

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97

УДК 616.98:579.841.95

Е.А. Нарышкина<sup>1</sup>, Я.М. Краснов<sup>1</sup>, Ж.В. Альхова<sup>1</sup>, Д.В. Баданин<sup>1</sup>, А.В. Осин<sup>1</sup>, О.Ю. Ляшова<sup>1</sup>,  
Л.В. Саяпина<sup>2</sup>, В.П. Бондарев<sup>2</sup>, В.А. Меркулов<sup>2</sup>, Ю.В. Олефир<sup>2</sup>, В.В. Кутырев<sup>1</sup>

## ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения России, Москва, Российская Федерация

**Целью** исследования стало проведение полногеномного секвенирования вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, а также определение на основании полученных результатов его филогенетических связей и особенностей генетической организации. **Материалы и методы.** Полногеномное секвенирование штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ осуществляли на платформах Ion PGM (Ion Torrent, США) и MinIon (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Выравнивание полученных прочтений на полный геном штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (CP009694, США, 2015 г.) осуществляли с помощью программного пакета DNASTAR Lasergene 15.3. Гибридную сборку ридов в контиги осуществляли с помощью программы Unicycler v. 0.4.4, используя данные, полученные по технологии полупроводникового секвенирования (Ion PGM) и секвенирования через нанопоры (MinIon). Филогенетический анализ выполняли на основе данных о найденных единичных нуклеотидных заменах (SNPs), находящихся в коровой части генома *F. tularensis*. Для построения дендрограммы по полученным данным общей SNP-матрицы использовали алгоритм Maximum parsimony. **Результаты и обсуждение.** Подтверждено близкое родство штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ с вакцинным штаммом *F. tularensis* LVS, который используется в странах Западной Европы и Северной Америки. При поиске общих единичных мутаций, характерных для вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS, найдены 5 уникальных SNPs, отличающих их от других 228 штаммов *F. tularensis*, используемых при сравнении. Геномный анализ вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ относительно вирулентных штаммов выявил в его структуре две протяженные делеции размером 526 п.н. (гены *pilA* и *pilE*) и 1480 п.н. (гены, кодирующие липопротеин). Аналогичные делеции присутствуют и в геноме вакцинного штамма *F. tularensis* LVS.

**Ключевые слова:** полногеномное секвенирование, филогенетический анализ, *Francisella tularensis*, вакцинный штамм.

Корреспондирующий автор: Нарышкина Екатерина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Альхова Ж.В., Баданин Д.В., Осин А.В., Ляшова О.Ю., Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Меркулов В.А., Олефир Ю.В., Кутырев В.В. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 2:91–97. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97

Поступила 02.07.19. Отправлена на доработку 02.09.19. Принята к публ. 30.10.19.

E.A. Naryshkina<sup>1</sup>, Ya.M. Krasnov<sup>1</sup>, Zh.V. Alhova<sup>1</sup>, D.V. Badanin<sup>1</sup>, A.V. Osin<sup>1</sup>, O.Yu. Lyashova<sup>1</sup>,  
L.V. Sayapina<sup>2</sup>, V.P. Bondarev<sup>2</sup>, V.A. Merkulov<sup>2</sup>, Yu.V. Olefir<sup>2</sup>, V.V. Kutyrev<sup>1</sup>

## Whole-Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of *Francisella tularensis* Vaccine Strain 15 NIEG

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation

**Abstract. Objective** of the study was to conduct whole-genome sequencing of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG and determine, based on the results, its phylogenetic relationships and the genetic organization features. **Materials and methods.** Whole-genome sequencing of *F. tularensis* 15 NIEG strain was performed on Ion PGM (Ion Torrent, USA) and MinIon (Oxford Nanopore Technologies, UK) platforms. Alignment of readings obtained to the whole-genome of *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (CP009694, USA, 2015) was performed using the software package DNASTAR Lasergene 15.3. Hybrid assembly of reads into contigs was performed by means of Unicycler v. 0.4.4, using data obtained by semiconductor sequencing technology (Ion PGM) and nanopore sequencing (MinIon). Phylogenetic analysis was performed on the basis of single nucleotide polymorphism (SNPs) data located in the core part of *F. tularensis* genome. Maximum parsimony algorithm was used to construct a dendrogram using the obtained data of common SNP-matrix. **Results and discussion.** The close relations of *F. tularensis* 15 NIEG strain with *F. tularensis* LVS vaccine strain used in the countries of Western Europe and North America was confirmed. Searching for common single mutations characteristic of *F. tularensis* 15 vaccine strains of NIEG and LVS, permitted to find 5 unique SNPs that distinguish them from all other 228 *F. tularensis* strains used in the comparison. Comparative genomic analysis of *F. tularensis* 15 NIEG vaccine strain and virulent strains revealed in its structure two extensive 526 bp deletions (genes *pilA* and *pilE*) and 1480 bp (genes encoding lipoprotein). Similar deletions are also present in the genome of the *F. tularensis* LVS vaccine strain.

