pētījumi apgalvo, ka sintēze ir iespējama pie 37 °C un paaugstinātā pH (7.5) (Singh & Viridi, 2004).

Visi *Y. enterocolitica* biotipi spēj inficēt zarnu gļotādu, bet tikai pYV plazmīdas klātbūtne ļauj tiem pārvietoties no Peijera plātnītēm uz iekšējiem orgāniem, kur tie var vairoties un izraisīt saslimšanu (Bancerz-Kisiel et al., 2018). Neskatoties uz plazmīdas svarīgumu baktērijas patogēnajā potenciālā, virulences novērtēšana, pamatojoties tikai uz plazmīdas gēnu klātbūtni, var būt neprecīza un novest pie viltus rezultātiem. pYV plazmīda nav stabila un var tikt zaudēta, kultūras ilgstoši glabājot, transportējot vai pakļaujot augstām temperatūrām (>37 °C) (Gierczyński, 2000, cit. pēc Bancerz-Kisiel et al., 2018; Thoerner et al., 2003). Svarīgākie pYV plazmīdas gēni ir:

- *yadA* (adhezīns A). Proteīns YadA ir trimēro autotransportieru adhezīnu grupas pārstāvis. Tas veido ledenēm līdzīgas struktūras (*lollypop-like*) uz šūnas virsmas, kas palīdz baktērijai piestiprināties pie cilvēka epitēlijšūnām (HEp-2). Saista kolagēnu I, II, IV un laminīnu (Mühlenkamp et al., 2015). Ir nozīmīgs hronisko infekciju veidošanai (Galindo et al., 2011).

- *yop* virulons. Kodē vairākus Yop proteīnus, ar kuru palīdzību baktērija var izdzīvot un vairoties limfajos, kā arī nomākt lokālo imūnatbildi. *yop* virulons sastāv no 4 daļām: III tipa sekrēcijas sistēma T3SS (zināma kā Ysc-Yops), translokatoriem (YopB, YopD), kontrolelementa YopN un efektoriem Yop proteīniem (YopE, YopH, YopM, YopO, YopP, YopT) (Cornelis, 2002). Daži no tiem izveido poras eikariotisko mērķšūnu membrānās, caur kuriem efektorproteīni tiek transportēti citosolā (Denecker et al., 2002). Yop proteīnu transportam ir nepieciešams ciešs kontakts starp baktērijas šūnu un mērķšūnu – to nodrošina YadA un InvA, kas piesaistās β 1 integrīniem (Galindo et al., 2011).

Y. enterocolitica īpaši patogēns biotips 1B, bez augstāk pieminētajiem virulences gēniem, satur hromosomālu augstās patogenitātes saliņu (*chromosomal high pathogenicity island* - HPI). Šajā saliņā ietilpst *asn*, *irp* gēnu klasteris un *fyuA*, kas iekodē Ybt faktora sintēzi (Schubert et al., 2004). Tā klātbūtne atvieglo dzelzs uzņemšanu un metabolismu, kas, savukārt, ļauj baktērijai izdzīvot un vairoties dzelzs trūkuma apstākļos (Sabina et al., 2011). HPI ir sastopams ne tikai *Y. enterocolitica*, bet arī citiem patogēniem *Yersinia* ģints pārstāvjiem (*Y. pestis* un *Y. pseudotuberculosis*), kā arī citām enterobaktērijām – enteropatogēnajiem *Escherichia coli* un *Salmonella enterica* (Bancerz-Kisiel et al., 2018).

Informācija par šajā nodaļā aprakstītiem *Y. enterocolitica* virulences gēniem ir apkopota 1. tabulā.

1. tabula

Galvenie *Yersinia enterocolitica* virulences gēni.

Table 1

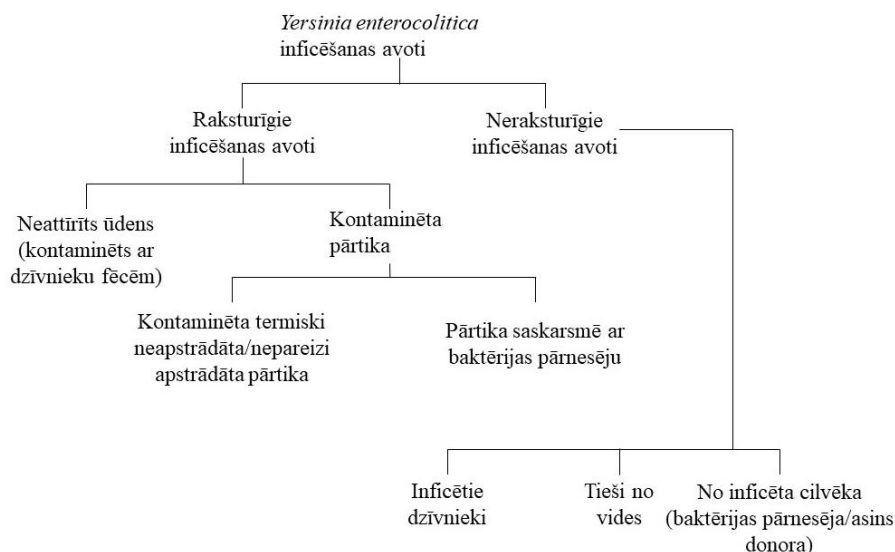
The main virulence genes in *Yersinia enterocolitica*.

Gēna nosaukums Name of gene	Gēna lokalizācijas vieta Gene's location	Gēna ekspresijas produkts Gene's expression product	Gēna galvenā funkcija Gene's main function	Raksturīgs biotipiem Typical for bitypes	Atsauce Reference
<i>ail</i>	hromosomā	Ail proteīns	piesaiste un uzbrukums	1B, 2-5, 1A	Kraushaar et al., 2011
<i>invA</i>	hromosomā	invazīns InvA	piesaiste un uzbrukums	1B, 2-5, 1A (neaktīvs)	Pierson & Falkow, 1990
<i>myfA</i>	hromosomā	mukoīds <i>Yersinia</i> faktors MyfA	piesaiste un uzbrukums	1B, 2-5, 1A	Bonardi et al., 2018
<i>hreP</i>	hromosomā	proteāze HreP	piesaiste un uzbrukums	1B, 2-5, 1A	Bhagat & Virdi, 2007
<i>ystA</i>	hromosomā	YstIA enterotoksīns	simptomu izraisīšana	1B, 2-5	Bancerz-Kisiel et al., 2018
<i>ystB</i>	hromosomā	YstIB enterotoksīns	simptomu izraisīšana	1A, reti - citos biotipos	Zheng et al., 2008
<i>ystC</i>	hromosomā	YstIC enterotoksīns	simptomu izraisīšana	reti – 1A	Bancerz-Kisiel et al., 2018
<i>ymoA</i>	hromosomā	<i>Yersinia</i> -modulējošs proteīns	citu gēnu ekspresijas regulācija	1B, 2-5, 1A (deaktivē <i>invA</i>)	Tennant et al., 2003
<i>yadA</i>	plazmīdā	adhezīns A	piesaiste un uzbrukums	1B, 2-5	Galindo et al., 2011
<i>virF</i>	plazmīdā	<i>Yersinia</i> virulences regulona transkripcijas aktivators VirF	citu gēnu ekspresijas regulācija	1B, 2-5	Galindo et al., 2011
<i>yop virulons</i>	plazmīdā	Yop proteīni	imūnatbildes nomākšana	1B, 2-5	Galindo et al., 2011

1.5. Jersinioze

Jersinioze ir akūta infekcijas slimība, kuras galvenie izraisītāji ir *Y. enterocolitica* un *Y. pseudotuberculosis*. Jaunākie pētījumi uzsver citu *Yersinia* ģints sugu potenciālo patogenitāti, taču šī pieņēmuma apstiprināšanai ir nepieciešami plašāki pētījumi (Imori et al., 2017; Yeung, 2021). No slimības galvenokārt cieš bērni līdz 10 gadu vecumam. Galvenie inficēšanas cēloņi

ir piesārņotu pārtikas produktu un ūdens lietošana uzturā, kā arī kontakts ar slimiem dzīvniekiem vai cilvēkiem (Galindo et al., 2011). Literatūrā minētie inficēšanas avoti ir uzskaitīti 1. attēlā.



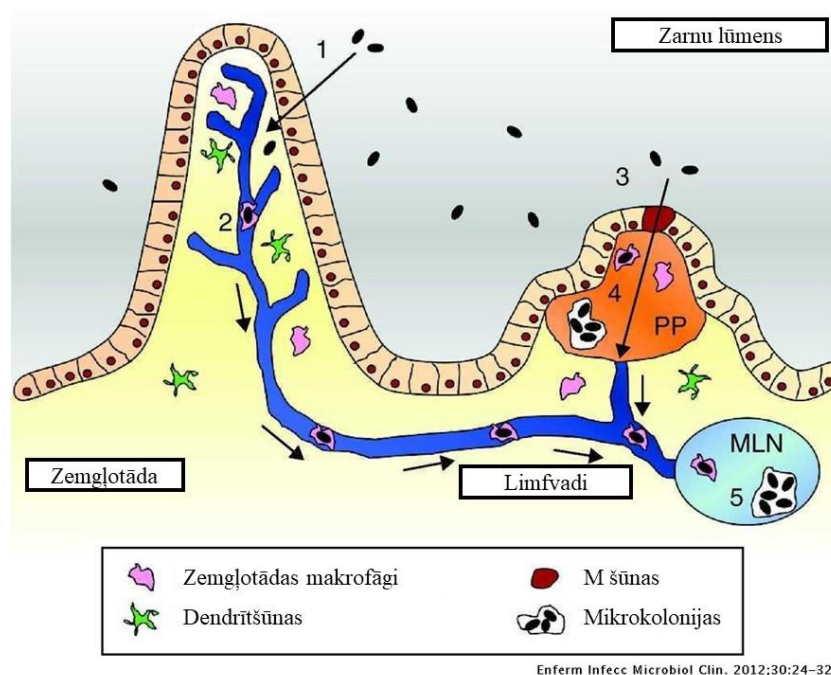
1. attēls. *Yersinia enterocolitica* inficēšanas avotu shēma (Sabina et al., 2011).

Figure 1. Mode of transmission of *Yersinia enterocolitica* (Sabina et al., 2011).

Jersinioze ir globāli novērota slimība, taču visvairāk tā ir izplatīta ziemeļu puslodē. Tā ir trešā visbiežāk konstatēta bakteriālā pārtikas izcelsmes zoonoze Eiropas Savienībā – 1.77 saslimšanas gadījumi uz 100.000 iedzīvotāju. Vislielākie saslimstības radītāji ir novēroti Somijā, Lietuvā un Čehijā. Visvairāk slimība skar bērnus līdz 4 gadiem – 7.2 uz 100.000 iedzīvotāju zēniem un 5.9 uz 100.000 iedzīvotāju meitenēm (ECDC, 2021). Pēc Slimību profilakses un kontroles centra datiem, 2020. gadā Latvijā ar jersiniozi saslima 88 cilvēki (4.6 gadījumi uz 100.000 iedzīvotāju), no kuriem 61 ir bērni līdz 14 gadu vecuma. Visi konstatētie gadījumi ir laboratoriski apstiprināti kā *Y. enterocolitica* infekcijas (SPKC, 2021). Ir svarīgi pieminēt, ka dati par saslimšanas gadījumu skaitu var būt neprecīzi. Akūtas jersiniozes simptomi ir līdzīgi citiem enterobakteriālo slimību simptomiem, parasti ārstēšana ir simptomātiska un nepieprasa konkrēta slimības izraisītāja noteikšanu. Francijā veikts pētījums norāda, ka saslimušo oficiālais skaits var būt vismaz 30 reīzu mazāks nekā faktiskais un sasniedz 30 uz 100.000 iedzīvotāju (van Cauteren et al., 2017).

Vidējais jersiniozes inkubācijas periods ir 1-11 dienas (Bottone, 2015). Infekcija sākas ar baktērijas iekļūšanu tievajā zarnā un tās adhēziju pie epitēlija šūnām, kas turpinās ar intestinālās barjeras šķērsošanu caur M šūnām. *Y. enterocolitica* var veiksmīgi vairoties Peijera plātnītēs un pāriet uz citiem limfauziem – mezenteriskajiem limfmezgliem (Grutzkau et al., 1990). *Y. enterocolitica* patogēnēzes modelis ir apskatāms 2. attēlā. Smagākas infekcijas gadījumos

baktērija var izplatīties no tievās zarnas turpmāk uz aknām un liesu, formējot monoklonālus mikroabscesus (Trülzsch et al., 2007).



2. attēls. *Y. enterocolitica* patoģenēzes modelis (Fàbrega & Vila, 2012). Bultiņas norāda limfas plūsmas virzienu. (1) Baktērijas šūnas šķērso intestinālo barjeru. (2) Zemgļotādas makrofāgi fagocitē patogēnu un ienāk limfvados, sasniedzot mezenterisko limfmezglu (MLN). (3) Citādi, baktērija var nonākt Peijera plātnītēs (PP) caur M šūnām. (4) Nonākot PP, baktērijas veido mikrokolonijas un uzsāk replikāciju. (5) MLN baktērijas veido mikrokolonijas un veiksmīgi vairojas.

Figure 2. *Y. enterocolitica* pathogenesis model (Fàbrega & Vila, 2012). Arrows show the direction of lymph flow. (1) Bacterial cells cross the intestinal barrier. (2) Submucosa macrophages phagocytose the pathogen and enter lymph vessels, reaching the mesenteric lymph node (MLN). (3) Alternatively, bacteria can enter Peyer's patches (PP) through M cells. (4) Once in PP, bacteria form microcolonies and start replicating. (5) In MLN bacteria forms microcolonies and successfully replicate.

Visbiežāk *Y. enterocolitica* infekcija izpaužas kā akūts gastroenterīts (vemšana, diareja, paaugstinātā temperatūra) un mezenteriskais limfadenīts. Smagāki jersiniozes simptomi ietver pseidoapendikulāro sindromu, mikotiskas aneirismas un, retāk, sepsi (Trülzsch et al., 2007). Viens no jersiniozes epidēmiju konstatēšanas faktoriem ir straujš apendektomiju biežuma pieaugums bērniem kļūdainas apendicīta diagnozes dēļ (ECDC, 2021).

Jersiniozes komplikācijas un hroniskās formas ietver reaktīvu artrītu, *erythema nodosum*, uveītu un miokardītu. Slimība tiek veiksmīgi ārstēta ar antibiotikām, taču, neskatoties uz to,

imūnkompromitēto pacientu mirstība sasniedz 50% baktērijas sistēmiskās izplatības dēļ (Fredriksson-Ahomaa et al., 2006).

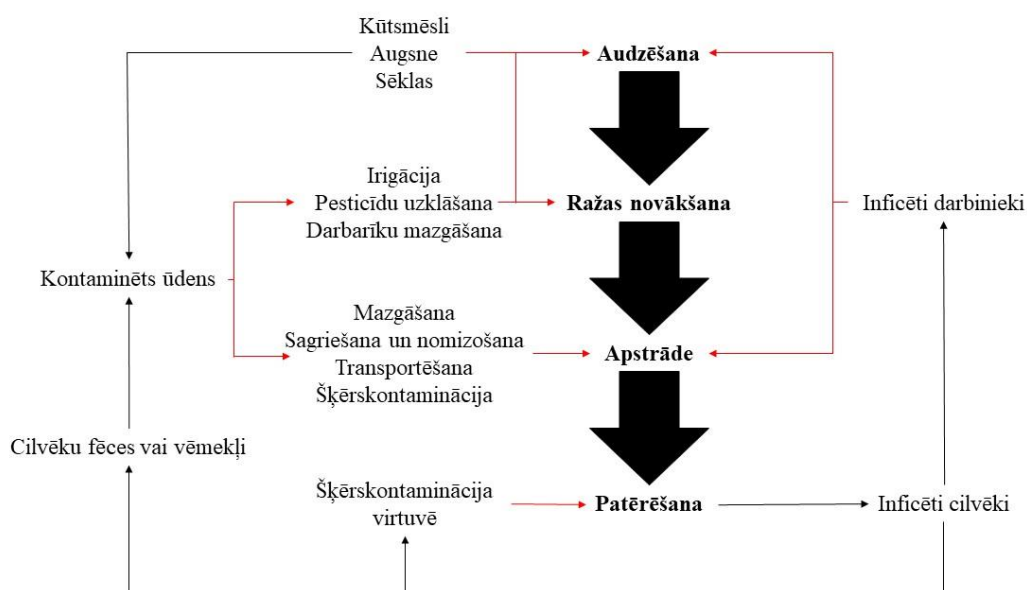
1.6. *Y. enterocolitica* augu valsts produktos

Y. enterocolitica tiek tradicionāli asociēta ar gaļu kā galveno inficēšanas avotu, taču vairākās valstīs novēro jersiniozes uzliesmojumus, kas ir saistīti tieši ar augu valsts produktiem, it īpaši ar t.s. *ready-to-eat* (gatavi lietošanai) dārzeņiem un salātiem.

