

DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-86-94

УДК 579:579.841.95

В.В. Евсеева¹, Г.М. Титарева¹, И.В. Бахтеева¹, Т.Б. Кравченко¹, А.И. Борзилов¹, Т.И. Комбарова¹,
Р.И. Миронова¹, Н.Ю. Красавина², Г.Х. Базарова², Е.Н. Рождественский², В.С. Тимофеев¹

Сравнительная жизнеспособность *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* и subsp. *holarctica* в условиях *in vivo* и *in vitro*

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск, Российская Федерация;

²ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация

Цель работы – сравнение способности к выживанию вирулентных штаммов эндемичных для России голарктического и среднеазиатского подвидов туляремийного микроба в водной среде и в условиях организма животного. **Материалы и методы.** Использовали 11 вирулентных штаммов различных подвидов из Государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск». Для оценки выживаемости бактериальные клетки исследуемых штаммов в концентрации $5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл инкубировали в течение 5 недель в автоклавированной водопроводной воде. Жизнеспособность бактериальных клеток *Francisella tularensis* определяли непосредственно перед экспериментом и далее еженедельно методом высева на плотную питательную среду. Для сравнения штаммов подвидов *holarctica* и *mediasiatica* по выживаемости *in vivo* смесь штаммов трижды пассировалась через мышей с подсчетом соотношения колоний каждого штамма в селезенке при каждом пассаже. Дифференциацию колоний проводили, оценивая длину VNTR-локуса Ft-M20 методом ПЦР с последующим гель-электрофорезом. **Результаты и обсуждение.** Подвид *mediasiatica* показал достоверно меньшую способность к выживанию в воде по сравнению с подвидом *holarctica*. В то же время анализ результатов высевов после сочетанного заражения мышей штаммами голарктического и среднеазиатского подвидов свидетельствует, что подвид *mediasiatica* размножается в организме хозяина более эффективно, чем подвид *holarctica*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, subsp. *mediasiatica*, водные экосистемы, жизнеспособность бактерий.

Корреспондирующий автор: Тимофеев Виталий Сергеевич, e-mail: timofeev_vitalii@mail.ru.

Для цитирования: Евсеева В.В., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Кравченко Т.Б., Борзилов А.И., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Красавина Н.Ю., Базарова Г.Х., Рождественский Е.Н., Тимофеев В.С. Сравнительная жизнеспособность *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* и subsp. *holarctica* в условиях *in vivo* и *in vitro*. Проблемы особо опасных инфекций. 2025; 2:86–94. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-86-94

Поступила 05.11.2024. Отправлена на доработку 17.12.2024. Принята к публикации 21.04.2025.

V.V. Evseeva¹, G.M. Titareva¹, I.V. Bakhteeva¹, T.B. Kravchenko¹, A.I. Borzilov¹, T.I. Kombarova¹,
R.I. Mironova¹, N.Yu. Krasavina², G.Kh. Bazarova², E.N. Rozhdestvensky², V.S. Timofeev¹

Comparative Viability of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* and subsp. *holarctica* under *in vivo* and *in vitro* Conditions

¹State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

²Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to compare the survival ability of virulent strains of tularemia microbe, *mediasiatica* and *holarctica* subspecies, endemic to Russia, in the aquatic environment and in the animal organism. **Materials and methods.** 11 virulent strains of various subspecies deposited in the State collection “SCPM-Obolensk” were used in the work. To assess the survival rate, bacterial cells of the studied strains at a concentration of $5 \cdot 10^6$ CFU/ml were incubated for 35 days in autoclaved tap water. The viability of *Francisella tularensis* bacterial cells was determined immediately before the experiment and then weekly by seeding on agar plates. To compare the *holarctica* and *mediasiatica* strains by *in vivo* survival ability during co-infection, the strain mixture was passaged three times through mice, the ratio of colonies of each strain in the spleen being calculated at each passage. Colony differentiation was performed by assessing the length of the Ft-M20 VNTR locus using PCR and subsequent gel electrophoresis. **Results and discussion.** Subsp. *mediasiatica* shows significantly lower ability to survive in water compared to subsp. *holarctica*. At the same time, analysis of the results of seeding after co-infection of mice with strains belonging to the two subspecies indicates that subsp. *mediasiatica* reproduces in the host organism more effectively than subsp. *holarctica*.

Key words: *Francisella tularensis*, subsp. *mediasiatica*, aquatic ecosystems, bacterial viability.

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

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

Bioethics: Experiments using laboratory animals were carried out in accordance with international legislation (Guidelines and rules of the European Union for the treatment, care and protection of laboratory animals) and approved by the Bioethics Committee of the Federal Budgetary Institution of Science “State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology” of the Rospotrebnadzor (veterinary protocol dated 20 Aug 2024 No. VP-2024/2A).

Corresponding author: Vitaly S. Timofeev, e-mail: timofeev_vitalii@mail.ru.

Citation: Evseeva V.V., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Kravchenko T.B., Borzilov A.I., Kombarova T.I., Mironova R.I., Krasavina N.Yu., Bazarova G.Kh., Rozhdestvensky E.N., Timofeev V.S. Comparative Viability of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* and subsp. *holarctica* under *in vivo* and *in vitro* Conditions. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2025; 2:86–94. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-86-94

Received 05.11.2024. Revised 17.12.2024. Accepted 21.04.2025.

Evseeva V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0383-4698>
Titareva G.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9478-5563>
Bakhteeva I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6897-3613>
Kravchenko T.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4681-1787>
Borzilov A.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6309-7645>
Kombarova T.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-1739>

Mironova R.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8318-4156>
Krasavina N.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9329-2648>
Bazarova G.Kh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4064-0155>
Rozhdestvensky E.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6005-3783>
Timofeev V.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9501-1380>

Небольшая грамотрицательная аэробная коккобацилла *Francisella tularensis* способна инфицировать более 250 видов млекопитающих, вызывая у них туляремию. Туляремия представляет собой природно-очаговую зоонозную инфекцию, характеризующуюся лихорадкой, интоксикацией и клиническими проявлениями в зависимости от механизма заражения [СанПиН 3.3686-21. Санитарные правила и нормы. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней (утверждены 01.09.2021)]. Таксономически *F. tularensis* – довольно полиморфный вид. Он разделяется как минимум на три подвида: *tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica*, – которые, в свою очередь, разделяются на несколько внутривидовых групп, отличающихся по ареалу распространения и/или эпидемической значимости [1]. В качестве четвертого подвида в отечественной литературе рассматривают близкородственный вид *F. novicida*, обозначая его в этом случае как *F. tularensis* subsp. *novicida* [1–4].