**Keywords:** whole-genome sequencing, phylogenetic analysis, *Francisella tularensis*, vaccine strain.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Ekaterina A. Naryshkina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Naryshkina E.A., Krasnov Ya.M., Alhova Zh.V., Badanin D.V., Osin A.V., Lyashova O.Yu., Sayapina L.V., Bondarev V.P., Merkulov V.A., Olefir Yu.V., Kuttyrev V.V. Whole-Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of *Francisella tularensis* Vaccine Strain 15 NIIEG. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 2:91–97. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97

Received 02.07.19. Revised 02.09.19. Accepted 30.10.19.

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, представляющая серьезную опасность для населения из-за высокой восприимчивости к ней людей [1, 2]. В России эффективную защиту против туляремии, вызванной штаммами голарктического подвида, обеспечивает применение туляремийной вакцины на основе живых микробных клеток вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, которая вызывает формирование напряженного специфического иммунитета [3].

Впервые аттенуированный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 получен Н.А. Гайским в 1945 г. В настоящее время туляремийная вакцина, изготавливаемая из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, остается единственной живой вакциной, которая широко используется для вакцинопрофилактики туляремии как на территории России, так и стран СНГ [4].

В США в 1956 г. на основе переданных из СССР культур *F. tularensis* 15 и 155 создан вакцинный штамм *F. tularensis* LVS (Live Vaccine Strain) [5]. Вместе с тем за рубежом туляремийная вакцина LVS не производится из-за несоответствия требованиям безопасности, предъявляемым к вакцинам в этих странах. В связи с этим штамм *F. tularensis* LVS используется в странах Западной Европы и Северной Америки только в экспериментальных целях [6, 7]. Однако, несмотря на отсутствие возможности использования туляремийной вакцины LVS в США и Европе, ранее продемонстрированы ее основные качества, такие как безопасность и эффективность [8, 9].

В 2006 г. полногеномная нуклеотидная последовательность ДНК штамма *F. tularensis* LVS представлена в базе данных NCBI GenBank. Генетическая характеристика вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ до настоящего времени оставалась малоизученной. В связи с этим актуальным является получение данных о геноме вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, его сравнение с зарубежным штаммом *F. tularensis* LVS, а также установление филогенетического родства с другими штаммами туляремийного микроба из базы данных NCBI GenBank.

**Целью** исследования стало проведение полногеномного секвенирования вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и определение на основании полученных результатов его филогенетических связей и особенностей генетической организации.

## Материалы и методы

Исследуемый штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ (дата лиофилизации 14.10.2011 г., пробирка А) получен из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Культивирование осуществляли на чашках Петри

с FT-агаром (ФБУН ГНЦ ПМБ), посевы инкубировали в течение 36–48 ч при температуре (37±1) °С. Выделение геномной ДНК проводили с помощью набора ChargeSwitch® gDNA Mini Kit Invitrogen (Life Technologies, США). Полногеномное секвенирование штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ осуществляли на платформе Ion PGM (Ion Torrent, США) с использованием наборов для пробоподготовки и секвенирования ДНК, рекомендованных производителем оборудования. Дополнительно геном исследуемого штамма секвенировали на платформе MinIon (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) с целью получения единичных прочтений (ридов) длиной 3000 п.н. и более. Выравнивание полученных прочтений на полный геном штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (CP009694, США, 2015) осуществляли с помощью программного пакета DNASTAR Lasergene 15.3. Гибридную сборку ридов в континги осуществляли с помощью программы Unicycler v. 0.4.4, используя совместно данные, полученные по технологии полупроводникового секвенирования (Ion PGM) и секвенирования через нанопоры (MinIon).