Pēdējo 10 gadu laikā Eiropā vismaz četri uzliesmojumi tika izraisīti dārzeņu, sulu un citu augu valsts produktu lietošanas dēļ. Trīs no tiem ir saistīti ar lietošanai gataviem iepakotiem salātiem. Vairumtirdzniecības iestādēm Eiropā ir noteiktas svaigo lietošanai gatavu dārzeņu un salātu regulārās pārbaudes uz *Escherichia*, *Listeria* un *Salmonella*, taču *Yersinia* neietilpst nevienā obligātā testēšanas protokolā (EFSA & ECDC, 2021; MacDonald et al., 2011).

Pēdējā literatūrā pieminētā *Y. enterocolitica* (konkrēti – 4/O:3 bioserotipa) epidēmija, kas ir saistīta ar augu valsts produktiem, bija konstatēta 2019. gada pavasarī Zviedrijā un Dānijā. Sākotnēji par uzliesmojumiem tika paziņots neatkarīgi, bet pēc bakteriālo sekvenču salīdzināšanas tie tika klasificēti kā viens starptautiskais uzliesmojums, kas bija saistīts ar svaigiem mazgoātiem spinātiem no Itālijas. Kopējais saslimšanas gadījumu skaits sasniedza 87, ar vislielāko īpatsvaru 15-39 gadu vecuma grupā (Karlsson et al., 2021).

Pārtika var tikt kontaminēta ar *Y. enterocolitica* vairākās audzēšanas un ražošanas stadijās, kas ir parādīts 2. attēlā.



3. attēls. Pārtikas bakteriālas kontaminācijas ceļi dažādās ražošanas stadijās (Machado-Moreira et al., 2019). Ar treknrakstu izceltas pārtikas ražošanas stadijas, sarkanās bultiņas norāda

pārtikas kontaminācijas ceļus, melnas bultiņas – ūdens kontaminācijas un cilvēku inficēšanas ceļus.

Figure 3. Microbial contamination of food during different manufacturing processes (Machado-Moreira et al., 2019). Manufacturing steps are shown in bold, red arrows point to ways of food contamination, black arrows – ways of water contamination and human infection.

Lauksaimniecībā galvenie kontaminācijas riski nāk no kūtsmēsliem, kurus bieži izmanto kā lētu un efektīvu mēslojumu (Julien-Javaux et al., 2019). Ūdens, kuru pielieto augu irigācijai un citiem mērķiem, var saturēt patogēnos mikroorganismus un netiek papildus attīrīts pirms izmantošanas (Alegbeleye et al., 2018).

Darbs ar mikrobioloģiski piesārņotu augsni vai ūdeni var novest pie baktēriju nokļūšanas uz darbinieku rokām, kuri var izplatīt tās uz vairākām produktu partijām. Instrumenti un virsmas, kuras tiek izmantotas pārtikas apstrādei ir vēl viens potenciāls kontaminācijas avots, kas var novest pie vairāku partiju piesārņošanas (Machado-Moreira et al., 2019). Darbinieki var inficēties no kontaminētās darba vides un kļūt par baktēriju izplatītāju (Julien-Javaux et al., 2019).

Svaigo augu valsts produktu mazgāšana ne vienmēr ir efektīva pret mikrobioloģisko piesārņojumu – baktērijas var palikt piesaistītas pie augu virsmas vai nonākt augu daļās, kur tās ir grūti noņemamas. Galvenā literatūrā piedāvātā baktēriju eliminācijas un pavairošanas apstādināšanas metode ir zemu uzglabāšanas un apstrādes temperatūru saglabāšana (Alegbeleye et al., 2018; Machado-Moreira et al., 2019), taču pastāv dati par *Y. enterocolitica* dzīvotspējas saglabāšanos ledusskapī turētos vai saldētos pārtikas produktos (Bottone, 2015). Citi veidi *Y. enterocolitica* eliminēšanai ietver apstrādi ar etiķskābi vai ozonu, taču neviena no šīm metodēm šobrīd netiek pielietota ražošanā (Selma et al., 2006; Sengun & Karapinar, 2005).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Darbā izmantotie materiāli, reaģenti un iekārtas

Reaģenti un šķīdumi:

Nātrijs hipohlorīta šķīdums, kas satur 1% aktīvā hlora (ROTH, Vācija),
destilēts ūdens,
nukleāzes nesaturošs ūdens (Thermo Fisher Scientific, ASV),
96% etanols (Iecavas spirta rūpnīca, Latvija),
1 M NaOH (Sigma-Aldrich, ASV).

Buferi:

PBS buferis (tableti (Thermo Fisher Scientific, ASV) izšķaida 100 ml dH₂O. 10 mM fosfāta, 150 mM NaCl, pH 7.3 līdz 7.5),
Tris-HCl 10 mM ar 0.05% Tween-20 (pH 8.0) (Thermo Fisher Scientific, ASV),
Tween-20 (Sigma-Aldrich, ASV).

Barotnes:

Blood agar, Sterile defibrinated sheep blood (Oxoid, Apvienotā Karaliste).

Reaģentu komplekti:

2. tabula

Darbā izmantoti reaģentu komplekti.

Table 2

Reagent kits used in the study.

Kita pilnais nosaukums Kit's full name	Ražotājs, valsts Manufacturer, country	Artikula Nr. Nr. of article
Qubit dsDNA high sensitivity assay kit	Thermo Fisher Scientific, ASV	Q32851
QIAxcel DNA High Resolution Kit	QIAGEN, Vācija	929002
ID Gene™ Mag Fast Extraction Kit	ID-Vet, Francija	MAGFAST384
Illumina DNA Prep Kit	Illumina, ASV	20018705
Nextera™ DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	Illumina, ASV	20018708
PhiX Control Kit v3	Illumina, ASV	FC-110-3001

Materiāli:**3. tabula**

Darbā izmantoti materiāli.

Table 3

Consumables used in the study.

Materiālu nosaukums Name of consumable	Ražotājs, valsts Manufacturer, country	Modelis/artikula Nr. Model/ Nr. of article
Automatiskā pipete 0,5-10 µl	BrandTech Scientific, ASV	7047 70
Automatiskā pipete 20-200 µl	BrandTech Scientific, ASV	7047 74
Automatiskā pipete 100-1000 µl	BrandTech Scientific, ASV	7047 80
Automātisko pipešu uzgaļi ar filtru, 10 µl	StarLab, ASV	S1111-3810
Automātisko pipešu uzgaļi ar filtru, 200 µl	StarLab, ASV	S1111-0810
Automātisko pipešu uzgaļi ar filtru, 1000 µl	StarLab, ASV	S1111-6810
Vienreizlietojamas bakterioloģiskās cilpas, 10 µl	SARSTEDT, Vācija	86.1562.050
Centrifūgas mikrostobriņi, 2 ml	SARSTEDT, Vācija	72.695.500
PCR stobriņi, 0,2 ml	SARSTEDT, Vācija	72.991.02
PCR 96 bedrīšu plates, 0,2 ml	Thermo Fisher Scientific, ASV	AB-0600
Stobri, 50 ml	SARSTEDT, Vācija	62.547.254
Plēves PCR plašu aizlīmēšanai	SARSTEDT, Vācija	95.1994
DNS izdalīšanas robota 96 bedrīšu plates, 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, ASV	A43075
DNS izdalīšanas robota 96 bedrīšu uzgaļu ķemmītes	Thermo Fisher Scientific, ASV	A43074
Qubit mikrostobriņi, 0,5 ml	Thermo Fisher Scientific, ASV	Q32856
Magnēts	Thermo Fisher Scientific, ASV	AM10027

Iekārtas:

4. tabula

Darbā izmantotās iekārtas.

Table 4

Equipment used in the study.

Iekārtas nosaukums Name of equipment	Ražotājs, valsts Manufacturer, country	Modelis Model
Laminārs	Clean Air, Nīderlande	EN 12469
UV bokss	Biosan, Latvija	UVC/T
Vortekss	Biosan, Latvija	MIKRO - SPIN
Centrifūga/vortekss	Biosan, Latvija	FVL-2400N
Centrifūga	Hermle, Vācija	Z 216 MK
Dzesēšanas - sildīšanas termostats	Biosan, Latvija	CH-100
Kratītājs-termostats	Biosan, Latvija	TS-100
Fluorometrs	Thermo Fisher Scientific, ASV	Qubit 3.0
DNS izdalīšanas robots	Thermo Fisher Scientific, ASV	KingFisher™ Flex 96 Deep- Well Magnetic Particle Processor
PCR amplifikators	Applied Biosystems, ASV	GeneAmp PCR System 9700
Kapilārās elektroforēzes iekārta	QIAGEN, Vācija	QIAxcel Advanced System
Ledusskapis	Snaige Soft line	1380370/2
Saldētava	Arctico, Dānija	ULUF 450
Sekvenators	Illumina, ASV	MiSeq System

2.2. Darba metodes

Darbs ar *Y. enterocolitica* tiek veikts otrajam biodrošības līmenim atbilstoši aprīkotā laboratorijā, ievērojot visus noteikumus pēc ISO/IEC 17025:2017. Darbs molekulārās diagnostikas laboratorijā tiek organizēts vairākās zonās: baktēriju kultūru pieņemšanas un pirmējās apstrādes zona, nukleīnskābju izdalīšanas zona, PCR reakcijas maisījumu sagatavošanas zona, amplifikācijas zona, elektroforēzes un sekvenēšanas zona. Visas darba telpas ir iekārtotas tādā veidā, lai izolātus tajos būtu nepieciešams ienest tikai vienu reizi.

2.2.1. Paraugu ievākšana

Darbā izmantoti 66 *Y. enterocolitica* izolāti tika ievākti 2017.-2021. gados no 11 mazumtirdzniecības vietām Pārtikas un veterinārā dienesta valsts uzraudzības programmas ietvaros, diagnostikas nolūkos un projekta Nr. lzp-2020/2-0418 “*Yersinia spp.* epidemioloģija un ģenētiskais raksturojums pārtikas ražošanā” ietvaros. Paraugi ir paņemti no svaigiem

dārzeņiem un salātiem. Informācija par izolātu avotiem ir apkopota 5. tabulā, pilna informācija par katru ir pieejama 1. pielikumā.

5. tabula

Izolātu avotu apkopojums.

Table 5

Summary of isolation sources.

Izolātu avotu grupa Isolates group of sources	Izolāta avots Isolate's source	Paraugu skaits Number of samples
Dārzeņi	bietes nemazgātas	10
	burkāni nemazgāti	5
	burkāni mazgāti	1
	burkāni mazgāti, tīrīti	27
	kartupeļi tīrīti	1
	kartupeļi griezti	11
	sīpoli tīrīti	3
Salāti	salāti nemazgāti	1
	salāti mazgāti	3
	salātu maisījumi	3

Baktērijas ir kultivētas aerobajos apstākļos 37 °C uz asins agara 48 stundas. Pēc kultūru iegūšanas tās uzglabā -80 °C institūta "BIOR" Mikroorganismu kultūru kolekcijā un atdzīvina pēc nepieciešamības. Kultūru sugas apstiprināšanai izmantoja MALDI-TOF masspektrometru un *Bruker-BDAL (MBT Compass Library, 7311 ierakstu)* bibliotēku.

2.2.2. DNS izdalīšana

DNS ekstrakcija no baktēriju kultūrām tika veikta ar *ID Gene™ Mag Fast* ekstrakcijas reaģentu komplektu un DNS izdalīšanas robotu *KingFisher™ Flex 96 Deep-Well Magnetic Particle Processor* atbilstoši ražotāja protokolam.

Baktēriju kultūru ar 10 µl bakterioloģisko cilpu ienes un izšķīdina DNS izdalīšanas robota 96 bedrīšu platē ar 100 µl PBS bufera, pievieno 20 µl lizozīma šķīduma un inkubē kratītājā-termostatā uz 500 RPM 37 °C 1-2 stundas. Pievieno 20 µl proteināzes un inkubē atkārtoti 56 °C 1-2 stundas. Lizēšanas beigās šķīdumam ir jābūt caurspīdīgam. Platē pievieno 125 µl LYS-FAST bufera un iepriekš kopā sajauktus 300 µl BB-FAST šķīdumu un 10 µl magnētiskās lodītes, lai sagatavotu paraugu plati DNS izdalīšanai.

Sagatavo piecas DNS izdalīšanas robota plates un ievieto tās robota secīgi:

1. Plate ar robota uzgaļu ķemmīti;
2. Elūcijas plate (80 µl elūcijas buferis);
3. 3. mazgāšanas plate (300 µl 80% etanola);
4. 2. mazgāšanas plate (300 µl Wash 2 bufera);

5. 1. mazgāšanas plate (300 µl Wash 1 bufera);

6. Paraugu plate.

Robotā iestāda un palaiž programmu “*IDGeneMAGFAST_96*”. Pēc programmas izpildes izmet plates ar reaģentiem. Elūcijas plati uzglabā ledusskapī 4 °C līdz turpmākai apstrādei.

2.2.3. DNS koncentrācijas nomērīšana

Pēc DNS ekstrakcijas ir nepieciešams pārliicināties, ka koncentrācija ir pietiekama turpmāko darbību veikšanai. To nomēra ar *Qubit 3.0* fluorometru, izmantojot *Qubit dsDNS high sensitivity assay* reaģentu komplektu, kas ļauj detektēt DNS koncentrāciju sākot no 0,1 ng/µl.

Uz katru DNS paraugu un diviem standartiem sagatavo darba šķīdumu (*Working solution*), sajaucot dsDNA HS reaģentu un dsDNA HS buferi attiecībā 1:200. *Qubit* stobriņā sajauc 196 µl darba šķīduma un 4 µl DNS šķīduma. Stobriņus nomarkē ar paraugu numuriem uz vāciņiem. Marķējumu novietošana uz stobriņa malas var novest pie nepareiziem nolasījumiem. Standarta šķīdumus aparāta kalibrācijai pagatavo, samaisot 190 µl darba šķīduma ar 10 µl *dsDNA HS Standard #1* šķīduma vai *dsDNA HS Standard #2* šķīduma.

Pēc iekārtas ieslēgšanas veic kalibrāciju. Aparātā secīgi ievieto stobriņus ar standarta šķīdumiem, aizver iekārtas vāciņu un nospiež *Read standart*. Pēc kalibrācijas uz iekārtas ekrāna parādās kalibrācijas grafiks.

Uz iekārtas ekrāna izvēlas *Run sample*, izvēlas DNS tilpumu un gala koncentrācijas mērvienības (ng/µl). Stobriņu ievieto iekārtā, aizver vāciņu un nospiež *Read tube*, samaina uz nākamo un atkārtoti darbības, līdz visu paraugu koncentrācijas ir nomērītas. DNS ar koncentrāciju zemāku par 5 ng/µl izdala atkārtoti.

2.2.4. Sekvenēšana

Sekvenēšanai izmantoja *Illumina MiSeq* aparātu, kas nodrošina 2x300 vai 2x250 bp garus nolasījumus. Turpmākas nodaļas apraksta visus bibliotēku sagatavošanas posmus pirms tās.

2.2.4.1. Bibliotēku konstruēšana

Sekvenēšanas bibliotēku konstruēšanai un sagatavošanai tika pielietots *Illumina DNA Prep* reaģentu komplekts. Visas darbības ir veiktas saskaņā ar ražotāja protokolu.