Из несомненно принадлежащих к виду *F. tularensis* подвидам наиболее изучены эпидемически значимые подвиды *tularensis* и *holarctica*. *F. tularensis* subsp. *tularensis* (он же тип А) – это наиболее патогенный для человека подвид. Он распространен в Северной Америке. Несмотря на выделение нескольких штаммов этого подвида в Европе, они, по-видимому, не эндемичны и занесены из Северной Америки [5].

Подвид *holarctica* (он же тип В) широко распространен по всему Северному полушарию, хотя недавно обнаружен и в Южном [6].

Ареал распространения подвида *mediasiatica* ограничен двумя регионами – Средней Азией и Алтаем – и включает отдельные районы Красноярского края. На основе данных молекулярного типирования subsp. *mediasiatica* делится на три подгруппы: МI, распространенную в Средней Азии, МII, циркулирующую на Алтае и в Сибири, и МIII, представленную на данный момент одним штаммом, выделенным в Каракалпакии (Республика Узбекистан) [7, 8].

Вирулентные свойства последнего подвида неоднозначны: несмотря на высокую вирулентность для лабораторных животных (в том числе вакцинированных) при инъекционном заражении, неизвестны подтвержденные случаи туляремии у людей, вызванной штаммами этого подвида. Большинство штаммов обычно выделялось из клещей *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor silvarum* и *Ixodes persulcatus*, случаи выделения этих штаммов от диких животных и из проб окружающей среды более редки. Мы непосредственно сталкивались только с одним таким случаем: в 2022 г. из пробы ила, отобранной в

Майминском районе Республики Алтай, в бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская ПЧС» был выделен штамм A281 *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Также в последние годы публиковались данные ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» о выделении в период с 2015 по 2021 г. штаммов туляремийного микроба как от эктопаразитов, так и из воды и объектов окружающей среды, из которых от 75 до 90 % (по данным из разных источников) принадлежали среднеазиатскому подвиду [9, 10]. Выделение штаммов среднеазиатского подвида из воды и ила интересно с точки зрения экологии туляремийного микроба. Общеизвестно, что этот микроорганизм способен довольно долго сохранять жизнеспособность в водных экосистемах, а туляремийная инфекция легко распространяется водным путем [11–13]. Но, несмотря на более чем 100 лет исследований, о конкретных механизмах этой устойчивости мало что известно [14]. Публиковались данные об устойчивости туляремийного микроба в воде и водных отложениях в течение по крайней мере 16 месяцев [15]. Среди гипотез о механизмах выживания *F. tularensis* в природе вне хозяина – предположение о возможности возникновения симбиотических или паразитических взаимодействий с простейшими [16] и членистоногими [17]. Также была выдвинута гипотеза, что *F. tularensis* образует биопленки, которые могут повышать выживаемость в водной среде [18], что соответствует образу жизни многих других бактерий. В лабораторных исследованиях, проведенных в богатой питательной среде и при температуре, близкой к температуре тела, были выделены изоляты *F. novicida*, *F. philomiragia*, *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *tularensis*, которые образовывали биопленки *in vitro* [19, 20]. Однако последующие исследования оспорили эту гипотезу и продемонстрировали, что долгосрочное выживание в этих условиях патогенных штаммов *F. tularensis*, по-видимому, не зависит от формирования биопленки [21]. Публиковались данные о том, что более низкие температуры воды и содержание хлорида натрия около 1–2 % более благоприятны для повышения выживаемости *F. tularensis*. Так, холодная вода, загрязненная тушами или экскрементами инфицированных животных, остается инфицированной в течение 10 недель [22].

Однако все эти исследования касались в большей степени подвида *holarctica* и в гораздо меньшей степени – подвида *tularensis*. Вопросы сохранения жизнеспособности подвида *mediasiatica* как в естественной водной среде (или в условиях, ее имитирующих), так и в условиях организма млекопитающих до сих пор не изучались. Таким образом, целью

работы является сравнение способности к выживанию эндемичных для России подвидов *holarctica* и *mediasiatica* в водной среде и в условиях организма животного.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали 11 вирулентных штаммов различных подвидов из Государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия): три природных штамма подвида *holarctica*, выделенных в различных районах России, семь штаммов подвида *mediasiatica*, выделенных в Средней Азии и на территории Сибири и Алтая, а также один штамм подвида *tularensis* (Schu), использованный нами в качестве контрольного по аналогии с публикацией I. Golovliov et al. [21]. Штаммы перечислены в табл. 1.

Условия культивирования. Штаммы *F. tularensis* выращивали при температуре 37 °С на плотной питательной среде для культивирования туляремиального микроба FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Оценка жизнеспособности разных подвидов *F. tularensis* в воде. Бактериальные клетки исследуемых штаммов вносили в колбы со стерильной водопроводной водой до конечной концентра-

ции 5·10⁶ КОЕ/мл. Далее колбы инкубировали при 22 °С и в холодильнике при 4 °С. Z.L. Berrada и S.R. Telford [22] использовали в своих исследованиях по выживанию *F. tularensis* в различных образцах воды сроки от 32 до 42 дней, мы наблюдали за жизнеспособностью *F. tularensis* в течение 35 суток. Выбранные температуры использованы как соответствующие зимним и летним колебаниям температуры воды в пресных водоемах. Жизнеспособность бактериальных клеток *F. tularensis* определяли непосредственно перед экспериментом и далее еженедельно методом посева на плотную питательную среду.

Экспериментальные животные. В качестве модельных животных использовали аутбредных мышей Swiss Webster (самцы/самки, 28–32 г), выращенных в питомнике ФБУН ГНЦ ПМБ. Эксперименты с использованием лабораторных животных проводились в соответствии с международным законодательством (Руководящими принципами и правилами Европейского союза по обращению, уходу и защите лабораторных животных, <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>) и одобрены Комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (ветеринарный протокол от 20.08.2024 № ВП-2024/2А). Мыши имели свободный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия). Животных размещали в поликарбонатных клетках (Lab Products Inc., США). Для экс-

Таблица 1 / Table 1

Штаммы, использованные в исследованиях
Strains used for the study

Подвид Subspecies	Штамм Strain	Год выделения Year of isolation	Место выделения Site of isolation	Источник выделения Source of isolation
<i>holarctica</i>	A1045	2011	Алтайский край Altai Territory	н/д n/d
<i>holarctica</i>	503	1949	Московская обл. Moscow Region	н/д n/d
<i>holarctica</i>	Р-д 464	н/д (n/d)	Ростовская область Rostov Region	н/д n/d
<i>mediasiatica</i>	120	1968	Казахстан Kazakhstan	н/д n/d
<i>mediasiatica</i>	60(B)57A	1960	Узбекистан, Каракалпакия Uzbekistan, Karakalpakia	н/д n/d
<i>mediasiatica</i>	A77	2015	Республика Алтай, Майминский р-н, руч. Бакала Republic of Altai, Maiminsky district, Bakala creek	Клещи <i>H. concinna</i> (дата отлова 27.04.2015) Ticks <i>H. concinna</i> (date of collection 27.04.2015)
<i>mediasiatica</i>	A678	2011	Алтайский край, Первомайский р-н, с. Покровка Altai Territory, Pervomaisky district, Pokrovka village	Клещи <i>I. persulcatus</i> (дата отлова 07.2011) Ticks <i>I. persulcatus</i> (date of collection 07.2011)
<i>mediasiatica</i>	K334	2021	Красноярский край, Каратузский р-н, Западно-Саянская горно-таежная зона Krasnoyarsk Territory, Karatuzsky district, West Sayan mountain-taiga zone	Клещи <i>I. persulcatus</i> , <i>H. concinna</i> Ticks <i>I. persulcatus</i> , <i>H. concinna</i>
<i>mediasiatica</i>	A281	2022	Республика Алтай, Майминский р-н, урочище Аткунов Лог Altai Republic, Maiminsky district, Atkunov Log tract	Ил Sludge
<i>mediasiatica</i>	A554	2011	Алтайский край, Ельцовский р-н, с. Мартыново Altai Territory, El'tsovsky district, Martynovo village	Клещи <i>H. concinna</i> (дата отлова 07.2011) Ticks <i>H. concinna</i> (date of collection 07.2011)
<i>tularensis</i>	Schu	н/д n/d	США USA	н/д n/d

Примечание: н/д – нет данных.
Note: n/d – no data.

периментов использовалось минимально необходимое количество животных. Состояние здоровья животных контролировалось не реже двух раз в день. Одобренные протоколы предусматривали научно обоснованные гуманные конечные точки, включая предварительно установленные критерии для эвтаназии умирающих мышей путем вдыхания CO_2 .

Инфицирование мышей. Для изучения способности штаммов *F. tularensis* сохраняться и размножаться в органах экспериментальных животных использовали их пассивирование через организм мышей. Заражение мышей ($n=3$ для каждого штамма в каждом пассаже) проводили подкожно смесью клеток *F. tularensis* двух штаммов – A1045 (subsp. *holarctica*) и A678 (subsp. *mediasiatica*). Первичное соотношение количества клеток *F. tularensis* A1045 : A678 составило 3:1. На пятые сутки после первого заражения мышей подвергали эвтаназии ингаляцией CO_2 . Их вскрывали, получали селезенки, пулировали и гомогенизировали в 5 мл ЗФР. Гомогенат использовался для заражения следующей партии мышей (по 0,5 мл подкожно), а также после десятикратного титрования – для посева на плотную питательную среду и определения подвидовой принадлежности колоний. После следующих пассажей животные проявляли тяжелые симптомы инфекции на третьи сутки, поэтому эвтаназия и высеивания из органов проводили в этот срок.

Оценка подвидовой принадлежности колоний, выделенных из селезенок мышей, зараженных смесью штаммов *F. tularensis* A1045 и A678. Дифференциация штаммов A1045 и A678 проводилась на основе полиморфизма длины VNTR-локуса Ft-M20 [23]. У штаммов A1045 и A678 длина локуса составляет 255 и 363 п.н. соответственно [8]. Эту разницу в размерах локуса мы в дальнейшем использовали для дифференциации колоний бактерий, выделенных из селезенок мышей, инфицированных смесью этих штаммов.

Колонии ресуспендировали в воде, получали из суспензии термолизат и определяли длину локуса Ft-M20 в ПЦР. Для амплификации локуса использованы следующие праймеры: последовательность прямого праймера 5'→3' – GCATAACTTTTGAGACAATTGGTGACAGATGATC, последовательность обратного праймера 5'→3' – GACCGCCAGTATATGCTTGACSTTGACTCC. Реакции амплификации фрагментов ДНК проводили с использованием термоциклера T100 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь для ПЦР содержала буфер для ДНК-полимеразы, 2,5 мМ MgCl_2 , 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,2 мкМ каждого дНТФ и 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы, 50–100 нг ДНК. Условия проведения ПЦР: при температуре 95 °C – 3 мин; 30 циклов: при температуре 95 °C – 30 с, при 64 °C – 30 с, при 72 °C – 30 с; при 72 °C – 5 мин. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 2 % агарозном геле (Sigma, США) в ТАЕ-буфере (Трис-ацетат 0,04 М, ЭДТА 0,002 М, рН 8,0), с последую-

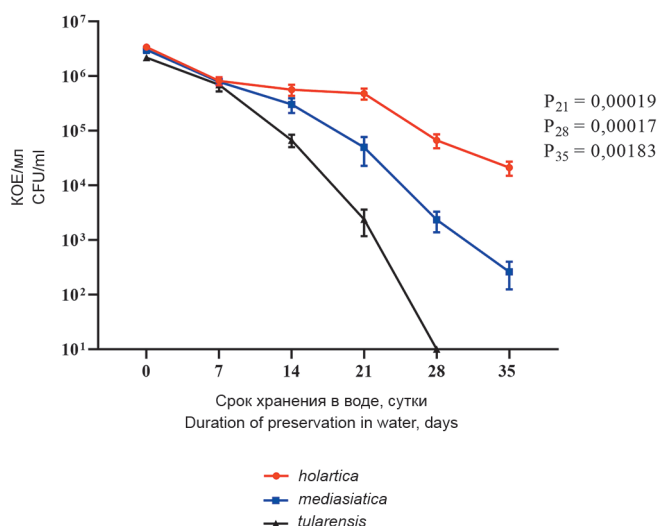
щим окрашиванием бромистым этидием (100 мг/л) [11, 20] и детекцией с использованием трансиллюминатора ECX-15.L при длине волны 365 нм (Vilber Lourmat, Франция).

Статистические методы. Для определения выживаемости в воде проведено два эксперимента. В каждом эксперименте каждый штамм использовался в трех повторях (в трех отдельных пробирках). Данные рассчитывались суммарно по подвидам и представлены в виде КОЕ/мл ± стандартная ошибка среднего значения (standard error of the mean – SEM). Среднее КОЕ/мл и ошибка средней для подвида *tularensis* рассчитывались с учетом трех повторов для каждой пробы. Все статистические расчеты и оценку достоверности различий (P) проводили с помощью программы GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/>).

Результаты и обсуждение

Для определения сравнительной жизнеспособности среднеазиатского и голарктического подвидов *in vitro* (в воде) мы использовали выборку, включающую три штамма подвида *holarctica* и семь штаммов подвида *mediasiatica*. Для того чтобы не оставить без внимания третий подвид, мы добавили в выборку один типовой для подвида *tularensis* (*nearctica*) штамм Shcu. Эксперименты проводили параллельно при двух температурных режимах: 22 и 4 °C. Однако серию опытов, проводимых при 22 °C, пришлось прекратить, так как уже на первой точке измерения (7 дней) высевались только отдельные колонии подвидов *mediasiatica* и *tularensis*, а ко второй (14 дней) погибали все исследуемые штаммы. Таким образом, данные, полученные при этой температуре, были не вполне показательными и удобными для интерпретации. Объединенные данные двух независимых экспериментов, проведенных в трех повторях по выживаемости при 4 °C, приведены на рисунке. Как видно из рисунка, наибольшую устойчивость показали штаммы подвида *holarctica*: количество жизнеспособных клеток через 28 и 35 суток уменьшалось на два порядка – с $5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл до $(6,7 \cdot 10^4 \pm 1,9 \cdot 10^4)$ и $(2,1 \cdot 10^4 \pm 6,2 \cdot 10^3)$ КОЕ/мл соответственно. В отличие от штаммов голарктического подвида, штамм Schu подвида *tularensis* показал наиболее низкую выживаемость: уже на 14-е сутки жизнеспособность падала до $(6,7 \cdot 10^4 \pm 1,7 \cdot 10^4)$ КОЕ/мл, к 21-му дню – до $(3,6 \cdot 10^3 \pm 4 \cdot 10^2)$ КОЕ/мл, а к 28-м суткам отмечались единичные жизнеспособные клетки.

Штаммы подвида *mediasiatica* занимали срединное положение: к 21-м суткам жизнеспособность снижалась до $(2,3 \cdot 10^4 \pm 2,7 \cdot 10^4)$ КОЕ/мл, к 28-м суткам – до $(2,4 \cdot 10^3 \pm 9,7 \cdot 10^2)$ КОЕ/мл, а к 35-м суткам – до $(2,6 \cdot 10^2 \pm 1,4 \cdot 10^2)$ КОЕ/мл. Различия между штаммами подвидов *holarctica* и *mediasiatica* на 21, 28 и 35-е сутки были статистически достоверны, уровень значимости различий P составлял 0,00018; 0,00017 и 0,00183 соответственно.



Кривые сохранения жизнеспособности при температуре 4 °C штаммов *F. tularensis* разных подвидов. Данные указаны со стандартной ошибкой среднего значения (SEM)

Viability curves at 4 °C for *F. tularensis* strains of different subspecies. Data are presented with standard error of the mean (SEM)

Таким образом, способность штаммов подвидов туляремии микроба к выживанию в воде в экосистемах распределилась от максимальной к минимальной следующим образом: *holartica* > *mediasiatica* > *tularensis*. К сожалению, использование только одного штамма подвида *tularensis* не позволяет оценить статистическую достоверность такого ранжирования в отношении всего подвида *tularensis* и делает его несколько спекулятивным, однако следует отметить, что наши данные совпадали с результатами I. Golovliov et al. [21], которые продемонстрировали более низкую жизнеспособность штамма Schu по сравнению со штаммами FSC200 и LVS подвида *holartica* при хранении в воде в виде биопленок.

Более низкая жизнеспособность в воде подвида *mediasiatica* по сравнению с голарктическим подвидом дает основание полагать, что случаи его выделения из воды и ила, скорее всего, являются следствием случайного попадания в воду зараженного животного, а не персистенции штамма непосредственно в воде или иле.

Интересно, что способность к выживанию в воде подвидов туляремии микроба обратно пропорциональна их вирулентности, которая ранжируется как *tularensis* > *mediasiatica* > *holartica* [24]. Таким образом, подвид *mediasiatica* менее адаптирован для выживания в воде, но более вирулентен, чем подвид *holartica*. Собственно говоря, это достаточно распространенное явление среди представителей микромира, при котором высокая вирулентность сопровождается ауксотрофностью, когда микроб, превосходно размножаясь в макроорганизме, плохо приспособлен к выживанию во внешней среде.

Большую вирулентность среднеазиатского подвида по отношению к голарктическому мы показали ранее при экспериментальной туляремии у

предварительно вакцинированных мышей [24]. Этот же факт подтверждается опытом работы в Алтайском очаге: при постановке биопробы на мышах время жизни животных, от которых в дальнейшем выделялась культура подвида *holartica*, составляло около 7 дней, а мыши, от которых в дальнейшем была выделена *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, погибали уже на 3–4-е сутки с более выраженной клинической картиной по сравнению с предыдущей группой биопробных животных.

Во всех наших опытах мы оценивали вирулентность по таким параметрам, как смертность, среднее время жизни и потеря веса при болезни. В настоящем исследовании мы решили дополнить эти данные сравнением вирулентных свойств штаммов среднеазиатского и голарктического подвидов по их способности вытеснять друг друга из организма зараженного животного при его одновременном инфицировании.

Такая комбинированная инфекция представляла собой экспериментальную туляремию аутбредных мышей после подкожного заражения смесью двух штаммов: *F. tularensis* штамма A1045 subsp. *holartica* и штамма A678 subsp. *mediasiatica*. Для заражения была приготовлена смесь штаммов в расчетных дозах 100 КОЕ/мышь каждого штамма в равных долях, то есть соотношение *holartica* : *mediasiatica* предполагалось 1:1. Однако контрольный высев из заражающей суспензии, приготовленной с использованием отраслевого стандарта мутности, и определение подвидовой принадлежности колоний показали, что реальное соотношение *holartica* : *mediasiatica* оказалось ~3:1 (табл. 2). Однако, несмотря на трехкратное преимущество на старте штамма A1045, уже после первого пассажа в гомогенате селезенки превалировал штамм A678. После второго и третьего пассажей преимущество штамма A678 сохранилось, но окончательного вытеснения штамма A1045 мы так и не зарегистрировали (табл. 2).

Всего проведено три пассажа смешанной культуры возбудителя туляремии через организм мышей. После первого пассажа концентрация клеток *F. tularensis* в селезенке составляла от 1 до 5·10⁷ КОЕ/мл гомогената, после второго и третьего пассажей – от 1 до 5·10⁸ КОЕ/мл.

Таким образом, доза заражения мышей первого пассажа составляла 100 КОЕ/мышь, второго и третьего пассажей – около 10⁷ и 10⁸ КОЕ/мышь соответственно. При этом если первичная заражающая культура содержала 23 % клеток среднеазиатского подвида, то в последующих посевах ее доля увеличилась до 80–95 %. Полученные результаты указывают на более эффективное и с большей скоростью размножение в организме хозяина подвида *mediasiatica*, чем подвида *holartica*.

Резюмируя изложенные в данной работе результаты, мы можем утверждать, что в водной среде *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* сохраняется значительно хуже, чем *F. tularensis* subsp. *holartica*. Однако в

Таблица 2 / Table 2

Результаты определения подвидовой принадлежности колоний *F. tularensis*, выделенных из селезенок мышей
Results of determining the subspecies apurtenance of *F. tularensis* colonies isolated from mouse spleens

Источник колоний Source of colonies	Количество типированных колоний (среднеазиатского подвида : голарктического подвида) Number of typed colonies (<i>mediasiatica</i> subspecies : <i>holarctica</i> subspecies)	% колоний среднеазиатского подвида % of colonies of <i>mediasiatica</i> subspecies
Исходная заражающая смесь Initial infectious mixture	176 (41:135)	23
Гомогенат селезенки от 1-го пассажа Spleen homogenate from the 1st passage	49 (46:3)	94
Гомогенат селезенки от 2-го пассажа Spleen homogenate from the 2nd passage	16 (13:3)	81
Гомогенат селезенки от 3-го пассажа Spleen homogenate from the 3rd passage	25 (21:4)	84

организме теплокровного хозяина все происходит с точностью до наоборот, что вполне согласуется с более высокой вирулентностью среднеазиатского подвида при экспериментальной туляремии у мышей.

В целом род *Francisella* включает множество видов, распространенных в водных экосистемах и патогенных для морских животных. *F. noatunensis* subsp. *orientalis* и *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* широко описаны как тепловодные и холодноводные патогены рыб, ответственные за «франциселлез рыб», но при этом непатогенные для человека [25]. *F. haliotida* может инфицировать моллюсков *Haliotis* (морские ушки) [26], а культура *F. marina* sp. nov. недавно идентифицирована как возбудитель заболевания у лучеперых рыб пятнистых розовых люцианов (*Lutjanus guttatus*) [27]. Публиковался факт, что новый вид *Francisella*, очень близкий к *F. haliotida*, выделен в США у пациента с диабетом из инфицированной раны кожи, образовавшейся после контакта с солоноватой водой [28]. Наконец, некоторые виды рода *Francisella*, например *F. endociliophora*, являются эндосимбионтами морских инфузорий [11].

F. tularensis также считается микроорганизмом, тесно связанным с водными экосистемами. К основным природным резервуарам этого микроорганизма, помимо мелких животных (грызунов и зайцеобразных), иксодовых клещей, комаров и оленых мух, относятся также вода и водные животные. За последние десятилетия в целом ряде стран зафиксированы вспышки туляремии, вызванные употреблением питьевой воды, контаминированной *F. tularensis*. Описаны случаи легочной формы туляремии, развившейся у тонувших и спасенных затем людей, а также ряд случаев заболеваний, связанных с плаванием [11]. К развитию туляремии может привести также и контакт с водными животными. Например, зарегистрированы случаи туляремии, при которой входными воротами инфекции служили повреждения кожи, полученные при ловле и чистке раков и рыбы [29]. В какой-то мере к «водному» способу распространения туляремии можно отнести и передачу этого заболевания комарами, периодически

встречающуюся в бореальных лесах, так как заражение комаров, видимо, происходит в воде на личиночной стадии развития [11]. Упомянутые выше случаи заболеваний людей в тех случаях, когда проводилась подвидовая идентификация, вызывались, как правило, штаммами подвида *holarctica* [11], за исключением случаев, описанных в [30, 31].

Кроме упомянутых выше публикаций, указывающих на возможность сохранения в воде штаммов подвида *tularensis*, можно упомянуть еще одну публикацию, в которой, несмотря на то, что точное таксономическое положение штамма *Francisella* sp., выделенного из воды, не было определено, показано, что он обладал генетическими маркерами, характерными для *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* [15]. Однако наш опыт разработки способов дифференцирования подвидов туляремийного микроба свидетельствует об определенной сложности различения подвидов *mediasiatica* и *tularensis* генетическими методами вследствие перекреста генетических маркеров, особенно заметного на больших выборках штаммов, поэтому у нас есть основания полагать, что с учетом места выделения штамма (Скандинавия) в работе [15] речь шла все же не о subsp. *mediasiatica*, а о subsp. *tularensis* или любом другом штамме *Francisella* sp.

Выделение нами штамма A281 *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* из ила и сообщение о том, что наша находка не уникальна [9], привели нас к вопросу, являются ли эти находки следствием кратковременного случайного нахождения культуры в воде или же subsp. *mediasiatica* способен достаточно долго сохраняться в воде и распространяться водным путем. Проведенные в данной работе исследования дают основание утверждать, что штаммы среднеазиатского подвида сравнительно быстро теряют жизнеспособность в воде, как минимум достоверно значительно быстрее, чем штаммы *F. tularensis* подвида *holarctica*.

Но все же стоит отметить, что, несмотря на крайне небольшое количество клеток, сохранивших в воде жизнеспособность, предположительно оно может быть достаточным для сохранения эпидемической опасности контаминированной воды и ила

и представлять собой потенциальную возможность распространения инфекции водным путем.

Поскольку жизнеспособность клеток штаммов подвида *mediasiatica* оказалась на три порядка меньше, чем штаммов подвида *holarctica*, на наш взгляд, это с высокой долей вероятности указывает на то, что среднеазиатский подвида не адаптирован к выживанию в воде. Низкая способность к выживанию в окружающей среде, характерная для подвидов *mediasiatica* и *tularensis* [21], вероятно, является причиной ограниченности ареалов их распространения, особенно по сравнению с подвидом *holarctica*, который способен эффективно выживать в окружающей среде. При этом снижение способности выживать в воде подвидов *mediasiatica* и *tularensis* сопровождалось их высокой вирулентностью и скоростью размножения в организме хозяина. В принципе, данное явление объяснимо и характерно не только для туляремии. Известно, что более высоковирулентные штаммы при многих инфекциях требуют для своего выживания более богатых питательных сред по сравнению со слабовирулентными штаммами. Эта особенность обусловлена тем, что они эволюционно адаптированы к существованию в макроорганизме, где среда гораздо более насыщена питательными веществами и микроэлементами по сравнению с окружающей средой, в которой существуют сапрофитные и условно-патогенные штаммы.

Парадоксально, что, несмотря на высокую вирулентность при экспериментальной инфекции, случаи туляремии у животных, вызванной штаммами подвида *mediasiatica*, крайне редки, а среди людей их вообще не зафиксировано. Почти все штаммы, особенно относящиеся к подгруппе М.П., выделяются из иксодовых клещей. Возможно, этот подвида, или как минимум его алтайская популяция, в ходе своей эволюции адаптировался к эндосимбиотическому образу жизни, циркулируя среди клещей путями трансвариальной передачи и гиперпаразитизма. При этом, несмотря на высокую эффективность размножения внутри организма теплокровного хозяина, возможно, что особенности взаимодействия с клещом снижают вероятность инфицирования при укусе, например в том случае, если клетки *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* не попадают в слюну клеща и не колонизируют его ротовой аппарат. Для того чтобы подтвердить или опровергнуть эту гипотезу, необходимо проведение широкого ряда дополнительных исследований по изучению особенностей взаимодействия разных подвидов туляремиального микроба с клещевыми переносчиками туляремии, которые позволяют понять особенности экологии и эволюции как среднеазиатского подвида возбудителя туляремии, так и всего вида *F. tularensis* в целом.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Биоэтика. Эксперименты с использованием лабораторных животных проводились в соответствии с международным законодательством (Руководящими принципами и правилами Европейского союза по обращению, уходу и защите лабораторных животных) и одобрены Комитетом по биоэтике ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ветеринарный протокол от 20.08.2024 № ВП-2024/2А).

Список литературы

1. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1105:30–66. DOI: 10.1196/annals.1409.011.
2. Kingry L.C., Petersen J.M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4:35. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00035.
3. Siddaramappa S., Challacombe J.F., Petersen J.M., Pillai S., Hogg G., Kuske C.R. Common ancestry and novel genetic traits of *Francisella novicida*-like isolates from North America and Australia as revealed by comparative genomic analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(15):5110–22. DOI: 10.1128/AEM.00337-11.
4. Jan H.E., Tsai C.S., Lee N.Y., Tsai P.F., Wang L.R., Chen P.L., Ko W.C. The first case of *Francisella novicida* infection in Taiwan: bacteraemic pneumonia in a haemodialysis adult. *Emerg. Microbes Infect.* 2022; 11(1):310–3. DOI: 10.1080/22221751.2022.2026199.
5. Chaudhuri R.R., Ren C.P., Desmond L., Vincent G.A., Silman N.J., Brehm J.K., Elmore M.J., Hudson M.J., Forsman M., Isherwood K.E., Gurycová D., Minton N.P., Titball R.W., Pallen M.J., Vipond R. Genome sequencing shows that European isolates of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* are almost identical to US laboratory strain Schu S4. *PLoS One.* 2007; 2(4):e352. DOI: 10.1371/journal.pone.0000352.
6. Eden J.S., Rose K., Ng J., Shi M., Wang Q., Sintchenko V., Holmes E.C. *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Ringtail Possums, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(7):1198–201. DOI: 10.3201/eid2307.161863.
7. Timofeev V., Bakhteeva I., Mokrievich A., Vakhrameeva G., Gritskova E., Anisimov Y., Rozhdestvensky E., Bazarova G., Zhumakaev R., Dyatlov I., Vergnaud G. The first finding of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* in Krasnoyarsk Territory, Siberia, and an update of the subspecies genetic diversity. *Bacteria.* 2022; 1(4):242–9. DOI: 10.3390/bacteria1040018.
8. Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christy D., Mokrievich A., Dyatlov I., Vergnaud G. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. *PLoS One.* 2017; 12(9):e0183714. DOI: 10.1371/journal.pone.0183714.
9. Зарва И.Д., Борзенко М.А., Холин А.В., Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Сынгеева А.К., Наумова К.В., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Санаров П.П., Полковников Е.С., Иваницкая Ю.Н., Сбитнева С.В., Красильникова Н.Ю., Пашенко И.Г. Проблемы трансграничного распространения эпизоотий туляремии в Алтайском регионе. В кн.: Материалы Международного Симпозиума «Единое здоровье – взгляд в будущее». 27 октября 2022 г., г. Алматы. С. 19–22. [Электронный ресурс]. URL: <https://nscedi.kz/wp-content/uploads/2022/11/07.11.2022-Sbornik-simpozium.pdf>.
10. Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Холин А.В., Сынгеева А.К., Полковников Е.С., Шестаков В.А., Шефер В.В., Фомина Л.А., Мищенко А.И., Балахонов С.В. Современные эпидемиолого-эпизоотологические особенности природных очагов туляремии на Алтае. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2019; 18(4):25–33. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-25-33.
11. Hennebique A., Boisset S., Maurin M. Tularemia as a waterborne disease: a review. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1):1027–42. DOI: 10.1080/22221751.2019.1638734.
12. Schaudinn C., Rydzewski K., Meister B., Grunow R., Heuner K. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* wild-type is able to colonize natural aquatic ex vivo biofilms. *Front. Microbiol.* 2023; 14:1113412. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1113412.
13. Brunet C.D., Hennebique A., Peyroux J., Pelloux I., Caspar Y., Maurin M. Presence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* DNA in the aquatic environment in France. *Microorganisms.* 2021; 9(7):1398. DOI: 10.3390/microorganisms9071398.
14. Telford S.R. 3rd, Goethert H.K. Toward an understanding of the perpetuation of the agent of tularemia. *Front. Microbiol.* 2011; 1:150. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00150.
15. Broman T., Thelau J., Andersson A.C., Bäckman S., Wikström P., Larsson E., Granberg M., Karlsson L., Bäck E., Eliasson H., Mattsson R., Sjöstedt A., Forsman M. Molecular detection of per-

sistent *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in natural waters. *Int. J. Microbiol.* 2011; 2011:851946. DOI: 10.1155/2011/851946.

16. Buse H.Y., Schaefer F.W. III, Rice E.W. Enhanced survival but not amplification of *Francisella* spp. in the presence of free-living amoebae. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2017; 64(1):17–36. DOI: 10.1556/030.63.2016.015.

17. Zellner B., Huntley J.F. Ticks and tularemia: do we know what we don't know? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:146. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00146.

18. van Hoek M.L. Biofilms: an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence.* 2013; 4(8):833–46. DOI: 10.4161/viru.27023.

19. Champion A.E., Catanzaro K.C.F., Bandara A.B., Inzana T.J. Formation of the *Francisella tularensis* biofilm is affected by cell surface glycosylation, growth medium, and a glucan exopolysaccharide. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):12252. DOI: 10.1038/s41598-019-48697-x.

20. Siebert C., Villers C., Pavlou G., Touquet B., Yakandawala N., Tardieux I., Renesto P. *Francisella novicida* and *F. philomiragia* biofilm features conditioning fitness in spring water and in presence of antibiotics. *PLoS One.* 2020; 15(2):e0228591. DOI: 10.1371/journal.pone.0228591.

21. Golovliov I., Bäckman S., Granberg M., Salomonsson E., Lundmark E., Näslund J., Busch J.D., Birdsell D., Sahl J.W., Wagner D.M., Johansson A., Forsman M., Thelaus J. Long-term survival of virulent tularemia pathogens outside a host in conditions that mimic natural aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 2021; 87(6):e02713-20. DOI: 10.1128/AEM.02713-20.

22. Berrada Z.L., Telford S.R. Survival of *Francisella tularensis* type A in brackish-water. *Arch. Microbiol.* 2011; 193(3):223–6. DOI: 10.1007/s00203-010-0655-8.

23. 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.

24. Timofeev V., Titareva G., Bahtejeva I., Kombarova T., Kravchenko T., Mokrievich A., Dyatlov I. The comparative virulence of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* for vaccinated laboratory animals. *Microorganisms.* 2020; 8(9):1403. DOI: 10.3390/microorganisms8091403.

25. Colquhoun D.J., Duodu S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet. Res.* 2011; 42(1):47. DOI: 10.1186/1297-9716-42-47.

26. Meyer G.R., Lowe G.J., Gilmore S.R., Bower S.M. Disease and mortality among Yesso scallops *Patinopecten yessoensis* putatively caused by infection with *Francisella haliotitida*. *Dis. Aquat. Organ.* 2017; 125(1):79–84. DOI: 10.3354/dao03130.

27. Soto E., Griffin M.J., Morales J.A., Calvo E.B., de Alexandre Sebastião F., Porras A.L., Viquez-Rodríguez X., Reichley S.R., Rosser T.G., Ware C., Byrne B.A., García J.C., LaFrentz B.R., Camus A.C. *Francisella marina* sp. nov., etiologic agent of systemic disease in cultured spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) in Central America. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018; 84(16):e00144-18. DOI: 10.1128/AEM.00144-18.

28. Respicio-Kingry L.B., Byrd L., Allison A., Brett M., Scott-Waldron C., Galliher K., Hannah P., Mead P., Petersen J.M. Cutaneous infection caused by a novel *Francisella* sp. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(10):3456–60. DOI: 10.1128/JCM.01105-13.

29. Whitten T., Bjork J., Neitzel D., Smith K., Sullivan M., Scheffel J. Notes from the field: *Francisella tularensis* type B infection from a fish hook injury – Minnesota, 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2017; 66(7):194. DOI: 10.15585/mmwr.mm6607a3.

30. Feldman K.A., Enscoe R.E., Lathrop S.L., Matyas B.T., McGuill M., Schrieffer M.E., Stiles-Enos D., Dennis D.T., Petersen L.R., Hayes E.B. An outbreak of primary pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345(22):1601–6. DOI: 10.1056/NEJMoa011374.

31. Matyas B.T., Nieder H.S., Telford S.R. 3rd. Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard: clinical, epidemiologic, and ecological characteristics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1105:351–77. DOI: 10.1196/annals.1409.013.

References

1. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1105:30–66. DOI: 10.1196/annals.1409.011.

2. Kingry L.C., Petersen J.M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4:35. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00035.

3. Siddaramappa S., Challacombe J.F., Petersen J.M., Pillai S., Hogg G., Kuske C.R. Common ancestry and novel genetic traits of *Francisella novicida*-like isolates from North America and Australia as revealed by comparative genomic analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(15):5110–22. DOI: 10.1128/AEM.00337-11.

4. Jan H.E., Tsai C.S., Lee N.Y., Tsai P.F., Wang L.R., Chen P.L., Ko W.C. The first case of *Francisella novicida* infection in Taiwan: bacteraemic pneumonia in a haemodialysis adult. *Emerg. Microbes Infect.* 2022; 11(1):310–3. DOI: 10.1080/22221751.2022.2026199.

5. Chaudhuri R.R., Ren C.P., Desmond L., Vincent G.A., Silman N.J., Brehm J.K., Elmore M.J., Hudson M.J., Forsman M., Isherwood K.E., Gurycová D., Minton N.P., Titball R.W., Pallen M.J., Vipond R. Genome sequencing shows that European isolates of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* are almost identical to US laboratory strain Schu S4. *PLoS One.* 2007; 2(4):e352. DOI: 10.1371/journal.pone.0000352.

6. Eden J.S., Rose K., Ng J., Shi M., Wang Q., Sintchenko V., Holmes E.C. *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Ringtail Possums, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(7):1198–201. DOI: 10.3201/eid2307.161863.

7. Timofeev V., Bakhteeva I., Mokrievich A., Vakhrameeva G., Gritskova E., Anisimov Y., Rozhdestvensky E., Bazarova G., Zhumakaeve R., Dyatlov I., Vergnaud G. The first finding of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* in Krasnoyarsk Territory, Siberia, and an update of the subspecies genetic diversity. *Bacteria.* 2022; 1(4):242–9. DOI: 10.3390/bacteria1040018.

8. Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christy D., Mokrievich A., Dyatlov I., Vergnaud G. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. *PLoS One.* 2017; 12(9):e0183714. DOI: 10.1371/journal.pone.0183714.

9. Zarva I.D., Borzenko M.A., Kholin A.V., Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Syngieva A.K., Naumova K.V., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Sanarov P.P., Polkovnikov E.S., Ivanitskaya Yu.N., Sbitneva S.V., Krasilnikova N.Yu., Pashchenko I.G. [Problems of transboundary spread of tularemia epizootics in the Altai region]. In: [Proceedings of the International Symposium “One Health – a Look into the Future”. October 27, 2022, Almaty]. P. 19–22. [Internet]. Available from: <https://nscedi.kz/wp-content/uploads/2022/11/07.11.2022-Sbornik-simpozium.pdf>.

10. Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Kholin A.V., Syngieva A.K., Polkovnikov E.S., Shestakov V.A., Shefer V.V., Fomina L.A., Mishchenko A.I., Balakhanov S.V. [Modern epidemiological and epizootological features of natural foci of tularemia in Altai]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2019; 18(4):25–33. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-4-25-33.

11. Hennebique A., Boisset S., Maurin M. Tularemia as a waterborne disease: a review. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1):1027–42. DOI: 10.1080/22221751.2019.1638734.

12. Schaudinn C., Rydzewski K., Meister B., Grunow R., Heuner K. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* wild-type is able to colonize natural aquatic *ex vivo* biofilms. *Front. Microbiol.* 2023; 14:1113412. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1113412.

13. Brunet C.D., Hennebique A., Peyroux J., Pelloux I., Caspar Y., Maurin M. Presence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* DNA in the aquatic environment in France. *Microorganisms.* 2021; 9(7):1398. DOI: 10.3390/microorganisms9071398.

14. Telford S.R. 3rd, Goethert H.K. Toward an understanding of the perpetuation of the agent of tularemia. *Front. Microbiol.* 2011; 1:150. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00150.

15. Broman T., Thelaus J., Andersson A.C., Bäckman S., Wikström P., Larsson E., Granberg M., Karlsson L., Bäck E., Eliasson H., Mattsson R., Sjöstedt A., Forsman M. Molecular detection of persistent *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in natural waters. *Int. J. Microbiol.* 2011; 2011:851946. DOI: 10.1155/2011/851946.

16. Buse H.Y., Schaefer F.W. III, Rice E.W. Enhanced survival but not amplification of *Francisella* spp. in the presence of free-living amoebae. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2017; 64(1):17–36. DOI: 10.1556/030.63.2016.015.

17. Zellner B., Huntley J.F. Ticks and tularemia: do we know what we don't know? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:146. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00146.

18. van Hoek M.L. Biofilms: an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence.* 2013; 4(8):833–46. DOI: 10.4161/viru.27023.

19. Champion A.E., Catanzaro K.C.F., Bandara A.B., Inzana T.J. Formation of the *Francisella tularensis* biofilm is affected by cell surface glycosylation, growth medium, and a glucan exopolysaccharide. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):12252. DOI: 10.1038/s41598-019-48697-x.

20. Siebert C., Villers C., Pavlou G., Touquet B., Yakandawala N., Tardieux I., Renesto P. *Francisella novicida* and *F. philomiragia* biofilm features conditioning fitness in spring water and in presence of antibiotics. *PLoS One.* 2020; 15(2):e0228591. DOI: 10.1371/journal.pone.0228591.

21. Golovliov I., Bäckman S., Granberg M., Salomonsson E., Lundmark E., Näslund J., Busch J.D., Birdsell D., Sahl J.W., Wagner D.M., Johansson A., Forsman M., Thelaus J. Long-term survival of virulent tularemia pathogens outside a host in conditions that mimic natural aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 2021; 87(6):e02713-20. DOI: 10.1128/AEM.02713-20.

22. Berrada Z.L., Telford S.R. Survival of *Francisella tularensis* type A in brackish-water. *Arch. Microbiol.* 2011; 193(3):223–6. DOI: 10.1007/s00203-010-0655-8.
23. 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.
24. Timofeev V., Titareva G., Bahtejeva I., Kombarova T., Kravchenko T., Mokrievich A., Dyatlov I. The comparative virulence of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* for vaccinated laboratory animals. *Microorganisms*. 2020; 8(9):1403. DOI: 10.3390/microorganisms8091403.
25. Colquhoun D.J., Duodu S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet. Res.* 2011; 42(1):47. DOI: 10.1186/1297-9716-42-47.
26. Meyer G.R., Lowe G.J., Gilmore S.R., Bower S.M. Disease and mortality among Yesso scallops *Patinopecten yessoensis* putatively caused by infection with *Francisella halioticida*. *Dis. Aquat. Organ.* 2017; 125(1):79–84. DOI: 10.3354/dao03130.
27. Soto E., Griffin M.J., Morales J.A., Calvo E.B., de Alexandre Sebastião F., Porras A.L., Viquez-Rodríguez X., Reichley S.R., Rosser T.G., Ware C., Byrne B.A., García J.C., LaFrentz B.R., Camus A.C. *Francisella marina* sp. nov., etiologic agent of systemic disease in cultured spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) in Central America. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018; 84(16):e00144–18. DOI: 10.1128/AEM.00144-18.
28. Respicio-Kingry L.B., Byrd L., Allison A., Brett M., Scott-Waldron C., Galliher K., Hannah P., Mead P., Petersen J.M. Cutaneous infection caused by a novel *Francisella* sp. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(10):3456–60. DOI: 10.1128/JCM.01105-13.
29. Whitten T., Bjork J., Neitzel D., Smith K., Sullivan M., Scheffel J. Notes from the field: *Francisella tularensis* type B infection from a fish hook injury – Minnesota, 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2017; 66(7):194. DOI: 10.15585/mmwr.mm6607a3.
30. Feldman K.A., Ensore R.E., Lathrop S.L., Matyas B.T., McGuill M., Schrieffer M.E., Stiles-Enos D., Dennis D.T., Petersen L.R., Hayes E.B. An outbreak of primary pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345(22):1601–6. DOI: 10.1056/NEJMoa011374.
31. Matyas B.T., Nieder H.S., Telford S.R. 3rd. Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard: clinical, epidemiologic, and ecological characteristics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1105:351–77. DOI: 10.1196/annals.1409.013.

Authors:

Evseeva V.V., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Kravchenko T.B., Borzilov A.I., Kombarova T.I., Mironova R.I., Timofeev V.S. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology. 24, "Block A" Territory, Obolensk, Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Krasavina N.Yu., Bazarova G.Kh., Rozhdestvensky E.N. Altai Plague Control Station. 2 Zavodskaya St., Gorno-Altai, Altai Republic, 649002, Russian Federation. E-mail: chumagorny@mail.ru.

Об авторах:

Евсеева В.В., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Кравченко Т.Б., Борзилов А.И., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Тимофеев В.С. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24. E-mail: info@obolensk.org.

Красавина Н.Ю., Базарова Г.Х., Рождественский Е.Н. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Республика Алтай, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chumagorny@mail.ru.