Филогенетический анализ выполняли на основе данных о найденных единичных нуклеотидных заменах (SNPs), находящихся в коровой части генома *F. tularensis*. Для этого получали общую SNP-матрицу с помощью программы Wombac 2.1 (<https://github.com/Victorian-Bioinformatics-Consortium/wombac/archive/v2.1.tar.gz>) на основе попарного сравнения с геномом референса нуклеотидных последовательностей 229 геномов *F. tularensis* из базы данных NCBI GenBank. В качестве референс-генома использовали штамм *F. tularensis* ssp. *tularensis* SCHU S4 (CP010446). Для построения дендрограммы по полученным данным общей SNP-матрицы использовали алгоритм Maximum parsimony.

## Результаты и обсуждение

Геном штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ собран в 28 контингов, средняя глубина покрытия – 135X, общая длина собранного генома составила 1826738 п.н. Нуклеотидная последовательность штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ депонирована в базе данных NCBI GenBank под номером LVYJ03000001.

Для проведения филогенетического анализа из базы данных NCBI GenBank взяты все доступные 229 геномов *F. tularensis*. В итоге в анализируемой группе, состоящей из 230 геномов *F. tularensis*, всего выявлено 31294 коровых SNPs. На основании филогенетического анализа по определению SNPs все исследованные геномы возбудителя туляремии кластеризовались в четыре группы в соответствии с подвидовой принадлежностью (рис. 1, А):

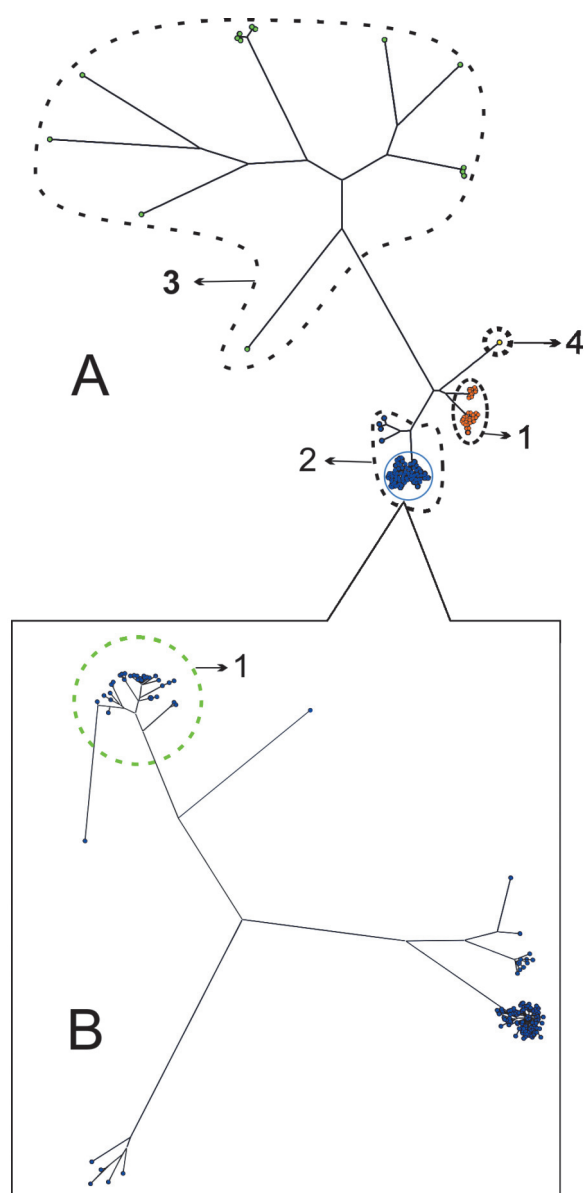


Рис. 1. **A** – дендрограмма, построенная с использованием алгоритма Maximum parsimony по данным матрицы коровых SNPs, полученной при сравнительном анализе 230 геномов штаммов *F. tularensis*. **B** – увеличенное изображение ветви кластера 2 (рис. **A**). Геном штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ входит в состав группы, обозначенной цифрой 1 (рис. **B**)

Fig. 1. **A** – a dendrogram constructed using Maximum parsimony algorithm according to the matrix of core SNPs obtained by comparative analysis of 230 genomes of *F. tularensis* strains. **B** shows an enlarged image of the branch of cluster 2 (fig. **A**). The genome of the strain *F. tularensis* 15 NIEG is part of the group indicated by the number 1 (fig. **B**)

