

DOI 10.21055/0370-1069-2021-3-134-140

УДК 616.98:579.841.95(470.61)

М.В. Цимбалистова<sup>1</sup>, В.М. Сорокин<sup>1</sup>, Н.В. Аронова<sup>1</sup>, А.С. Анисимова<sup>1</sup>, Н.Л. Пичурина<sup>1</sup>,  
Н.И. Пасюкова<sup>1</sup>, Н.А. Селянская<sup>1</sup>, С.О. Водопьянов<sup>1</sup>, А.С. Водопьянов<sup>1</sup>, Р.В. Писанов<sup>1</sup>,  
Н.В. Павлович<sup>1</sup>, Е.В. Ковалев<sup>2</sup>, А.К. Носков<sup>1</sup>

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *FRANCISELLA TULARENSIS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2020 г.

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ростовской области, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

**Цель работы** – изучение биологических свойств и генетических характеристик штаммов возбудителя туляремии, изолированных в природных очагах Ростовской области в 2020 г. **Материалы и методы.** Полевой материал исследовали серологическим, бактериологическим, биологическим и молекулярно-генетическими методами. Получение белковых спектров исследуемых культур методом MALDI-TOF MS проводили с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics и программного обеспечения Flex Control, идентификацию штаммов – с помощью программы Biotyper. Генетические характеристики штаммов определяли методами VNTR- и INDEL-типирования и SNP-анализом. **Результаты и обсуждение.** При мониторинге природных очагов туляремии от мышевидных грызунов с помощью биологической пробы выделены шесть штаммов возбудителя туляремии. Показано, что по своим биологическим свойствам, а также в соответствии с данными ПЦР-анализа и INDEL-типирования по каноническим маркерам все штаммы являются типичными представителями вида *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* biovar *EryR*. При VNTR-типировании по шести генетическим локусам установлено, что штаммы относятся к четырем индивидуальным генотипам. Штамм, выделенный в 2020 г. в природном очаге Сальского района, оказался идентичен штамму, выделенному в этом же районе в 1989 г. На основе полногеномного секвенирования двух штаммов обнаружено, что по изучаемому набору SNP-маркеров они наиболее близки культурам, изолированным в Турции (2009, 2012 гг.) и в Ханты-Мансийске (2013 г.). Таким образом, установлено, что в природных очагах Ростовской области в течение длительного времени могут циркулировать как идентичные (или близкородственные) клоны возбудителя туляремии, так и появляться новые штаммы с уникальными генотипами, ранее не описанными для Ростовской области.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, выделение штаммов, биологические свойства, INDEL-типирование, VNTR-типирование, SNP-типирование.

Корреспондирующий автор: Павлович Наталья Владимировна, e-mail: info@tularemia.ru.

Для цитирования: Цимбалистова М.В., Сорокин В.М., Аронова Н.В., Анисимова А.С., Пичурина Н.Л., Пасюкова Н.И., Селянская Н.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Павлович Н.В., Ковалев Е.В., Носков А.К. Биологические свойства и генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, изолированных на территории Ростовской области в 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:134–140. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-134-140.

Поступила 29.09.2020. Отправлена на доработку 24.02.2021. Принята к публ. 26.02.2021.

M.V. Tsimbalistova<sup>1</sup>, V.M. Sorokin<sup>1</sup>, N.V. Aronova<sup>1</sup>, A.S. Anisimova<sup>1</sup>, N.L. Pichurina<sup>1</sup>,  
N.I. Pasyukova<sup>1</sup>, N.A. Selyanskaya<sup>1</sup>, S.O. Vodop'yanov<sup>1</sup>, A.S. Vodop'yanov<sup>1</sup>, R.V. Pisanov<sup>1</sup>,  
N.V. Pavlovich<sup>1</sup>, E.V. Kovalev<sup>2</sup>, A.K. Noskov<sup>1</sup>

## Biological Properties and Genetic Characteristics of *Francisella tularensis* Strains Isolated in the Territory of the Rostov Region in 2020

<sup>1</sup>Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

<sup>2</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Abstract. Objective** of the study was to investigate biological properties and genetic characteristics of tularemia agent strains isolated from natural foci of the Rostov Region in 2020. **Materials and methods.** Field material from natural foci of the Rostov Region was examined by serological, bacteriological, biological, and molecular-genetic methods. Cultural-morphological, biochemical, antigenic and pathogenic properties of isolated cultures were studied. Protein profiles were obtained through MALDI-TOF MS using mass spectrometer Autoflex speed III Bruker Daltonics and Flex Control of Biotyper software. The genetic characteristics of the strains were determined by VNTR and INDEL typing and SNP analysis. **Results and discussion.** Six strains of tularemia pathogen were isolated from mouse-like rodents using biological method. The investigation of their biological features and data of PCR analysis and INDEL typing with canonical markers showed that all strains are typical representatives of the *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* biovar *EryR*. VNTR typing by six genetic loci revealed that all strains belong to four individual genotypes. The strain isolated in 2020 in the Salsky district was identical to the strain which was isolated in the same area in 1989. Based on the whole genome sequencing of two strains, we established that they are closest to the cultures isolated in Turkey (2009, 2012) and Khanty-Mansiysk (2013) by the studied set of SNP markers. Thus, we found that both identical (or closely related) clones of the tularemia agent and new strains with unique genotypes which previously were not described for the Rostov Region can circulate in natural foci of this region for a long period of time.

