

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-148-156

УДК 616.98:579.841.95

Н.А. Осина, Д.А. Ситмбетов, О.А. Морозов, Е.Г. Булгакова, А.В. Осин, С.С. Чекмарева, Е.В. Сазанова, А.М. Сеничкина, О.Ю. Ляшова, Т.А. Полунина, Я.М. Краснов, З.Л. Девдариани, С.А. Щербакова

Внутривидовая дифференциация штаммов *Francisella tularensis* с помощью молекулярно-генетических методов. Комплексный подход

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

Цель исследования – разработка алгоритма внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя туляремии с использованием комплекса подходов, основанных на амплификационных и секвенационных технологиях. **Материалы и методы.** В работе использовали 97 штаммов *Francisella tularensis* различных подвигов, биоваров и субпопуляций. Внутривидовую принадлежность штаммов возбудителя туляремии осуществляли с использованием системы «*F. tularensis*-4с», анализа варибельности области дифференциации RD1, гена *sdhA*, диско-диффузионным методом с использованием дисков с эритромицином. Фрагментное секвенирование по Сэнгеру осуществляли на генетическом анализаторе 3500 XL (Applied Biosystems, США) с учетом рекомендаций производителя. Оценку гомологии последовательностей – по алгоритму BLAST, используя базу данных GenBank NCBI, программы MEGA11 v11.0.13 и Unipro UGENE v50.0. **Результаты и обсуждение.** Выявлены подвидо- и биовароспецифичные мутации в гене 23S рРНК. Определены перспективные для изучения участки данного гена с помощью фрагментного секвенирования. Предложена комплексная схема внутривидовой дифференциации штаммов туляремийного микроба, где на первом этапе проводится определение подвиговой принадлежности и биовара японика, а на втором – верификация полученных результатов на основании определения мутаций в гене 23S рРНК. Эффективность предложенного комплексного подхода подтверждена при исследовании 97 коллекционных штаммов возбудителя туляремии. Проведенные исследования позволяют осуществить быструю идентификацию штаммов разных подвигов туляремийного микроба и верифицировать их таксономическую принадлежность с помощью молекулярно-генетических методов, дополняют данные о циркуляции различных подвигов, биоваров и субпопуляций патогена на территории Европы, Азии и других регионов мира.

Ключевые слова: внутривидовая дифференциация, *Francisella tularensis*, биовары, подвиды, алгоритм, комплексный подход, амплификационные и секвенационные технологии.

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

Для цитирования: Осина Н.А., Ситмбетов Д.А., Морозов О.А., Булгакова Е.Г., Осин А.В., Чекмарева С.С., Сазанова Е.В., Сеничкина А.М., Ляшова О.Ю., Полунина Т.А., Краснов Я.М., Девдариани З.Л., Щербакова С.А. Внутривидовая дифференциация штаммов *Francisella tularensis* с помощью молекулярно-генетических методов. Комплексный подход. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2024; 2:148–156. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-148-156

Поступила 02.04.2024. Отправлена на доработку 11.04.2024. Принята к публ. 06.06.2024.

N.A. Osina, D.A. Sitmbetov, O.A. Morozov, E.G. Bulgakova, A.V. Osin, S.S. Chekmareva, E.V. Sazanova, A.M. Senichkina, O.Yu. Lyashova, T.A. Polunina, Ya.M. Krasnov, Z.L. Devdariani, S.A. Shcherbakova

Intraspecific Differentiation of *Francisella tularensis* Strains Using Molecular-Genetic Methods. Complex Approach

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

Abstract. The aim of the study was to develop an algorithm for intraspecific differentiation of tularemia agent strains using a set of approaches based on amplification and sequencing technologies. **Materials and methods.** 97 strains of *Francisella tularensis* of various subspecies, biovars and subpopulations from the State Collection of Pathogenic Bacteria of the Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” were used in the work. The intraspecific identification of tularemia agent strains was carried out using the “*F. tularensis*-4c” system; analysis of the variability of the RD1 differentiation region, the *sdhA* gene, by applying the disk diffusion method using disks with erythromycin. Fragment Sanger sequencing was performed on a 3500 XL genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) taking into account the manufacturer’s recommendations. Sequence homology assessment was conducted using the BLAST algorithm, the GenBank NCBI database, MEGA11 v11.0.13 and Unipro UGENE v50.0 software. **Results and discussion.** Subspecies- and biovar-specific mutations have been detected in the 23S rRNA gene. Promising regions of this gene for further investigation have been identified using fragment sequencing. A comprehensive scheme for intraspecific differentiation of tularemia microbe strains has been put forward, where at the first stage the subspecies and biovar japonica are determined, and at the second stage, the results are verified based on the determination of mutations in the 23S rRNA gene. The effectiveness of the proposed integrated approach has been confirmed in a study of 97 collection strains of tularemia agent. The conducted research allows for rapid identification of tularemia agent strains of different subspecies and verification of their taxonomic appurtenance using molecular-genetic methods, expanding data on the circulation of various subspecies, biovars and subpopulations of the pathogen in Europe, Asia and other regions of the world.