кластер 1 – *F. tularensis* ssp. *tularensis*, кластер 2 – *F. tularensis* ssp. *holarctica*, кластер 3 – *F. tularensis* ssp. *novicida*, кластер 4 – *F. tularensis* ssp. *mediasiatica*. Кластер 2 содержал 172 штамма *F. tularensis* подвида *holarctica* и был представлен двумя подкластерами. Исследуемый штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ вошел в состав наиболее многочисленного подкластера (обведен кругом на рис. 1, A), состоящего из 168 штаммов *F. tularensis*. При детальном рассмотрении этого подкластера установлено, что он делится еще на три основные группы, в одной из которых и представлен изучаемый штамм туляремии микроба (группа штаммов, обведенная кругом на рис. 1, B). В итоге установлено, что максимально близко, с отличием в 2 коровых SNPs, к исследуемому штамму расположены два варианта штамма *F. tularensis* LVS (CP009694 и AM233362, NCBI GenBank) (рис. 2).

Следующим по филогенетической близости к штамму *F. tularensis* 15 НИИЭГ оказался штамм *F. tularensis* ssp. *holarctica* MAX (LVKZ01000001, Россия, выделен в 1928 г. от больного человека) с от-

личием от исследуемого штамма на 15 коровых SNPs. Далее следует группа из трех штаммов *F. tularensis* ssp. *holarctica*, выделенных в 2011 г. в Норвегии от больных людей, – NO17 (JPMR01000001), NO18 (JPMS01000001) и NO7 (JPML01000001), отличающихся от штамма 15 НИИЭГ на 23, 23 и 24 коровых SNPs соответственно. Наиболее удаленным по филогенетическому родству от штамма 15 НИИЭГ из рассматриваемой группы (рис. 2, группа штаммов обведена пунктиром) является штамм 503 (LVKX01000001, Россия, выделен в 1939 г. от клеща рода *Dermacentor*), отличающийся от него на 29 коровых SNPs.

Сравнительную оценку структуры генома штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводили методом картирования ридов секвенированного генома штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на геном штамма *F. tularensis* LVS (CP009694), покрытие последнего составило 100 %, всего выявлено шесть единичных мутаций (SNPs): две несинонимичные, одна нонсенс-мутация, одна единичная делеция, одна синонимич-

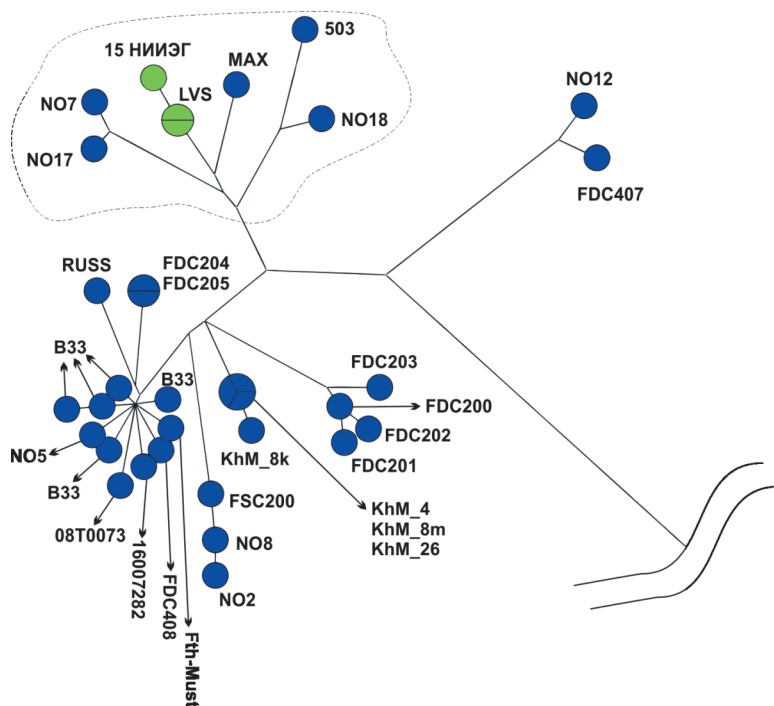


Рис. 2. Детальное изображение филогенетического родства между геномами, входящими в группу, обведенную кругом на рис. 1, В

Fig. 2. A detailed picture of phylogenetic relations between the genomes in the group circled in fig. 1, B

ная замена и одна единичная замена в межгенной области. Других инсерций и делеций не обнаружено (табл. 1). Риды, которые не картировались на геном штамма *F. tularensis* LVS, собраны в три небольшие контига, последовательность каждого была полностью идентична фрагментам контигов, полученных при гибридной сборке генома штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Таким образом, как в структуре генома штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, так и в структуре генома штамма *F. tularensis* LVS не обнаружено областей, которые были бы уникальными при их сравнительном анализе.