**Key words:** *Francisella tularensis*, isolation of strains, biological properties, INDEL-typing, VNTR-typing, SNP-typing.

**Conflict of interest:** The authors confirm the absence of conflict of financial / non-financial interest relating to the writing of the manuscript.

**Corresponding author:** Natalia V. Pavlovich, e-mail: info@tularemia.ru.

**Citation:** Tsimbalistova M.V., Sorokin V.M., Aronova N.V., Anisimova A.S., Pichurina N.L., Pasyukova N.I., Selyanskaya N.A., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Pavlovich N.V., Kovalev E.V., Noskov A.K. Biological Properties and Genetic Characteristics of *Francisella tularensis* Strains Isolated in the Territory of the Rostov Region in 2020. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021;3:134–140. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-134-140.

Received 29.09.2020. Revised 24.02.2021. Accepted 26.02.2021.

Tsimbalistova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>  
Sorokin V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1835-1496>  
Aronova N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7772-9276>  
Anisimova A.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4010-2138>  
Pichurina N.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1876-5397>  
Pasyukova N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1525-5693>  
Selyanskaya N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>

Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>  
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>  
Pisanov R.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7178-8021>  
Pavlovich N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>  
Kovalev E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0840-4638>  
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Туляремия – опасное инфекционное заболевание человека и широкого круга млекопитающих. Массовая иммунизация населения в середине XX в. живой туляремийной вакциной позволила снизить заболеваемость до спорадического уровня, и в настоящее время туляремия относится к так называемым вакциноуправляемым инфекциям [1, 2]. Вместе с тем природные очаги болезни характеризуются стабильностью, что проявляется их циклической активизацией и, как следствие, формированием эпидемических рисков возникновения случаев заболевания среди восприимчивого населения. Природные очаги туляремии в дельтах рек Волги, Дона, Урала и в Московской области известны более 90 лет. Согласно данным Т.Ю. Кудрявцевой с соавт. (2019), с 2009 по 2018 год в России зарегистрировано 1944 случая заболевания человека туляремией, из которых 1005 имели место во время эпидемической вспышки в Ханты-Мансийском автономном округе (2013 г.). Спорадическая и групповая заболеваемость туляремией в последние годы наблюдалась в основном на территориях Северо-Западного и Сибирского федеральных округов. В 2018 г. в стране зарегистрирован 71 случай туляремии в 19 регионах страны [3]. Стабильность природных очагов связана с биологическими особенностями туляремийного микроба – широким кругом хозяев и переносчиков, с одной стороны, и его высокой устойчивостью к факторам внешней среды – с другой. Это определяет необходимость пристального внимания и системного мониторинга состояния активности эндемичных территорий и оценки рисков заболеваемости людей.

Ростовская область является эндемичной по туляремии, причем природные очаги пойменно-болотного и степного типов зарегистрированы в 35 из 42 муниципальных образований. Поэтому на сегодняшний день болезнь остается актуальной для Ростовской области [4]. Следует подчеркнуть, что с 1996 по 2017 год эпидемическая ситуация по туляремии в области оценивалась как стабильно благополучная [4].

**Целью** настоящей работы явилось изучение биологических свойств и генетических характеристик штаммов возбудителя туляремии, изолированных из природных очагов Ростовской области в 2020 г.

## Материалы и методы

Культуры возбудителя туляремии выращивали на плотной питательной среде Т и агаре FT (производство ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболensk). В связи с высокой температурой окружающей среды (38–40 °C) в питательную среду Т дополнительно вводили полимиксин (100 ед/мл) и цефотаксим (25 мкг/мл) для предотвращения контаминации посторонней микрофлорой.

В качестве типового штамма использовали вакцинный штамм туляремийного микроба *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ subsp. *holarctica*, полученный из музея живых культур Ростовского-на Дону противочумного института.

Первый этап исследования включал изучение полевого материала с помощью серологических и молекулярно-генетических методов в соответствии с МУ 3.1.2007-05, МУК 4.2.2939-11.

Реакцию нейтрализации антител (РНАт) проводили с туляремийным антигенным эритроцитарным диагностиком (производство Ставропольского противочумного института) согласно инструкции производителя.

ПЦР для выявления ДНК возбудителя туляремии проводили с использованием набора реагентов «ОМ-Скрин-Туляремия-РВ» производства ЗАО «СИНТОЛ». ДНК из биологических проб выделяли с помощью набора «Рибо-преп» («Амплисенс»). Реакцию выполняли на амплификаторе ДТ-прайм (производство «ДНК-технология»).

Из серологически (РНАт) и ПЦР-позитивных образцов полевого материала для выделения культур туляремийного микроба использовали биологический метод (МУ 3.1.2007-05).