Pirmais solis bibliotēku sagatavošanā ir DNS tagmentācija, kuras laikā DNS tiek fragmentēta un iezīmēta ar adapteru sekvencēm (*tagged*):

1. PCR platē pievieno 30 μ l DNS šķīduma. Ja gala tilpums ir mazāks par 30 μ l, pievieno attiecīgo daudzumu nukleāžu brīva ūdens, lai tilpums sasniegtu 30 μ l.
2. Labi savorteksē lodītēm piesaistītās transposomas (*bead-linked transposomes*, BLT).
3. Stobrā samaisa 11 μ l BLT un 11 μ l TB1 (*tagmentation buffer 1*, tagmentācijas buferis 1) attiecīgi paraugu skaitam, savorteksē un pievieno 20 μ l katram. 10 reizes samaisa ar pipeti.
4. Aizlīmē plati ar plēvi un ievieto amplifikatorā uz 55 °C 15 min.

Pēc tagmentācijas veic attīrīšanu:

5. Tagmentētai DNS pievieno 10 μ l TSB (*tagmentation stop buffer*, tagmentāciju apstādinošs buferis), lēni samaisa ar pipeti 10 reizes.
6. Aizlīmē plati ar plēvi un ievieto amplifikatorā uz 37 °C 15 min.
7. Novieto plati uz magnēta un sagaida, kamēr šķīdums kļūs dzidrs. Savāc un izmet supernatantu ar pipeti.
8. Noņem no magnēta un pievieno 100 μ l TWB (*tagmentation washing buffer*, tagmentācijas mazgāšanas buferis). Ievieto kratītāja uz 1 minūti 1600 RPM.
9. Novieto plati uz magnēta un atkārti iepriekšējās darbības 2 reizes.
10. Aizlīmē plati ar plēvi un novieto plati uz magnēta un sagaida, kamēr šķīdums kļūs dzidrs.

Kā nākamo soli veic tagmentētas DNS amplifikāciju ar PCR palīdzību. PCR laikā pie DNS piesaistās indeksi, kas ļauj vēlāk atpazīt katru izolātu, kā arī sekvences, kas ir nepieciešamas sekvenču klasteru izveidošanā:

11. Stobrā samaisa 22 μ l EPM (*enhanced PCR mix*, uzlabots PCR maisījums) un 22 μ l nukleāžu brīva ūdens attiecīgi paraugu skaitam. Savorteksē un nocentrifugē uz mazās centrifūgas.
12. No plates ar paraugiem savāc un izmet supernatantu.
13. Noņem plati no magnēta un katram paraugam pievieno 40 μ l EPM un ūdens maisījuma. Aizlīmē plati ar plēvi un ievieto kratītāja uz 1 minūti 1600 RPM. Nocentrifugē plati uz 280 RPM 3 sekundes.
14. Katram paraugam pievieno 10 μ l indeksu adapteru. Aizlīmē plati ar plēvi un ievieto kratītāja uz 1 minūti 1600 RPM, nocentrifugē uz 280 RPM 30 sekundes.
15. Ievieto plati ar paraugiem PCR amplifikatorā ar sekojošiem uzstādījumiem (sk. 6. tabulu):

6. tabula

PCR programma tagmentētas DNS amplifikācijai.

Table 6

PCR programme for amplification of tagged DNA.

Temperatūra, °C Temperature, °C	Cikla ilgums Length of cycle	Ciklu skaits Number of cycles
68	3 min	1
98	3 min	1
98	45 s	12
62	30 s	
68	2 min	1
68	1 min	
10	līdz izņemšanai	

Pēc amplifikācijas nepieciešamības gadījumā paraugus var uzglābāt ledusskapī (no 2 līdz 8 °C) līdz 3 dienām.

Veic sagatavoto bibliotēku attīrīšanu ar magnētiskām lodītēm:

16. Plati ar paraugiem nocentrifugē uz 280 RPM 30 sekundes, novieto plati uz magnēta un sagaida, kamēr šķīdums kļūs dzidrs. 45 µl supernatanta pārliet jaunajā PCR platē.
17. Savorteksē un apmaisa SPB (*sample purification beads*, paraugu attīrīšanas lodītes).
18. Paraugiem pievieno 49 µl nukleāžu brīva ūdens un 45 µl SPB, samaisa ar pipeti. Aizlīmē plati ar plēvi un inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
19. Novieto plati uz magnēta un sagaida, kamēr šķīdums kļūs dzidrs.
20. Savorteksē SPB, pievieno 11,5 µl jaunajā PCR platē un pārliet 135 µl supernatanta no iepriekšējās plates. Samaisa ar pipeti. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes.
21. Novieto plati uz magnēta un sagaida, kamēr šķīdums kļūs dzidrs. Savāc un izmet supernatantu ar pipeti.
22. Pievieno 200 µl svaiga 80% etanola un inkubē istabas temperatūrā 30 sekundes. Savāc un izmet supernatantu ar pipeti, nepieskaroties lodītēm.
23. Atkārti mazgāšanu ar etanolu un atstāj plati žāvēties istabas temperatūrā 5 minūtes.
24. Noņem no magnēta un pievieno 32 µl RSB (*resuspension buffer*, resuspensijas buferis), samaisa ar pipeti. Inkubē istabas temperatūrā 2 minūtes.
25. Novieto plati uz magnēta un sagaida, kamēr šķīdums kļūs dzidrs. Pārvieta 30 µl supernatanta jaunajā PCR platē tā, lai nepieskartos lodītēm.

Nepieciešamības gadījuma sagatavotās bibliotēkas var uzglābāt saldētavā (no -25 līdz -15 °C) līdz 30 dienām.

2.2.4.2. Bibliotēku kvalitātes pārbaude

Pirms sekvenēšanas ir nepieciešams pārlicināties par sagatavoto bibliotēku kvalitāti, kā arī iegūt nepieciešamos datus bibliotēku koncentrāciju normalizēšanai. Šim nolūkam veic koncentrācijas mērījumus ar *Qubit* (aprakstīts nodaļā 2.2.3), sagatavošanai mērījumiem izmanto 2 µl DNS un 198 µl darba šķīduma; fragmentu garuma mērījumus veic ar kapilārās elektroforēzes aparātu.

Kapilārās elektroforēzes aparātā ievieto un pieslēdz *High Resolution* gēla kārtidžu. Reaģentu platē izvieto 0,2 ml stobriņu rindu ar 15 bp – 3 kbp korekcijas marķieri, katram stobriņam pievienojot 15 µl minerāleļļas, lai marķieri neiztvaikotu mērījumu laikā. Attiecīgajos lauciņos platē ielej mazgāšanas buferi un DNS separācijas buferi, kurus pārklāj ar attiecīgi diviem un četriem mililitriem minerāleļļas. Pielieto divus marķieru veidus – izmēra marķieri (*Size Marker*) un korekcijas marķieri (*Alignment Marker*). Izmēra marķieri (šajā pētījumā 50 bp – 1,5 kbp) izmanto aparāta mērījumu salīdzināšanai ar noteikto DNS fragmentu garumu. Korekcijas marķieris ir nepieciešams fragmentu kustīguma korekcijai, kā arī mērījumu robežvērtību noteikšanai. Pēc reaģentu plates sagatavošanas aparātā iestiprina plati ar paraugiem. Gadījumā, ja kāda no plates iedobēm ir tukša, tā tiek piepildīta ar DNS dilūcijas buferi, lai novērstu aparāta kārtidža kapilāru bojāšanu. Mērījumiem izmanto 1 l µl parauga. Plati ievieto aparātā un ieslēdz programmu “*NGS quality control QS*”. Programmā norāda, cik rindas ir aizpildītas ar stobriņiem un palaiž mērījumu (*Start*). Pēc elektroforēzes beigām programmā ir apskatāms attēls ar paraugu DNS un marķieriem (elektroferogramma), kas izteikti attiecīgajos bāzu pāros. Noraksta protokolā paraugu DNS fragmentu garumu bāzu pāros.

2.2.4.3. Bibliotēku normalizēšana un apvienošana

Bibliotēku normalizēšanas posms ir nepieciešams, lai novestu visas sekvenēšanā izmantotās bibliotēkas līdz vienādai koncentrācijai (4 nM). Izmantojot iepriekš iegūtos datus par bibliotēku DNS koncentrāciju un fragmentu garumu, izrēķina attiecīgo bibliotēku tilpumu un RSB tilpumu, kas ir nepieciešams bibliotēku atšķaidīšanai.

$$DNS_t = \frac{GT * 660 * FG * GK}{PK * 10^6}$$

4. attēls. Formula DNS parauga tilpuma (DNS_t) bibliotēku normalizēšanai. GT – bibliotēkas gala tilpums (20 μ l), FG – DNS fragmenta garums (bp), GK – bibliotēkas gala koncentrācija (4 nM), PK – parauga koncentrācija (ng/ μ l).

Figure 4. Formula of DNA sample volume for normalization of libraries. GT – final volume of library (20 μ l), FG – length of DNA fragment (bp), GK – final concentration of library (4 nM), PK – concentration of sample (ng/ μ l).

Visas normalizētās DNS bibliotēkas vienādos tilpumos apvieno vienā stobriņā. Citā stobriņā samaisa 800 μ l nukleāžu brīva ūdens un 200 μ l 1M NaOH, lai pagatavotu 0,2 M NaOH šķīdumu. Jaunā stobriņā pievieno 5 μ l apvienoto bibliotēku un 5 μ l NaOH šķīduma, savorteksē. Inkubē 5 minūtes istabas temperatūrā. Pievieno 990 μ l HT1 un savorteksē. Līdz nākamo posmu veikšanai denaturēto DNS bibliotēku tur uz ledus.

Sagatavo, denaturē un atšķaida PhiX kontroli. Tā ir nepieciešama sekvenēšanas kvalitātes kontroles veikšanai. Stobriņā samaisa 2 μ l PhiX bibliotēku un 3 μ l Tris-Cl. Pievieno NaOH šķīdumu, savorteksē un nocentrifugē uz mazās centrifūgas. Inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes. Pievieno 990 μ l HT1. Denaturētu PhiX var glabāt saldētavā līdz 3 nedēļām.

Jaunā stobriņā pievieno 600 μ l sagatavotas un apvienotas DNS bibliotēkas. Ar pipeti izņem 6 μ l no bibliotēkas un pievieno 6 μ l PhiX. Inkubē termostatā 2 minūtes 98 °C un 5 minūtes 4 °C. Sagatavoto bibliotēku ievieto kārtidžā *Load Sample* rezervuārā.

2.2.4.4. Sekvenatora uzstādīšana

Pirms sekvenēšanas uzsākšanas pārlicinās, ka iekārta ir gatava darbam. Nepieciešamības gadījumā palaiž *Maintenance Wash*. Atšķaida Tween-20 līdz 0,5%, piepilda visas mazgāšanas plates rezervuārus un ievieto iekārtā kopā ar 350 ml atšķaidīta Tween-20 mazgāšanas pudelē. Iekārtā palaiž *Maintenance Wash* programmu. Kopā veic 3 mazgāšanas.

Iekārtas ekrānā izvēlas *Sequence* pogu, lai sāktu sekvenēšanu. Augšupielādē protokolu (*Sample Sheet*), kur ir norādīti paraugu nosaukumi un izkārtojums platē (nepieciešams tālākai indeksu atpazīšanai). Nomazgā plūsmas šūnu čipu (*flow cell*) ar destilētu ūdeni un nosusina ar papīra dvieli. Iekārtā ieliek plūsmas šūnu, kārtidžu ar DNS bibliotēkām un PR2 pudeli. Pārlicinās, ka atkritumu pudele ir tukša. Nospiež *Start Run* pogu.

2.2.5. Datu apstrāde

Sekvenču apstrāde un virulences gēnu klātbūtnes noteikšana ir veikta *Galaxy* platformā (Afgan et al., 2018). *Trimmomatic* v0.38 (Bolger et al., 2014) un *fastp* v0.19.5 (S. Chen et al.,

2018) programmas pielieto, lai izgrieztu adapteru sekvenču un zemas kvalitātes nolasījumus (kvalitātes vērtējums zem 20). Datu kvalitātes novērtēšanai izmanto *FastQC* v0.11.8 (Andrews, n.d.) un *MultiQC* v1.9 programmu rezultātu vizualizācijai (Ewels et al., 2016). *FastQC* programma ļauj izvērtēt sekvenču kvalitāti, balstoties uz vairākiem parametriem. *SPAdes* v3.12.0 asamblēšanas programmu pielieto sekvenču *de novo* asamblēšanai (Bankevich et al., 2012).

Asamblēto sekvenču kvalitāti apskata ar *Quast* v5.0.2 (Mikheenko et al., 2018). Analizē pievērš uzmanību genomu izmēram (*Y. enterocolitica* tam ir jābūt 3.7 Mbp – 5.5 Mbp), kontigu skaitam, %GC (*Y. enterocolitica* ir ap 47%) un N50 parametram, kas raksturo sekvenču nepārtrauktību (50% no sekvenču satura ir kontigos, kuru garums ir mazāks par vai vienāds ar N50) (>15kb). Nekvalitatīvas sekvenču netiek iekļautas turpmākajās darbībās. Baktēriju taksonomisko piederību apstiprina ar *Kraken2* v2.1.1 programmu, salīdzinot pret *MiniKraken2* v2 datubāzi (Wood & Salzberg, 2014). Visus kontaminētus izolātus un izolātus, kuriem mazāk par 60% kontigu tika identificēti kā *Y. enterocolitica*, izslēdza no turpmākajām darbībām.

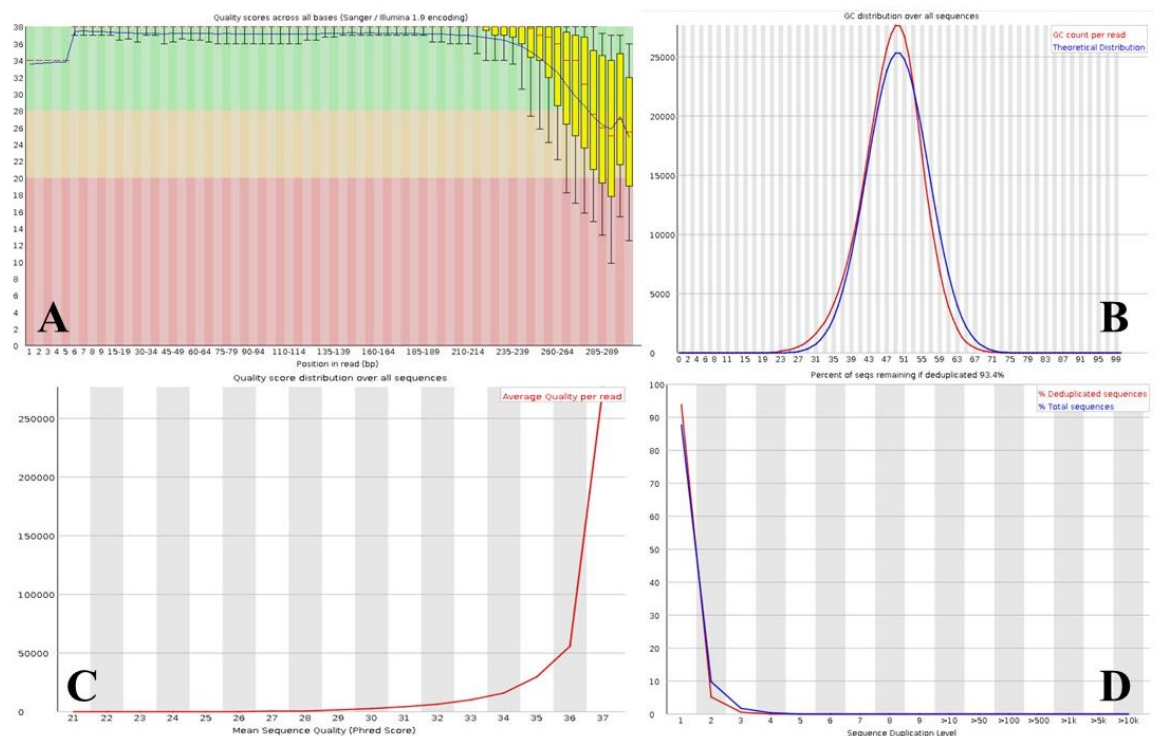
Virulences gēnu klātbūtnes noteikšanai pielieto *ABRicate* v1.0.1 programmu (Seemann, 2016) un virulences faktoru datu bāzi *VFDB* (versija no 19.04.2020, 2597 ierakstu) (B. Liu et al., 2019). Gēnu klātbūtni konstatēja, ja vismaz 70% no tā garuma ar vismaz 70% identitāti sakrita ar nukleotīdiem kontigos. *ystA* un *ystB* gēnu gadījumā vismaz 80% sakritības. *starmap* v0.7.1 (Bharat et al., 2022) izmanto plazmīdu klātbūtnes konstatēšanai, salīdzinot pret *PlasmidFinder* datubāzi (versija no 29.11.2021) (Camacho et al., 2009; Carattoli et al., 2014), kā arī antibiotiku rezistences gēnu noteikšanai, salīdzinot pret *ResFinder* datubāzi (versija no 04.02.2022) (Bortolaia et al., 2020; Camacho et al., 2009).

