

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-132-141

УДК 616.98:579.841.95

Н.А. Осина, Д.А. Ситмбетов, Е.Г. Булгакова, С.С. Чекмарева, Е.В. Сазанова, А.М. Сеничкина, О.Ю. Ляшова, А.В. Осин, С.А. Щербакова

Внутривидовая дифференциация штаммов *Francisella tularensis* методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель – разработка способа внутривидовой дифференциации туляремиального микроба: подвиды *tularensis* (субпопуляции AI и AII), *holarctica* (биовары japonica, Ery^{SR}), *mediasiatica* и *novicida* – с помощью мультилокусной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. **Материалы и методы.** В работе использовали 48 штаммов *Francisella tularensis* различных подвидов, биоваров и субпопуляций. Внутривидовую принадлежность штаммов устанавливали на основании анализа варибельности области дифференциации RD-1 методом ПЦР, гена *sdhA* – методом фрагментного секвенирования по Сэнгеру, диско-диффузионным методом с использованием дисков с эритромицином. Подбор праймеров и зондов проводили с помощью программного обеспечения на сайте www.genscript.com и программы GeneRunner 6.5.52. Оценку гомологии последовательностей – по алгоритму BLAST, используя базу данных GenBank NCBI. **Результаты и обсуждение.** Получены новые данные по структуре и встречаемости областей дифференциации RD-8, RD-12, RD-28, гена *FTT1122c* и гомологичных ему последовательностей у штаммов туляремиального микроба различной подвидовой принадлежности. Выявлена новая RD_{hm} размером 346 п.н., характерная для штаммов subsp. *mediasiatica*, *holarctica*, которая делетирована у subsp. *tularensis* и отсутствует у subsp. *novicida*. На основе выявления локусов *FTT1670*, *FTT1122c*, *FTT1067*, *FTW_2084* разработана мультилокусная ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени «*F. tularensis* 4с», обеспечивающая определение всех подвидов туляремиального микроба, отдельно биовара japonica голарктического подвида и субпопуляций AI, AII подвида *tularensis*. Подтверждена ее специфичность при исследовании штаммов туляремиального микроба из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб». Полученные результаты расширяют представление о внутривидовой генетической неоднородности туляремиального микроба и возможности идентификации возбудителя туляремии с помощью молекулярно-генетических методов. Они также важны для понимания процессов приспособления возбудителя к циркуляции в макроорганизме и объектах окружающей среды, направлений эволюции и образования новых видов франциселл.

Ключевые слова: мультилокусная ПЦР, внутривидовая дифференциация, *Francisella tularensis*, биовары, подвиды, области дифференциации RD, структурная организация.

Корреспондирующий автор: Осина Наталия Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Осина Н.А., Ситмбетов Д.А., Булгакова Е.Г., Чекмарева С.С., Сазанова Е.В., Сеничкина А.М., Ляшова О.Ю., Осин А.В., Щербакова С.А. Внутривидовая дифференциация штаммов *Francisella tularensis* методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 1:132–141. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-132-141

Поступила 27.02.2023 Принята к публ. 24.03.2023.

N.A. Osina, D.A. Sitmbetov, E.G. Bulgakova, S.S. Chekmareva, E.V. Sazanova, A.M. Senichkina, O.Yu. Lyashova, A.V. Osin, S.A. Shcherbakova

Intraspecific Differentiation of *Francisella tularensis* Strains Using Multilocus Real-Time Polymerase Chain Reaction

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to develop a method for intraspecific differentiation of the tularemia microbe: subspecies *tularensis* (subpopulations AI and AII), *holarctica* (biovars japonica, Ery^{SR}), *mediasiatica*, and *novicida* using multilocus real-time PCR. **Materials and methods.** We used 48 strains of *F. tularensis* of various subspecies, biovars, and subpopulations. Intraspecific appurtenance of the strains was carried out on the basis of the analysis of the RD-1 region variability applying PCR, the *sdhA* gene by Sanger fragment sequencing and by the disk diffusion method using disks with erythromycin. The selection of primers and probes was performed using the software available at www.genscript.com and GeneRunner 6.5.52. Sequence homology was assessed using the BLAST algorithm and the GenBank NCBI database. **Results and discussion.** New data on the structure and occurrence of the differentiation regions RD-8, RD-12, RD-28 of *FTT1122c* gene and its homologous sequences in strains of tularemia microbe of various subspecies have been obtained. Novel RD_{hm} 346 bp in size, characteristic of strains of the subsp. *mediasiatica*, *holarctica*, which is deleted in subsp. *tularensis* and absent in subsp. *novicida* has been detected. Based on the detection of the *FTT1670*, *FTT1122c*, *FTT1067*, *FTW_2084* loci, a multilocus real-time PCR has been developed – “*F. tularensis* 4с”, providing for identification of all subspecies of the tularemia microbe, separately for the biovar japonica of the *holarctica* subspecies and subpopulations AI, AII of the subspecies *tularensis*. The PCR specificity was confirmed in the study of strains of tularemia microbe from the fund of the “State Collection of Pathogenic Bacteria” at the premises of the Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. The results obtained expand the concept of intraspecific genetic heterogeneity of tularemia microbe and possibilities of identifying the causative agent of tularemia using molecular-genetic methods.

They are important for understanding the processes of adaptation of the pathogen to circulation in the host organism and environmental objects, the course of evolution and formation of new species of *Francisella*.

Key words: multilocus PCR, intraspecific differentiation, *Francisella tularensis*, biovars, subspecies, RD differentiation regions, structural organization.

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

Corresponding author: Natalia A. Osina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Osina N.A., Sitmbetov D.A., Bulgakova E.G., Chekmareva S.S., Sazanova E.V., Senichkina A.M., Lyashova O.Yu., Osin A.V., Shcherbakova S.A. Intraspecific Differentiation of *Francisella tularensis* Strains Using Multilocus Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; 1:132–141. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-132-141

Received 27.02.2023. Accepted 24.03.2023.

Osina N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>

Sitmbetov D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2766-2624>

Bulgakova E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2405-2684>

Chekmareva S.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5487-2240>

Sazanova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9140-3910>

Senichkina A.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1026-2680>

Lyashova O.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1332-9580>

Osin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5308-0022>

Shcherbakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Согласно современной классификации, вид *Francisella tularensis* представлен четырьмя подвидами: *tularensis* (две субпопуляции AI и AII), *holarctica* (три биовара: *japonica*, эритромицинустойчивый Ery^R, эритромицинчувствительный Ery^S), *mediasiatica* и *novicida* [1–3]. Для подвигов, биоваров и генетических групп туляремиального микроба характерны различные ареалы распространения. Степень вирулентности туляремиального микроба зависит от того, к какому подвиду он относится. Поэтому на этапе идентификации выделенных культур возбудителя туляремии большое значение имеет определение их внутривидовой принадлежности.

Применение в соответствии с действующими нормативно-методическими документами (МУ 3.1.2007-05, МУ 4.2.2939-11) для этих целей бактериологического и биологического методов трудоемко и продолжительно во времени. Перспективными подходами в данном направлении являются молекулярно-генетические методы.