При поиске общих единичных мутаций, характерных для вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS, нами обнаружены 5 уникальных SNPs, отличающих их от всех других 228 штаммов *F. tularensis*, используемых при сравнении (табл. 2).

Особенно стоит отметить мутацию в гене *purL*, кодирующем фосфорибозил-формилглицинаминидин синтазу, которая участвует в метаболизме пуринов. Нарушение биосинтеза пуриновых соединений оказывает негативное влияние на выживаемость бактерий в макрофагах [10, 11]. Единичная мутация обнаружена и в гене, кодирующем 2-кето-4-пентеноат гидратазу; предполагается, что данный ферментативный белок участвует в катаболизме ароматических соединений. В условиях голода ароматические соединения могут служить альтернативным источником углерода, а потеря способности катаболизма этих соединений может ограничивать рост бактерий в организме хозяина [12]. Также, возможно, существенное значение имеет мутация в гене, кодирующем ацилтрансферазу биосинтеза липида А в структуре липополисахарида. Существуют данные, что

Таблица 1 / Table 1

Отличия в структуре генома штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ относительно штамма *F. tularensis* LVS (CP009694)

Differences in the *F. tularensis* 15 NIEG genome structure as compared with *F. tularensis* LVS (CP009694) strain

Позиция в штамме LVS Position in strain LVS	Тип основания в штамме LVS Type of base in strain LVS	Тип основания в штамме 15 НИИЭГ Type of base in 15 NIEG strain	Тип мутации Type of mutation	Вероятность мутации (SNP), % Mutation probability (SNP), %	Наименование гена и кодируемого продукта (по штамму LVS) The name of the gene and the encoded product (by LVS strain)
1169122	C	-	Сдвиг рамки считывания Reading frame shift	100	<i>AW21_1333</i> – гипотетический белок <i>AW21_1333</i> – hypothetical protein
1314900	C	A	Несинонимичная замена Non-synonymous replacement	73	<i>AW21_1477</i> – формил-трансфераза <i>AW21_1477</i> – formyl transferase
1326993	C	T	Нонсенс-мутация Nonsense mutation	64	<i>AW21_1487</i> - <i>trxA</i> – тиоредоксин <i>AW21_1487</i> - <i>trxA</i> – thioredoxin
1518663	G	T	Несинонимичная замена Non-synonymous replacement	100	<i>AW21_1697</i> – аминокислот-пермеаза <i>AW21_1697</i> – aminoacid permease
1835981	A	G	Синонимичная замена Synonymous replacement	45	<i>AW21_2083</i> – гипотетический белок <i>AW21_2083</i> – hypothetical protein
178404	C	T	-	100	-



Таблица 2 / Table 2

Уникальные SNPs для вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS  
 Unique SNPs for *F. tularensis* 15 NIEG and LVS vaccine strains

Тип основания в референтном штамме (OR96-0246) The type of base in the reference strain (OR96-0246)	Тип основания в штаммах 15 НИИЭГ и LVS The type of base in the strains NIEG and LVS	Положение в гене Position in gene	Обозначение гена в референтном штамме (OR96-0246) The designation of the gene in the reference strain (OR96-0246)	Продукт Product
C	T	3113 bp	<i>AAX59_01085   purL</i>	Фосфорибозил-формилглицинаминидин синтаза Phosphoribosyl-formylglycinamidin synthase
G	A	697 bp	<i>AAX59_02630</i>	Неохарактеризованный секреторный белок Uncharacterized secretory protein
C	T	226 bp	<i>AAX59_03990   fmt</i>	Метионил-тРНК формилтрансфераза Methionyl tRNA formyl transferase
G	T	246 bp	<i>AAX59_05100</i>	2-кето-4-пентеноат гидратаза 2-keto-4-pentenoate hydratase
T	G	491 bp	<i>AAX59_09600</i>	Ацилтрансфераза биосинтеза липида A Lipid A biosynthesis acyltransferase

лабораторные штаммы *F. tularensis* с измененной структурой ЛПС отличаются от природных изолятов *F. tularensis* по способности размножаться в макрофагах и в органах экспериментальных животных [1]. Найденные единичные мутации, характерные только для вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS, могут способствовать повышению степени аттенуации данных штаммов.