В качестве экспресс-теста для индикации и идентификации возбудителя туляремии использовали «ИХ-тест систему *F. tularensis*» (производство ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболensk).

Цитруллинуреидазную, фосфатазную и β-лактамазную активность определяли в соответствии с ранее описанными методами [5–7].

Антибиотикочувствительность исследуемых культур изучали диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.2495–09 «Определение чувстви-

тельности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сеп, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам».

Вирулентность изолированных штаммов определяли на беспородных белых мышах (18–20 г), которых подкожно заражали 1–10–100–1000 м.к./мышь. По количеству выживших и павших животных оценивали  $LD_{50}$  или DCL. Все работы с животными выполняли в соответствии с СП 1.3.3118-13 и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [8].

Белковые профили штаммов изучали методом MALDI-TOF MS с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics и программного обеспечения Flex Control, идентификацию проводили с помощью программы Biotyper и ранее созданной базы данных «Белковые профили масс-спектров представителей рода *Francisella* для программы MALDI Biotyper» (свидетельство о регистрации 2014621080).

С целью получения генетических характеристик выделенных культур проводили INDEL-анализ и VNTR-типирование. Для определения подвида штаммов *F. tularensis* использовали пять авторских INDEL-маркеров. VNTR-типирование выполняли с набором 6 VNTR-локусов из 11, ранее предложенных A.J. Vogler *et al.* [9]: M3, M5, M6, M10, M23 и M24. Для уменьшения размеров конечного продукта и повышения точности измерений типирование проводили с помощью модифицированных нами праймеров для указанных локусов. Амплификацию выполняли на программируемом термоциклере «Терцик». По окончании реакции смеси разделяли электрофоретически в 8 % полиакриламидном геле, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете. Результаты реакции учитывали по наличию и размеру амплификатов, определяемых по маркеру молекулярных масс и/или ампликону референтного штамма.

Данные о генотипах штаммов возбудителя туляремии, определенных другими авторами, получены из онлайн-базы данных MLVAbank [10]. Кластерный анализ и построение дендрограмм проводили с

помощью авторского программного обеспечения по методам UPGMA и MST (minimal spanning tree). Для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 [11].

В работу включены данные полногеномного секвенирования 22 штаммов туляремийного микроба из базы данных NCBI. Секвенирование двух штаммов 2020 г. проводили на платформе MiSeq Illumina. Сборку геномов и отбор SNP-маркеров для сравнительного анализа выполняли по методике, описанной ранее [12].

## Результаты и обсуждение

Ключевым разделом эпидемиологического надзора за туляремией является мониторинг эпизоотологического состояния природных очагов болезни [13].

В 2020 г. проведено эпизоотологическое обследование территории Ростовской области (РО): Неклиновский, Матвеево-Курганский, Мясниковский, Аксайский, Азовский, Куйбышевский, Ремонтненский, Сальский районы и г. Ростов-на-Дону.

Исследование полевого материала проводили с помощью скрининг-методов – серологического теста (РНат) и ПЦР-анализа. При получении положительных результатов в обоих тестах для обнаружения в полевом материале живых бактерий проводили биологическую пробу с использованием чувствительных лабораторных животных (белые мыши).

Материал от биопробных животных (гомогенаты печени, селезенки и кровь) давал четкие позитивные результаты в РНат, ИХ-тестах и ПЦР. При посеве на селективную питательную среду нам удалось изолировать шесть культур с подозрением на туляремийный микроб. При их дальнейшем изучении с помощью традиционных микробиологических (культурально-морфологические, биохимические, антигенные свойства, патогенность для лабораторных животных) и современных молекулярно-биологических методов установлено, что все выделенные культуры относятся к виду *F. tularensis*. Таким образом, в результате исследования от мелких грызунов, собранных в Сальском и Ремонтненском районах РО, выделены шесть культур возбудителя туляремии (рис. 1, таблица).

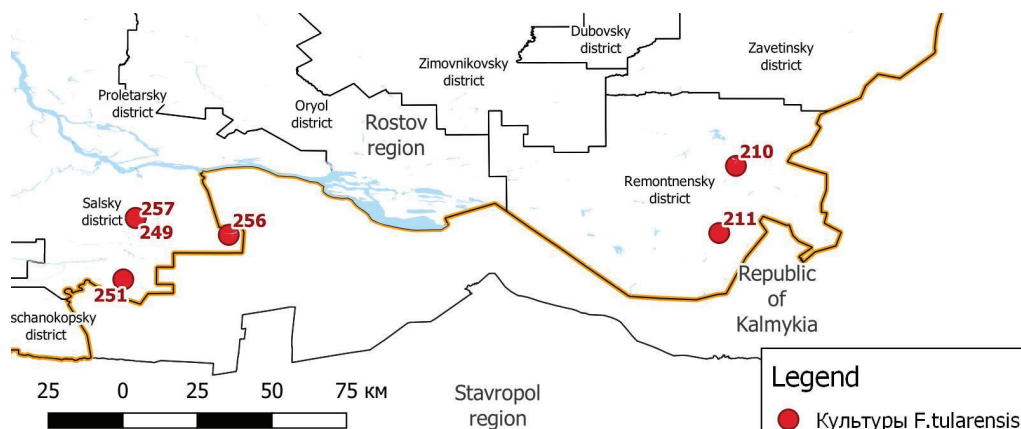


Рис. 1. Регионы Ростовской области и прилегающих к ним территорий с указанием мест изоляции культур возбудителя туляремии в 2020 г.