Lai izpētītu izolātu daudzveidību, neapstrādātas sekvenču augšupielādēja *Enterobase*, kur veica multi-lokusu sekvenču tipēšanu (*MLST*) un kodola genomu multi-lokusu sekvenču tipēšanu (*cgMLST*) (Zhou et al., 2020). *HierCC* v1 metodi izmanto, lai noskaidrotu izolātu radniecību (Zhou et al., 2021). Ģenētisko distanci, balstoties uz *cgMLST* profiliem izrēķina ar *MSTree* v2 (J. Liu et al., 2020) algoritmu uz vizualizē ar *GrapeTree* (Zhou et al., 2018).

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Sekvenču kvalitātes un taksonomiskās piederības novērtējums

Pirms asamblēšanas ar *FastQC* palīdzību tika pārbaudīta iegūto sekvenču kvalitāte. Programma apskata vairākus radītājus, no kuriem svarīgākie ir sekvenču kvalitāte pēc bāzēm, sekvenču kvalitātes vērtību sadalījums, GC īpatsvars, N daudzums, sekvenču atkārtojumu līmenis un adapteru sekvenču klātbūtne. 5. attēls parāda kvalitatīvas sekvenču radītāju piemēru.



5. attēls. Kvalitatīvas sekvenču *FastQC* analīzes piemērs. (A) Kvalitātes vērtības visās nolasījumu pozīcijās (B) GC īpatsvara sadalījums sekvenču. (C) Sekvenču kvalitātes vērtību sadalījums starp visām bāzēm nolasījumos. (D) Sekvenču atkārtojumi.

Figure 5. An example of good quality sequences' *FastQC* analysis. (A) Per base quality score. (B) Per sequence GC content. (C) Per sequence quality score. (D) Duplicate sequences.

Uz 5. attēla A daļas y-ass parāda kvalitātes vērtības. Jo lielāks ir rādītājs – jo labāks ir bāzes signāls. Grafika fons sadala to ļoti labos nolasījumos (zaļā krāsā), pietiekami labos (oranžā) un sliktos (sarkanā). *Illumina* platformas sekvenču var bieži novērot kvalitātes kritumu, tuvojoties nolasījumu beigām. B daļa attēlo GC daudzumu (sarkans grafiks) un salīdzina to ar teorētisko sadalījumu (zils grafiks). C daļa norāda, cik daudz bāzes ir nolasītas ar katru kvalitātes vērtību, kas ir dota uz x ass. D daļa atspoguļo sekvenču daļas un to atkārtotības līmeni. Zems atkārtotības līmenis liecina par labu sekvenču pārklājumu, bet augsts – par konkrētu daļu pārampifikāciju PCR laikā.

Adapteru sekvenču nebija detektētas, tās tika veiksmīgi izgrieztas iepriekš. N daudzums (bāzu skaits, kuras nevar konkrēti noteikt) visām sekvencēm ir zem 1%.

7. tabula parāda asamblēto sekvenču kvalitātes rādītājus. Visiem izolātiem izdevās iegūt kvalitatīvas pilna genoma sekvenču. Visas darbā iegūtas sekvenču ir pieejama ENA (*European Nucleotide Archive*) datubāzē ar piekļuves numuru PRJEB52846 .

7. tabula.

Asamblēto sekvenču kvalitātes dati.

Table 7.

Quality data of assembled sequences.

Kvalitātes rādītājs Quality parameter	Vidējais Average	Minimums Minimal	Maksimums Maximal
Genoma garums, Mbp	4,72	4,43	5,52
Kontigu skaits	115	32	897
N50, kbp	201,4	19,9	345,3

Pēc *Kraken2* visi izolāti, izņemot vienu, pieder pie *Y. enterocolitica* sugas, ieskaitot divus paraugus, kas pēc MALDI-TOF tika identificēti kā *Y. canariae*. Viens celms (Nr. 62, salātu maisījums) tika apstiprināts kā *Y. massiliensis*. Tā ir cita *Yersinia* suga, kas tiek visbiežāk izolēta no saldūdens paraugiem (Thomas et al., 2022). Visticamāk, baktērija nokļuva uz salātu virsmu caur kontaminēto ūdeni irigācijas vai mazgāšanas laikā. *Y. massiliensis* nav uzskatīta par patogēno sugu, un tai nav tradicionālu *Yersinia* virulences gēnu (Souza & Falcão, 2012). Tika nolemts paturēt šo izolātu turpmākajās analizēs, lai apskatītu tā virulences potenciālu.

3.2. *Y. enterocolitica* virulences gēnu identificēšana

Y. enterocolitica ir augsti heterogēna suga, un izolātu virulences gēnu klātbūtnes noteikšana ir svarīgs solis patogenitātes izvērtēšanā. 66 darbā izmantotiem izolātiem tika noteikti 74 dažādi virulences gēni, kas ir atbildīgi par piesaisti un uzbrukumu saimniekšūnām, motilitāti un hemotaksi, sekrēciju un O antigēnu sintēzi. Pilno informāciju par katrā izolātā atrastajiem virulences gēniem ir apkopota 2. pielikumā. Zemāk ir aprakstīti nozīmīgākie atrastie gēni un to grupas.

No visiem klasiskajiem *Y. enterocolitica* virulences marķieriem, kas ir aprakstīti 1.4 nodaļā, pētījuma gaitā tika konstatēti tikai trīs – *ail*, *inv* un *ystB*. Pēc Garzetti et al., 2014, *ystB* ir biotipa 1A marķieris, savukārt *ystA* un *ail* – citu *Y. enterocolitica* biotipu (1B un 2-5). Tas ļauj izdarīt pieņēmumu, ka visi no atrastajiem izolātiem pieder pie 1A biotipa, kas tiek uzskatīts par nosacīti nepatogēno un kuram trūkst vairāki nozīmīgi virulences gēni (Tennant et al., 2003). Turklāt, nevienam no celmiem netika konstatēts neviens plazmīdas virulences gēns, kā arī pašas pYV plazmīdas klātbūtne.

4,6% (Nr. 33, 42, 49) no izolātiem tika konstatēta *ail* gēna klātbūtne. Izolāti nāk attiecīgi no tūrītiem burkāniem, nezināma avota un kartupeļu daivām. Visu paraugu ģeogrāfiskā izcelsme ir Latvija. Pēc Verbikova et al., 2018, *ail* prevalence svaigajos dārzeņos Eiropas Savienībā ir nedaudz augstāka - 6,7%. Šis gēns tiek uzskatīts par vienu no galvenajiem patogēno *Yersinia* marķieriem – to visbiežāk izmanto standartizētajos protokolos patogēno *Yersinia* noteikšanai (ISO, 2015). Vairāki mūsdienu pētījumi norāda, ka *ail* ir konstatēts arī nosacīti nepatogēnajam 1A biotipam, taču tikai šī gēna klātbūtne nevar viennozīmīgi apstiprināt celma bīstamību sabiedrības veselībai (Kraushaar et al., 2011; Sihvonen et al., 2011). Šis pieņēmums sakrīt ar citu pētījumu datiem, kur no augu valsts produktiem tiek izolēti tikai 1A biotipa celmi (Lee et al., 2004; Verbikova et al., 2018). Dažos pētījumos ir norādīts, ka, visticamāk, 1A biotipam ir alternatīvi virulences mehānismi, kas veicina uzbrukumu saimniekšūnām (apskatīts vēlāk nodaļā) (Batzilla et al., 2011; McNally et al., 2007). Šo uzskatu apstiprina arī 1A biotipa klīniskie izolāti no pacientiem ar diareju, kuriem *ail* gēnu atklāj tikai retos gadījumos (Campioni & Falcão, 2014).

Lielākai daļai izolātu tika konstatēti vēl divi klasiskie hromosomālie virulences marķieri – *inv* (95,4%) un *ystB* (98,5%). *inv* ir svarīgs baktērijas pārvietošanai no M šūnām, un, kopā ar *ail*, var veicināt veiksmīgu baktērijas pārvietošanos uz zarnu lūmenu. 1A biotipa izolātiem šis gēns nav aktīvs (Pierson & Falkow, 1990). Svarīgi piebilst, ka Pīrsona un Falkova pētījumā tika iekļauti tikai četri izolāti, kas, ņemot vērā nepatogēno izolātu lielo ģenētisko daudzveidību (Batzilla et al., 2011), nevar viennozīmīgi apstiprināt *inv* ekspresiju 1A biotipa izolātiem.

ystB ir enterotoksīnu YstIB kodējošais gēns, kas var izraisīt jersiniozes klīniskos simptomus. Tas ir visbiežāk sastopams 1A biotipam. Ir pierādīta YstIB letalitāte pelēm (Bhagat & Viridi, 2011), taču minimālā efektīvā deva tām ir 19,5 reišu lielāka nekā YstIA. *Y. enterocolitica* kultūras producē enterotoksīnu pie 37 °C un pH 7.5, kas ir tuvu vides apstākļiem tievajā zarnā (Singh & Viridi, 2004). Klīniskajiem izolātiem no pacientiem ar diareju konstatē *ystB* gēna klātbūtni (Campioni & Falcão, 2014; Platt-Samoraj et al., 2017; Singh & Viridi, 2004b). Visi šie fakti norāda uz izolātu ar *ystB* gēnu potenciālu spēju izraisīt jersiniozi.

Svarīgi piebilst, ka lielākai daļai klīnisko 1A biotipa izolātu, bez augstāk pieminētajiem gēniem, tiek konstatēti arī *hreP* un *myf*, kas ir nepieciešami baktērijas veiksmīgam uzbrukumam saimniekšūnām (Bancerz-Kisiel et al., 2018), un *fep-fes* gēnu klasteris (Schubert et al., 1999), kas atvieglo dzelzs uzņemšanu (Campioni & Falcão, 2014). Literatūrā nav ziņojumu par *Yersinia* veiksmīgas inficēšanas iespējamību bez šiem konkrētiem gēniem, tam ir nepieciešami papildus pētījumi.

Y. enterocolitica ir trīs galvenās T3SS sekrēcijas sistēmas, kas ir svarīgas virulencei – Ysp, kas ir iekodēta plazmīdā, Ysa hromosomāli un flagelārā sekrēcijas sistēma (Kim et al.,

2008). Nevienā izpētītajā izolātā nav Ysp un Ysa kodējošo gēnu, taču visos ir atrasti gēni no flagelārās sekrēcijas sistēmas. Daļa no tiem ir *flgA*, *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE*, *flgF*, *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgJ*, *flgK*, *flgL*, *flgM*, *flgN*, *flhA*, *flhB* (98,5%), *flhC*, *flhD*, *flhE*, *fliA*, *fliD*, *fliE*, *fliF*, *fliG*, *fliH*, *fliI*, *fliJ*, *fliK*, *fliL*, *fliM*, *fliN*, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, *fliS*, *fliT* un *fliZ* (visiem gēniem, kuriem nav norādīta prevalence – 100%). Visi no uzskaitītiem gēniem ir svarīgi flagellu biosintēzē, kas, savukārt, veicina uzbrukumu saimniekšūnām. Ir pierādīts, ka 1A biotipa baktērijas ar dažādām mutācijām flagellu veidojošos gēnos nav spējīgas kolonizēt cilvēka HEP-2 šūnu kultūras, kā arī demonstrē zemāku dzīvotspēju makrofāgos – trīs stundas salīdzinot ar 24 stundām savvaļas tipam. Spēja izdzīvot un veiksmīgi vairoties makrofāgos varētu būt viens no noteicošajiem faktoriem *Y. enterocolitica* infekcijās ar celmiem bez klasiskajiem virulences gēniem (Pujol & Bliska, 2005). *Y. enterocolitica* flagellu klātbūtne samazina iekaisuma veicinoša citokinīna TNF- α sintēzes intensitāti makrofāgiem un palielina – pretiekaisuma interleikīna (IL)-10. Pie tam, ir izteikts pieņēmums, ka flagelārā T3SS veicina baktērijas spēju kolonizēt zarnu epitēliju, kas ir svarīgs solis infekcijas veidošanās (tuvāk apskatīts nodaļā 1.5) (McNally et al., 2007). Visi no minētajiem faktiem apstiprina, ka *Yersinia* celmi bez klasiskajiem piesaistes un uzbrukuma gēniem var joprojām inficēt cilvēka šūnas, izmantojot flagellas, kas apstiprina uzskatu par 1A biotipa patogenitāti un izskaidro klīnisko izolātu bez klasiskajiem virulences marķieriem patogenitātes mehānismu.

Flagellu veidojošie gēni ir svarīgi citu virulences gēnu regulācijai. *flhDC* ir galvenais motilitāti regulējošs operons, savukārt *fliA* kodē ζ -28 faktoru. Turklāt, ir pierādīts, ka *fliA* regulē *inv* un plazmīdas virulences gēnu ekspresiju, kas tālāk apstiprina motilitātes gēnu lomu *Yersinia* virulences veidošanā (Horne & Prüß, 2006; Young et al., 2000).

No augstāk minētajiem motilitāti nosakošiem gēniem ir divi, kas netika konstatēti visiem izolātiem – *fliB* (83,1%) un *fliC* (53,8%). *fliC* gēns kodē flagelīnu, kas ir flagellu veidojošs proteīns (Kapatral & Minnich, 1995), savukārt *fliB* kodē flagelīna lizīn-N-metilāzi, kas arī ir nepieciešama flagellu veidošanai. Svarīgi pieminēt, ka *fliB* tiek pastiprināti aktivēts zemākās temperatūrās, veicinot baktērijas izdzīvošanu nelabvēlīgajos apstākļos (Bresolin et al., 2006). Literatūrā nav pieminētas šo gēnu delēcijas sekas.

Bez augstāk pieminētajiem gēniem, citi atrasti flagelārās sekrēcijas sistēmas gēni ir *cheA*, *cheB*, *cheD*, *cheR*, *cheW*, *cheY* un *cheZ* (visiem norādītiem gēniem prevalence ir 100%), kas iekodē proteīnus, atbildīgus par hemotakses mehānismu. Pateicoties šai gēnu grupai, baktērija spēj ātri reaģēt uz ķīmiskām izmaiņām vidē un modificēt flagellu rotācijas virzienu. *motA* (100%) un *motB* (100%), savukārt, iekodē flagellārus motorproteīnus (Bren & Eisenbach, 2000). Kaut gan to trūkums neierobežo motilitāti, tie ietekmē baktērijas spējas pielāgoties mainīgiem vides apstākļiem. Flagellu veidojošie gēni ir svarīgi bioplēvju veidošanai, kas ļauj

Yersinia ilgāku laiku saglabāties vides paraugos, tai skaitā uz augu valsts produktu virsmas (Kim et al., 2008).

Lipopolisaharīdi ir svarīga Gram-negatīvo baktēriju ārējās membrānas sastāvdaļa. Tie aktivē imūnsistēmas patogēnu atpazīšanas receptorus, kas uzsāk iekaisuma procesu (Alexander & Rietschel, 2001). LPS ir svarīgi baktēriju izdzīvošanai (G. Zhang et al., 2013) un, *Yersinia* gadījumā, virulencei. *Y. enterocolitica* LPS sastāv no polisaharīda – O antigēna un lipīda A, hidrofoba, pie membrānas piestiprināta lipīda (Raetz et al., 2007). O antigēnu trūkums noved pie *inv* samazinātās ekspresijas, *ail* ekspresijas inhibēšanas un *flhDC* operona pastiprinātās ekspresijas (Bengoechea et al., 2004).