Разными исследователями предложены подходы для дифференцирования нескольких подвигов туляремиального микроба: *tularensis* [4]; *holarctica* [5]; *tularensis*, *holarctica*, *novicida* [6]; субпопуляций AI и AII *F. tularensis* subsp. *tularensis* [2]; *F. tularensis* subsp. *tularensis* AI и AII, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *novicida* [3] – методами ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной (ПЦР-РВ) или электрофоретической (ПЦР-ЭФ) детекцией. Применяя аналогичные приемы, а также ПЦР со случайными праймерами (RAPD), ряд исследователей смогли дифференцировать все подвиды патогена [7–10].

Дифференцировать подвиды, субпопуляции AI и AII *F. tularensis* subsp. *tularensis*, биовар *japonica* *F. tularensis* subsp. *holarctica* удалось D.N. Birdsell et al. [11] путем выявления одиннадцати полиморфных нуклеотидов (SNP) методом монолокусной ПЦР-РВ и В.М. Сорокину с соавт. [12] на основании детекции пяти INDEL-маркеров с помощью монолокусной ПЦР с электрофоретическим учетом результатов в 8 % полиакриламидном геле.

Однако предложенные подходы либо недостаточно чувствительны [7], либо недостаточно информативны [2, 4–6], трудоемки в исполнении [9, 11, 12] и продолжительны по времени [7]. Все это указыва-

ет на необходимость разработки простых, быстрых и информативных подходов для определения подвигов и биоваров туляремиального микроба с помощью молекулярно-генетических методов.

Целью работы являлась разработка способа внутривидовой дифференциации туляремиального микроба: подвиды *tularensis* (субпопуляции AI и AII), *holarctica* (биовары *japonica*, Ery^{S/R}), *mediasiatica* и *novicida* с помощью мультилокусной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 48 штаммов туляремиального микроба из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», из них подвиды *tularensis* AI – 3, *tularensis* AII – 4, *mediasiatica* – 3, *holarctica* bv. Ery^R – 19, *holarctica* bv. Ery^S – 13, *holarctica* bv. *japonica* – 4, *novicida* – 2. Штаммы культивировали на FT-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ) в течение 36–48 ч при температуре (37±1) °C. Из выросших культур готовили суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ НЦЭСМП (ОСО 42-28-85-П, 10МЕ), что соответствовало 5·10⁹ м.к./мл для возбудителя туляремии. Затем десятикратными разведениями в 0,9 % растворе натрия хлорида микробные взвеси доводили до концентрации 1·10³ м.к./мл. Обеззараживание проб осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Выделение ДНК проводили с помощью набора «ДНК-сорб В» в соответствии с инструкцией к препарату.

Определение чувствительности штаммов туляремиального микроба к эритромицину осуществляли диско-диффузионным методом с использованием дисков с антибиотиком 15 мкг/мл (Oxoid Ltd., Великобритания).

Для проведения реакции амплификации применяли фермент SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами и другие реагенты производства ООО «Синтол» (10хПЦР-Буфер-Б, 25 мМоль MgCl₂, 25 мМоль смеси дНТФ).

Постановку ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли на при-

боре типа RotorGene (Qiagen, Германия) и CFX96 (BioRad, США), а с электрофоретической детекцией – на амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия) визуализируя ампликоны в 2 % агарозном геле.

Определение подвиговой принадлежности на основании анализа варибельности области дифференциации RD-1 методом ПЦР с электрофоретической детекцией проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [5]. Для выявления полиморфных нуклеотидов в гене *sdhA* проводили амплификации его фрагмента размером 521 п.н. с использованием праймеров *sdhA1* 5'-AACGAGCGTTTGGTGGGATG-3', *sdhA2* 5'-CACCACGCCCTTCCATAATTTC-3'. Полученные методом фрагментного секвенирования по Сэнгеру нуклеотидные последовательности выравнивали относительно гена *sdhA* штамма *F. tularensis* SchuS4 (GenBank NCBI № NC_006570.2). Для *F. tularensis* subsp. *tularensis* AI характерны следующие нуклеотиды: 441G, 465A, 480C, 750T, 795 C; *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* – 441G, 465G, 480T, 750T, 795C; *F. tularensis* subsp. *tularensis* AII и *F. tularensis* *holarctica* bv. Ery^{RS} – 441G, 465G, 480C, 750T, 795C; *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. *japonica* – 441G, 465G, 480C, 750C, 795C; *F. tularensis* subsp. *novicida* – 441A, 465G, 480T, 750T, 795T.

Фрагментное секвенирование по Сэнгеру осуществляли на генетическом анализаторе 3500 XL в соответствии с рекомендациями производителя.

Подбор праймеров и зондов проводили с помощью программного обеспечения на сайте www.genscript.com (Bioinformatics Tools/Molecular Biology/Real-time PCR (TaqMan) Primer Design) и программы GeneRunner 6.5.52. Для оценки гомологии последовательностей использовали алгоритм BLAST и базу данных GenBank NCBI, программу MEGA X64.

Результаты и обсуждение

Подбор перспективных ДНК-мишеней для внутривидовой дифференциации туляремиального микроба методом мультилокусной ПЦР. Поиск генетических маркеров, специфичных для подвигов, биоваров и субпопуляций туляремиального микроба осуществляли на основании анализа зарубежных публикаций [2, 13, 14], а также нуклеотидных последовательностей полных геномов штаммов патогена с установленным таксономическим положением, представленных в базе данных GenBank NCBI.

В качестве ДНК-мишени для дифференциации туляремиального микроба голарктического подвида методом ПЦР представляется перспективным использование локуса *ISFtu2*, имеющего различное расположение в геноме *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Эффективность такого подхода была подтверждена ранее [5]. С этой же целью может рассматриваться ген *narH* (FTT1670, RD-28), который, по данным Н. LeButt [15] и

S.T. Sarva *et al.* [16] отсутствует у штаммов подвида *holarctica*. Таким образом, штаммы данного подвида, в отличие от штаммов других подвигов, не будут выявляться методом ПЦР с праймерами, комплементарными данному гену.

По данным L. Rohmer *et al.* [14] и М.М. Samrakandi *et al.* [17], для подвида *tularensis* потенциально специфичной может рассматриваться область RD-8 (FTT1066-FTT1073 по нуклеотидной последовательности *F. tularensis* Schu S4, GenBank NCBI № NC_006570.2) размером 11,1 т.п.н., которая содержит шесть функциональных генов, два псевдогена (FTT1066, FTT1075) и фланкирована ISFtu1 и 16 нуклеотидными повторами. Проведенный нами анализ данной области *in silico* показал, что аналогичный по составу участок FTM0877-FTM0869 (*F. tularensis* FSC147 GenBank NCBI № CP00915.1) встречается у штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* биоваров Ery – KCX64_05490 – KCX64_05555 (*F. tularensis* 2015321842 № CP073125), *F. tularensis* subsp. *holarctica* биовар *japonica* – JPFTKU_12440 – JPFTKU_12600 (*F. tularensis* KU-1 № AP023460), штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* – N894_0885-N894_0896 (*F. tularensis* PA10-7858 № CP016635). В последних двух случаях область не фланкирована ISFtu1 (рис. 1).

Более детальный анализ генов, входящих в данную область, показал, что в гене FTT1067, кодирующем синтез рестрикционной эндонуклеазы III типа и являющемся, предположительно, нефункциональным у *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4, выявлена делеция размером 19 п.н. (рис. 1). Аналогичные делеции обнаружены у других штаммов подвида *tularensis*, представленных в базе данных GenBank NCBI, а также у штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 2015321842, выделенного от человека в США в 2015 г. (GenBank NCBI № C3073125).