Помимо единичных нуклеотидных замен геномный анализ вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ выявил в его структуре две протяженные делеции размером 526 п.н. (затрагивает части генов, кодирующих пили IV типа – *pilA* и *pilE*) и 1480 п.н. (затрагивает части генов, кодирующих липопротеин). Данные делетированные фрагменты соответствуют областям дифференциации (RD – от англ. region of difference) RD19 (содержит гены *pilA* и *pilE*) и RD18 (содержит гены, кодирующие липопротеин) [13].

Подобные делеции описаны ранее в геноме вакцинного штамма LVS [14, 15]. По мнению большинства авторов, они оказывают влияние на повышение степени аттенуации вакцинного штамма [12, 14, 16–19].

Для подтверждения уникальности данных делеций для вакцинных штаммов 15 НИИЭГ и LVS нами проведен сравнительный анализ всех геномов штаммов *F. tularensis* ssp. *holarctica* (рис. 1, А, кластер 2). В результате сравнительного анализа геномов представленных штаммов выяснено, что делеция 1480 п.н. в генах, кодирующих липопротеин, характерна только для штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* LVS. Неожиданной находкой стало обнаружение делеции 526 п.н. в штамме *F. tularensis* MAX, изолированном от больного человека. Эта делеция оказалась идентичной выявленной ранее в вакцинных штаммах. Возможно, данная мутация не является определяющей для существенной аттенуации *F. tularensis* ssp. *holarctica*. Вероятно, окончательное решение о значимости этой делеции может быть получено после получения генно-инженерного штам-

ма с направленной аналогичной мутацией и изучения его вирулентности. Ранее К. Svensson *et al.* [13] методом ПЦР-анализа выявлены штаммы с делецией в генах, кодирующих липопротеин (область дифференциации RD18): авирулентный вариант SCHU (FSC 043, выделен от человека, штат Огайо, США, 1941 г.), SVA T7 (FSC 074, выделен от зайца, Швеция, 1974 г.), SVA T7K (FSC 069, получен путем пассажа SVA T7), LVS (FSC 155, живой вакцинный штамм, Россия), штамм 015 (FSC 338, вакцинный штамм, Россия). Также авторами выявлены штаммы с делецией в генах *pilA* и *pilE* (область дифференциации RD19): FAM SR (FSC 014, неизвестное происхождение, 1960 г.), CCUG 33391 (FSC 158, выделен от человека, Норвегия), LVS (FSC 155, живой вакцинный штамм, Россия), штамм 015 (FSC 338, вакцинный штамм, Россия). Авторы предполагают, что обнаруженные делеции могут являться результатом многократных пассажей штаммов *F. tularensis*. К. Svensson *et al.* [13] допускают, что делеции в генах, кодирующих липопротеин и/или пили IV типа, играют роль в аттенуации штаммов, поскольку обнаружены в вакцинных штаммах 015 (FSC338), LVS (FSC 155) и в авирулентном варианте SCHU (FSC043) [13].

Таким образом, полученные результаты секвенирования генома вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и проведение его филогенетического анализа относительно всех геномов *F. tularensis*, представленных в базе данных NCBI GenBank на момент исследования, позволили установить наиболее близкородственные к нему штаммы (LVS, MAX, NO18, NO17, NO7 и 503). Оценка идентичности структуры генома штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ относительно генома *F. tularensis* LVS (CP009694), методом картирования ридов, показала 100 % покрытие последнего, всего выявлено шесть единичных мутаций, инсерций и значительных делеций не обнаружено. На основании полученных данных можно сделать заключение о том, что по филогенетическому родству и структурной организации геном исследуемого

штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ максимально близок к геному штамма *F. tularensis* LVS. Кроме того, выявлены уникальные SNPs и делеции, отличающие оба вакцинных штамма от всех остальных штаммов, представленных в базе данных NCBI GenBank.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