Key words: intraspecific differentiation, *Francisella tularensis*, biovars, subspecies, algorithm, integrated approach, amplification and sequencing technologies.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

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

Citation: Osina N.A., Sitmbetov D.A., Morozov O.A., Bulgakova E.G., Osin A.V., Chekmareva S.S., Sazanova E.V., Senichkina A.M., Lyashova O.Yu., Polunina T.A., Krasnov Ya.M., Devdariani Z.L., Shcherbakova S.A. Intraspecific Differentiation of *Francisella tularensis* Strains Using Molecular-Genetic Methods. Complex Approach. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 2:148–156. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-148-156

Received 02.04.2024. Revised 11.04.2024. Accepted 06.06.2024.

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>
Osin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5308-0022>
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>
Polunina T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2234-2760>
Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>
Shcherbakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Идентификация штаммов туляремийного микроба предусматривает определение принадлежности к подвиду, биовару и субпопуляции патогена. Важность такой дифференциации связана с отличиями по вирулентности штаммов возбудителя туляремии, относящихся к различным внутривидовым таксонам [1]. В настоящее время выделяют четыре подвида *Francisella tularensis*: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*; при этом подвид *tularensis* имеет две субпопуляции – AI и AII, *holarctica* – три биовара: *japonica*, эритромицинустойчивый Ery^R, эритромицинчувствительный Ery^S [2, 3].

В последние годы для определения подвидовой принадлежности возбудителя туляремии широкое применение получили молекулярно-генетические методы. Среди них особое место занимает полимеразная цепная реакция (ПЦР). С использованием различных вариантов данного метода (ПЦР с гибридационно-флуоресцентной [ПЦР-РВ] или электрофоретической [ПЦР-ЭФ] детекцией, RAPD) предложены подходы для дифференциации как отдельных подвигов и биоваров патогена [3–5], так и практически всех внутривидовых таксонов [6–11]. Однако все разработанные способы не позволяют определять принадлежность штаммов голарктического подвида к биоварам Ery^R и Ery^S. Ряд авторов показали возможность дифференциации этих биоваров на основании выявления единичной мутации в гене 23S рРНК: A2059C (нумерация нуклеотидов по последовательности *Escherichia coli*) [12–14].

Возможность образования мутаций в геноме туляремийного микроба определяет необходимость использования для внутривидовой дифференциации нескольких подходов на основе молекулярно-генетических технологий, которые направлены на выявление различных ДНК-мишеней: отдельных генов, участков, содержащих INDEL-маркеры или полиморфные нуклеотиды (SNP). В связи с этим представляется перспективным создание комплексной системы определения внутривидовой принадлежности штаммов туляремийного микроба, которая позволила бы, с одной стороны, выявить все подвиды, биовары и субпопуляции патогена, а с другой – верифицировать результаты исследования.

Целью работы является разработка алгоритма внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя туляремии с использованием комплекса подходов, основанных на амплификационных и секвенционных технологиях.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 97 штаммов туляремийного микроба из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, из них подвида *tularensis* AI – 2, *tularensis* AII – 4, *mediasiatica* – 3, *holarctica* bv. Ery^R – 53, *holarctica* bv. Ery^S – 29, *holarctica* bv. *japonica* – 4, *novicida* – 2. Штаммы культивировали на FT-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ) в течение 36–48 ч при температуре (37±1) °С. Из выросших культур готовили суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по фармакопейному Стандартному образцу мутности бактериальных взвесей 10 МЕ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, что соответствовало 5·10⁹ м.к./мл. Обеззараживание проб осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Выделение ДНК проводили с помощью набора реагентов «ДНК-сорб-В» в соответствии с инструкцией производителя.

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

Для проведения реакции амплификации применяли 10хПЦР-Буфер-Б, 25 мМоль MgCl₂, 25 мМоль смеси дНТФ, фермент *SynTaq* ДНК-полимеразу с активностью 5 ед/мкл с ингибирующими активностью фермента антителами (ООО «Синтол», Россия).

Амплификацию осуществляли в реакционной смеси, содержащей 10 пМоль соответствующих праймеров, 0,2 мМоль дНФ, 2,5 ед. фермента, по следующей программе: 95 °С – 5 мин; 40 циклов 95 °С – 20 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин; 72 °С – 5 мин.

Постановку ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли на приборе типа CFX96 (Bio-Rad, США), а с электрофоретической детекцией – на амплификаторе Mastercycler nexus (Eppendorf, Германия), визуализируя ампликоны в 2 % агарозном геле.

Определение подвидовой принадлежности с использованием разработанной нами системы «*F. tularensis*-4с» осуществляли в соответствии с описанными ранее условиями [7], на основании анализа вариабельности области дифференциации RD1 – методом ПЦР с электрофоретической детекцией, как указано в рекомендациях ВОЗ [5], и на основании выявления полиморфных нуклеотидов в гене *sdhA* – в соответствии с представленными данными [7].

Фрагментное секвенирование по Сэнгеру осуществляли на генетическом анализаторе 3500 XL (Applied Biosystems, США) с учетом рекомендаций производителя. Для оценки гомологии последовательностей использовали алгоритм BLAST и базу данных GenBank NCBI, программу MEGA11 v11.0.13 [16], дизайн праймеров и ПЦР *in silico* Unipro UGENE v50.0 [17].