Полученные данные указывают на возможность сохранения у штаммов туляремиального микроба голарктического подвида японского биовара и подвида *novicida* остатков области RD-8, частично гомологичной с таковой у *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, а также приобретения практически аналогичной структуры штаммом голарктического подвида Ery^{RS}. В последнем случае донором может выступать *F. tularensis* subsp. *tularensis*, поскольку на территории США одновременно циркулируют подвиды *tularensis* и *holarctica* с делецией 19 п.н. в области RD-8. Существующие отличия в количестве открытых рамок считывания в области RD-8 у различных подвигов и биоваров могут быть следствием циркуляции этих патогенов на различных носителях и переносчиках.

Исходя из полученных данных, ген FTT1067 может быть использован для дифференциации штаммов туляремиального микроба подвигов *mediasiatica* и *holarctica* биовара *japonica*.

Другими вариантами, подходящими для внутривидового типирования туляремиального микро-

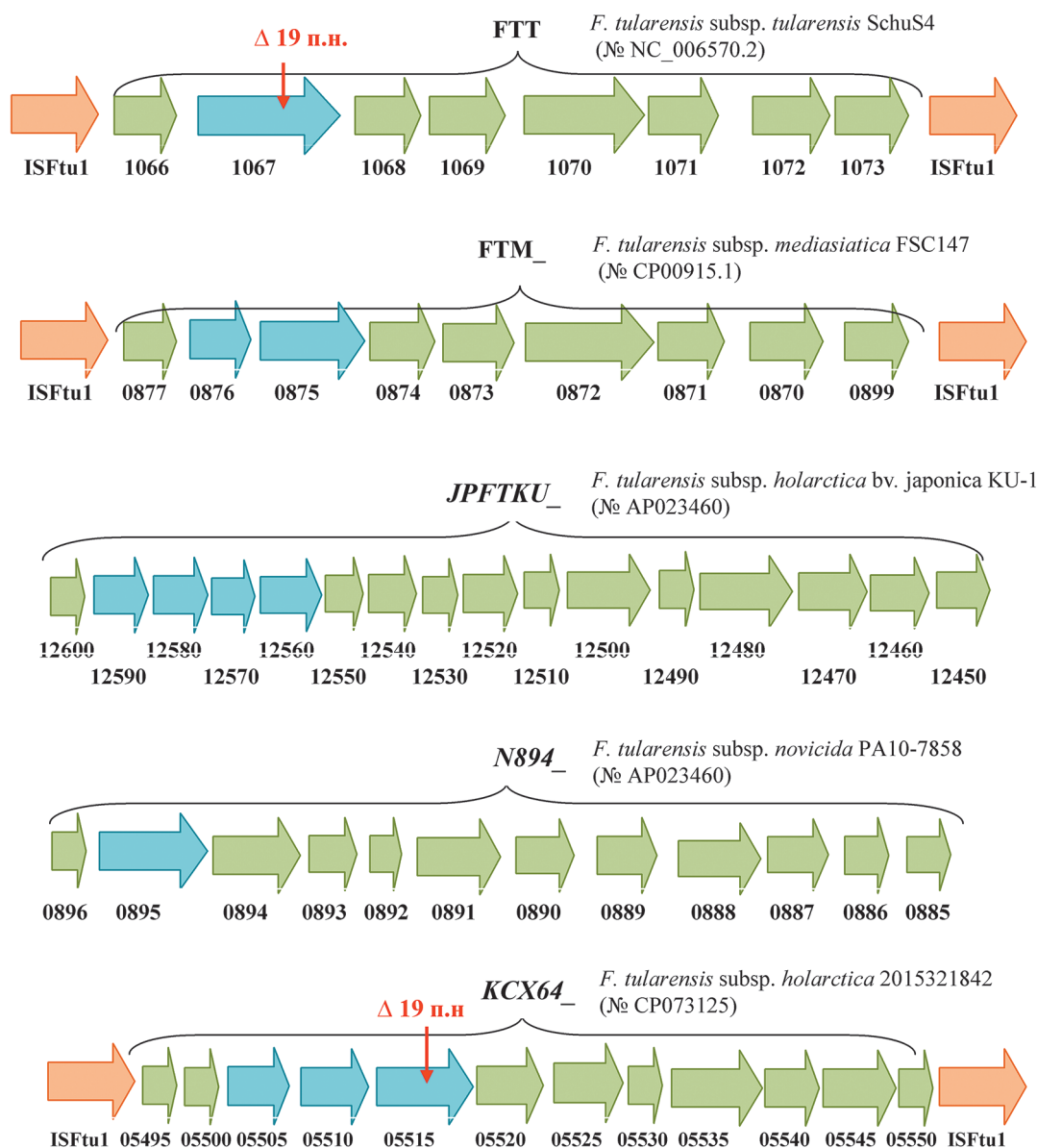


Рис. 1. Структура области дифференциации RD-8 и гомологичных ей участков у штаммов различных подвидов и биоваров: красным Δ отмечена делеция размером 19 п.н., выявленная у штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis* и штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 2015321842 (№ CP073125); зеленым отмечены открытые рамки считывания; голубым выделен ген *FTT1067* и участки, частично ему гомологичные; оранжевым – *ISFtu1*

Fig. 1. Structure of the RD-8 differentiation region and its homologous regions in strains of various subspecies and biovars: red Δ marks a 19 bp deletion detected in strains of *F. tularensis* subsp. *tularensis* and strain of *F. tularensis* subsp. *holarctica* 2015321842 (No. CP073125); open reading frames are marked in green; the *FTT1067* gene and regions partially homologous to it are highlighted in blue; *ISFtu1* is shown in orange

ба, могут быть гены *FTT0097*, *FTT0432*, *FTT0435*, *FTT0496*, *FTT0525*, *FTT0528*, *FTT0677c*, *FTT0754c*, *FTT0939c*, *FTT1080c*, *FTT1122c*, *FTT1598*, *FTT1666c*, *FTT1667*, *FTT1766*, *FTT1781c*, *FTT1784c*, *FTT1787c*, *FTT1789*, которые, по данным L. Rohmer *et al.* [14] и M.D. Champion *et al.* [13], не функционируют у штаммов подвидов *novicida* и *holarctica*. Среди исследованных генов особый интерес представляет *FTT 1122c*, кодирующий у штаммов подвида *tularensis* гипотетический липопротеин. Проведенный анализ показал, что фрагменты данного гена выявлены в геноме всех подвидов туляреминого микроба (рис. 2).