### Список литературы

1. Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. М.: ООО «ТиРу»; 2012. 267 с.
2. Мещерякова И.С., Добровольский А.А., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И., Михайлова Т.В. Трансмиссивная эпидемическая вспышка туляремии в г. Ханты-Мансийске в 2013 году. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; 5:14–20.
3. Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Павлов В.М. Получение штамма туляремии микроба без одной копии гена *iglC* и без гена *recA*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 31(4):33–9.
4. Избанова У.А., Куница Т.Н., Лухнова Л.Ю. Достижения в области специфической профилактики туляремии. *Medicine (Almaty)*. 2016; 10:49–59.
5. Sandström G. The Tularaemia Vaccine. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1994; 59(4):315–20. DOI: 10.1002/jctb.280590402.
6. Ellis J., Oyston P.C., Green M., Titball R.W. Tularaemia. *Clinical. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4):631–46. DOI: 10.1128/CMR.15.4.631–646.2002.
7. Reed D.S., Smith L.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 82(5):2098–105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.
8. Jia Q., Horwitz M.A. Live Attenuated Tularaemia Vaccines for Protection Against Respiratory Challenge With Virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:154. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00154.
9. Titball R.W., Oyston P.C.F. A vaccine for tularaemia. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2003; 3(4):645–53. DOI: 10.1517/14712598.3.4.645.
10. Kadzhaev K., Zingmark C., Golovliov I., Bolanowski M., Shen H., Conlan W., Sjöstedt A. Identification of Genes Contributing to the Virulence of *Francisella tularensis* SCHU S4 in a Mouse Intradermal Infection Model. *PLoS ONE*. 2009; 4(5):e5463. DOI: 10.1371/journal.pone.0005463.
11. Sammons-Jackson W.L., McClelland K., Manch-Citron J.N., Metzger D.W., Bakshi C.S., Garcia E., Rasley A., Anderson B.E. Generation and Characterization of an Attenuated Mutant in a Response Regulator Gene of *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain (LVS). *DNA Cell Biol.* 2008; 27(7):387–403. DOI: 10.1089/dna.2007.0687.
12. Rohmer L., Brittnacher M., Svensson K., Buckley D., Haugen E., Zhou Y., Chang J., Levy R., Hayden H., Forsman M., Olson M., Johansson A., Kaul R., Miller S.I. Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison. *Infect. Immun.* 2006; 74(12):6895–906. DOI: 10.1128/IAI.01006-06.
13. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of Subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903–3908.2005.
14. Forslund A.L., Kuoppa K., Svensson K., Salomonsson E., Johansson A., Byström M., Oyston P.C., Michell S.L., Titball R.W., Noppa L., Frithz-Lindsten E., Forsman M., Forsberg A. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59(6):1818–30. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05061.x.
15. Salomonsson E., Forsberg A., Roos N., Holz C., Maier B., Koomey M., Winther-Larsen H.C. Functional analyses of pilin-like proteins from *Francisella tularensis*: complementation of type IV pilus phenotypes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology*. 2009; 155(Pt 8):2546–59. DOI: 10.1099/mic.0.028183-0.
16. Кормилицына М.И., Мещерякова И.С., Михайлова Т.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, различающихся по таксономической принадлежности и вирулентности. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 3:22–5.
17. Forsberg A., Guina T. Type II secretion and type IV pili of *Francisella*. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:187–201. DOI: 10.1196/annals.1409.016.
18. Jaing C.J., McLoughlin K.S., Thissen J.B., Zemla A.,

Gardner S.N., Vergez L.M., Bourguet F., Mabery S., Fofanov V.Y., Koshinsky H., Jackson P.J. Identification of Genome-Wide Mutations in Ciprofloxacin-Resistant *F. tularensis* LVS Using Whole Genome Tiling Arrays and Next Generation Sequencing. *PLoS ONE*. 2016; 11(9):e0163458. DOI: 10.1371/journal.pone.0163458.

19. Qin A., Scott D.W., Thompson J.A., Mann B.J. Identification of an essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* virulence factor. *Infect. Immun.* 2009; 77(1):152–61. DOI: 10.1128/IAI.01113-08.