O antigēna klastera gēni, kas tika atklāti, ir *ddhA* (43,1%), *ddhB* (40,0%), *wbcA* (7,7%), *wbcC* (7,7%), *wbcD* (7,7%), *wbcF* (7,7%), *wbcG* (10,8%), *wbcH* (10,8%), *wzx* (7,7%), *wzy* (7,7%), *fcl* (12,3%), *gmd* (16,9%), *galE* (93,8%), *galU* (78,5%), *manB* (20,0%) un *manC* (16,9%). Ir vērts pieminēt, ka tikai *gal*, *man* un *gmd* gēni ir atrodami visbiežāk sastopamo patogēno serotipu O:3, O:9, O:8 un O:5,27 gēnu klasteros, bet pārējie tiek asociēti ar O:8 un O:9 serotipiem (Garzetti et al., 2014; L. Zhang et al., 1997). Četriem izolātiem (Nr. 37, 38, 39, 41) netika konstatēts neviens no O antigēna gēnu klastera gēniem, kas varētu liecināt par to zemu virulences potenciālu.

wbcA, kas ir atklāts 7,7% sekvenēs, ir O:8 serotipa marķieris. Citu serotipu ģenētiskie marķieri netika konstatēti (Garzetti et al., 2014). O:8 celmi tiek bieži izolēti no pacientiem ar jersiniozi, taču tie var piederēt gan pie augsti patogēnā 1B biotipa, gan pie 1A (Bottone, 1997). Kaut gan O:8 serotipa *Y. enterocolitica* galvenokārt atklāj Amerikas Savienotajās Valstīs un Japānā, tie ir sastopami arī Eiropā, tai skaitā uz dārzeniem un augļiem (Verbikova et al., 2018). Kā jau minēts iepriekš, daudzi no klasiskajiem virulences gēniem netika atrasti nevienam no izolātiem, tāpēc nav iemeslu pieņemt, ka atrastie O:8 serotipa celmi varētu piederēt pie 1B biotipa (Garzetti et al., 2014).

Vēl viens gēns, kas tika atklāts tikai O:8 serotipa celmiem, ir *prt* (7,7%). Literatūrā tas tiek pieminēts kā *Y. pseudotuberculosis* (cita jersiniozes izraisītāja) (Fredriksson-Ahomaa et al., 2014) O antigēna sintēzes gēnu klastera daļa (Skurnik et al., 2000), taču nav ziņojumu par šo gēnu *Y. enterocolitica* vai citām *Yersinia* sugām. Turpmākie pētījumi ir nepieciešami, lai noskaidrotu, kādu lomu tas spēlē *Y. enterocolitica* virulencei.

Izpētītajos izolātos tika atklāti divi gēni, kas kodē proteīnus lipīda A sintēzei – *lpxC* (100%) un *lpxD* (15,4%). Lipīds A ir svarīgs baktērijas izdzīvošanai un tā trūkums var novest pie celma mazākai izturībai pret antibiotikām (Cole et al., 2011; Knirel et al., 2021).

Vēl viena ārējās membrānas sastāvdaļa, kas ir raksturīga visām patogēnajām *Yersinia* – ārējās membrānas proteīns OmpA, kuru iekodē gēns *ompA* (atrasts 100% izolātu). Šis gēns ir

ļoti konservatīvs un homologs ne tikai starp dažādiem *Y. enterocolitica* serotipiem (Gu et al., 2012; Li et al., 2014), bet arī starp visām patogēnajām *Yersinia*. OmpA ir imunogēns (izsauc aktīvu imūnatbildi), tāpēc tiek piedāvāts kā vakcīnas pret *Yersinia* mērķproteīns (Y. Chen et al., 2015). Visticamāk, *ompA* ir saistīts ar *ystB* ekspresiju, taču konkrēts mehānisms vēl nav atklāts (Li et al., 2014).

Viens no pēdējiem atklātajiem *Y. enterocolitica* virulences mehānismiem ir citotoksitāte, kuru nodrošina YaxAB proteīni. Tie veido poras mērķšūnu membrānā, kas noved pie osmotiskās līzes. *yaxA* un *yaxB* gēnu (atklāti 96,9% izolātu) trūkums samazina baktērijas virulences potenciālu, kā arī neļauj tai kolonizēt liesu. Abu gēnu regulēšanai ir nepieciešams transkripcijas regulators RovA, taču *rovA* netika atklāts nevienā no izolātiem (Wagner et al., 2013). RovA piedalās vairāku gēnu ekspresijas regulācijā, tai skaitā *inv* (Dube et al., 2003). No tā var secināt, ka, visticamāk, izpētītajos celmos ne *yaxAB*, ne *inv* nav aktīvi.

Visiem izpētītajiem izolātiem tika atklāts gēns *blaA*, kas nosaka rezistenci pret ampicilīnu. Tas sakrīt ar datiem no citiem no pārtikas iegūtiem *Y. enterocolitica* pētījumiem, tai skaitā veiktiem Latvijā (Lee et al., 2004; Terentjeva et al., 2021).

Pēc tradicionālā uzskata *Y. enterocolitica* patogenitāti nosaka klasiskie virulences faktori kā *ail*, *inv*, *ymoA* un *myfA*, un to trūkums norāda uz celma avirulenci. Visas molekulārās *Y. enterocolitica* pato-serotipēšanas sistēmas balstās tieši uz šo gēnu noteikšanu (Garzetti et al., 2014). Neskatoties uz to, vairākiem klīniskiem izolātiem no dažādām valstīm trūkst šo virulences gēnu. Stephan et al., 2013 norāda, ka nevienam no klīniskajiem 1A biotipa celmiem nebija atrasti *ail*, *ystA* vai *myfA*, taču tie tika visbiežāk konstatēti pacientiem ar diareju (46% gadījumos). Bez tam, ģenētiski radniecīgi celmi bija atklāti cilvēkiem bez jersiniozes simptomiem, kas norāda, ka *Y. enterocolitica* var ilgstoši saglabāt dzīvotspēju organismā kā oportūnists.

Kaut gan 1A biotipa izolātiem trūkst nozīmīgu virulences gēnu, tie var izmantot alternatīvus virulences mehānismus caur flagelāro sekrēcijas sistēmu. Tie spēj veiksmīgi kolonizēt zarnu epitēlija šūnas un izdzīvot makrofāgos, kas ļauj tiem neizmantot M šūnas un Peijera plātnītes kā ceļu iekļūšanai limfajos (McNally et al., 2007)

Gandrīz visiem 1A biotipa celmiem konstatē *ystB* gēna klātbūtni, kurš, visticamāk, ir atbildīgs par jersiniozes simptomu izraisīšanu – diareju un gastroenterītu (Singh & Viridi, 2004a). Nav ziņojumu, kas salīdzina šī biotipa infekcijas nopietnumu ar citiem biotipiem, taču, balstoties uz literatūrā aprakstīto pYV plazmīdas lomu (it īpaši *yadA*) imūnatbildes nomākšanā un hronisko infekciju veidošanā (Galindo et al., 2011), varētu būt, ka 1A biotipa celmi nevar izraisīt nopietnākus jersiniozes simptomus, kā arī hronisko *Y. enterocolitica* infekciju. Šī

pieņēmuma pārbaudei ir nepieciešams plašs klīnisko izolātu pētījums ar dažādu infekcijas gadījumu iekļaušanu.

1A biotipa spēja kolonizēt zarnu epitēlijšūnas un izraisīt infekciju ir atkarīga no mērķorganisma imūnsistēmas stāvokļa (Batzilla et al., 2011). Visticamāk, *ail* gēna klātbūtne palielina tā virulences potenciālu (Kraushaar et al., 2011; Platt-Samoraj et al., 2017).

Ir jāpiemin, ka 1A biotips ir raksturīgs ar lielu ģenētisko daudzveidību, tāpēc dažādu izolātu patogenitāte var krasi atšķirties (Batzilla et al., 2011). Līdz šim brīdim veikti pētījumi, kas apskata šo baktēriju bīstamību, balstās uz virulences gēnu izmeklējumiem un ģenētisko līdzību ar patogēnajiem celmiem (Bhagat & Viridi, 2007; Campioni & Falcão, 2014; Tennant et al., 2003). Eksperimenti ar šūnu kultūrām (HEp-2 un makrofāģiem) ar dažādiem izolātiem no daudzveidīgiem avotiem (klīniskie, no asimptomatiskiem pacientiem, pārtikas un vides) varētu sniegt labāku priekšstatu par 1A biotipa bīstamību sabiedrības veselībai.

No izpētītās literatūras izriet, ka vissvarīgākie komponenti *Y. enterocolitica* 1A biotipa virulencei ir flagelārā sekrēcijas sistēma (McNally et al., 2007) un *ystB* (Singh & Viridi, 2004a). Tie ir atrodami 98,5% *Y. enterocolitica* izolātiem. LPS sastāvdaļas (O antigēns un lipīds A) ir svarīgas un ietekmē citu virulences gēnu ekspresiju, taču nav obligātas (Bengoechea et al., 2004). Tas nozīmē, ka, neskatoties uz tradicionālu uzskatu par 1A biotipa nepatogēnitāti un augu valsts izcelsmes produktos sastopamu izolātu vāju virulenci, tie joprojām var izraisīt saslimšanu, it īpaši imūnkompromitētiem cilvēkiem.

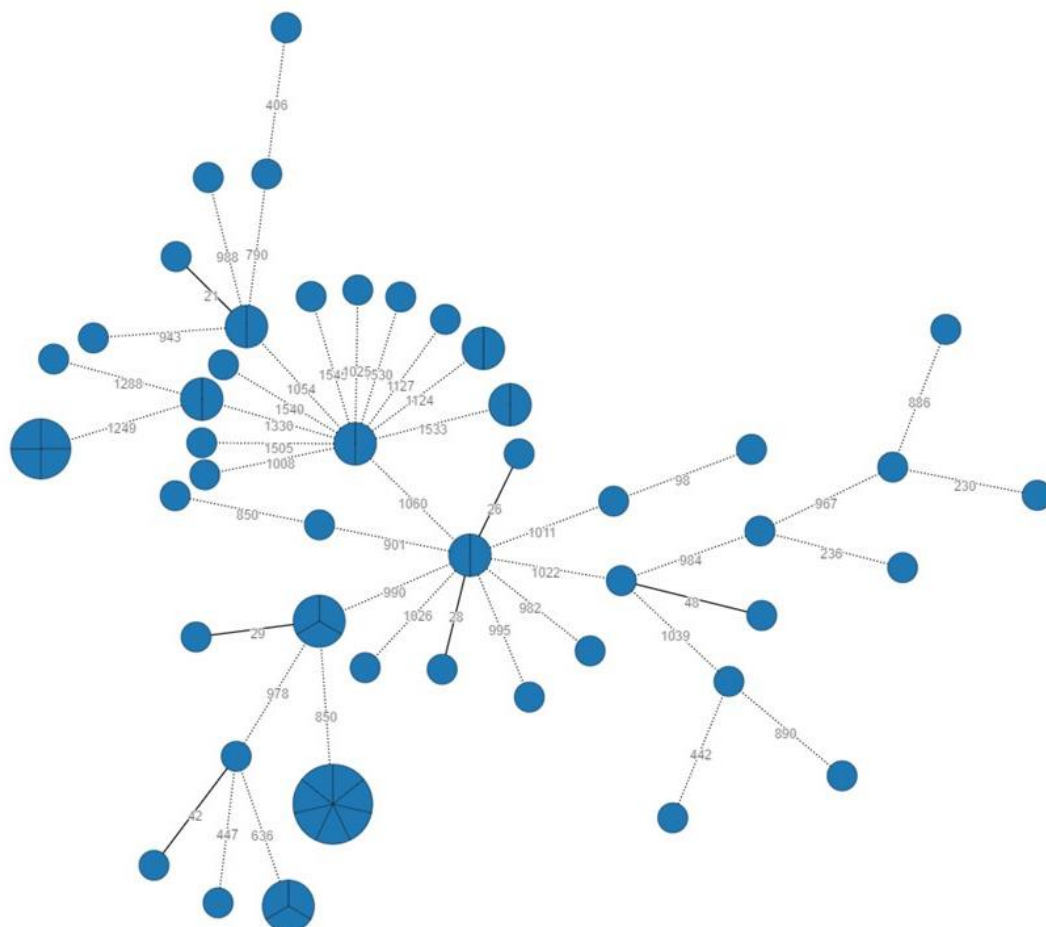
Y. massiliensis izolātam (Nr. 62) netika konstatēti daudzi virulencei svarīgi gēni, tai skaitā *ail*, *inv*, *fliB*, *fliC*, *yaxA* un *yaxB*. Interesanti, ka celmam ir atklāts *ystB*, kas iet pretrunā ar literatūrā aprakstīto. Tā kā *Y. massiliensis* nespēj veiksmīgi inficēt šūnas (Souza & Falcão, 2012), tikai šī viena gēna klātbūtne neapstiprina izolāta patogenitāti.

3.3. Augu izcelsmes pārtikas izolātu ģenētiskā daudzveidība

Lai izpētītu visu iegūto izolātu ģenētisko daudzveidību un līdzību, tika izmantota *cgMLST* pieeja, kas ļauj salīdzināt dažādas asamblētas sekvences pēc 1553 dažādu gēnu alēlēm. Tas ir nepieciešams, lai noskaidrotu, vai izolāti no dažādiem avotiem un vietām ir ģenētiski saistīti. Turklāt, ir iespējams salīdzināt tos ar citiem celmiem no *Enterobase* datubāzes (20.05.2022 versija, 5872 ieraksti). *HierCC* metodē 1490 alēļu atšķirība atdala pasugas, 1520 – sugas, savukārt izolātiem, kas ir saistīti ar vienu uzliesmojumu novēro līdz 10 alēļu atšķirību (HC10), radniecīgajiem izolātiem – līdz 200 (HC200). Katram celmam tiek piešķirts sekvenču tips (Zhou et al., 2020).

Salīdzināšanu veica ar citiem pārtikas izolātiem no Latvijas, lai noskaidrotu, vai *Yersinia* kontaminācija nonāk uz augu valsts produktiem no dzīvnieku fermām; kā arī ar citiem *Yersinia*

celmiem ar tiem pašiem sekvenču tipiem. Analizē tika iekļauti 64 *Y. enterocolitica* izolāti no šī darba, seši cilvēka izolāti no Apvienotās Karalistes; Latvijā iegūti 51 cūkgaļas izolāti, trīs liellopu gaļas un četri pārtikas izolāti no nezināma avota; kā arī viens savvaļas dzīvnieka izolāts, 119 izolāti no Latvijas cūkām un seši no nezināmiem avotiem.



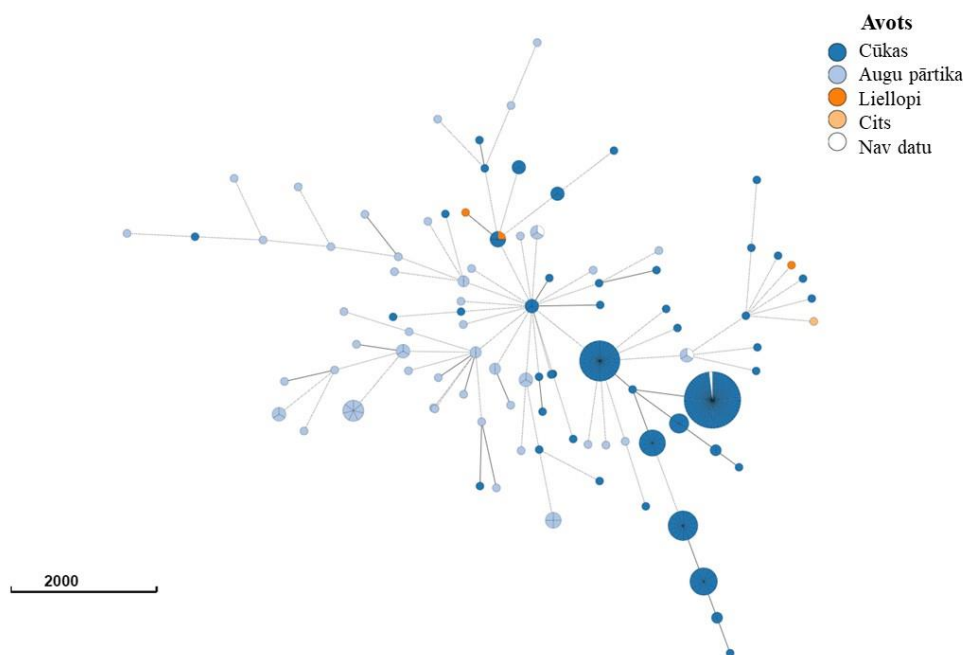
6. attēls. MST (*minimal spanning tree*) dendrogramma *Y. enterocolitica* izolātiem no augu izcelsmes pārtikas produktiem. Skaitļi uz līnijām apzīmē atšķirīgu alēļu skaitu starp celmiem. Celmi ar atšķirību mazāku par 10 alēlēm apvienoti vienā aplī.