На рис. 2 видно, что участок гена *FTT1122c* (*F. tularensis* Schu S4, GenBank NCBI № NC_006570.2) с 55-го по 198-й нуклеотид гомологичен началу гена *AW21_1735* штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (№ CP009694.1), *FTM1290* – *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* FSC147 (№ CP00915.1), *AW25_904* – *F. tularensis* subsp. *novicida* U-112. Участок с 199-го по 471-й нуклеотид гомологичен концевому участку гена *AW21_1736* штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, гену *FTM1289* *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* FSC147. Выбранный для анализа штамм подвида *novicida* U-112 не содержал концевую часть гена *FTT1122c*, у него присутствовал фрагмент,

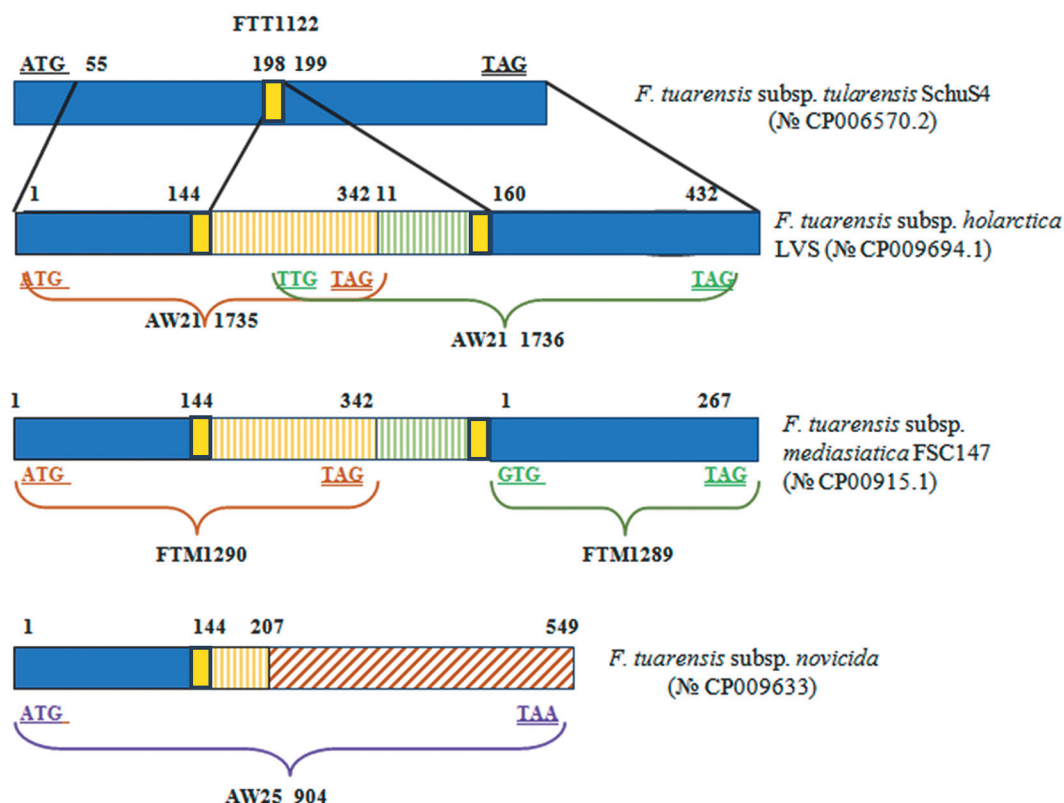


Рис. 2. Анализ гомологии локуса *FTT1122c* у штаммов различных подвидов *F. tularensis*:

старт-кодоны подчеркнуты одной чертой; стоп-кодоны – двумя чертами; синим отмечены участки, гомологичные гену *FTT1122c*; желтой и зеленой вертикальной штриховкой отмечены области, идентичные у подвидов *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*; коричневой косой штриховкой отмечен уникальный участок для *F. tularensis* subsp. *novicida*; области, отмеченные желтой и зеленой вертикальной штриховкой, составляют область дифференциации, обозначенную как RD_{hm}; желтым прямоугольником обозначены прямые повторы

Fig. 2. Analysis of the homology of the *FTT1122c* locus in strains of various subspecies of *F. tularensis*:

start codons are underlined with one line; stop codons – with two lines; blue marks the regions homologous to the *FTT1122c* gene; yellow and green vertical lines mark areas that identical in subspecies *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*; brown hatching outlines a unique for *F. tularensis* subsp. *novicida* site; the areas colored with yellow and green vertical lines make up the differentiation region designated as RD_{hm}; direct repeats are marked with yellow rectangle

идентичный локусу гена с 144-го по 207-й нуклеотид, характерный для подвидов *holarctica* и *mediasiatica*. Последовательность гена *AW25_904* штамма *F. tularensis novicida* U-112, негомологичная гену *FTT1122c* *F. tularensis* Schu S4, значительно отличалась от аналогичных генов всех других подвидов. Участок, отсутствующий в гене *FTT1122c*, но выявляющийся у подвидов *holarctica* и *mediasiatica*, фланкирован прямыми 10-нуклеотидными повторами TGTGGAGGAT. Такая структура указывает на принадлежность данного участка генома к области дифференциации RD. Эту область размером 346 п.н. мы обозначили RD_{hm}.

У штаммов подвидов *tularensis* и *novicida* отсутствует один из повторов, однако в первом случае утрата повтора могла произойти в результате делетирования RD, во втором случае – в результате встраивания высокоспецифичного для *novicida* участка. Возможность генетических перестроек в этой области обусловлена располагающейся рядом с указанными генами транспозазой. Полученные данные в полной мере подтверждают, что локус *FTT1122c* и продукт, который он кодирует, интактен только у штаммов подвида *tularensis*. У остальных подвидов, несмотря на наличие схожих участков, будут экспрессировать-

ся совершенно другие белки. Проведенный анализ выявил структурные особенности гена *FTT1122c* у туляремиального микроба подвида *novicida*, которые позволяют использовать его в качестве ДНК мишени, специфичной для этого подвида.

Панее С.Р. Molins-Schneekloth *et al.* [2] выявили отличия по составу областей дифференциации RD у субпопуляций *F. tularensis* subsp. *tularensis* AI и AII и рекомендовали использовать для их дифференциации области RD-3, RD-6, RD-10. Мы для этих целей остановили свой выбор на гене *FTW_2084*, содержащем RD-12 размером 179 п.н. и кодирующем хитиназу. Эта область, по данным этих авторов, встречается только у *F. tularensis* subsp. *tularensis* AII и *F. tularensis* subsp. *novicida*. Для выбора перспективного участка мы проанализировали участки, гомологичные локусу *FTW_2084* у штаммов других подвидов, представленных в базе данных GenBank NCBI (рис. 3).

Установлено, что в состав этого гена входят VNTR-повторы – FT-M20, определенные ранее A. Johansson *et al.* [18]. Более того, у штаммов *F. tularensis tularensis* AII имеется вставка нуклеотида G в позиции 575, что приводит к образованию стоп-кодона TGA и нарушению продукции у дан-

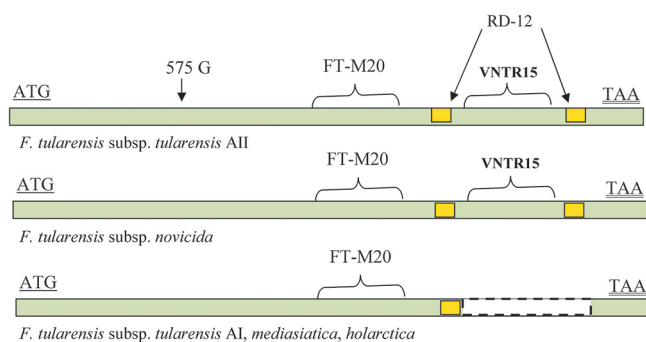


Рис. 3. Структура локуса *FTW_2084* и гомологичных ему областей у штаммов туляремии микроба различных биоваров:

прямые повторы, фланкирующие область дифференциации, выделены желтым; пунктиром обозначена делеция RD-12 области, содержащей VNTR15, у штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis* AI, *mediasiatica*, *holarctica*; старт-кодон подчеркнут одной чертой; стоп-кодон – двумя чертами

Fig. 3. Structure of the *FTW_2084* locus and its homologous regions in strains of tularemia microbe of various biovars:

direct repeats flanking the region of differentiation are highlighted in yellow; the dotted line shows the deletion of the RD-12 region containing VNTR15 in strains of *F. tularensis* subsp. *tularensis* AI, *mediasiatica*, *holarctica*; start codon is underlined with one line; stop codon – with two lines

ной группы патогена белка с функцией хитиназы. Отсутствие функциональной активности этого гена была ранее показана J.C. Chanler *et al.* [19]. Нами обнаружено, как и ожидалось, что у штаммов *F. tularensis tularensis* AII и *F. tularensis novicida* имеется область дифференциации RD-12, фланкированная прямыми 20-нуклеотидными повторами GCTCAATGGTGGACACAAGG, однако ее размер отличается у разных штаммов.

Детальное изучение области дифференциации RD-12 у штаммов туляремии микроба, последовательности которых депонированы в базе данных GenBank NCBI, и референс-штаммов, подобранных нами ранее для каждого подвида возбудителя [20] из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», показало наличие в данной области VNTR-повторов размером 15 п.н. GGTA(A/T/C) AATGACCAA (VNTR15). Наличие разного числа таких повторов и определило разницу в размере области RD-12 у исследованных штаммов: от 178 п.н. (2 повтора) до 238 п.н. (6 повторов).

Полученные результаты не в полной мере соответствуют данным A. Johansson *et al.* [18], которые показали, что у штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis* AII – 22–25 повторов FT-M20, а *F. tularensis* subsp. *novicida* – 31–39 повторов. В ходе проведенного нами анализа области RD-12 у штаммов этих групп обнаружено, что количество повторов FT-M20 составляет 4–7 и 5–15 для штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis* AII и *F. tularensis* subsp. *novicida* соответственно. Различия в размере амплифицируемого фрагмента гена с использованием предложенных авторами праймеров определяются не только количеством этих повторов, но и числом выявленных нами VNTR15 (2–6) в области RD-12. Эти данные не умаляют дискриминирующие воз-

можности локуса *FTW_2084*, однако включение в анализ VNTR15 повышает адекватность и достоверность результатов исследования.

Интересно, что область дифференциации с аналогичными tandemными повторами в гене хитиназы I обнаружена также у штаммов *F. hispaniense* и *F. opportunistica*. В первом случае мотив VNTR15 отсутствует, но есть своеобразный участок ATTAATAATGACCAAGGTAAT (по нуклеотидной последовательности *F. hispaniense* FSC454, GenBank NCBI № CP018093.1). У *F. opportunistica* в одном из фланкирующих повторов наблюдается замена A2415G (по нуклеотидной последовательности штамма PA05-1188, GenBank NCBI № CP022377.1), имеются четыре типичных VNTR15 и один несовершенный повтор CAAAACAATGACCAA, а также делеция TGA после 2252-го нуклеотида. Представляет интерес дальнейшее изучение функциональной активности гена хитиназы I, выявленного у еще двух видов франциселл, вызывающих заболевание у человека.

Установленная структура локуса *FTW_2084* в полной мере подтвердила перспективность его использования для дифференцирования *F. tularensis* subsp. *tularensis* AI и AII и *F. tularensis* subsp. *novicida*.

Подбор специфичных праймеров и зондов для мультилокусной амплификации выбранных локусов и оптимизация условий реакции. На основании нуклеотидной последовательности выбранных генов и локусов подобраны олигонуклеотидные праймеры и зонды формата TaqMan. Для возможности осуществления мультилокусной ПЦР в состав зондов введены различные флуоресцентные метки (табл. 1). Для дифференцирования голарктического подвида дополнительно подобрали праймеры и зонд на специфичную для данного подвида область, содержащую ISFtu2: F: 5'-TTCACCATAATTAGGTTCTG-3', R: 5'-GCTTCATCATTTGGTATGTAT-3', P: 5'-R6G-TTCATTTGCTAAACCATTTGA-BHQ1-3'. Для оптимизации условий амплификации использовали подобранную ранее панель штаммов *F. tularensis* различных подвигов: *holarctica* биовары Ery^S – KM-3, Ery^R – KM-8, *japonica* – KM-5; *mediasiatica* – KM-4; *tularensis* AII – KM-6; *tularensis* AI – KM-7 [20].

При проведении монолокусных реакций во всех случаях наблюдалось специфичное свечение по соответствующим каналам: FAM (*FTT1122*), JOE (*FTT1670*), ROX (*FTT1067*), RED (*FTW_2084*). При амплификации ISFtu2 накопление флуоресценции было слабым, смесь соответствующих праймеров и зонда плохо хранилась при температуре 6–8 °C, поэтому в дальнейшей работе их не использовали.

В ходе ряда экспериментов определены оптимальные условия реакции: праймеры и зонды в концентрации 8 пМоль и 4 пМоль соответственно; ионы Mg²⁺ – 2,5 мМоль; дНТФ – 0,2 мМоль; фермент Taq-ДНК-полимеразы с «горячим стартом» – 5 ед. Программа амплификации включала предварительную денатурацию при температуре 95 °C в течение

Таблица 1 / Table 1

Нуклеотидная последовательность олигонуклеотидов, подобранных в данной работе для внутривидовой дифференциации туляремии микроба, и амплификация ДНК-мишеней с их участием у штаммов различных групп

Nucleotide sequence of oligonucleotides selected in this work for intraspecific differentiation of tularemia microbe, and amplification of target DNA with their involvement in strains of various groups

| Локус Locus | Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов, 5'-3' Nucleotide sequence of primers and probes, 5'-3' | Наличие амплификации* The presence of amplification* | | | | | |
|-----------------|---|---|---------|-----|---------|---------|-----|
| | | FTT AI | FTT AII | FTM | FTH Ery | FTH jap | FTN |
| <i>FTT1122</i> | F: ATGCTGCTAAAGCACATGGA R: GCGCAGAGTCTCTACCTGAA P: FAM-CCGCTTCCGTCAGCAGCAAA-RTQ1 | | | | | | |
| <i>FTT1670</i> | F: ATCCAAGCAATACCTTTAGT R: TCACTAATGCTTGTGGTACT P: R6G-TCCAGCGTATCATATGCTAA- BHQ1 | | | | | | |
| <i>FTT1067</i> | F: AGCAAATTCTAATTCTCTATCTAA R: GGCTATATAATTGATGATGTCT P: ROX-TCATCACCCAATCTAATGAACCTTACC-BHQ2 | | | | | | ** |
| <i>FTW_2084</i> | F: CAATGACCAAGGTAATAATG R: ATACAGTTTGAGGATTCCAT P: Cy5-ACCAAAGTGGTGATAATTCTTC-BHQ2 | | | | | | |

Примечание: * FTT – *F. tularensis* subsp. *tularensis*, FTM – *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, FTH Ery – *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. Ery^{SR}, FTH jap – *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. *japonica*, FTN – *F. tularensis* subsp. *novicida*; ** по данным *in silico* в редких случаях возможна амплификация *FTT1067* локуса у штаммов *F. tularensis* subsp. *novicida*.