### References

1. Pavlov V.M., Dyatlov I.A. Molecular Genetic Studies of Bacteria of the Genus *Francisella* and Their Applied Value. M.: LLC “TiRu”; 2012. 267 p.
2. Meshcheryakova I.S., Dobrovolsky A.A., Demidova T.N., Kormilitsyna M.I., Mikhailova T.V. Transmissible epidemic outbreak of tularaemia in Khanty-Mansiysk in 2013. *Epidemiologia I Vaktsynoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2014; 5:14–20.
3. Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Kombarova T.I., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. Obtaining a strain of tularaemia microbe without one copy of the *iglC* gene and without *recA* gene. *Molekularnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2015; 31(4):33–3.
4. Izbanova U.A., Kunitsa T.N., Lukhnova L.Yu. Achievements in the field of specific prevention of tularaemia. *Medicine (Almaty)*. 2016; 10:49–59.
5. Sandström G. The Tularaemia Vaccine. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1994; 59(4):315–20. DOI: 10.1002/jctb.280590402.
6. Ellis J., Oyston P.C., Green M., Titball R.W. Tularaemia. *Clinical. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4):631–46. DOI: 10.1128/CMR.15.4.631–646.2002.
7. Reed D.S., Smith L.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 82(5):2098–105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.
8. Jia Q., Horwitz M.A. Live Attenuated Tularaemia Vaccines for Protection Against Respiratory Challenge With Virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:154. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00154.
9. Titball R.W., Oyston P.C.F. A vaccine for tularaemia. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2003; 3(4):645–53. DOI: 10.1517/14712598.3.4.645.
10. Kadzhaev K., Zingmark C., Golovliov I., Bolanowski M., Shen H., Conlan W., Sjöstedt A. Identification of Genes Contributing to the Virulence of *Francisella tularensis* SCHU S4 in a Mouse Intradermal Infection Model. *PLoS ONE*. 2009; 4(5):e5463. DOI: 10.1371/journal.pone.0005463.
11. Sammons-Jackson W.L., McClelland K., Manch-Citron J.N., Metzger D.W., Bakshi C.S., Garcia E., Rasley A., Anderson B.E. Generation and Characterization of an Attenuated Mutant in a Response Regulator Gene of *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain (LVS). *DNA Cell Biol.* 2008; 27(7):387–403. DOI: 10.1089/dna.2007.0687.
12. Rohmer L., Brittnacher M., Svensson K., Buckley D., Haugen E., Zhou Y., Chang J., Levy R., Hayden H., Forsman M., Olson M., Johansson A., Kaul R., Miller S.I. Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison. *Infect. Immun.* 2006; 74(12):6895–906. DOI: 10.1128/IAI.01006-06.
13. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of Subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903–3908.2005.
14. Forslund A.L., Kuoppa K., Svensson K., Salomonsson E., Johansson A., Byström M., Oyston P.C., Michell S.L., Titball R.W., Noppa L., Frithz-Lindsten E., Forsman M., Forsberg A. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59(6):1818–30. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05061.x.
15. Salomonsson E., Forsberg A., Roos N., Holz C., Maier B., Koomey M., Winther-Larsen H.C. Functional analyses of pilin-like proteins from *Francisella tularensis*: complementation of type IV pilus phenotypes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology*. 2009; 155(Pt 8):2546–59. DOI: 10.1099/mic.0.028183-0.
16. Kormilitsyna M.I., Meshcheryakova I.S., Mikhailova T.V. Molecular genetic characteristics of strains of *Francisella tularensis*, differing in taxonomic affiliation and virulence. *Molekularnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2013; 3:22–5.
17. Forsberg A., Guina T. Type II secretion and type IV pili of *Francisella*. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:187–201. DOI: 10.1196/annals.1409.016.
18. Jaing C.J., McLoughlin K.S., Thissen J.B., Zemla A., Gardner S.N., Vergez L.M., Bourguet F., Mabery S., Fofanov V.Y.,

Koshinsky H., Jackson P.J. Identification of Genome-Wide Mutations in Ciprofloxacin-Resistant *F. tularensis* LVS Using Whole Genome Tiling Arrays and Next Generation Sequencing. *PLoS ONE*. 2016; 11(9):e0163458. DOI: 10.1371/journal.pone.0163458.

19. Qin A., Scott D.W., Thompson J.A., Mann B.J. Identification of an essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* virulence factor. *Infect. Immun.* 2009; 77(1):152–61. DOI: 10.1128/IAI.01113-08.

#### Authors:

Naryshkina E.A., Krasnov Ya.M., Alhova Zh.V., Badanin D.V., Osin A.V., Lyashova O.Yu., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Sayapina L.V., Bondarev V.P., Merkulov V.A., Olefir Yu.V. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. 8, Petrovsky Bulvar, Moscow, 127051, Russian Federation.

#### Об авторах:

Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Альхова Ж.В., Баданин Д.В., Осин А.В., Ляшова О.Ю., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Меркулов В.А., Олефир Ю.В. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.