Результаты и обсуждение

Оценка возможности и эффективности внутривидовой дифференциации штаммов туляреминого микроба на основании изучения варибельности гена 23S рРНК. Ранее Н. Rossow *et al.* [18] показали эффективность применения гена 23S рРНК в качестве ДНК-мишени для выявления и идентификации штаммов туляреминого микроба, используя секвенирование фрагмента данного гена размером 834 п.н. Авторы определили принадлежность выявленного в пробе патогена к *F. tularensis holarctica*. В работе Е. Karlsson *et al.* [14] показаны единичные мутации, специфичные для голарктического подвида возбудителя туляремии: G160A, C1151T, T1340C, T2123C, C2716T; а также для его биоваров Ery^{SR}: C588T, C1397T, C1526T, G2444A, C2519T, T2673T. Несмотря на проанализированное авторами ограниченное количество штаммов и не всех подвидов, было заявлено о возможности дифференциации подвида *holarctica* туляреминого микроба и его биоваров на основании определения единичных мутаций в гене 23S рРНК.

Ввиду небольшого количества представленных на тот момент в GenBank полногеномных последовательностей *F. tularensis* в упомянутых работах сравнение нуклеотидных последовательностей гена 23S рРНК проводилось с аналогичным геном *E. coli*. Но гены 23S рРНК туляреминого микроба и кишечной палочки имеют значительные различия. Поэтому мы использовали в качестве референтного штамма *F. tularensis tularensis* AI SchuS4 (GenBank № AJ749949.2), а не *E. coli*. Сравнительный анализ последовательностей генов 23S рРНК референтных штаммов всех подвидов и биоваров возбудителя туляремии, представленных в базе данных GenBank: *F. tularensis tularensis* AI SchuS4 (GenBank № AJ749949.2) – референс, *F. tularensis tularensis* AII WY96-3418 (CP000608.1), *F. tularensis mediasiatica* FSC147 (CP000915.1), *F. tularensis holarctica* japonica KU-1 (AP023460.1), *F. tularensis holarctica* Ery^S OSU18 (CP000437.1), *F. tularensis holarctica* Ery^R FSC200 (CP003862.1), *F. tularensis novicida* U-112 (табл. 1), – подтверждает биспецифичность мутаций C588T, C1397T, C1526T, G2444A, C2519T, T2673T для биоваров Ery^{SR} *F. tularensis holarctica*, заявленную в работе Е. Karlsson *et al.* [14].

В то же время специфичные (по данным авторов) для голарктического подвида SNP: G160A, T1340C – оказались характерны также для *F. tula-*

rensis novicida. Помимо этого, нами выявлены три мутации, встречающиеся только у *F. tularensis mediasiatica* (A1375G, G2049A, A2707G), восемь – у *F. tularensis novicida* (G133A, C137T, G143A, T159C, C342G, G1303T, A1477G, T2402C). Установлено, что штаммы *F. tularensis tularensis* AII имеют замену в позиции 2155 (G→A), а для штаммов *F. tularensis tularensis* AI специфично наличие нуклеотида A905, который у всех других подвидов и биоваров заменен на нуклеотид G. Еще одной интересной и важной находкой оказались две нуклеотидные замены, позволяющие различать эритромицинчувствительный и эритромицинрезистентный биовары голарктического подвида – A2052C и A449G. Полученные данные позволили предложить в качестве ДНК-мишени для внутривидовой дифференциации туляреминого микроба определенные фрагменты гена 23S рРНК и таксонспецифичные полиморфные нуклеотиды, которые необходимо использовать для проведения анализа.

Работа по подтверждению специфичности и стабильности выявленных *in silico* мутаций гена 23S рРНК проведена на 48 штаммах туляреминого микроба, для которых ранее другими методами нами была определена подвидовая, биоварная и субпопуляционная принадлежность [7]. Для исследования подобраны две пары праймеров, обеспечивающие амплификацию фрагментов гена с 200 по 698 н. (23S FT-200 5'-ATTGAGATTCCCGTAGTAGTG-3'; 23S FT-698 5'-GTACTACCTAATCTTCAACCTG-3') и с 1700 по 2295 н. (23S FT-1700 5'-GTAACCTTTGGAAGAAGGTGTG-3'; 23S FT-2295 5'-ACCTTCGTACTCCTCCGTTAC-3').

Показано, что все исследованные штаммы туляреминого микроба подвидов *tularensis*, *mediasiatica*, *holarctica* с учетом биоварной и субпопуляционной принадлежности несут в изученных фрагментах гена 23S рРНК мутации, характерные для каждого таксона, выявленные нами для референтных штаммов *in silico* (табл. 2).

Однако при изучении фрагмента гена 200–698 н. у штамма *F. tularensis novicida* Like F6168 не обнаружена замена C342G, которая выявлена у штамма данного подвида U-112. В связи с этим нами изучен данный участок гена 23S рРНК у штаммов подвида *novicida*, представленных в базе данных GenBank NCBI. Результаты исследования в сравнении с данными варибельности данного гена у других подвидов представлены в табл. 1. Мутации G133A, C137T, G143A оказались специфичными только для штамма *F. tularensis novicida* U-112, мутации T159C, C342G, G1303T, A1477G в разной степени встречаются у культур данного подвида и только полиморфизм T2402C был характерен для всех выбранных для анализа штаммов *F. tularensis novicida*. Среди выявленных в этой области мутаций подвидовую специфичность для *F. tularensis novicida* определяла только мутация T2402C. Поэтому для идентификации этого подвида предложен дополнительный уча-

Таблица 1 / Table 1

Результаты сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 23S рРНК у штаммов туляремийного микроба различных подвидов и биоваров
Results of a comparative analysis of the nucleotide sequence of the 23S rRNA gene in tularemia microbe strains of various subspecies and biovars

Подвиды и биовары <i>F. tularensis</i> Subspecies and biovars of <i>F. tularensis</i>	Позиции единичных мутаций в гене 23S рДНК (начиная от старт-кодона) Positions of single mutations in the 23S rDNA gene (beginning from the start codon)																										
	905	2155	1375	2049	2707	1151	2123	2716	588	1397	1526	2444	2519	2673	449	2052	160	1340	133	137	143	159	342	1303	1477	2402	
Референс / Reference	A	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	G	T	G	C	G	T	C	G	A	T	
FTT AI	A	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	G	T	G	C	G	T	C	G	A	T	
FTT AII	G	A	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	G	T	G	C	G	T	C	G	A	T	
FTM	G	G	G	A	G	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	G	T	G	C	G	T	C	G	A	T	
FTH japonica	G	G	A	G	A	T	C	T	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	G	C	G	T	C	G	A	T	
FTH EryS	G	G	A	G	A	T	C	T	T	T	A	T	C	T	A	A	A	C	G	C	G	T	C	G	A	T	
FTH EryR	G	G	A	G	A	T	C	T	T	T	A	T	C	T	G	C	A	C	G	C	G	T	C	G	A	T	
FTN	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	A	T	A	C	G	T	G	C	
Вариабельность в гене 23S рДНК у штаммов <i>F. tularensis novicida</i> Variability in the 23S rDNA gene in <i>F. tularensis novicida</i> strains																											
FTN U-112 (M-130)	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	A	T	A	C	G	T	G	C	
FTN AZ06-7470	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	G	C	G	C	C	T	G	C	
FTN F6168 (M-131)	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	G	C	G	C	C	G	G	C	
FTN AI.97-2214	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	G	C	G	C	C	G	G	C	
FTN Fx1	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	G	C	G	C	G	G	A	C	
FTN D9876	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	G	C	G	T	C	G	G	C	
FTN PA10-7858	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	G	C	G	C	C	G	G	C	
FTN DPG_3A-IS	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	G	C	G	C	C	G	G	C	
FTN TCH2015	G	G	A	G	A	C	T	C	C	C	C	G	C	T	A	A	A	C	G	C	G	C	C	G	A	C	

Примечания: FTT AI – *F. tularensis tularensis* AI, FTT AII – *F. tularensis tularensis* AII, FTM – *F. tularensis mediasiatica*, FTN japonica – *F. tularensis holartctica japonica*, FTH Ery^S – *F. tularensis holartctica* Ery^S, FTH Ery^R – *F. tularensis holartctica* Ery^R, FTN – *F. tularensis novicida*; серым цветом отмечены полиморфные нуклеотиды, характерные для определенных подвидов, биоваров и субпопуляций туляремийного микроба; референтный штамм *F. tularensis tularensis* AI SchuS4 (GenBank № AJ1749949.2).

Notes: FTT AI – *F. tularensis tularensis* AI, FTT AII – *F. tularensis tularensis* AII, FTM – *F. tularensis mediasiatica*, FTN japonica – *F. tularensis holartctica japonica*, FTH Ery^S – *F. tularensis holartctica* Ery^S, FTH Ery^R – *F. tularensis holartctica* Ery^R, FTN – *F. tularensis novicida*; gray color indicates polymorphic nucleotides characteristic of certain subspecies, biovars and subpopulations of tularemia microbe; reference strain – *F. tularensis tularensis* AI SchuS4 (GenBank No. AJ1749949.2).

Таблица 2 / Table 2

Результаты определения специфичности мутаций во фрагментах гена 23S рРНК
Results of determining the specificity of mutations in fragments of the 23S rRNA gene

Подвид, биовар, субпопуляция Subspecies, biovar, subpopulation	Штамм Strain	Нуклеотидные замены в гене 23S рРНК Nucleotide substitutions in the 23S rRNA gene						
		200–698 н. (н.)			1700–2295 н. (н.)			
		342	449	588	2049	2052	2123	2155
FTT AI	SchuS4 (Reference)	C	A	C	G	A	T	G
FTT AI	O-328, O-402	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
FTT AII	E-261, O/284, A-Cole B-399, O-419	▪	▪	▪	▪	▪	▪	A
FTM	A-61(117), A-142(112), A-148(120)	▪	▪	▪	A	▪	▪	▪
FTH Ery ^R	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	▪	G	T	▪	C	C	▪
FTH Ery ^S	21-L, M-184, M-80, M-81, I-346, I-337, I-339, 6984, 7000, K-910, B 25/12, B-300, I-328	▪	▪	T	▪	▪	C	▪
FTH japonica	Kosho, Ichijo, Miura, Yasoe	▪	▪	▪	▪	▪	C	▪
FTN	U-112	G*	▪	▪	▪	▪	▪	▪
	Like F8186	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪

Примечания: FTT AI – *F. tularensis tularensis* AI, FTT AII – *F. tularensis tularensis* AII, FTM – *F. tularensis mediasiatica*, FTH Ery^R – *F. tularensis holarctica* Ery^R, FTH Ery^S – *F. tularensis holarctica* Ery^S, FTH japonica – *F. tularensis holarctica* japonica, FTN – *F. tularensis novicida*; зеленым цветом обозначены мутации, которые выявляются при секвенировании фрагмента гена 23S рРНК – 200–698 н., сиреневым – 1700–2295 н.;

- идентичный нуклеотид;
- * неспецифичная замена для FTN.

Notes: FTT AI – *F. tularensis tularensis* AI, FTT AII – *F. tularensis tularensis* AII, FTM – *F. tularensis mediasiatica*, FTH Ery^R – *F. tularensis holarctica* Ery^R, FTH Ery^S – *F. tularensis holarctica* Ery^S, FTH japonica – *F. tularensis holarctica* japonica, FTN – *F. tularensis novicida*; green color indicates mutations that are detected by sequencing a fragment of the 23S rRNA gene – 200–698 n., lilac color – 1700–2295 n.;

- identical nucleotide;
- * non-specific substitution for FTN.

сток гена 23S рРНК, ограниченный праймерами 23S FT-2200 5’-GAGATTCGAGGACAGTGTATG-3’, 23S FT-2599 5’-AGGGACCGAACTGTCTCAC-3’, обеспечивающими амплификацию фрагмента с 2200 по 2599 н. размером 400 п.н.

Разработка комплексной схемы внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя туляремии с помощью амплификационных и секвенационных технологий и ее апробация при исследовании коллекционных штаммов. При идентификации патогенных бактерий с помощью молекулярно-генетических методов важное значение имеет верификация полученных результатов. Одним из перспективных подходов в этом направлении является секвенирование ДНК-мишеней, позволяющих установить точную таксономическую принадлежность изучаемых штаммов. Основываясь на данном принципе нами предложена комплексная схема внутривидовой дифференциации штаммов туляремии микроба, которая включает в себя два этапа исследования, первый из которых довольно быстр в исполнении, но имеет свои ограничения, а второй, при значительно большей продолжительности, позволяет достоверно определять таксономическую принадлежность франциселл.

На первом этапе проводится определение принадлежности исследуемого штамма *F. tularensis* к подвидам с использованием ПЦР-системы «*F. tularensis*-4с». На втором этапе проводится верификация

результатов первого этапа методом секвенирования выявленных переменных фрагментов гена 23S рРНК: 200–698 н. и 1700–2295 н. – при исследовании Ery^R и Ery^S подвидов *tularensis*, *mediasiatica*, *holarctica*; 2200–2599 н. – *F. tularensis novicida* на основании выявления подвидо- и биовароспецифичных мутаций, также осуществляется дифференциация биоваров Ery^R и Ery^S голарктического подвида.

Для апробации предложенной схемы внутривидовой дифференциации туляремии микроба проведено изучение 97 штаммов патогена из разных географических регионов (табл. 3).

Применение комплексного подхода позволило на первом этапе быстро определить принадлежность исследуемых штаммов к подвидам, дифференцировать биовар japonica голарктического подвида (время проведения исследования – до 3 ч в зависимости от количества исследуемых образцов), а на втором – подтвердить результаты первичного анализа по определению внутривидовых таксонов и дифференцировать биовары Ery^R и Ery^S (занимает около 30 ч). Таким образом, в течение 30 ч осуществлена идентификация коллекционных штаммов туляремии микроба с верификацией внутривидовой принадлежности: подвид, биовар, субпопуляция.

Результаты исследования позволяют точно определять таксономию (подвид, биовар) штаммов *F. tularensis*. Предложенный системный подход не противоречит данным, полученным при использовании

Таблица 3 / Table 3

Результаты исследования коллекционных штаммов возбудителя туляремии с использованием разработанной комплексной схемы внутривидовой дифференциации туляремийного микроба
Results of the study of collection strains of tularemia agent using the developed complex scheme for intraspecific differentiation of tularemia microbe

Место выделения Site of isolation	Количество штаммов Number of strains	I этап / I step		II этап / II step							Таксон Taxon
		ПЦР система «F. tularensis-4c» PCR system "F. tularensis-4c"	588	Нуклеотидные замены в гене 23S рРНК Nucleotide substitutions in the 23S rRNA gene							
				200–698 н. (н.) 449	2049	2052	2123	2155	2200–2599 н. (н.) 2402		
США (USA)	SchuS4 (reference)	FTT AI	C	A	G	A	T	G	T		FTT AI
Канада / Canada, США / USA	2	FTT AI	•	•	•	•	•	•	•	•	FTT AI
США / USA	4	FTT AII	•	•	•	•	•	A	•	•	FTT AII
Казахстан / Kazakhstan	3	FTM	•	•	A	•	•	•	•	•	FTM
США / USA	2	FTN	•	•	•	•	•	•	•	C	FTN
Япония / Japan	4	FTH japonica	•	•	•	•	•	•	C	•	FTH japonica
Россия, ЦФО / Russia, Central FD	4	FTH Ery ^{SIR}	G	T	•	C	C	•	•	•	FTH Ery ^R
	1	FTH Ery ^{SIR}	•	T	•	•	C	•	•	•	FTH Ery ^S
Россия, ПФО / Russia, Volga FD	3	FTH Ery ^{SIR}	G	T	•	C	C	•	•	•	FTH Ery ^R
	7	FTH Ery ^{SIR}	•	T	•	•	C	•	•	•	FTH Ery ^S
Россия, СКФО / Russia, North Caucasian FD	13	FTH Ery ^{SIR}	G	T	•	C	C	•	•	•	FTH Ery ^R
Россия, ЮФО / Russia, Southern FD	15	FTH Ery ^{SIR}	G	T	•	C	C	•	•	•	FTH Ery ^R
	2	FTH Ery ^{SIR}	•	T	•	•	C	•	•	•	FTH Ery ^S
Россия УрФО / Russia, Ural FD	2	FTH Ery ^{SIR}	G	T	•	C	C	•	•	•	FTH Ery ^R
Россия, СФО / Russia, Siberian FD	1	FTH Ery ^{SIR}	G	T	•	C	C	•	•	•	FTH Ery ^R
	1	FTH Ery ^{SIR}	•	T	•	•	C	•	•	•	FTH Ery ^S
Россия, ДВФО / Russia, Far Eastern FD	4	FTH Ery ^{SIR}	•	T	•	•	C	•	•	•	FTH Ery ^S
	3	FTH Ery ^{SIR}	•	T	•	•	C	•	•	•	FTH Ery ^S
Казахстан / Kazakhstan	11	FTH Ery ^{SIR}	G	T	•	C	C	•	•	•	FTH Ery ^R
	4	FTH Ery ^{SIR}	•	T	•	•	C	•	•	•	FTH Ery ^S
Таджикистан / Tajikistan	2	FTH Ery ^{SIR}	G	T	•	C	C	•	•	•	FTH Ery ^R
Монголия / Mongolia	1	FTH Ery ^{SIR}	•	T	•	•	C	•	•	•	FTH Ery ^S
США / USA	6	FTH Ery ^{SIR}	•	T	•	•	C	•	•	•	FTH Ery ^S

Примечания: FTT AI – F. tularensis tularensis AI, FTT AII – F. tularensis tularensis AII, FTM – F. tularensis mediasiatica, FTN – F. tularensis novitida, FTH japonica – F. tularensis holartetica japonica, FTH Ery^S – F. tularensis holartetica Ery^S, FTH Ery^R – F. tularensis holartetica Ery^R; зеленым цветом обозначены мутации, которые выявляются при секвенировании фрагмента гена 23S рРНК 200–698 н., розовым – 1700–2295 н., розовым – 2200–2599 н.; • идентичный нуклеотид, * система «F. tularensis-4c» не дифференцирует Ery^R и Ery^S биовары FTH.

Notes: FTT AI – F. tularensis tularensis AI, FTT AII – F. tularensis tularensis AII, FTM – F. tularensis mediasiatica, FTN – F. tularensis novitida, FTH japonica – F. tularensis holartetica japonica, FTH Ery^S – F. tularensis holartetica Ery^S, FTH Ery^R – F. tularensis holartetica Ery^R; Green color indicates mutations that are detected by sequencing a fragment of the 23S rRNA gene 200–698 n., lilac color – 1700–2295 n., pink – 2200–2599 n.; • identical nucleotide; * "F. tularensis-4c" system does not differentiate Ery^R and Ery^S biovars FTH; FD – Federal District.

ранее описанных методов, проверенных на ограниченном количестве штаммов. Принадлежность подвида *F. tularensis holarctica* к биоварам Ery^R или Ery^S коррелирует с их чувствительностью к эритромицину, определенной диско-диффузионным методом. Представленные материалы подтвердили эффективность комплексной схемы для идентификации штаммов *F. tularensis*.

Исследование географической распространенности таксонов показало, что большинство исследованных штаммов туляремиального микроба голарктического подвида, выделенных на территории Центрального (ЦФО), Северо-Кавказского (СКФО) и Южного (ЮФО) федеральных округов, относились к эритромицинрезистентному биовару. Культуры, патогена, изолированные в Приволжском федеральном округе (ПФО) представлены обоими биоварами практически в равной доле. На территории Дальневосточного федерального округа (ДФО) выделяются только штаммы эритромицинчувствительного биовара.

Штаммы возбудителя туляремии, выделенные на территории Казахстана, в 11 случаях из 18 идентифицированы как *F. tularensis holarctica* Ery^R, четыре штамма – как *F. tularensis holarctica* Ery^S и три – как *F. tularensis mediasiatica*. Два штамма, выделенные на территории Таджикистана, отнесены к *F. tularensis holarctica* Ery^R. При исследовании культур, изолированных на территории США, установлено, что шесть штаммов голарктического подвида относятся к биовару Ery^S. Кроме того, среди штаммов, выделенных на территории США и Канады, выявлены штаммы *F. tularensis tularensis* субпопуляций AI (2) и AII (4), а также два штамма *F. tularensis novicida*. Для выяснения географической приуроченности отдельных таксонов *F. tularensis* необходимы более широкие исследования. Не вызывает сомнения, что в этом случае предложенная комплексная система может быть полезна.

В последние годы значительно расширились возможности внутривидовой дифференциации штаммов туляремиального микроба, в основном за счет использования молекулярно-генетических методов, позволяющих выявлять особенности организации генома у разных подвигов: наличие или отсутствие областей дифференциации RD или отдельных генов, INDEL-маркеров, полиморфных нуклеотидов, а также различия в расположении сайтов рестрикции [6–11]. Большинство предложенных подходов основаны на технологии ПЦР и с их применением невозможно определить все внутривидовые таксоны. Важным остается вопрос верификации полученных данных. Одним из перспективных направлений в решении данной задачи является использование комплекса методов, направленных на детекцию различных ДНК-мишеней с помощью амплификационных и секвенационных технологий.

H. Rossow *et al.* [18] продемонстрировали возможность использования гена 23S рРНК в качестве

ДНК-мишени для выявления и идентификации штаммов *F. tularensis holarctica*. Позднее E. Karlsson *et al.* [14] определили единичные мутации, специфичные для голарктического подвида возбудителя туляремии (G160A, C1151T, T1340C, T2123C, C2716T) и общие для биоваров Ery^{S/R} *F. tularensis holarctica* (C588T, C1397T, C1526T, G2444A, C2519T, T2673T) в этом гене.

На основе детального анализа нуклеотидных последовательностей гена 23S рРНК у разных подвигов и биоваров туляремиального микроба нами расширены представления о типизирующих возможностях этой мишени. Специфичность мутаций для отдельных подвигов, биоваров и субпопуляций показана как при исследовании нуклеотидных последовательностей патогена, представленных в базе данных GenBank NCBI, так и при анализе ранее охарактеризованных по внутривидовой принадлежности коллекционных штаммов туляремиального микроба. У всех штаммов *F. tularensis tularensis* AI, как и у референсного штамма этого таксона, определяется нуклеотид A905, в то время как у других подвигов и биоваров произошла замена этого нуклеотида на G; штаммы *F. tularensis tularensis* AII отличает замена G2155A; *F. tularensis mediasiatica* – A1375G, G2049A, A2707G; *F. tularensis holarctica* – C1151T, T1340C, T2123C, C2716T; *F. tularensis holarctica* биовары Ery^{S/R} – C588T, C1397T, C1526T, G2444A, C2519T, T2673T; *F. tularensis holarctica* биовар Ery^R – A2052C и A449G; *F. tularensis novicida* – T2402C. Также акцентировано внимание на ценности гена 23S рРНК в качестве ДНК-мишени при идентификации подвигов голарктика с дифференциацией его биоваров Ery^R и Ery^S.

В результате проведенной работы выбраны три фрагмента гена: 200–698, 1700–2295 и 2200–2599 н., – определение полиморфных нуклеотидов в которых позволяет дифференцировать все внутривидовые таксоны патогена. Мутации в первых двух указанных фрагментах позволяют дифференцировать штаммы *F. tularensis* подвигов *tularensis*, *mediasiatica*, *holarctica*; в третьем – *F. tularensis novicida*.

Разработанная комплексная схема внутривидовой дифференциации культур туляремиального микроба включает два этапа. На первом этапе – определение подвиговой принадлежности франциселл и биовара *japonica* *F. tularensis holarctica* исследуемого штамма возбудителя туляремии с использованием одного из предложенных подходов методом ПЦР, на втором – дифференциация всех биоваров голарктического подвида при выявлении подвиго- и биовароспецифичных мутаций в гене 23S рРНК методом фрагментного секвенирования и верификация полученных на первом этапе результатов. Время каждого этапа – до 3 и 30 ч соответственно. В результате такого исследования можно провести определение всех известных на сегодняшний день подвигов, биоваров и субпопуляций туляремиального микроба. Эффективность предложенного комплексного подхода подтверждена при изучении 97 штаммов пато-

гена из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Полученные нами результаты дополняют сведения о распространении на территории Европы и Азии штаммов туляремийного микроба голарктического подвида эритромицинчувствительного и эритромицинрезистентного биоваров, полученные Р.И. Куделиной и Н.Г. Олсуфьевым [19], а также данные Е. Karlsson *et al.* [14] о встречаемости данных биоваров во всем мире.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 190 с.
2. List of Procariotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bacterio.net/francisella.html> (дата обращения 15.02.2024).
3. Molins-Schneekloth C.R., Belisle J.T., Petersen J.M. Genomic markers for differentiation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* A.I and A.II strains. *Appl. Environmental Microbiol.* 2008; 74(1):336–41. DOI: 10.1128/AEM.01522-07.
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. 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.
7. Осина Н.А., Ситмбетов Д.А., Булгакова Е.Г., Чекмарева С.С., Сазанова Е.В., Сенчикина А.М., Ляшова О.Ю., Осин А.В., Щербаклова С.А. Внутривидовая дифференциация штаммов *Francisella tularensis* методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 1:132–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-132-141.
8. Вахрамеева Г.М., Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Миронова Р.И., Дятлов И.А. ПЦР-дифференциация подвигов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2011; 1:46–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-46-48.
9. 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.
10. 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.
11. Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Дифференциация подвигов *Francisella tularensis* методом INDEL-типирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2022; 99(2):193–202. DOI: 10.36233/0372-9311-189.
12. Biswas S., Raoult D., Rolain J.-M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 32(3):207–20. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.03.017.
13. Тимофеев В.С., Мокриевич А.Н., Павлов В.М. Роль нуклеотидных замен в V домене 23S РНК *Francisella tularensis* в формировании резистентности туляремийного микроба к эритромицину. В кн.: Куличенко А.Н., редактор. Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых

ученых и специалистов Роспотребнадзора. Ставрополь; 2014. С. 112.

14. Karlsson E., Golovliov I., Lärkeryd A., Granberg M., Larsson E., Ohrman C., Niemcewicz M., Birdsell D., Wagner D.M., Forsman M., Johansson A. Clonality of erythromycin resistance in *Francisella tularensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(10):2815–23. DOI: 10.1093/jac/dkw235.
15. Svensson K., Granberg M., Karlsson L., Neubauer V., Forsman M., Johansson A. A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS One.* 2009; 4(12):e8360. DOI: 10.1371/journal.pone.0008360.
16. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(7):2022–27. DOI: 10.1093/molbev/msab120.
17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012; 28(8):1166–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
18. Rossow H., Sissonen S., Koskela K.A., Kinnunen P.M., Hemmälä H., Niemimäa J., Huitu O., Kuusi M., Vapalahti O., Henttonen H., Nikkari S. Detection of *Francisella tularensis* in voles in Finland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(3):193–8. DOI: 10.1089/vbz.2012.1255.
19. Куделина Р.И., Олсуфьев Н.Г. Чувствительность к антибиотикам группы макролидов и линкомицину возбудителя туляремии голарктической расы. *Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии.* 1980; 24(1):84–91.

References

1. Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology, and Laboratory Diagnostics of Tularemia Agent]. Moscow: "Medicine"; 1975. 190 p.
2. List of Procariotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). (Cited 15 Feb 2024). [Internet]. Available from: <http://www.bacterio.net/francisella.html>.
3. Molins-Schneekloth C.R., Belisle J.T., Petersen J.M. Genomic markers for differentiation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* A.I and A.II strains. *Appl. Environmental Microbiol.* 2008; 74(1):336–41. DOI: 10.1128/AEM.01522-07.
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. 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.
7. 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):132–41. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-132-141.
8. 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):46–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-46-48.
9. 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.
10. 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.
11. Sorokin V.M., Vodopyanov A.S., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Differentiation of *Francisella tularensis* subspecies using INDEL typing. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2022; 99(2):193–202. DOI: 10.36233/0372-9311-189.
12. Biswas S., Raoult D., Rolain J.-M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 32(3):207–20. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.03.017.
13. Timofeev V.S., Mokrievich A.N., Pavlov V.M. [The role of nucleotide substitutions in the V domain of *Francisella tularensis* 23S RNA in the formation of resistance of tularemia microbe to erythromycin]. In: Kulichenko A.N., editor. [Current Issues of Epidemiology

and Preventive Medicine: Materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Specialists of the Rospotrebnadzor]. Stavropol; 2014. P. 112.

14. Karlsson E., Golovliov I., Lärkeryd A., Granberg M., Larsson E., Ohrman C., Niemcewicz M., Birdsell D., Wagner D.M., Forsman M., Johansson A. Clonality of erythromycin resistance in *Francisella tularensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(10):2815–23. DOI: 10.1093/jac/dkw235.

15. Svensson K., Granberg M., Karlsson L., Neubauerova V., Forsman M., Johansson A. A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS One.* 2009; 4(12):e8360. DOI: 10.1371/journal.pone.0008360.

16. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(7):3022–27. DOI: 10.1093/molbev/msab120.

17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012; 28(8):1166–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.

18. Rossow H., Sissonen S., Koskela K.A., Kinnunen P.M., Hemmilä H., Niemimaa J., Huitu O., Kuusi M., Vapalahti O., Henttonen H., Nikkari S. Detection of *Francisella tularensis* in voles in Finland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(3):193–8. DOI: 10.1089/vbz.2012.1255.

19. Kudelina R.I., Olsuf'ev N.G. [Sensitivity to macrolide antibiotics and lincomycin in the causative agent of tularemia of the holarctic race]. *Zhurnal Gigieny, Epidemiologii, Mikrobiologii i Immunologii [Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology]*. 1980; 24(1):84–91.

Authors:

Osina N.A., Sitmbetov D.A., Morozov O.A., Bulgakova E.G., Osin A.V., Chekmareva S.S., Sazanova E.V., Senichkina A.M., Lyashova O.Yu., Polunina T.A., Krasnov Ya.M., Devdariani Z.L., 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., Морозов О.А., Булгакова Е.Г., Осин А.В., Чекмарева С.С., Сазанова Е.В., Сеничкина А.М., Ляшова О.Ю., Полунина Т.А., Краснов Я.М., Девдариани З.Л., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.