Fig. 1. Territories of the Rostov Region and neighboring territories where tularemia microbe was isolated in 2020



Sources, areas of *F. tularensis* isolation, VNTR-typing of *F. tularensis* strains

№ штамма <i>F. tularensis</i> Strain No.	Место выделения Areas of isolation	Источник выделения Sources of isolation	VNTR-типирование штаммов VNTR-typing of strains					
			M3	M5	M6	M10	M23	M24
210	Ремонтненский район, п. Первомайский, июль 2020 Remontnensky district, Pervomaisky village, July 2020	Общественная полевка <i>Microtus socialis</i> Social vole <i>Microtus socialis</i>	20	2	7	2	1	2
211	Ремонтненский район, п. Первомайский, июль 2020 Remontnensky district, Pervomaisky village, July 2020	Общественная полевка <i>Microtus socialis</i> Social vole <i>Microtus socialis</i>	20	2	7	2	1	2
249	Сальский район, с. Новый Егорлык, июль 2020 Salsky district, Novy Yegorlyk village, July 2020	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> Common vole <i>Microtus arvalis</i>	14	2	4	2	1	2
251	Сальский район, с. Сандата, июль 2020 Salsky district, Sandata village, July 2020	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> Common vole <i>Microtus arvalis</i>	14	2	4	2	1	2
256	Сальский район, с. Романовка, июль 2020 Salsky district, Romanovka village, July 2020	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> Common vole <i>Microtus arvalis</i>	11	2	4	2	1	2
257	Сальский район, с. Новый Егорлык, июль 2020 Salsky district, Novy Yegorlyk village, July 2020	Обыкновенная полевка <i>Microtus arvalis</i> Common vole <i>Microtus arvalis</i>	21	2	6	2	1	2

Следующий этап исследования включал подробную характеристику биологических и генетических свойств штаммов, циркулирующих в настоящее время на территории Ростовской области.

С помощью разработанных ранее биохимических экспресс-тестов дополнительно проведена внутривидовая дифференциация культур [5–7]. Обнаружено, что исследуемые штаммы продуцируют β-лактамазу (тест с нитроцефиновыми дисками) и не обладают цитруллинуреидазной и фосфатазной активностями (тест с индоксилфосфатными дисками), что характерно для голарктического подвида туляремии микроба. Бактерии характеризовались устойчивостью к β-лактамам (пенициллины и цефалоспорины), клиндамицину, полимиксину и эритромицину, но проявляли высокую чувствительность к аминогликозидам, фторхинолонам, рифампицину. Таким образом, все выделенные штаммы относились к виду *F. tularensis* подвиду *holarctica* биовара *EryR*.

Как известно, ИХ-тест используют как для обнаружения антигена в нативных пробах, так и на этапе идентификации чистой культуры возбудителя. Ранее показано, что тест может быть полезен и при оценке вирулентности туляремии микроба *in vitro* [14]. Определение патогенных свойств выделенных культур с помощью ИХ-тестов показало, что все они синтезируют полноценную структуру ЛПС, следовательно, являются высоковирулентными для чувствительного хозяина. Эти данные подтверждены в экспериментах *in vivo*: изученные штаммы при инфицировании лабораторных животных (белых мышей) вызывали их гибель при дозе заражения 1–10 м.к.

В результате масс-спектрометрического анализа белковых профилей всех выделенных на территории РО штаммов обнаружено, что они являются типичными представителями голарктического подвида возбудителя [15]. Интересно отметить, что по белковому спектру штаммы 249 и 251, изолированные в Сальском районе в 2020 г., наиболее близки профилю штамма 250, выделенному в том же районе в 1989 г.

Анализ штаммов с применением INDEL-типирования по каноническим маркерам также подтвердил принадлежность штаммов к подвиду *holarctica*.

В настоящее время молекулярно-генетический мониторинг распространения возбудителя туляремии на эндемичных территориях позволяет обнаружить степень родства между штаммами, циркулирующими в окружающей среде, определить генетические линии микроорганизма и провести временной анализ распространения возбудителя. Например, в рамках нескольких международных проектов осуществлено исследование вариативности геномов штаммов, изолированных в Швеции, Испании, Германии, Японии, Китае, Турции, Чехии, Швейцарии и других странах. SNP-анализ штаммов туляремии микроба, собранных на трех континентах из 27 стран и от 43 различных хозяев, показал значительную вариативность геномов голарктических штаммов туляремии микроба [16, 17]. Тем не менее большинство штаммов, собранных на Европейском континенте представлены двумя ветвями: западно-европейской и восточно-европейской.