Note: * FTT – *F. tularensis* subsp. *tularensis*, FTM – *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, FTH Ery – *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. Ery^{SR}, FTH jap – *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. *japonica*, FTN – *F. tularensis* subsp. *novicida*; ** according to *in silico* data, in rare cases, amplification of the *FTT1067* locus in strains of *F. tularensis* subsp. *novicida* is possible.

5 мин; 10 циклов 95 °C – 10 с, 59 °C – 30 с, 72 °C – 20 с; 35 циклов 95 °C – 10 с, 56 °C – 30 с (учет флуоресценции), 72 °C – 20 с. Программа была адаптирована для приборов RotorGene Q и CFX96. В случае использования термоциклера RotorGene Q для красителей Green и Orange границы значений по усилению сигнала 5 и 10, Yellow и Red – 15 и 20.

При использовании амплификатора RotorGene Q показатели для учета результатов составили: устранение выбросов – 5 %; Threshold/Порог по всем каналам – 0,05; коррекция уклона – используется. Для прибора CFX96 определение пороговой линии осуществляется в автоматическом режиме. Граничное значение Ct при использовании обоих видов термоциклеров составило 26.

Проведение реакции в мультилокусном формате в соответствии с подобранными условиями в полной мере обеспечивало внутривидовую дифференциацию взятых для исследования референсных для каждого подвида штаммов туляремии микроба: subsp. *tularensis* AI – *FTT1122c*+, *FTT1670*+, *FTT1067*-, *FTW_2084*-; subsp. *tularensis* AII – *FTT1122c*+, *FTT1670*+, *FTT1067*-, *FTW_2084*±; subsp. *mediasiatica* – *FTT1122c*+, *FTT1670*+, *FTT1067*+, *FTW_2084*-; subsp. *holarctica* биовары Ery^{SR} – *FTT1122c*+, *FTT1670*-, *FTT1067*-, *FTW_2084*-; subsp. *holarctica* биовар *japonica* – *FTT1122c*+, *FTT1670*-, *FTT1067*+, *FTW_2084*-; subsp. *novicida* – *FTT1122c*-, *FTT1670*+, *FTT1067*±, *FTW_2084*±.

Таким образом, нами была разработана мультилокусная ПЦР «*F. tularensis* 4с», позволяющая на основании амплификации четырех локусов *FTT1670*, *FTT1122c*, *FTT1067*, *FTW_2084* с учетом результатов

в режиме реального времени определять все подвиды туляремии микроба, биовар *japonica* голарктического подвида, субпопуляции AI, AII подвида *tularensis*.

Чувствительность и специфичность разработанной мультилокусной ПЦР «*F. tularensis* 4с». Для определения чувствительности и специфичности предложенного подхода исследовали 48 штаммов возбудителя туляремии различных подвидов, биоваров и субпопуляций. Для штаммов предварительно была определена подвидовая принадлежность на основании анализа вариабельности RD-1 области методом ПЦР с электрофоретической детекцией и гена *sdhA* методом фрагментного секвенирования по Сэнгеру. Первый методический подход рекомендован ВОЗ для внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя туляремии [5]. Во втором случае использовали прием, апробированный нами ранее [20] при подборе референсных штаммов, который основан на выявлении полиморфных нуклеотидов в гене *sdhA*, кодирующем синтез сукцинатдегидрогеназы и имеющем отличия у представителей рода *Francisella* [21, 22].

При использовании разработанной мультилокусной ПЦР «*F. tularensis* 4с» и референсных подходов для исследования указанных штаммов, вне зависимости от сроков и места выделения, во всех случаях отмечено совпадение результатов определения принадлежности к подвидам, биовару *japonica* голарктического подвида и субпопуляциям AI, AII подвида *tularensis* (табл. 2). Полученные результаты указывают на высокую специфичность предложенной мультилокусной ПЦР.

Таблица 2 / Table 2

 Результаты определения специфичности разработанной мультилокусной ПЦР «*F. tularensis* 4с»

 Results of determination of the specificity of the developed multilocus PCR “*F. tularensis* 4c”

| Подвиды <i>F. tularensis</i> , n – количество штаммов Subspecies of <i>F. tularensis</i> , n – number of strains | Наименование штаммов Strain | Определение подвидовой принадлежности с использованием подходов Determination of subspecies using approaches | | | Результаты идентификации Results of identification |
|---|---|---|---|---|--|
| | | Анализ RD-1 (ВОЗ) RD-1 analysis (WHO) | Мультилокусная ПЦР Multilocus PCR “ <i>F. tularensis</i> -4c” | Анализ гена <i>sdhA</i> Analysis of <i>sdhA</i> gene | |
| subsp. <i>tularensis</i> AI n=3 | KM-7 (O-328) Nevada № 14 O-402 | <i>tularensis</i> | <i>tularensis</i> AI | <i>tularensis</i> AI | <i>tularensis</i> AI |
| subsp. <i>tularensis</i> AI n=4 | KM-6 (E-261), O/284, B-399 A.Coli, O-419 | <i>tularensis</i> | <i>tularensis</i> AII | <i>holarctica</i> Ery ^{S/R} | <i>tularensis</i> AII |
| subsp. <i>mediasiatica</i> n=3 | KM-4 (A-61(117)), A-142(112), A-148(120) | <i>mediasiatica</i> | <i>mediasiatica</i> | <i>mediasiatica</i> | <i>mediasiatica</i> |
| subsp. <i>holarctica</i> biovar Ery ^R n=19 | KM-8 (M-498), 9, 84, 7, 359, 480, 219 “hare”, M-69, M-101, M-104, M-157, A-108, A-259, A-264, C-226, C-304, C-103, C-104, C-107 | <i>holarctica</i> Ery ^{S/R} | <i>holarctica</i> Ery ^{S/R} | <i>holarctica</i> Ery ^{S/R} | <i>holarctica</i> Ery ^{S/R} |
| subsp. <i>holarctica</i> biovar Ery ^S n=13 | KM-3 (21-JI), 6984, 7000, K-910, B 25/12, B-300, M-184, M-80, M-81, И-328, И-346, И-337, И-339 | <i>holarctica</i> Ery ^{S/R} | <i>holarctica</i> Ery ^{S/R} | <i>holarctica</i> Ery ^{S/R} | <i>holarctica</i> Ery ^{S/R} |
| subsp. <i>holarctica</i> biovar japonica n=4 | KM-5 (Kosho) Ichijo Miura Yasoe | <i>holarctica</i> japonica | <i>holarctica</i> japonica | <i>holarctica</i> japonica | <i>holarctica</i> japonica |
| subsp. <i>novicida</i> n=2 | U-112 Like F6168 | н/и n/i | <i>novicida</i> | <i>novicida</i> | <i>novicida</i> |

Примечание: н/и – не идентифицируется.

Note: n/i – not identified.

Чувствительность разработанной системы «*F. tularensis* 4с» составила $1 \cdot 10^5$ м.к./мл. При такой концентрации во всех случаях вне зависимости от внутривидовой принадлежности патогена наблюдалось образование флуоресцентных сигналов по соответствующим каналам. Продолжительность исследования составила 2,5–3,0 ч в зависимости от количества проб.