Figure 6. MST (*minimal spanning tree*) for *Y. enterocolitica* isolates from plant-based foods. Numbers on lines indicate different alleles number between strains. Strains with difference smaller than 10 are combined into one circle.

Pēc 6. attēla var spriest, ka augu izcelsmes pārtikas izolāti nav saistīti savā starpā, izņemot gadījumus, kad tie ir paņemti no viena avota vienlaicīgi un, attiecīgi, atbilst vienam sekvenču tipam. Šie dati liecina par to, ka augu izcelsmes pārtikas kontamināciju ar *Y. enterocolitica* nevar saistīt ar vienu avotu, kas ir izskaidrojams ar risku daudzveidību (aprakstīts 1.6 nodaļā). Tā kā paraugu mikrobioloģiskais piesārņojums var veidoties jebkurā ražošanas stadijā, ir svarīgi veikt monitoringa pasākumus, it īpaši lietošanai gataviem produktiem (Machado-Moreira et al., 2019).

Apskatot Latvijas *Y. enterocolitica* dzīvnieku un augu valsts izcelsmes pārtikas MST dendrogrammu (7. attēlā), var redzēt, ka neviens no dzīvnieku izcelsmes izolātiem nav radniecīgs šajā darbā apskatītajiem. Tas varētu liecināt, ka augu izcelsmes pārtikas kontaminācija nenāk no dzīvnieku fermām (piemēram, no kūtsmēsliem), bet no citiem avotiem. Tā kā dzīvnieku izolātiem konstatē lielāku virulences potenciālu (Platt-Samoraj et al., 2017), kontaminācija no fermām var būt īpaši bīstama sabiedrības veselībai.

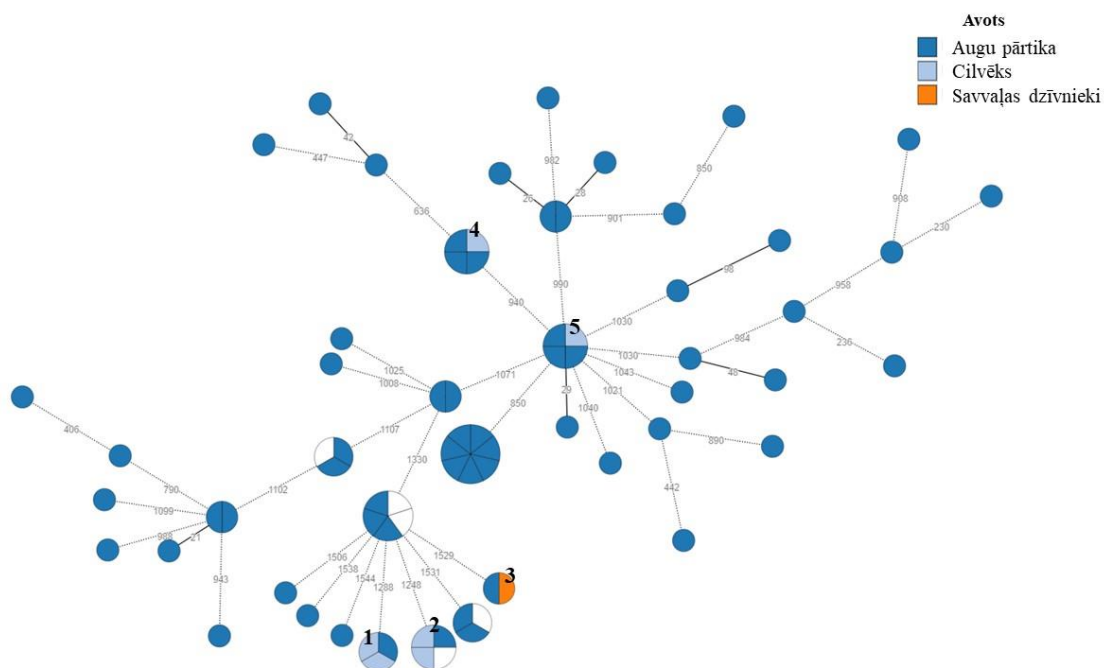
Y. enterocolitica tiek bieži izolēta no vides, t.sk. saldūdens, un varētu nonākt uz augiem irigācijas laikā. Pie tam, pieaug ziņojumu skaits par grauzējiem kā baktērijas pārnēsējiem. Backhans et al., 2011 norāda, ka patogēnie *Y. enterocolitica* celmi ir ģenētiski ļoti līdzīgi izolātiem no cūku fermām un tiek atrasti tikai grauzējos, kas tās apdzīvo. Jaunākie pētījumi apstrīd šo uzskatu – tajos konstatētās *Y. enterocolitica* pieder pie 1A biotipa un ir atrastas dzīvniekos ar plašāku dzīvošanas areālu. Pie tā, šie izolāti ģenētiski ir līdzīgi citos savvaļas dzīvniekos konstatētajiem celmiem, kā arī augu izcelsmes pārtikas izolātiem (Platt-Samoraj et al., 2020). Tā kā Latvijā netiek ņemti *Y. enterocolitica* paraugi no vides un savvaļas dzīvniekiem, šo pieņēmumu nav iespējams apstiprināt – ir nepieciešami papildus izmeklējumi.



7. attēls. MST (*minimal spanning tree*) dendrogramma *Y. enterocolitica* augu valsts izcelsmes pārtikas un dzīvnieku izolātiem no Latvijas.

Figure 7. MST (*minimal spanning tree*) for *Y. enterocolitica* animal and plant-based foods isolates from Latvia.

Lai noskaidrotu, vai līdzīgi izolāti ir sastopami citos reģionos, tika nolemts izveidot MST dendrogrammu ar visiem izolātiem ar tādiem pašiem ST, kā *Y. enterocolitica* izolātiem no augu izcelsmes pārtikas (sk. 8. attēlu).



8. attēls. MST (*minimal spanning tree*) dendrogramma *Y. enterocolitica* izolātiem, kas ir ģenētiski līdzīgi augu valsts izcelsmes pārtikas izolātiem no Latvijas. Skaitļi uz līnijām apzīmē atšķirīgu alēļu skaitu starp celmiem. Celmi ar atšķirību, mazāku par 10 alēlēm, apvienoti vienā aplī. Balta krāsa apzīmē nezināmās izcelsmes izolātus. Ar numuriem ir atzīmēti mezgli, kuros konstatējama celmu no dažādu avotu līdzība.

Figure 8. MST (*minimal spanning tree*) for *Y. enterocolitica* isolates genetically similar to plant-based foods isolates from Latvia. Numbers on lines indicate different alleles number between strains. Isolates with difference smaller than 10 are combined into one node. White indicates samples from unknown source. Nodes where similarity between strains is visible are numbered.

Enterobase datubāzē tika atrasti 6 cilvēka izolāti, kuriem ir 10 un mazāk alēļu atšķirība ar šajā darbā apskatītajiem augu pārtikas izolātiem. Ir vērts pieminēt, ka visos no šiem izolātiem ir atrasti *ystB* un *inv* virulences gēni, taču nav *ail*. Visi no tiem nāk no Apvienotās Karalistes un ir iegūti 2017.-2021. gados. Datubāzē nav datu par iespējamo inficēšanas avotu, kā arī nav noteikts biotips un serotips.

8. attēlā mezglā 1 ir apvienoti trīs izolāti, no kuriem divi nāk no cilvēka un ir iegūti 2018. gadā. Augu pārtikas izolāts (Nr. 20) nāk no tīrītiem burkāniem un ir iegūts 2020. gadā. Mezgls 2 apvieno divus 2021. gada cilvēka izolātus, piecus pārtikas izolātus no Latvijas (Nr. 37-41) un divus izolātus no Ķīnas ar nezināmu izcelsmi. Mezglā 3 ir attēloti 2014. gada Itālijā iegūts izolāts no savvaļas dzīvnieka (brīža) un 2019. gada pārtikas izolāts (Nr. 49) no kartupeļu daivām. Interesanti, ka šī izolāta taksonomiskā piederība ir noteikta kā *Y. proxima*. Šī suga ir

atklāta 2020. gadā, tāpēc tā nav labi izpētīta un var būt grūti noteicama ar plaši izmantotām metodēm (t.sk. pielietotiem šajā darbā) (le Guern et al., 2020). Mezgls 4 satur cilvēka izolātu no 2017. gada un trīs 2017. gada izolātus (Nr. 64-66) no tīrītiem sīpoliem. Mezglā 5 attēlots 2021. gada cilvēka izolāts un trīs 2018. gada izolāti no kartupeļu daivām (Nr. 43, 45, 46).

HC10 rādītājs parasti norāda celmus, kas ir saistīti ar vienu epidemioloģisko uzliesmojumu, taču atklāto līdzību gadījumā kaut kādu sakaru ir grūti pierādīt liela laika starpības un ģeogrāfiskā attāluma dēļ. Neskatoties uz to, ir skaidrs, ka celmi ar ļoti līdzīgu ģenētisko profilu šajā darbā apskatītajiem var inficēt cilvēkus. Diemžēl, *Enterobase* nav nekādu datu par slimības gaitu un pacientu veselības stāvokli, tāpēc nav iespējams turpmāk spriest par novērotiem simptomiem, hronisko *Y. enterocolitica* infekciju un citiem parametriem.

Lai turpmāk apskatītu un salīdzinātu izolātu ģenētisko līdzību, visiem cilvēka un savvaļas dzīvnieka izolātiem tika veikta virulences gēnu noteikšana pēc 2.2.5 nodaļā aprakstītas procedūras. Iegūtie rezultāti ir apskatīti 3. pielikumā. Nevienam no celmiem netika atrasts *ail* gēns, taču visiem cilvēka izolātiem konstatēja *inv* un *ystB* un flagelārās sekrēcijas sistēmas gēni. Šo izolātu izmeklējumi sakrīt ar Stephan et al., 2013 aprakstītiem klīniskajiem *Y. enterocolitica* 1A biotipa izolātiem.

Celmam no brieža netika konstatēti *ail* un *yaxAB* (līdzīgi tam radniecīgajam izolātam Nr. 49), kas varētu liecināt par tā piederību pie citas *Yersinia* sugas. Turpmāk to apliecina šo izolātu liela skaita alēļu atšķirība (1539).

3.4. *Y. enterocolitica* izolātu no augu valsts izcelsmes produktiem virulences potenciāls

Kā aprakstīts iepriekšējās nodaļās, pētījuma gaitā ir veiksmīgi iegūtas 66 pilna genoma sekvences. 65 izolātiem apstiprināja taksonomisko piederību pie *Y. enterocolitica*, vienam – *Y. massiliensis*. Trijiem no *Y. enterocolitica* izolātiem (4,6%) konstatēja klasiskā virulences marķiera *ail* klātbūtni, kā arī *inv* un *ystB* lielākai daļai izolātu (95,4% un 98,5% attiecīgi). Visiem no šajā darbā apskatītajiem celmiem trūkst svarīgu hromosomu virulences gēnu (*myf*, *hreP*, *ymoA*, *rovA*), kā arī plazmīdas pYV, kas apstiprina to piederību 1A biotipam (Garzetti et al., 2014). Pēc tradicionālā uzskata, tas apzīmē zemu virulences potenciālu un norāda, ka šādi izolāti nav bīstami sabiedrības veselībai (Tennant et al., 2003). Tāds pieņēmums ir maldinošs un neļauj pilnībā izvērtēt jersiniozes riskus.

Kā var secināt no vairāku pētījumu rezultātiem (Kraushaar et al., 2011; Platt-Samoraj et al., 2017; Stephan et al., 2013), 1A biotipa celmi spēj izraisīt saslimšanu un veiksmīgi kolonizēt zarnu epitēlija šūnas. Šajā darbā tika atklāti 12 (18,4% no visiem pētītajiem) *Y. enterocolitica* izolāti, kas ir ģenētiski līdzīgi klīniskajiem izolātiem. Līdz šim Latvijā nav veikta *Y.*

enterocolitica izolātu no augu valsts izcelsmes produktiem izpēte, un regulārs monitorings varētu turpmāk izskaidrot gan kontaminācijas izcelsmi, gan izvērtēt potenciālus riskus. Ir jāņem vērā, ka visi paraugi ir ņemti no t.s. gataviem lietošanai produktiem, kuri bieži tiek lietoti uzturā bez jebkādas apstrādes. *Y. enterocolitica* kontaminācija šajā gadījumā var būt īpaši bīstama, it īpaši imūnkompromitētiem cilvēkiem un bērniem (Machado-Moreira et al., 2019), kas sastāda lielu jersiniozes gadījumu proporciju Latvijā (69,3%) SPKC, 2021).

Augu valsts izcelsmes produktu *Y. enterocolitica* izolātu virulences potenciāls netiek pietiekami novērtēts un pētīts. Dati par baktērijas sastopamību dažādās produktu grupās ir ierobežoti, nav sistematizēti un nesniedz visaptverošu informāciju, kas ļautu pieņemt atbilstošos lēmumus pārtikas drošības jomā. Pēdējo gadu jersiniozes uzliesmojumi, kas bija saistīti ar augu valsts izcelsmes produktu grupu, apstiprina nepieciešamību pievērst lielāku uzmanību šim jautājumam.

Ir svarīgi pieminēt, ka konkrēta celma virulences potenciāls ir tikai daļa no faktoriem, kas ietekmē riskus sabiedrības veselībai. Baktēriju daudzums konkrētajā pārtikas produktā ietekmē inficēšanas varbūtību, savukārt, saimniekorganisma īpašības – vecums, hroniskas saslimšanas, imūnsistēmas stāvoklis – nosaka slimības gaitu (Galindo et al., 2011). Jersiniozes gadījumā neviens no šiem faktoriem nav pietiekami izskaidrots un pieprasa papildus pētījumus.

4. SECINĀJUMI

1. Virulences potenciāla izvērtēšana, balstoties tikai uz klasiskajiem virulences marķieriem ir noderīga, bet ne visaptveroša pieeja. Visticamāk, *Y. enterocolitica* eksistē alternatīvais virulences mehānisms, kas ļauj īstenot uzbrukumu mērķšūnām, neizmantojot tradicionāli aprakstītus mehānismus.
2. Augu valsts izcelsmes izolātiem ir raksturīga liela ģenētiska daudzveidība, kas liecina, ka *Y. enterocolitica* pārtikas kontaminācijas gadījumi dažādās vietās nav saistīti.
3. Izolātiem no augu valsts produktiem un dzīvnieku produktiem nav novērota savstarpēja līdzība. Tas ļauj pieņemt, ka augu valsts pārtikas kontaminācija Latvijā nenāk no dzīvnieku fermām, bet no citiem avotiem, kuru identificēšanai ir nepieciešami papildus pētījumi.
4. Kaut gan visi darbā aprakstītie *Y. enterocolitica* izolāti pieder pie 1A biotipa, kas netiek uzskatīts par patogēnu, nevar pilnībā noliegt šo izolātu virulences potenciālu. Ir nepieciešami papildus pētījumi un plašāks salīdzinājums ar klīniskajiem izolātiem, lai noskaidrotu atbilstošus risinājumus jersiniozes ierobežošanai.