Ранее А. Johansson *et al.* (2004) для дифференциации штаммов *F. tularensis* предложили схему VNTR-типирования, основанную на 25 VNTR-локусах [18]. Позднее А. J. Vogler *et al.* (2009) оптимизировали эту схему, выбрав 11 наиболее вариативных локусов [9]. Для настоящего исследования на основании изучения *in silico* геномов более 200 штаммов *F. tularensis* подвида *holarctica* выбраны 6 наиболее вариативных для этого подвида VNTR-локусов: M3, M5, M6, M10, M23 и M24. По этим локусам проведено генотипирование изолированных штаммов, результаты которого представлены в таблице.

Кластерный анализ (по локусам M3 и M6) показал, что изученные штаммы представлены четырьмя индивидуальными генотипами и, следовательно, принадлежат к различным генетическим линиям (рис. 2). При этом штаммы 210 и 211 имеют один и тот же генотип. Интересно отметить, что одинаковые генотипы зарегистрированы как у недавно выделенных штаммов 249 и 251, так и у штамма 250, выделенного в 1989 г. В то же время вакцинный штамм 15 НИИЭГ отличался от остальных изученных штаммов. Подобное генетическое разнообразие можно объяснить длительным существованием микроба на данной территории [19].

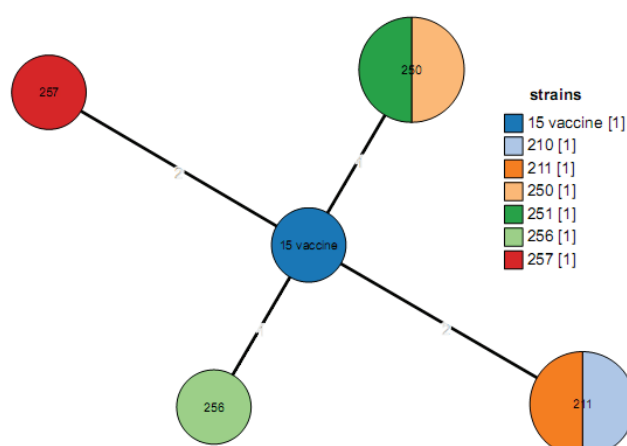


Рис. 2. Кластерный анализ пяти штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории Ростовской области в 2020 г. (метод MST-minimal spanning tree)

Fig. 2. Cluster analysis of 5 *F. tularensis* strains isolated in the Rostov Region in 2020 (MST-minimal spanning tree method)

Для проведения сравнительного изучения из онлайн-базы данных MLVAbank получены VNTR-профили 113 штаммов *F. tularensis*, выделенных на территории России в различные годы и исследованных другими авторами по локусам M3, M5, M6, M10, M23 и M24. Это позволило провести кластерный анализ и построить дендрограмму, отражающую генетическую близость изученных штаммов (рис. 3). Близкородственные штаммы 257 (обыкновенная полевка, Сальский район, 2020) и генетически идентичные штаммы 210 и 211 (общественная полевка, Ремонтненский район, 2020) составили отдельную группу и характеризовались генотипами, ранее не обнаруженными на территории Ростовской области. Штамм 256, выделенный в 2020 г. от обыкновенной полевки в Сальском районе, также имел уникальный генотип и вошел в состав самого многочисленного кластера, объединяющего штаммы практически всех эндемичных территорий РФ. И наконец, в другой группе этого кластера находятся штаммы 249, 250 и 251 (Сальский район). Следует особо отметить, что выделенный в 2017 г. от зайца-русака в Целинском районе штамм *F. tularensis* 20198, от которого впоследствии заразились два человека, имел уникальный генотип и генетически располагался достаточно обособленно от ближайших штаммов этого же кластера. Таким образом, проведенное исследование показало, что в Ростовской области при активизации очагов инфекции происходит не только выявление ранее циркулирующих штаммов, но и появление новых генетических линий возбудителя туляремии. Полученные данные позволяют предположить существование на территории Ростовской области независимых микроочагов возбудителя (или одного большого гетерогенного). Это согласуется с данными О.А. Гнусаревой с соавт. (2019), показавшими генетическое разнообразие штаммов, выделенных в Ставропольском крае в 2017 г., которые