Таким образом, на основании проведенного анализа получены новые данные о структуре и встречаемости областей дифференциации RD-8, RD-12, RD-28, гена *FTT122c* и гомологичных ему последовательностей у штаммов туляремии микроба различных подвидов, биоваров и субпопуляций. Выявлена новая RD_{hm} размером 346 п.н., характерная для штаммов патогена subsp. *mediasiatica*, *holarctica*, которая делетирована у subsp. *tularensis* и отсутствует у subsp. *novicida*. Полученные результаты позволили подобрать локусы, перспективные для использования при внутривидовой дифференциации возбудителя туляремии методом ПЦР: *FTT1670*, *FTT122c*, *FTT1067*, *FTW_2084*, – и разработать на их основе мультилокусную ПЦР «*F. tularensis* 4с», обеспечи-

вающую определение всех подвидов туляремии микроба: *tularensis*, *mediasiatica*, *holarctica*, *novicida*, отдельно биовара japonica голарктического подвида и субпопуляции AI, AII подвида *tularensis*. При исследовании штаммов туляремии микроба различного происхождения из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» подтверждена высокая специфичность предложенной мультилокусной ПЦР.

Выявленные различия в структуре области дифференциации RD-12 в гене *chiA*, кодирующем синтез хитиназы, определяются наличием разного количества VNTR-повторов размером 15 п.н. Включение таких повторов в последовательность может быть обусловлено необходимостью персистенции возбудителя в объектах окружающей среды, поскольку наибольшее количество VNTR15 выявлено у штаммов *F. tularensis* subsp. *novicida*, циркулирующих в природных биотопах. Возможно, такая структура гена *chiA* играет важную роль в преодолении защитных систем человека другими франциселлами – *F. hispaniensis* и *F. opportunistica*, которые со-

держат в этом гене аналогичные полные и неполные VNTR15.

Предполагаемое делитирование у *F. tularensis* subsp. *tularensis* области дифференциации RD_{hm} привело к образованию локуса *FTT1122*, отвечающего за синтез липопротеина, тогда как у штаммов патогена subsp. *mediasiatica*, *holarctica* гомологичная область, содержащая RD_{hm}, представлена двумя генами, продукты которых имеют совершенно другие свойства. Такие генетические перестройки могут быть связаны с персистенцией подвидов туляремии микроба на различных территориях, носителях и переносчиках.

Проведенные исследования расширяют и дополняют сведения о внутривидовой генетической неоднородности туляремии микроба, что имеет большое значение в понимании процессов приспособления возбудителя к циркуляции в макроорганизме и объектах окружающей среды, направлений эволюции и образования новых видов франциселл.

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

Список литературы

1. List of Procariotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bacterio.net/francisella.html> (дата обращения 15.01.2023).
2. Molins-Schneekloth C.R., Belisle J.T., Petersen J.M. Genomic markers for differentiation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* AI and AII strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(1):336–41. DOI: 10.1128/AEM.01522-07.
3. Gunnell M.K., Lovelace C.D., Satterfield B.A., Moore E.A., O'Neill K.L., Robison R.A. A multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of *Francisella tularensis* subspecies. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61(Pt. 1):1525–31. DOI: 10.1099/jmm.0.046631-0.
4. Tomaso H., Scholz H.C., Neubauer H., Al Dahouk S., Seibold E., Landt O., Forsman M., Spletstoeser W.D. Real-time PCR using hybridization probes for the rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol. Cell. Probes.* 2007; 21(1):12–6. DOI: 10.1016/j.mcp.2006.06.001.
5. WHO. Guidelines on Tularemia. WHO Press; 2007. 115 p.
6. Woubit A., Yehualaeshet T., Habtemariam T., Samuel T. Novel genomic tools for specific and real-time detection of biothreat and frequently encountered food-borne pathogens. *J. Food Prot.* 2012; 75(4):660–70. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-480.
7. Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A., Byström M., Eriksson U., Larsson E., Prior R.G., Sjöstedt A., Titball R.W., Forsman M. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(7):2924–31. DOI: 10.1128/JCM.41.7.2924-2931.2003.
8. Осина Н.А., Мошкова М.С., Уткин Д.В., Ляшова О.Ю., Куличенко А.Н. Идентификация подвидов туляремии микроба методом мультиплексной полимеразной цепной реакции. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2007; 1:92–3.
9. Вахрамеева Г.М., Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Миронова Р.И., Дятлов И.А. ПЦР-дифференциация подвидов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2011; 1:46–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-46-48.
10. Larson M.A., Sayood K., Bartling A.M., Meyer J.R., Starr C., Baldwin J., Dempsey M.P. Differentiation of *Francisella tularensis* subspecies and subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 2020. 58(4):e01495-19. DOI: 10.1128/JCM.01495-19.
11. Birdsell D.N., Vogler A.J., Buchhagen J., Clare A., Kaufman E., Naumann A., Driebe E., Wagner D.M., Keim P.S. TagMan real-time PCR assays for single-nucleotide polymorphisms which identify *Francisella tularensis* and its subspecies and subpopulations. *PLoS One.* 2014; 9(9):e107964. DOI: 10.1371/journal.pone.0107964.
12. Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Дифференциация подвидов *Francisella tularensis* методом INDEL-типирования. *Журнал микробиологии, эпидемио-*

логии и иммунологии. 2022; 99(2):193–202. DOI: 10.36233/0372-9311-189.

13. Champion M.D., Zeng Q., Nix E.B., Nano F.E., Keim P., Kodira C.D., Borowsky M., Young S., Koehrsen M., Engels R., Pearson M., Howarth C., Larson L., White J., Alvarado L., Forsman M., Bearden S.W., Sjöstedt A., Titball R., Michell S.L., Birren B., Galagan J. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5):e1000459. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000459.
14. Rohmer L., Fong C., Abmayr S., Wasnick M., Larson Freeman T.J., Radey M., Guina T., Svensson K., Hayden H.S., Jacobs M., Gallagher L.A., Manoil C., Ernst R.K., Drees B., Buckley D., Haugen E., Bovee D., Zhou Y., Chang J., Levy R., Lim R., Gillett W., Guentherer D., Kang A., Shaffer S.A., Taylor G., Chen J., Gallis B., D'Argenio D.A., Forsman M., Olson M.V., Goodlett D.R., Kaul R., Miller S.I., Brittner M.J. Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. *Genome Biol.* 2007; 8(6):R102. DOI: 10.1186/gb-2007-8-6-r102.
15. LeButt H. The Construction and Use of a *Francisella tularensis* DNA Microarray. PhD thesis The Open University. 2008. DOI: 10.21954/ou.ro.0000f2d6f.
16. Sarva S.T., Waldo R.H., Belland R.J., Klose K.E. Comparative transcriptional analyses of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *PLoS One.* 2016; 11(8):e0158631. DOI: 10.1371/journal.pone.0158631.
17. Samrakandi M.M., Zhang C., Zhang M., Niefeldt J., Kim J., Iwen P.C., Olson M.E., Fey P.D., Duhamel G.E., Hinrichs S.H., Cirillo J.D., Benson A.K. Genome diversity among regional populations of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* isolated from the US. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 237(1):9–17. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.008.
18. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Byström M., Fox J., Chu M., 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(17):5808–18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808–5818.2004.
19. Chandler J.C., Molins C.R., Petersen J.M., Belisle J.T. Differential chitinase activity and production within *Francisella* species, subspecies, and subpopulations. *J. Bacteriol.* 2011; 193(13):3265–75. DOI: 10.1128/JB.00093-11.
20. Осина Н.А., Уткин Д.В., Сеничкина А.М., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Набор штаммов бактерий вида *Francisella tularensis* для получения комплекта контрольных ДНК препаратов, комплект ДНК препаратов для генно-диагностических исследований. Патент РФ № 2443772, опубл. 27.02.2012. Бюл. № 6.
21. Barns S.M., Grow C.C., Okinaka R.T., Keim P., Kuske C.R. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71(9):5494–500. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5494-5500.2005.
22. Berrada Z.L., Telford S.R. Diversity of *Francisella* species in environmental samples from Martha's Vineyard, Massachusetts. *Microb. Ecol.* 2010; 59(2):277–83. DOI: 10.1007/s00248-009-9568-y.

References

1. List of Procariotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). (Cited 15 Jan 2023). [Internet]. Available from: <http://www.bacterio.net/francisella.html>
2. Molins-Schneekloth C.R., Belisle J.T., Petersen J.M. Genomic markers for differentiation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* AI and AII strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(1):336–41. DOI: 10.1128/AEM.01522-07.
3. Gunnell M.K., Lovelace C.D., Satterfield B.A., Moore E.A., O'Neill K.L., Robison R.A. A multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of *Francisella tularensis* subspecies. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61(Pt. 1):1525–31. DOI: 10.1099/jmm.0.046631-0.
4. Tomaso H., Scholz H.C., Neubauer H., Al Dahouk S., Seibold E., Landt O., Forsman M., Spletstoeser W.D. Real-time PCR using hybridization probes for the rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol. Cell. Probes.* 2007; 21(1):12–6. DOI: 10.1016/j.mcp.2006.06.001.
5. WHO. Guidelines on Tularemia. WHO Press; 2007. 115 p.
6. Woubit A., Yehualaeshet T., Habtemariam T., Samuel T. Novel genomic tools for specific and real-time detection of biothreat and frequently encountered food-borne pathogens. *J. Food Prot.* 2012; 75(4):660–70. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-480.
7. Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A., Byström M., Eriksson U., Larsson E., Prior R.G., Sjöstedt A., Titball R.W., Forsman M. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(7):2924–31. DOI: 10.1128/JCM.41.7.2924-2931.2003.

8. Osina N.A., Moshkova M.S., Utkin D.V., Lyashova O.Yu., Kulichenko A.N. [Identification of subspecies of the tularemia microbe by multiplex polymerase chain reaction]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2007; (1):92–3.
9. Vakhrameeva G.M., Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Mironova R.I., Dyatlov I.A. [PCR differentiation of *Francisella tularensis* subspecies using one primer]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2011; 1(107):46–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-46-48.
10. Larson M.A., Sayood K., Bartling A.M., Meyer J.R., Starr C., Baldwin J., Dempsey M.P. Differentiation of *Francisella tularensis* subspecies and subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 2020. 58(4):e01495-19. DOI: 10.1128/JCM.01495-19.
11. Birdsell D.N., Vogler A.J., Buchhagen J., Clare A., Kaufman E., Naumann A., Driebe E., Wagner D.M., Keim P.S. TaqMan real-time PCR assays for single-nucleotide polymorphisms which identify *Francisella tularensis* and its subspecies and subpopulations. *PLoS One.* 2014; 9(9):e107964. DOI: 10.1371/journal.pone.0107964.
12. Sorokin V.M., Vodop'yanov A.S., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. [Differentiation of *Francisella tularensis* subspecies using INDEL typing]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology]. 2022; 99(2):193–202. DOI: 10.36233/0372-9311-189.
13. Champion M.D., Zeng Q., Nix E.B., Nano F.E., Keim P., Kodira C.D., Borowsky M., Young S., Koehrsen M., Engels R., Pearson M., Howarth C., Larson L., White J., Alvarado L., Forsman M., Bearden S.W., Sjöstedt A., Titball R., Michell S.L., Birren B., Galagan J. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5):e1000459. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000459.
14. Rohmer L., Fong C., Abmayr S., Wasnick M., Larson Freeman T.J., Radey M., Guina T., Svensson K., Hayden H.S., Jacobs M., Gallagher L.A., Manoil C., Ernst R.K., Drees B., Buckley D., Haugen E., Bovee D., Zhou Y., Chang J., Levy R., Lim R., Gillett W., Guentherer D., Kang A., Shaffer S.A., Taylor G., Chen J., Gallis B., D'Argenio D.A., Forsman M., Olson M.V., Goodlett D.R., Kaul R., Miller S.I., Brittner M.J. Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. *Genome Biol.* 2007; 8(6):R102. DOI: 10.1186/gb-2007-8-6-r102.
15. LeButt H. The Construction and Use of a *Francisella tularensis* DNA Microarray. PhD thesis The Open University. 2008. DOI: 10.21954/ou.ro.0000fd6f.
16. Sarva S.T., Waldo R.H., Belland R.J., Klose K.E. Comparative transcriptional analyses of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *PLoS One.* 2016; 11(8):e0158631. DOI: 10.1371/journal.pone.0158631.
17. Samrakandi M.M., Zhang C., Zhang M., Nietfeldt J., Kim J., Iwen P.C., Olson M.E., Fey P.D., Duhamel G.E., Hinrichs S.H., Cirillo J.D., Benson A.K. Genome diversity among regional populations of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* isolated from the US. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 237(1):9–17. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.008.
18. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Byström M., Fox J., Chu M., 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(17):5808–18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808–5818.2004.
19. Chandler J.C., Molins C.R., Petersen J.M., Belisle J.T. Differential chitinase activity and production within *Francisella* species, subspecies, and subpopulations. *J. Bacteriol.* 2011; 193(13):3265–75. DOI: 10.1128/JB.00093-11.
20. Osina N.A., Utkin D.V., Senichkina A.M., Bugorkova T.V., Kuttyrev V.V. [A panel of bacterial strains of the species *Francisella tularensis* for obtaining a set of control DNA preparations, a set of DNA preparations for genetic diagnostic studies]. RF patent No. 2443772, publ. 02/27/2012. Bull. No. 6.
21. Barns S.M., Grow C.C., Okinaka R.T., Keim P., Kuske C.R. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71(9):5494–500. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5494-5500.2005.
22. Berrada Z.L., Telford S.R. Diversity of *Francisella* species in environmental samples from Martha's Vineyard, Massachusetts. *Microb. Ecol.* 2010; 59(2):277–83. DOI: 10.1007/s00248-009-9568-y.

Authors:

Osina N.A., Sitmbetov D.A., Bulgakova E.G., Chekmareva S.S., Sazanova E.V., Senichkina A.M., Lyashova O.Yu., Osina A.V., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Осина Н.А., Ситмбетов Д.А., Булгакова Е.Г., Чекмарева С.С., Сазанова Е.В., Сеничкина А.М., Ляшова О.Ю., Осина А.В., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.