5. PATEICĪBAS

Izsaku pateicību darba vadītājam Jurim Ķibildam par palīdzību darba organizēšanā, noderīgiem padomiem un labojumiem datu apstrādes un darba rakstīšanas laikā. Pateicos Silvai Gradovskai par apmācību un palīdzību darba organizēšanā laboratorijā. Paldies Laurai Alksnei par baktēriju kultūru atdzīvināšanu no mikroorganismu kultūru kolekcijas. Paldies arī Margaritai Terentjevai par iespēju izmantot darbā projekta lzp-2020/2-0418 ietvaros iegūtos izolātus.

6. LITERATŪRAS SARAKSTS

- Afgan, E., Baker, D., Bér', B., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Bj", B., Grüninggr"grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., ... Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*, 537–544.
- Alegbeleye, O. O., Singleton, I., & Sant'Ana, A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, *73*, 177–208.
- Alexander, C., & Rietschel, E. T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research*, *7*(3), 167–202.
- Andrews, S. (n.d.). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Backhans, A., Fellström, C., & Lambertz, S. T. (2011). Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in small wild rodents. *Epidemiology and Infection*, *139*(8), 1230–1238.
- Bancerz-Kisiel, A., Pieczywek, M., Łada, P., & Szweda, W. (2018). The Most Important Virulence Markers of *Yersinia enterocolitica* and Their Role during Infection. *Genes*, *9*(5), 235.
- Bancerz-Kisiel, A., Platt-Samoraj, A., Szczerba-Turek, A., Syczyło, K., & Szweda, W. (2015). The first pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strain isolated from a hunted wild boar (*Sus scrofa*) in Poland. *Epidemiology and Infection*, *143*(13), 2758–2765.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. v, Sirotkin, A. v, Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455–477.
- Batzilla, J., Heesemann, J., & Rakin, A. (2011). The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. *International Journal of Medical Microbiology*, *301*(7), 556–561.
- Bengoechea, J. A., Najdenski, H., & Skurnik, M. (2004). Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. *Molecular Microbiology*, *52*(2), 451–469.
- Bhagat, N., & Viridi, J. S. (2007). Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. *FEMS Microbiology Letters*, *266*(2), 177–183.
- Bhagat, N., & Viridi, J. S. (2011). The Enigma of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. *Critical Reviews in Microbiology*, *37*(1), 25–39.

- Bharat, A., Petkau, A., Avery, B. P., Chen, J. C., Folster, J. P., Carson, C. A., Kearney, A., Nadon, C., Mabon, P., Thiessen, J., Alexander, D. C., Allen, V., el Bailey, S., Bekal, S., German, G. J., Haldane, D., Hoang, L., Chui, L., Minion, J., ... Mulvey, M. R. (2022). Correlation between Phenotypic and In Silico Detection of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* in Canada Using Staramr. *Microorganisms*, *10*(2), 292.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Genome analysis Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120.
- Bonardi, S., le Guern, A. S., Savin, C., Pupillo, G., Bolzoni, L., Cavalca, M., & Pongolini, S. (2018). Detection, virulence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in bulk tank milk in Italy. *International Dairy Journal*, *84*, 46–53.
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*(12), 3491–3500.
- Bottone, E. J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. *Clinical Microbiology Reviews*, *10*(2), 257–276.
- Bottone, E. J. (2015). *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an Enduring Human Pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter*, *37*(1), 1–8.
- Bottone, E. J., Bercovier, H., & Mollaret, H. H. (2015). *Yersinia*. In M. E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, & W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley.
- Bren, A., & Eisenbach, M. (2000). How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *Journal of Bacteriology*, *182*(24), 6865–6873.
- Bresolin, G., Neuhaus, K., Scherer, S., & Fuchs, T. M. (2006). Transcriptional analysis of long-term adaptation of *Yersinia enterocolitica* to low-temperature growth. *Journal of Bacteriology*, *188*(8), 2945–2958.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, *10*(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Campioni, F., & Falcão, J. P. (2014). Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. *APMIS*, *122*(3), 215–222.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., & Hasman, H. (2014). In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(7), 3895–3903.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, *34*(17), i884–i890.

- Chen, Y., Duan, R., Li, X., Li, K., Liang, J., Liu, C., Qiu, H., Xiao, Y., Jing, H., & Wang, X. (2015). Homology analysis and cross-immunogenicity of OmpA from pathogenic *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Molecular Immunology*, 68(2), 290–299.
- Cole, K. E., Gattis, S. G., Angell, H. D., Fierke, C. A., & Christianson, D. W. (2011). Structure of the metal-dependent deacetylase LpxC from *Yersinia enterocolitica* complexed with the potent inhibitor CHIR-090. *Biochemistry*, 50(2), 258–265.
- Cornelis, G. R. (2002). *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *Journal of Cell Biology*, 158(3), 401–408.
- de Rouvroit, C. L., Sluiter, C., & Cornelis, G. R. (1992). Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology*, 6(3), 395–409.
- Denecker, G., Töttemeyer, S., Mota, L. J., Troisfontaines, P., Lambermont, I., Youta, C., Stainier, I., Ackermann, M., & Cornelis, G. R. (2002). Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infection and Immunity*, 70(7), 3510–3520.
- Dube, P. H., Handley, S. A., Revell, P. A., & Miller, V. L. (2003). The *rovA* mutant of *Yersinia enterocolitica* displays differential degrees of virulence depending on the route of infection. *Infection and Immunity*, 71(6), 3512–3520.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). *Yersiniosis. Annual epidemiological report for 2019*. Stockholm: ECDC; 2021.
- European Food Safety Authority. (2014). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (*Salmonella* and *Norovirus* in leafy greens eaten raw as salads). *EFSA Journal*, 12(3).
- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2), e06406.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048.
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2012). *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(1), 24–32.
- Felek, S., & Krukonis, E. S. (2009). The *Yersinia pestis* Ail protein mediates binding and Yop delivery to host cells required for plague virulence. *Infection and Immunity*, 77(2), 825–836.
- Fredriksson-Ahomaa, M., & Korkeala, H. (2003). Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 220–229.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Lindström, M., & Korkeala, H. (2014). *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In *Pathogens and Toxins in Foods* (pp. 164–180). ASM

- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., & Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 47(3), 315–329.
- Galindo, C. L., Rosenzweig, J. A., Kirtley, M. L., & Chopra, A. K. (2011). Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *Research Journal of Pathogens*, 2011, 16.
- Garzetti, D., Susen, R., Fruth, A., Tietze, E., Heesemann, J., & Rakin, A. (2014). A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3–4), 275–283.
- Grutzkau, A., Hanski, C., Hahn, H., & Steglitz, K. (1990). Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut*, 31, 1011–1015.
- Gu, W., Wang, X., Qiu, H., Luo, X., Xiao, D., Xiao, Y., Tang, L., Kan, B., & Jing, H. (2012). Comparative antigenic proteins and proteomics of pathogenic *Yersinia enterocolitica* bio-serotypes 1B/O: 8 and 2/O: 9 cultured at 25°C and 37°C. *Microbiology and Immunology*, 56(9), 583–594.
- Hall, M., Chattaway, M. A., Reuter, S., Savin, C., Strauch, E., Carniel, E., Connor, T., van Damme, I., Rajakaruna, L., Rajendram, D., Jenkins, C., Thomson, N. R., & McNally, A. (2015). Use of whole-genus genome sequence data to develop a multilocus sequence typing tool that accurately identifies *Yersinia* isolates to the species and subspecies levels. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(1), 35–42.
- Heusipp, G., Young, G. M., & Miller, V. L. (2001). HreP, an in vivo-expressed protease of *Yersinia enterocolitica*, is a new member of the family of subtilisin/kexin-like proteases. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3556–3563.
- Horne, S. M., & Prüß, B. M. (2006). Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes. *Archives of Microbiology*, 185(2), 115–126.
- Imori, P. F. M., Passaglia, J., Souza, R. A., Rocha, L. B., & Falcão, J. P. (2017). Virulence-related genes, adhesion and invasion of some *Yersinia enterocolitica*-like strains suggests its pathogenic potential. *Microbial Pathogenesis*, 104, 72–77.
- International Organisation for Standardization (ISO). (2015). ISO/TS 18867:2015 Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*.
- Jaballah, S., Fhoula, I., Boumaiza, M., Najjari, A., Mhajbi, N., Boudabous, A., Klibi, N., & Ouzari, H.-I. (2022). Prevalence and risk factors of potential pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Tunisian frozen ground beef through a shelf-life monitoring protocol validation. *Journal of Food Processing and Preservation*. 00, e16360.
- Julien-Javaux, F., Gérard, C., Campagnoli, M., & Zuber, S. (2019). Strategies for the safety management of fresh produce from farm to fork. *Current Opinion in Food Science*, 27, 145–152.

- Kapatral, V., & Minnich, S. A. (1995). Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three *Yersinia enterocolitica* flagellin genes. *Molecular Microbiology*, *17*(1), 49–56.
- Karlsson, P. A., Tano, E., Jernberg, C., Hickman, R. A., Guy, L., Järhult, J. D., & Wang, H. (2021). Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Yersinia enterocolitica* From Foodborne Outbreaks in Sweden. *Frontiers in Microbiology*, *12*.
- Kim, T.-J., Young, B. M., & Young, G. M. (2008). Effect of Flagellar Mutations on *Yersinia enterocolitica* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(17), 5466–5474.
- Knirel, Y. A., Anisimov, A. P., Kislichkina, A. A., Kondakova, A. N., Bystrova, O. v., Vagaikskaya, A. S., Shatalin, K. Y., Shashkov, A. S., & Dentovskaya, S. v. (2021). Lipopolysaccharide of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex. *Biomolecules* *11*(10).
- Kraushaar, B., Dieckmann, R., Wittwer, M., Knabner, D., Konietzny, A., Mä De, D., & Strauch, E. (2011). Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain harbouring an ail gene. *Journal of Applied Microbiology*, *111*, 997–1005.
- Laporte, J., Savin, C., Lamourette, P., Devilliers, K., Volland, H., Carniel, E., Créminon, C., & Simon, S. (2015). Fast and Sensitive Detection of Enteropathogenic *Yersinia* by Immunoassays. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(1), 146–159.
- le Guern, A.-S., Savin, C., Angermeier, H., Brémont, S., Clermont, D., Mühle, E., Orozova, P., Najdenski, H., & Pizarro-Cerdá, J. (2020). *Yersinia artesianana* sp. nov., *Yersinia proxima* sp. nov., *Yersinia alsatica* sp. nov., *Yersinia vastinensis* sp. nov., *Yersinia thracica* sp. nov. and *Yersinia occitanica* sp. nov., isolated from humans and animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(10), 5363–5372.
- Lee, T.-S., Lee, S.-W., Seok, W.-S., Yoo, M.-Y., Yoon, J.-W., Park, B.-K., Moon, K.-D., & Oh, D.-H. (2004). Prevalence, Antibiotic Susceptibility, and Virulence Factors of *Yersinia enterocolitica* and Related Species from Ready-to-Eat Vegetables Available in Korea. *Journal of Food Protection*, *67*(6), 1123–1127.
- Li, K., Gu, W., Liang, J., Xiao, Y., Qiu, H., Yang, H., Wang, X., & Jing, H. (2014). Gene polymorphism analysis of *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein A and putative outer membrane protein A family protein. *BMC Genomics* *15*, 201.
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D687–D692.
- Liu, J., Liu, Q., & Yang, Q. (2020). mstree: A Multispecies Coalescent Approach for Estimating Ancestral Population Size and Divergence Time during Speciation with Gene Flow. *Genome Biology and Evolution*, *12*(5), 715–719.
- Lucero Estrada, C. S. M., Velázquez, L. del C., Favier, G. I., di Genaro, M. S., & Escudero, M. E. (2012). Detection of *Yersinia* spp. in meat products by enrichment culture, immunomagnetic separation and nested PCR. *Food Microbiology*, *30*(1), 157–163.
- MacDonald, E., Heier, B. T., Stalheim, T., Cudjoe, K. S., Skjerdal, T., Wester, A., Lindstedt, B. A., & Vold, L. (2011). *Yersinia enterocolitica* O:9 infections associated with bagged salad mix in Norway, February to April 2011. *Eurosurveillance*, *16*(19).

- Machado-Moreira, B., Richards, K., Brennan, F., Abram, F., & Burgess, C. M. (2019). Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 1727–1750.
- McNally, A., la Ragione, R. M., Best, Angus., Manning, G., & Newell, D. G. (2007). An aflagellate mutant *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain displays altered invasion of epithelial cells, persistence in macrophages, and cytokine secretion profiles in vitro. *Microbiology*, 153(5), 1339–1349.
- Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., & Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*, 34(13), i142–i150.
- Mikula, K. M., Kolodziejczyk, R., Goldman, A., Francis, M., Kempf, V. A., & Hermoso, J. A. (2013). *Yersinia* infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2.
- Mühlenkamp, M., Oberhettinger, P., Leo, J. C., Linke, D., & Schütz, M. S. (2015). *Yersinia* adhesin A (YadA) – Beauty & beast. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(2), 252–258.
- Peruzy, M. F., Aponte, M., Proroga, Y. T. R., Capuano, F., Cristiano, D., Delibato, E., Houf, K., & Murru, N. (2020). *Yersinia enterocolitica* detection in pork products: Evaluation of isolation protocols. *Food Microbiology*, 92, 103593.
- Peruzy, M. F., Murru, N., Yu, Z., Kerkhof, P. J., Neola, B., Joossens, M., Proroga, Y. T. R., & Houf, K. (2019). Assessment of microbial communities on freshly killed wild boar meat by MALDI-TOF MS and 16S rRNA amplicon sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 51–60.
- Petsios, S., Fredriksson-Ahomaa, M., Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2016). Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 55–72.
- Pierson, D. E., & Falkow, S. (1990). Nonpathogenic Isolates of *Yersinia enterocolitica* Do Not Contain Functional *inv*-Homologous Sequences. *Infection and Immunity* 58(4). <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Platt-Samoraj, A., Syczyło, K., Szczerba-Turek, A., Bancercz-Kisiel, A., Jabłoński, A., Łabuć, S., Pajdak, J., Oshakbaeva, N., & Szweda, W. (2017). Presence of *ail* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A isolates from game animals in Poland. *The Veterinary Journal*, 221, 11–13.
- Platt-Samoraj, A., Żmudzki, J., Pajdak-Czaus, J., Szczerba-Turek, A., Bancercz-Kisiel, A., Procajło, Z., Łabuć, S., & Szweda, W. (2020). The Prevalence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in Small Wild Rodents in Poland. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(8), 586–592.
- Pujol, C., & Bliska, J. B. (2005). Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clinical Immunology*, 114(3), 216–226.
- Raetz, C. R. H., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 295–329.

- Ramamurthy, T., Yoshino, K. I., Huang, X., Balakrish Nair, G., Carniel, E., Maruyama, T., Fukushima, H., & Takeda, T. (1997). The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *Microbial Pathogenesis*, 23(4), 189–200.
- Rastawicki, W., & Gierczyński, R. (2009). Expression, purification, and characterization of the humoral immune response to recombinant MyfA protein of *Yersinia enterocolitica*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28(12), 1491.
- Rusak, L. A., de Castro Lisboa Pereira, R., Freitag, I. G., Hofer, C. B., Hofer, E., Asensi, M. D., & Vallim, D. C. (2018). Rapid detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 using a duplex PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 154, 107–111.
- Sabina, Y., Rahman, A., Ray, R. C., & Montet, D. (2011). *Yersinia enterocolitica*: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. *Journal of Pathogens*, 2011, 1–10.
- Savin, C., Leclercq, A., & Carniel, E. (2012). Evaluation of a Single Procedure Allowing the Isolation of Enteropathogenic *Yersinia* along with Other Bacterial Enteropathogens from Human Stools. *PLoS ONE* 7(7): e41176.
- Schmid, Y., Grassl, G. A., Bühler, O. T., Skurnik, M., Autenrieth, I. B., & Bohn, E. (2004). *Yersinia enterocolitica* Adhesin A induces production of Interleukin-8 in epithelial cells. *Infection and Immunity*, 72(12), 6780–6789.
- Schubert, S., Fischer, D., & Heesemann, J. (1999). Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6387–6395.
- Schubert, S., Rakin, A., & Heesemann, J. (2004). The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2–3), 83–94.
- Seemann, T. (2016). ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes. <https://github.com/tseemann/abricate>
- Selma, M. V., Beltrán, D., Chacón-Vera, E., & Gil, M. I. (2006). Effect of Ozone on the Inactivation of *Yersinia enterocolitica* and the Reduction of Natural Flora on Potatoes. *Journal of Food Protection*, 69(10), 2357–2363.
- Sengun, I. Y., & Karapinar, M. (2005). Elimination of *Yersinia enterocolitica* on carrots (*Daucus carota* L.) by using household sanitisers. *Food Control*, 16(10), 845–850.
- Sihvonen, L. M., Hallanvuori, S., Haukka, K., Skurnik, M., & Siitonen, A. (2011). The *ail* Gene Is Present in Some *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A Strains. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(3), 455–457.
- Singh, I., & Viridi, J. S. (2004a). Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Medical Microbiology*, 53(11), 1065–1068.
- Singh, I., & Viridi, J. S. (2004b). Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Medical Microbiology*, 53(11), 1065–1068.