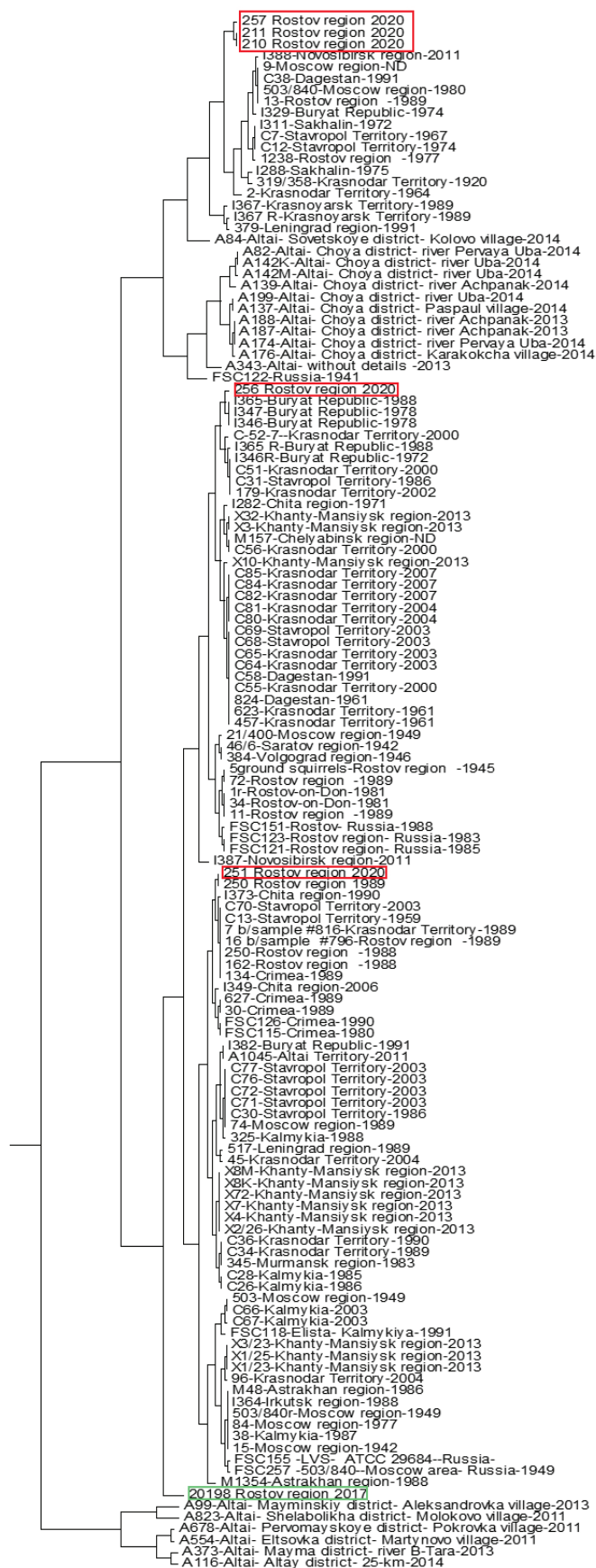


Рис. 3. Дендрограмма VNTR-генотипов *F. tularensis*, построенная по методу UPGMA

Fig. 3. Dendrogram of *F. tularensis* VNTR genotypes, constructed using the UPGMA method

имели, согласно результатам MLVA, разноудаленные генетические дистанции [20]. В связи с этим представляется целесообразным проведение постоянного молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя туляремии, циркулирующих на территории Ростовской области, и оценки их эпидемического потенциала.

С целью изучения вариативности SNP-маркеров проведено полногеномное секвенирование двух штаммов 210 (депонирован в GenBank 22.09.2020 № JACXBQ000000000: JACXBQ010000001 – JACXBQ010000958) и 211. Для сравнительного анализа из базы данных NCBI сформирована коллекция из 22 геномов туляремийного микроба голарктического подвида, выделенных на территории России и Европы. Кластерный анализ на основе сформированного перечня 6324 SNP позволил построить дендрограмму, отражающую генетическое родство изучаемых штаммов (рис. 4).

Удивительно, что ростовские культуры оказались идентичными по изучаемому набору SNP штамму FDC205, выделенному в Турции в 2012 г. В эту же монофилетическую группу попал штамм из Турции 2009 г. (отличия составили три SNP) и изоляты, выделенные в Ханты-Мансийске в 2013 г. (отличия по девяти SNP). От вакцинного штамма их отличало 17 SNP, а от штаммов, изолированных в других европейских странах, – более 200 нуклеотидных замен из составленного нами перечня.

Обращает на себя внимание явная территориальная приуроченность отдельных кластеров европейских штаммов. Так, культуры, выделенные в Норвегии в 2011 г., дистанцированы от всех других

штаммов и представлены отдельной группой; штаммы из Испании (2007 и 2008 гг.) также составили отдельную группу. Аналогичная ситуация наблюдается для штаммов из Германии (2008, 2009 и 2015 гг.). Это подтверждает существование стойких микроочагов туляремии.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что циркулирующие в настоящее время на территории Ростовской области штаммы туляремийного микроба являются типичными представителями голарктического подвида *F. tularensis* *EryR*. При этом они стабильно сохраняют основные видовые биологические свойства: типичную антигенную структуру, высокую патогенность для чувствительных хозяев и чувствительность к аминогликозидам, фторхинолонам и рифампицину. Вместе с тем изолированные из различных очагов культуры *F. tularensis* характеризуются генетическим разнообразием и формируют четыре индивидуальных генотипа. В то же время обнаружено, что на территории Сальского района выделенные в 2020 г. штаммы генетически идентичны штамму, изолированному нами в 1989 г. Это позволяет предполагать, что в природных очагах в течение длительного времени могут стабильно сохраняться идентичные (или близкородственные) клоны штаммов возбудителя туляремии. В то же время в 2020 г. удалось изолировать новые штаммы с уникальными генотипами, ранее не описанными в Ростовской области.

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

#### Список литературы

1. 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(78):14–20.
2. Мокриевич А.Н., Кравченко Т.Б., Фирстова В.В., Титарева Г.М., Дятлов И.А., Тимофеев В.С. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования. Оболонск; М.: Династия; 2019. 263 с.
3. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Паккина Н.Д., Холин А.В., Мазепа А.В., Куликалова Е.С., Косилко С.А., Бирковская Ю.А., Транквиловский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Эпидемическая активность природных очагов туляремии на территории Российской Федерации в 2018 г. и прогноз ситуации на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:32–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-32-41.
4. Ковалев Е.В., Карпущенко Г.В., Швагер М.М., Полонский А.В., Сидельников В.В., Гончаров А.Ю., Половинка Н.В. Особенности распространения туляремийной инфекции в Ростовской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(6):37–40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40.
5. Родионова И.В. Дифференциация географических рас *Francisella tularensis* на основании активности цитруллинуреидазы. *Лабораторное дело*. 1970; 1:42–3.
6. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Фосфатазная активность у представителей рода *Francisella*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1998; 1:10–3.
7. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Особенности формирования устойчивости *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* к β-лактамам антибиотикам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 1:3–8.
8. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2010. 48 с.
9. Vogler A.J., Birdsell D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.*

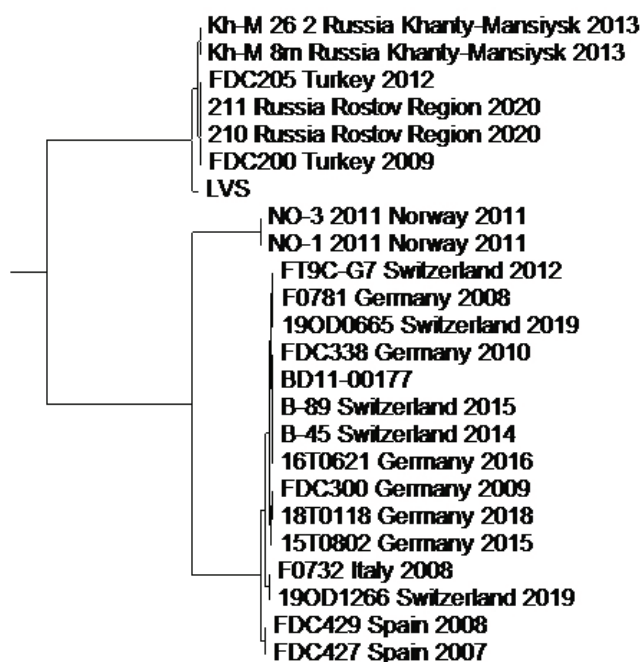


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основе распределения SNP-маркеров по данным полногеномного секвенирования штаммов туляремийного микроба

Fig. 4. Dendrogram based on SNP markers distribution according to a full-genome sequencing of *F. tularensis* strains



2009; 48(1):140–4. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02484.x.

10. Grissa I., Bouchon P., Pourcel C., Vergnaud G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*. 2008; 90(4):660–8. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.07.014.

11. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28:2731–9. DOI: 10.1093/molbev/msr121.

12. Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П., Кругликов В.Д., Титова С.В. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* – разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016; 21(3):146–52. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-3-146-152.

13. Транквиловский Д.В., Царенко В.А., Жуков В.И. Современное состояние эпизоотологического мониторинга за природными очагами инфекций в Российской Федерации. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2016; 2:19–24.

14. Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Аронова Н.В., Горбатов А.А. Способ оценки вирулентности *in vitro* штаммов туляремийного микроба подвидов *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, subsp. *mediasiatica*, subsp. *holarctica*. Патент РФ № 2018118456, опублик. 25.07.2019. Бюл. № 21.

15. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С. Масс-спектрометрический анализ природных и антиген-измененных штаммов туляремийного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 4:92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96.

16. Gyuranecz M., Birdsell D.N., Splettstoesser W., Seibold E., Beckstrom-Sternberg S.M., Makrai L., Fodor L., Fabbì M., Vicari N., Johansson A., Busch J.D., Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2):290–3. DOI: 10.3201/eid1802.111305.

17. Sissonen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmälä H., Henttonen H., Isomursu M., Kinnunen P.M., Pelkola K., Pelkonen S., Tarkka E., Myrtenäs K., Nikkari S., Forsman M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis. (Lond)*. 2015; 47:701–6. DOI: 10.3109/23744235.2015.1049657.

18. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Byström M., Fox J., Chu M.C., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186:5808–18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004.

19. Schulze C., Heuner K., Myrtenäs K., Karlsson E., Jacob D., Kutzer P., Große K., Forsman M., Grunow R. High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(14):3025–36. DOI: 10.1017/S0950268816001175.

20. Гнусарева О.А., Котенев Е.С., Волюнкина А.С., Чисенюк Т.И., Кулиниченко А.Н. Молекулярно-эпидемиологический анализ вспышки туляремии в Ставропольском крае в 2017 г. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(3):57–61. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13008.

## References

1. Mesheryakova I.S., Dobrovolsky A.A., Demidova T.N., Kormilitsyna M.I., Mikhailova T.V. Vector-borne epidemic outbreak of tularemia in the town of Khanty-Mansiysk in 2013. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika. [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2014; 5(78):14–20.

2. Mokrievich A.N., Kravchenko T.B., Firstova V.V., Titareva G.M., Dyatlov I.A., Timofeev V.S. Tularemia: State of the Problem and Research Methods. Obolensk; M.: “Dynasty”; 2019. 263 p.

3. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Pakskina N.D., Kholin A.V., Mazepa A.V., Kulikalova E.S., Kosilko S.A., Birkovskaya Yu. A., Trankvilevsky D.V., Khramov M.V., Dyatlov I.A. Epidemic activity of natural tularemia foci in the territory of the Russian Federation in 2018 and forecast of the situation for 2019. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 1:32–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-32-41.

4. Kovalev E.V., Karpushchenko G.V., Schwager M.M., Polonsky A.V., Sidelnikov V.V., Goncharov A.Yu., Polovinka N.V. Features of distribution of tularemia infection in the Rostov Region. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika. [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2017; 16(6):37–40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40.

5. Rodionova I.V. Differentiation of the geographical races of *Francisella tularensis* based on the activity of citrulline ureidase. *Laboratornoye delo [Laboratory Practice]*. 1970; 1: 42–3.

6. Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. The phosphatase activity in representatives of the genus *Francisella*. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1998; 1:10–3.

7. Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Features of resistance formation to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2014; 1:3–8.

8. Directive of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes 2010/63 / EU. St. Petersburg; 2010.48 p.

9. Vogler A.J., Birdsell D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 48(1):140–4. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02484.x.

10. Grissa I., Bouchon P., Pourcel C., Vergnaud G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*. 2008; 90(4):660–8. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.07.014.

11. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28:2731–9. DOI: 10.1093/molbev/msr121.

12. Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin B.N., Oleynikov I.P., Kruglikov V.D., Titova S.V. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* – development of the algorithm for data analysis of whole genome sequencing. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2016; 21(3):146–52. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-3-146-152.

13. Trankvilevsky D.V., Tsarenko V.A., Zhukov V.I. The current state of epizootic monitoring of natural foci of infections in the Russian Federation. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni. [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2016; 2: 19–24.

14. Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Aronova N.V., Gorbato A.A. Method for *in vitro* virulence assessment of tularemia microbe strains of subspecies *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, subsp. *mediasiatica*, subsp. *holarctica*. RF patent No. 2018118456, publ. 07/25/2019. Bul. No. 21.

15. Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Chaika I.A., Chaika S.O., Vodop'yanov A.S. Mass spectrometric analysis of natural and antigen-modified strains of tularemia agent. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:92–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96.

16. Gyuranecz M., Birdsell D.N., Splettstoesser W., Seibold E., Beckstrom-Sternberg S.M., Makrai L., Fodor L., Fabbì M., Vicari N., Johansson A., Busch J.D., Vogler A.J., Keim P., Wagner D.M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2):290–3. DOI: 10.3201/eid1802.111305.

17. Sissonen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmälä H., Henttonen H., Isomursu M., Kinnunen P.M., Pelkola K., Pelkonen S., Tarkka E., Myrtenäs K., Nikkari S., Forsman M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis. (Lond)*. 2015; 47:701–6. DOI: 10.3109/23744235.2015.1049657.

18. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Byström M., Fox J., Chu M.C., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186:5808–18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004.

19. Schulze C., Heuner K., Myrtenäs K., Karlsson E., Jacob D., Kutzer P., Große K., Forsman M., Grunow R. High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(14):3025–36. DOI: 10.1017/S0950268816001175.

20. Gnusareva O.A., Kotenev E.S., Volynkina A.S., Chishenyuk T.I., Kulichenko A.N. Molecular-epidemiological analysis of the tularemia outbreak in the Stavropol Territory in 2017. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie. [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2018; 7(3):57–61. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13008.

## Authors:

Tsimbalistova M.V., Sorokin V.M., Aronova N.V., Anisimova A.S., Pichurina N.L., Pasyukova N.I., Sel'yanskaya N.A., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Pavlovich N.V., Noskov A.K. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: info@tularemia.ru.

Kovalev E.V. Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region. 7A, 18th Liniya St., Rostov-on-Don, Russian Federation, 344019.

## Об авторах:

Цимбалистова М.В., Сорокин В.М., Аронова Н.В., Анисимова А.С., Пичурина Н.Л., Пасюкова Н.И., Селянская Н.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Павлович Н.В., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Ковалев Е.В. Управление Роспотребнадзора по Ростовской области. Российская Федерация, 344019, Ростов-на-Дону, ул. 18-я Линия, 7А.