- Skorek, K., Raczkowska, A., Dudek, B., Miećka, K., & Guz-Regner, K. (2013). Regulatory Protein OmpR Influences the Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* O:9 by Modifying the Structure of the Outer Membrane. *PLoS ONE*, 8(11), 79525.
- Skurnik, M., Peippo, A., & Ervelä, E. (2000). Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Molecular Microbiology*, 37(2), 316–330.
- Slimību profilakses un kontroles centrs. (2021, April 15). Pārskats par atsevišķām infekcijas un parazitārām slimībām 2020. gadā. Valsts Statistikas Pārskats. <https://www.spkc.gov.lv/lv/media/15144/download>
- Souza, R. A., & Falcão, J. P. (2012). Pathogenic Potential of the *Yersinia massiliensis* Species. In A. M. P. de Almeida & N. C. Leal (Eds.), *Advances in Yersinia Research* (pp. 223–228). Springer, New York.
- Stephan, R., Joutsen, S., Hofer, E., Säde, E., Björkroth, J., Ziegler, D., & Fredriksson-Ahomaa, M. (2013). Characteristics of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from patients and asymptomatic carriers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32, 869–875.
- Tennant, S. M., Grant, T. H., & Robins-Browne, R. M. (2003). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38, 127–137.
- Terentjeva, M., Ķibilds, J., Meistere, I., Gradovska, S., Alksne, L., Streikiša, M., Ošmjana, J., & Valciņa, O. (2021). Virulence Determinants and Genetic Diversity of *Yersinia* Species Isolated from Retail Meat. *Pathogens*, 11(1), 37.
- Thoerner, P., Kingombe, C. I. B., Bögli-Stuber, K., Bissig-Choisat, B., Wassenaar, T. M., Frey, J., & Jemmi, T. (2003). PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1810–1816.
- Thomas, M. C., Arling, V., Goji, N., Janzen, T. W., Duceppe, M.-O., Mathews, A., Carrillo, C., & Amoako, K. K. (2022). First Complete Genome Sequence of *Yersinia massiliensis*. *Genome Announcements*, 6(20), e00416-18.
- Trülzsch, K., Heesemann, J., & Oellerich, M. F. (2007). Invasion and Dissemination of *Yersinia enterocolitica* in the Mouse Infection Model. In R. D. Perry & J. D. Fetherston (Eds.), *The Genus Yersinia: From Genomics to Function* (pp. 279–285). Springer New York.
- Uliczka, F., Pisano, F., Schaake, J., Stolz, T., & Rohde, M. (2011). Unique Cell Adhesion and Invasion Properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the Most Frequent Cause of Human Yersiniosis. *PLoS Pathog*, 7(7), 1002117.
- van Cauteren, D., le Strat, Y., Sommen, C., Bruyand, M., Tourdjman, M., da Silva, N. J., Couturier, E., Fournet, N., de Valk, H., & Desenclos, J.-C. (2017). Estimated Annual Numbers of Foodborne Pathogen-Associated Illnesses, Hospitalizations, and Deaths, France, 2008-2013. *Emerging Infectious Diseases*, 23(9), 1486–1492.
- Verbikova, V., Borilova, G., Babak, V., & Moravkova, M. (2018). Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* and other

- Yersinia* species found in fruits and vegetables from the European Union. *Food Control*, 85, 161–167.
- Wagner, N. J., Lin, C. P., Borst, L. B., & Miller, V. L. (2013). YaxAB, a *Yersinia enterocolitica* Pore-Forming Toxin Regulated by RovA. *Infection and Immunity*, 81(11), 4208–4219.
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15(3), R46.
- Xanthopoulos, V., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2010). Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. *Food Control*, 21(4), 393–398.
- Yeung, E. Y. H. (2021). A case series of diarrheal diseases associated with *Yersinia frederiksenii*. *Infectious Disease Reports*, 13(2), 552–557.
- Young, G. M., Badger, J. L., & Miller, V. L. (2000). Motility Is Required To Initiate Host Cell Invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity*, 68(7), 4323–4326.
- Zhang, G., Meredith, T. C., & Kahne, D. (2013). On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 16(6), 779–785.
- Zhang, L., Radziejewska-Lebrecht, J., Krajewska-Pietrasik, D., Toivanen, P., & Skurnik, M. (1997). Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Molecular Microbiology*, 23(1), 63–76.
- Zheng, H., Sun, Y., Mao, Z., & Jiang, B. (2008). Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53(3), 368–374.
- Zhou, Z., Alikhan, N.-F., Mohamed, K., Fan, Y., & Achtman, M. (2020). The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Research*, 30(1), 138–152.
- Zhou, Z., Alikhan, N.-F., Sergeant, M. J., Luhmann, N., Vaz, C., Francisco, A. P., Carriço, J. A., & Achtman, M. (2018). GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Research*, 28(9), 1395–1404.
- Zhou, Z., Charlesworth, J., & Achtman, M. (2021). HierCC: a multi-level clustering scheme for population assignments based on core genome MLST. *Bioinformatics*.

PIELIKUMI

Informācija par izolātiem

N.p.k.	Suga	Izolācijas avots	Ģeogrāfiskā izcelsme	Parauga ņemšanas datums	ENA/SRA bibliotēkas nosaukums	ENA/SRA izolāta piekļuves numurs
1	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes	Latvija	20.12.2017	Ye-2021-4538	ERS11981260
2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes	Latvija	20.12.2017	Ye-2021-4539	ERS11981261
3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes	Latvija	20.12.2017	Ye-2021-4540	ERS11981262
4	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes	Latvija	20.12.2017	Ye-2021-4541	ERS11981263
5	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes	Latvija	20.12.2017	Ye-2021-4542	ERS11981264
6	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes	Latvija	09.01.2018	Ye-2021-4613	ERS11981269
7	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes	Latvija	09.01.2018	Ye-2021-4614	ERS11981270
8	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes	Latvija	09.01.2018	Ye-2021-4615	ERS11981271
9	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes	Latvija	09.01.2018	Ye-2021-4616	ERS11981272
10	<i>Yersinia enterocolitica</i>	bietes, nemazgātas	Latvija	05.01.2018	Ye-2021-4596	ERS11981268
11	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni	Latvija	01.07.2019	Ye-2019-40336-3	ERS11981223
12	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni	Latvija	20.10.2020	Ye-2021-13690	ERS11981235
13	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni	Latvija	20.10.2020	Ye-2021-13691	ERS11981236
14	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni	Latvija	02.11.2020	Ye-2021-13863	ERS11981237
15	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni	Latvija	01.07.2019	Ye-2019-40336-4	ERS11981224
16	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, mazgāti	Latvija	25.11.2020	Ye-2021-14105	ERS11981239
17	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Nīderlande	24.07.2019	Ye-2020-49543-4	ERS11981227
18	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	nav datu	03.09.2020	Ye-2020-55728-1	ERS11981228
19	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	nav datu	03.09.2020	Ye-2020-55728-2	ERS11981229
20	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	nav datu	03.09.2020	Ye-2020-55728-3	ERS11981230
21	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	19.11.2019	Ye-2020-80540-4	ERS11981231
22	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	nav datu	03.09.2020	Ye-2021-13182	ERS11981233

Informācija par izolātiem

N.p.k.	Suga	Izolācijas avots	Ģeogrāfiskā izcelsme	Parauga ņemšanas datums	ENA/SRA bibliotēkas nosaukums	ENA/SRA izolāta piekļuves numurs
23	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	nav datu	03.09.2020	Ye-2021-13183	ERS11981234
24	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	23.11.2020	Ye-2021-14104	ERS11981238
25	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	05.07.2021	Ye-2021-327130-1-3	ERS11981250
26	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	05.07.2021	Ye-2021-327130-1-4	ERS11981251
27	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	05.07.2021	Ye-2021-327130-1-5	ERS11981252
28	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Nīderlande	10.08.2021	Ye-2021-380460-1-1	ERS11981253
29	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Nīderlande	10.08.2021	Ye-2021-380460-1-3	ERS11981254
30	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Nīderlande	10.08.2021	Ye-2021-380460-1-4	ERS11981255
31	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Nīderlande	10.08.2021	Ye-2021-380460-1-5	ERS11981256
32	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	09.03.2021	Ye-2021-38496-1-1	ERS11981257
33	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	09.03.2021	Ye-2021-38496-1-4	ERS11981258
34	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	09.03.2021	Ye-2021-38496-1-5	ERS11981259
35	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	nav datu	24.11.2021	Ye-2021-958736-1	ERS11981282
36	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	nav datu	24.11.2021	Ye-2021-958736-2	ERS11981283
37	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	25.07.2019	Ye-2021-9589	ERS11981284
38	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	25.07.2019	Ye-2021-9590	ERS11981285
39	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	25.07.2019	Ye-2021-9591	ERS11981286
40	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	25.07.2019	Ye-2021-9592	ERS11981287
41	<i>Yersinia enterocolitica</i>	burkāni, tīrīti	Latvija	25.07.2019	Ye-2021-9593	ERS11981288
42	<i>Yersinia enterocolitica</i>	nav datu	nav datu	2022	Ye-2021-314936	ERS11981249
43	<i>Yersinia enterocolitica</i>	kartupeļi daivās	Latvija	30.08.2018	Ye-2021-6558	ERS11981273

Informācija par izolātiem

N.p.k.	Suga	Izolācijas avots	Ģeogrāfiskā izcelsme	Parauga ņemšanas datums	ENA/SRA bibliotēkas nosaukums	ENA/SRA izolāta piekļuves numurs
44	<i>Yersinia enterocolitica</i>	kartupeļi daivās	Latvija	30.08.2018	Ye-2021-6559	ERS11981274
45	<i>Yersinia enterocolitica</i>	kartupeļi daivās	Latvija	30.08.2018	Ye-2021-6560	ERS11981275
46	<i>Yersinia enterocolitica</i>	kartupeļi daivās	Latvija	30.08.2018	Ye-2021-6561	ERS11981276
47	<i>Yersinia enterocolitica</i>	kartupeļi daivās	Latvija	07.03.2019	Ye-2021-8036	ERS11981277
49	<i>Yersinia enterocolitica</i>	kartupeļi daivās	Latvija	29.04.2019	Ye-2021-9043	ERS11981280
50	<i>Yersinia enterocolitica</i>	kartupeļi daivās	Latvija	29.04.2019	Ye-2021-9044	ERS11981281
51	<i>Yersinia enterocolitica</i>	kartupeļi, tīrīti	Latvija	30.11.2020	Ye-2021-14118	ERS11981240
52	<i>Yersinia canariae</i>	kartupeļu salmiņi	Latvija	30.03.2020	Ye-2020-17185-3	ERS11981225
53	<i>Yersinia canariae</i>	kartupeļu salmiņi	Latvija	30.03.2020	Ye-2020-17185-4	ERS11981226
54	<i>Yersinia enterocolitica</i>	kartupeļu salmiņi	Latvija	30.03.2020	Ye-2021-11895	ERS11981232
55	<i>Yersinia enterocolitica</i>	mini burkāni	Dānija	18.05.2021	Ye-2021-15263	ERS11981246
56	<i>Yersinia enterocolitica</i>	mini burkāni	Portugāle	22.10.2021	Ye-2021-818389-1-3	ERS11981279
57	<i>Yersinia enterocolitica</i>	mini spināti	Itālija	27.04.2021	Ye-2021-15080	ERS11981245
58	<i>Yersinia enterocolitica</i>	rukola	Itālija	16.03.2021	Ye-2021-14737	ERS11981243
59	<i>Yersinia enterocolitica</i>	rukola	Itālija	27.04.2021	Ye-2021-206172-2	ERS11981248
60	<i>Yersinia enterocolitica</i>	rukola, nemazgāta	Itālija	12.04.2021	Ye-2021-14950	ERS11981244
61	<i>Yersinia enterocolitica</i>	salātu maisījums	Itālija	16.03.2021	Ye-2021-14735	ERS11981242
62	<i>Yersinia massiliensis</i>	salātu maisījums	Itālija	18.05.2021	Ye-2021-15267	ERS11981247
63	<i>Yersinia enterocolitica</i>	salātu maisījums	nav datu	01.03.2021	Ye-2021-14593	ERS11981241
64	<i>Yersinia enterocolitica</i>	sīpoli, tīrīti	Latvija	19.12.2017	Ye-2021-4543	ERS11981265
65	<i>Yersinia enterocolitica</i>	sīpoli, tīrīti	Latvija	19.12.2017	Ye-2021-4544	ERS11981266
66	<i>Yersinia enterocolitica</i>	sīpoli, tīrīti	Latvija	19.12.2017	Ye-2021-4546	ERS11981267

2-1. pielikums.
Virulences gēnu klātbūtne

N.p.k.	ail	cheA	cheB	cheD	cheR	cheW	cheY	cheZ	ddhA	ddhB	fcl	flgA	flgB	flgC	flgD	flgE	flgF	flgG	flgH	flgI	flgJ	flgK	flgL	flgM	flgN	flhA	flhB	flhC	flhD	flhE	fliA	fliB	fliC	fliD	fliE	fliF	fliG						
1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
5	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+			
7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+		
10	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
11	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
12	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
13	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
14	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+		
15	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
16	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
17	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
18	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
19	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
20	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+		
21	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
22	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
23	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
24	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
26	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
27	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
28	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
29	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
31	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
32	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
33	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
34	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
35	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
36	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
37	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
38	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	

2-2. pielikums.
Virulences gēnu klātbūtne

N.p.k.	ail	cheA	cheB	cheD	cheR	cheW	cheY	cheZ	ddhA	ddhB	fcl	flgA	flgB	flgC	flgD	flgE	flgF	flgG	flgH	flgI	flgJ	flgK	flgL	flgM	flgN	flhA	flhB	flhC	flhD	flhE	fliA	fliB	fliC	fliD	fliE	fliF	fliG			
39	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+		
40	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
41	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+		
42	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
43	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
44	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
45	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
46	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
47	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
48	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
49	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
50	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
51	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
52	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
53	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
54	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
55	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
56	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
57	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
58	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
59	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
60	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
61	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
63	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
64	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
65	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
66	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
62	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	

2-3. pielikums.
Virulences gēnu klātbūtne

N.p.k.	fliH	fliI	fliJ	fliK	fliL	fliM	fliN	fliO	fliP	fliQ	fliR	fliS	fliT	fliZ	galE	galU	gmd	inv	lpxC	lpxD	manB	manC	motA	motB	ompA	prt	wbcA	wbcC	wbcD	wbcF	wbcG	wbcH	wzx	wzy	yaxA	yaxB	ystB	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

2-4. pielikums.
Virulences gēnu klātbūtne

N.p.k.	fliH	fliI	fliJ	fliK	fliL	fliM	fliN	fliO	fliP	fliQ	fliR	fliS	fliT	fliZ	galE	galU	gmd	inv	lpxC	lpxD	manB	manC	motA	motB	ompA	prt	wbcA	wbcC	wbcD	wbcF	wbcG	wbcH	wzx	wzy	yaxA	yaxB	ystB			
39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+			
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	
57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
62	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Bakalaura darbs „No augu izcelsmes pārtikas produktiem izolētu *Yersinia enterocolitica* ģenētiskā daudzveidība un virulences potenciāls” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Tatjana Kiseļova *paraksts* 01.06.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Mag.biol. Juris Ķibilds *paraksts* 01.06.2022.

Recenzents: *paraksts* lekt., Mag.biol. Māris Lazdiņš

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 01.06.2022.

Lietvede: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: