

DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-134-144

УДК 579.841.95:579.25

Е.А. Нарышкина, Н.А. Осина, С.Д. Катышев, Я.М. Краснов, Н.А. Шарапова, А.В. Федоров,
А.Д. Катышев, О.Ю. Ляшова, А.В. Осин, З.Л. Девдариани, С.А. Щербакова

Встречаемость у природных штаммов туляремии микроба генетических детерминант, ассоциированных с аттенуацией

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

Цель работы – определение генетических маркеров, ассоциированных с аттенуацией (делеции в RD-18, RD-19, единичные мутации), у природных штаммов возбудителя туляремии. **Материалы и методы.** В работе использованы 107 штаммов *Francisella tularensis* из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, а также 1077 геномов *F. tularensis* из базы данных NCBI GenBank. Культивирование осуществляли на чашках Петри с FT-агаром (ФБУН ГНЦ ПМБ), pH 7,2, посевы инкубировали в течение 36–48 ч при температуре (37±1) °C. Сборку чернового генома осуществляли с помощью пакета программ Unicycler v.0.4.7. С использованием программы snippy v.4.6.0 получена матрица из коровых SNPs. Дендрограмму получали в программе PhyML методом Likelihood с моделью замен GTR. **Результаты и обсуждение.** Среди изученных штаммов туляремии микроба выявлено 11 эритромицин-резистентных штаммов *F. tularensis* филогенетических групп B.12 B.24 и B.12 B.20, содержащих делеции в областях RD-18 и RD-19. Также определены эритромицин-резистентные и эритромицин-чувствительные культуры патогена групп B.12 B.24, B.12 B.20, B.12 B.39 и B.4, B.6 B.10, B.6 B.7 соответственно, имеющие делецию только в области RD-18 – 11 штаммов, и только в RD-19 – 8. Из 11 культур, имеющих делеции в обеих областях, 9 относились к филогенетической группе B.12 B.24 и формировали отдельный кластер, оставшиеся две – к B.12 B.20. Для кластера таких штаммов характерно наличие семи уникальных мутаций, ассоциированных с формированием липополисахарида, метаболизмом ароматических соединений и размножением в макрофагах. У штаммов группы B.12 B.24 выявлены три дополнительные специфические мутации. Нами определены 29 штаммов возбудителя туляремии (вакцинные, их производные и природные), несущие в разном количестве генетические маркеры, ассоциированные с аттенуацией.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, генетические маркеры, ассоциированные с аттенуацией полиморфные нуклеотиды, области дифференциации RD-18 и RD-19, вакцинные штаммы, филогенетическая линия.

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

Для цитирования: Нарышкина Е.А., Осина Н.А., Катышев С.Д., Краснов Я.М., Шарапова Н.А., Федоров А.В., Катышев А.Д., Ляшова О.Ю., Осин А.В., Девдариани З.Л., Щербакова С.А. Встречаемость у природных штаммов туляремии микроба генетических детерминант, ассоциированных с аттенуацией. Проблемы особо опасных инфекций. 2025; 2:134–144. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-134-144
Поступила 19.05.2025. Принята к публикации 28.05.2025.

E.A. Naryshkina, N.A. Osina, S.D. Katyshev, Ya.M. Krasnov, N.A. Sharapova, A.V. Fedorov,
A.D. Katyshev, O.Yu. Lyashova, A.V. Osin, Z.L. Devdariani, S.A. Shcherbakova

Occurrence of Genetic Determinants Associated with Attenuation in Wild-Type Strains of the Tularemia Microbe

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

Abstract. The aim of our work was to determine genetic markers associated with attenuation (deletions in RD-18, RD-19 positions, single mutations) in natural strains of the causative agent of tularemia. **Materials and methods.** The work used 107 *Francisella tularensis* strains from the State Collection of Pathogenic Bacteria of the Russian Anti-Plague Institute “Microbe”, as well as 1077 *F. tularensis* genomes provided by the NCBI GenBank database. Cultivation was carried out on Petri dishes with FT-agar (State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology), pH 7.2; the cultures were incubated for 36–48 h at a temperature of (37±1) °C. The draft genome was assembled using the Unicycler v.0.4.7 software package. The snippy v.4.6.0 program was used to obtain a matrix of core SNPs. The dendrogram was drawn in the PhyML program using the Likelihood method with the GTR substitution model. **Results and discussion.** Among the studied strains of tularemia microbe, eleven erythromycin-resistant strains of *F. tularensis* of the phylogenetic groups B.12 B.24 and B.12 B.20 were identified, containing deletions in the RD-18 and RD-19 regions. Erythromycin-resistant and erythromycin-sensitive cultures of the pathogen of the groups B.12 B.24, B.12 B.20, B.12 B.39 and B.4, B.6 B.10, B.6 B.7, respectively, were also identified, having a deletion only in the RD-18 region – 11 strains, and only in RD-19 – 8. Of the 11 cultures with deletions in both regions, in 9 cases the strains belonged to the phylogenetic group B.12 B.24 and formed a separate cluster, the remaining two – to B.12 B.20. The cluster of such strains is characterized by the presence of seven unique mutations associated with the formation of lipopolysaccharide, metabolism of aromatic compounds and reproduction in macrophages. Three additional specific mutations have been identified for the B.12 B.24 group strains. We have identified 29 strains of the tularemia pathogen (vaccine ones, their derivatives and natural ones), carrying genetic markers associated with attenuation to varying degrees.

Key words: *Francisella tularensis*, genetic markers, attenuation-associated polymorphic nucleotides, RD-18 and RD-19 differentiation regions, vaccine strains, phylogenetic lineage.

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

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

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

Citation: Naryshkina E.A., Osina N.A., Katyshev S.D., Krasnov Ya.M., Sharapova N.A., Fedorov A.V., Katyshev A.D., Lyashova O.Yu., Osin A.V., Devdariani Z.L., Shcherbakova S.A. Occurrence of Genetic Determinants Associated with Attenuation in Wild-Type Strains of the Tularemia Microbe. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2025; 2:134–144. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-134-144
Received 19.05.2025. Accepted 28.05.2025.

Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>
Osina N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>
Katyshev S.D., ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-7575-653X>
Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>
Sharapova N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>
Fedorov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Katyshev A.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8260-4670>
Lyashova O.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1332-9580>
Osin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5308-0022>
Devdariani Z.L., ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8528-1933>
Shcherbakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Возбудитель туляремии – факультативная внутриклеточная бактерия *Francisella tularensis*, которая вызывает сезонные вспышки или спорадические случаи среди людей и других млекопитающих [1]. Вид *F. tularensis* включает четыре подвида: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*, – каждый из которых имеет различные биохимические характеристики, географическое распространение и вирулентность [2]. При распространении возбудителя практически на всей территории страны эпидемическая ситуация по туляремии в Российской Федерации остается напряженной: ежегодно регистрируются случаи заболевания человека и эпизоотической активности на территории от 51 до 67 субъектов страны [3]. В связи с этим остро стоит вопрос профилактики туляремии, которую в России осуществляют при помощи лицензированной живой туляреминой вакцины из штамма *Francisella tularensis* 15 (линия НИИЭГ), которая является одним из наиболее эффективных профилактических препаратов, создающих стойкий специфический иммунитет [4–6].

Проведенные ранее исследования показали, что вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производный LVS имеют в геноме ряд отличий. По данным отечественных и зарубежных авторов, аттенуированные штаммы несут делецию размером 1480 п.н. в области дифференциации RD-18, включающей гены *FTT0918-0919*, отвечающие за синтез липопroteина, а также 539 п.н. – RD-19, содержащие гены *pilA* и *pilE*, кодирующие пили IV типа, и относятся к филогенетической группе B.12 B.24 [7–14].

Ранее нами установлены специфичные мутации для вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS: C3113T – в гене *AAX59_01085*, G697A – *AAX59_02630*, C226T – *AAX59_03990*, G246T – *AAX59_05100*, T491G – *AAX59_09600* (нумерация генов по последовательности *F. tularensis* OR96-0246, GenBank NCBI № GCA_001044315.2) [7].

В то же время у ряда природных штаммов возбудителя туляремии отмечено отсутствие одной из указанных областей: RD-18 – SVA T7 (FSC 074, выделен от зайца, Швеция, 1974 г.), SVA T7K (FSC 069, получен путем пассажа SVA T7), RD-19 – FAM SR (FSC 014, неизвестное происхождение, 1960 г.), CCUG 33391 (FSC 158, выделен от человека, Норвегия) [15]. В наших исследованиях также был обнаружен природный штамм *F. tularensis* MAX

(LVKZ01000001), несущий делецию только в области RD-19 [7]. Указанные штаммы туляреминой микроба, отличающиеся по наличию делеций в областях дифференциации RD-18 и RD-19, выделены в 1960–1970-е гг. Данных о циркуляции подобных культур возбудителя туляремии в более поздние сроки нет. Представляется актуальным также оценить специфичность указанных выше мутаций на более широкой выборке штаммов возбудителя туляремии.

Цель работы – определение генетических маркеров, ассоциированных с аттенуацией (делеции в RD18, RD19, единичные мутации), у природных штаммов возбудителя туляремии.

Материалы и методы

В работе использовали 107 штаммов *F. tularensis* из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, а также нуклеотидные последовательности полных геномов 1077 штаммов *F. tularensis*, представленные в базе данных GenBank NCBI.

Культивирование осуществляли на чашках Петри с FT-агаром (ФБУН ГНЦ ПМБ), pH 7,2, посе- вы инкубировали в течение 36–48 ч при температуре (37±1) °C. Бактериальную взвесь клеток готовили в 2 мл 0,9 % раствора хлорида натрия по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует 5·10⁹ м.к./мл для *F. tularensis*. Выделение геномной ДНК проводили набором EasyPure® Bacteria Genomic DNA Kit в соответствии с рекомендациями производителя. Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MGI (DNBSEQ-G50, Китай) с использованием наборов, рекомендованных производителем оборудования для пробоподготовки и парноконцевого секвенирования (PE150) фрагментов ДНК. Сборка чернового генома осуществлялась с помощью пакета программ Unicycler v.0.4.7 [16].

Путем попарного выравнивания нуклеотидной последовательности каждого из 1184 геномов штаммов *F. tularensis* на референсный геном штамма *F. tularensis* OR96-0246 (CP011488) с помощью программы snippy v.4.6.0 [<https://github.com/tseemann/snippy>] получена матрица из 12 336 коровых SNPs. Дендрограмму получали в программе PhyML мето-

дом Likelihood с моделью замен GTR. Поиск уникальных SNPs осуществляли при помощи программы (скрипта), написанной на языке программирования Python 3.10.8, суть которой заключается в работе с отчетами, полученными ранее программой snippy v.4.6.0.

Геномный анализ осуществляли с помощью программ MEGA 10 (<https://www.megasoftware.net/>), Ugene 44.0 (<http://ugene.net/ru/>), алгоритма BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Результаты и обсуждение

Наличие делеций в областях дифференциации RD-18 и RD-19 у исследованных штаммов возбудителя туляремии. На первом этапе нами проведен детальный анализ представленных в базе данных GenBank NCBI геномов штаммов *F. tularensis*. В результате проделанной работы определены 15 штаммов, у которых делетированы либо обе указанные области, либо только одна из них (табл. 1).

Наличие делеций, аналогично, как у вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выявлено у четырех культур возбудителя туляремии: LVS, 08-1281, NR-28537, Tul-161_KZ, – которые в большинстве случаев являются потомками вакцинного штамма, за

исключением культуры 08-1281, происхождение которой до конца неизвестно.

Помимо этого, у шести штаммов *F. tularensis*: B-8367, B-8366, B-8365, CHUGA-Ft70, FDC186, FSC937 – определено наличие делеции только в области RD-18. Источниками выделения этих штаммов являлись человек, полевая мышь, ондатра, вода открытых водоемов. У четырех культур патогена: MAX, 242, FDC179, FDC184, – выделенных от человека и зайца-русака, обнаружена делеция только в области RD-19.

На следующем этапе исследований мы провели полногеномное секвенирование 107 природных штаммов *F. tularensis* из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб». Из 107 изученных штаммов в 93 случаях ни одной из указанных делеций не обнаружено.

У четырех штаммов *F. tularensis*: M-2, M-45, M-49, M-58 – выявлена делеция только в области RD-18, при этом источниками выделения этих культур служили водяная крыса и серый хомячок на территории Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, восточная полевка и серая крыса – на территории Дальневосточного федерального округа (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

Природные штаммы *F. tularensis holarctica*, у которых выявлено наличие делеций в областях дифференциации RD-18 и/или RD-19
Wild-type strains of *F. tularensis holarctica* that have been found to contain deletions in the differentiation regions RD-18 and/or RD-19

Обозначение штамма Designation of the strain	Характеристика Characteristic	Делеция в Deletion in		Номер в NCBI GenBank (VGARus) NCBI GenBank Number (VGARus)
		<i>lpp</i> (RD-18)	<i>pilAE</i> (RD-19)	
1	2	3	4	5
15 НИИЭГ 15 NPIEG	Вакцинный штамм (производный штамма 15) Vaccine strain (strain 15 derivative)	+	+	GCA_001611815.4
LVS	Вакцинный штамм (производный штамма 15) Vaccine strain (strain 15 derivative)	+	+	GCA_000833335.1
LVS	Вакцинный штамм (производный штамма 15) Vaccine strain (strain 15 derivative)	+	+	GCA_000009245.1
08-1281	РФ, 2008 г., неизвестное происхождение Russia, 2008, unknown origin	+	+	GCA_009815765.1
NR-28537	США, 2020 г., производный штамма LVS USA, 2020, strain LVS derivative [17]	+	+	GCA_014931515.1
Tul-161_KZ	Казахстан, 2021 г., производный штамма 15 НИИЭГ Kazakhstan, 2021, strain 15 NPIEG derivative [18]	+	+	GCA_017090005.1
M-1	Саратовская обл., 1939 г., человек Saratov Region, 1939, human	+	+	(micr028360)
M-18	США, 1920 г., человек / USA, 1920, human	+	+	(micr028373)
M-26	о. Кара-Куль, 1958 г., ондатра Lake Kara-Kul, 1958, muskrat	+	+	(micr028362)
M-29	Актюбинская обл., 1966 г., водяная крыса Aktobe Region, 1966, water rat	+	+	(micr028363)
M-96	Астраханская обл., 1993 г., полевая мышь Astrakhan Region, 1993, field mouse	+	+	(micr028370)

Окончание табл. 1 / Ending of table 1

1	2	3	4	5
M-97	Астраханская обл., 1987 г., полевая мышь Astrakhan Region, 1987, field mouse	+	+	(micr028371)
B-8367	г. Хабаровск, 1975 г., человек Khabarovsk, 1975, human	+	–	GCA_010232785.1
B-8366	Приморский край, 1971 г., полевая мышь Primorsk Territory, 1971, field mouse	+	–	GCA_010232985.1
B-8365	г. Хабаровск, 1966 г., человек Khabarovsk, 1966, human	+	–	GCA_010233165.1
CHUGA-Ft70	Франция, 2016 г., человек France, 2016, human	+	–	GCA_009812665.1
FDC186	Болгария, 1962 г., ондатра / Bulgaria, 1962, muskrat	+	–	GCA_015666755.2
FSC937	Болгария, 1962 г., вода / Bulgaria, 1962, water	+	–	GCA_015666675.2
M-2	Астраханская обл., 1944 г., водяная крыса Astrakhan Region, 1944, water rat	+	–	(micr028361)
M-45	Ставропольский край, 1977 г., серый хомячок Stavropol Territory, 1977, gray hamster	+	–	(micr028366)
M-49	Бурятская АССР, 1973 г., труп восточной полевки Buryat ASSR, 1973, corpse of the eastern vole	+	–	(micr028367)
M-58	Корсаково (о. Сахалин), 1972 г., серые крысы Korsakovo (Sakhalin), 1972, gray rats	+	–	(micr028368)
242	Франция, 1947 г., заяц-русак / France, 1947, hare	–	+	GCA_009815675.1
FDC179	Болгария, 1998 г., заяц-русак / Bulgaria, 1998, hare	–	+	GCA_015666855.2
FDC184	Болгария, 2003 г., человек / Bulgaria, 2003, human	–	+	GCA_015666765.2
MAX	Россия, 1928 г., человек / Russia, 1928, human	–	+	GCA_001696955.1
M-41	Ставропольский край, 1961 г., блохи с трупа обыкновенной полевки Stavropol Territory, 1961, fleas from the corpse of the common vole	–	+	(micr028364)
M-44	Ставропольский край, 1977 г., лесная мышь Stavropol Territory, 1977, wood mouse	–	+	(micr028365)
M-62	Тургайская обл., 1972, водяная крыса Turgay Region, 1972, water rat	–	+	(micr028369)
M-128	Ставропольский край, 2012 г., иксодовые клещи Stavropol Territory, 2012, ixodid ticks	–	+	(micr028372)

Для еще четырех штаммов туляремияного микроба: M-41, M-44, M-62, M-128 – характерна делеция в области RD-19, эти штаммы выделены от лесной мыши, обыкновенной полевки, водяной крысы, иксодовых клещей на территориях Северо-Кавказского федерального округа Российской Федерации и Казахстана.

Особый интерес представляют шесть штаммов *F. tularensis*: M-1, M-18, M-26, M-29, M-96, M-97, – которые содержат делеции в обеих областях – RD-18 и RD-19. Эти штаммы выделены от человека, ондатры, водяной крысы, полевой мыши на территории США и России (Приволжский и Южный федеральные округа).

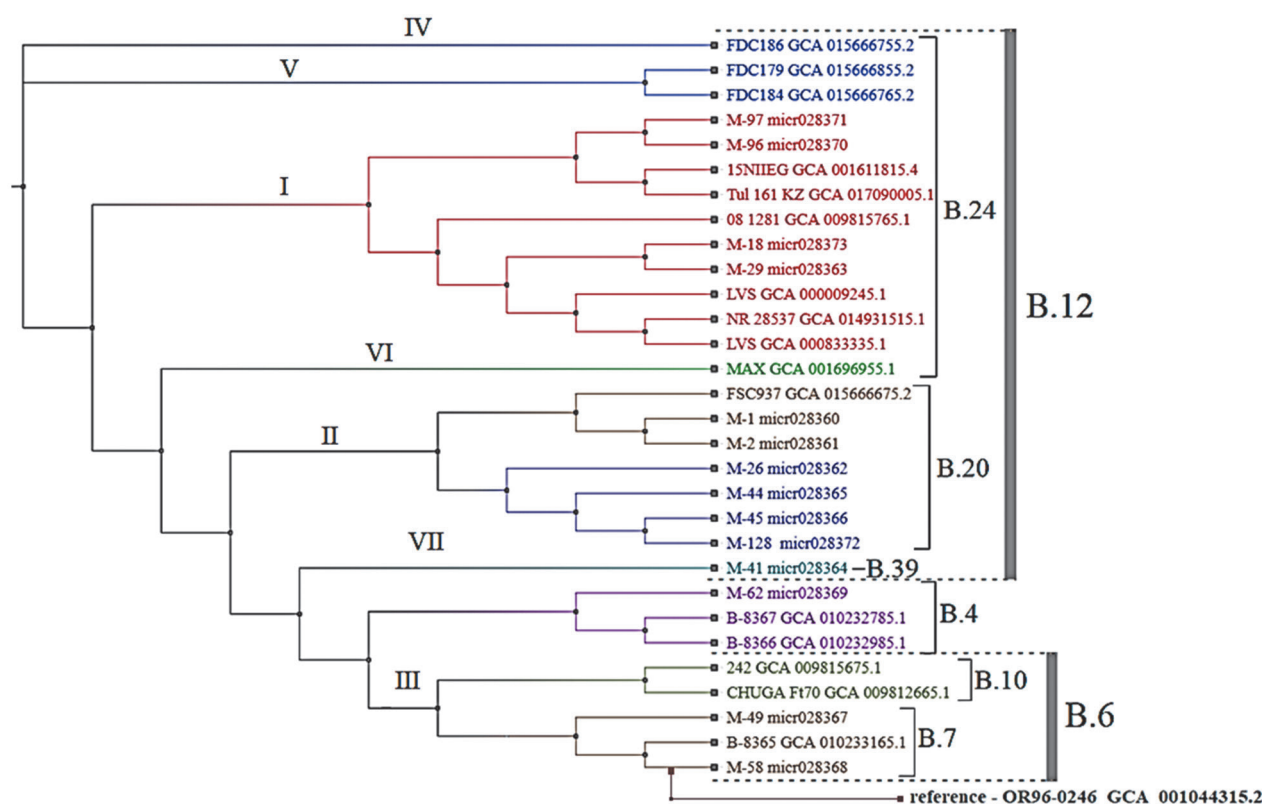
Нуклеотидные последовательности полных геномов всех штаммов, содержащих делеции в областях RD-18 и/или RD-19, мы депонировали в российскую генетическую базу данных VGenus (<http://genomenvpn.crie.ru/>) (табл. 1).

Таким образом, среди изученных 1184 штаммов туляремияного микроба выявлено одиннадцать, ко-

торые содержат делеции в областях RD-18 и RD-19, из них четыре – вакцинные и их производные, а семь – природные, выделенные от различных источников с 1920 по 1993 г. на территории Российской Федерации и США. Также определено десять культур патогена, имеющих делецию только в области RD-18, и восемь – только в области RD-19. Штаммы возбудителя туляремии, несущие делецию только в одной из указанных областей, получены на территории Российской Федерации, Болгарии и Франции от различных носителей с 1928 по 2016 г.

Филогенетическая принадлежность штаммов туляремияного микроба, у которых выявлены делеции в областях RD-18 и RD-19. В данной работе, основываясь на выявленных ранее единичных мутациях, мы определили филогенетическое положение штаммов возбудителя туляремии, в которых ранее обнаружили делеции в одной или нескольких областях дифференциации (рисунок).

Большинство изученных штаммов *F. tularensis* (14 из 29 культур), несущих делецию в RD-18 и/или



Фрагмент дендрограммы, построенной с использованием алгоритма Maximum Likelihood по данным матрицы коровых SNPs от 1184 штаммов *F. tularensis*, содержащий группу из 28 штаммов *F. tularensis*, имеющих делецию в областях RD-18 и/или RD-19

A fragment of a dendrogram constructed using the Maximum Likelihood algorithm based on the core SNP matrix data from 1184 *F. tularensis* strains, containing a group of 28 *F. tularensis* strains with a deletion in the RD18 and/or RD19 regions

RD-19, принадлежали к филогенетической линии B.12 B.24, к которой относятся культуры голарктического подвида эритромицин-устойчивого биовара. Штаммы этой линии включали четыре кластера: I, IV, V, VI.

Наиболее многочисленным являлся кластер I, который представлен штаммами патогена, имеющими делеции в RD-18 и RD-19: вакцинные 15 НИИЭГ, LVS и их производные; природные 08-1281, M-18, M-29, M-96, M-97. Оставшиеся кластеры включают единичные штаммы: V и VI – *F. tularensis* FDC179, FDC184 и MAX соответственно, содержащие делецию только в RD-19; IV – *F. tularensis* FDC186, имеющий делецию только в RD-18.

Из оставшихся 15 культур патогена, несущих делеции в областях дифференциации RD-18 и RD-19, семь принадлежат к филогенетической линии B.12 B.20: *F. tularensis* FSC937, M-1, M-2, M-26, M-44, M-45, M-128 (кластер II). Все эти штаммы – природные и преимущественно имели делецию только в одной из областей. Исключения составили культуры M-1 и M-26, несущие делеции в обеих областях.

Только один штамм – *F. tularensis* M-41 RD-18⁻ – относился к филогенетической линии B.12 B.39 (кластер VII).

Заслуживает внимания факт принадлежности ряда природных штаммов возбудителя туляремии, содержащих делеции в RD-18 или RD-19, к филогенетическим линиям B.4, B.6 B.7, B.6 B.10 (кла-

стер III), к которым принадлежат эритромицин-чувствительные штаммы голарктического подвида туляремиального микроба.

Большинство исследованных, дефектных по областям дифференциации RD-18, RD-19, штаммов возбудителя туляремии этих филогенетических групп имели делецию только в области RD-18: B.4 – B-8367, B-8366; B.6 B.10 – CHUGA Ft70; B.6 B.7 – M-49, M-58, B-8365. Оставшиеся две культуры *F. tularensis*: M-62 (B.4) и 242 (B.6 B.10) – имели делецию в RD-19.

Таким образом, все исследованные штаммы туляремиального микроба, несущие делеции в областях RD-18 и/или RD-19, принадлежали к шести филогенетическим линиям: B.12 B.24, B.12 B.20, B.12 B.39, B.4, B.6 B.7, B.6 B.10. При этом из 11 культур, имеющих делеции в обеих областях, девять относились к филогенетической группе B.12 B.24, где формировали отдельный кластер I, две – к B.12 B.20. Штаммы, дефектные по одной из указанных областей, принадлежали ко всем обозначенным выше филогенетическим линиям.

Наличие у штаммов туляремиального микроба, имеющих делеции в RD-18 и RD-19 областях, полиморфных нуклеотидов, специфичных для вакцинных штаммов. Ранее нами описаны пять единичных полиморфных нуклеотидов (SNPs), уникальных для вакцинных штаммов. Увеличение количества штаммов, использованных в работе, потребовало про-

ведения повторного анализа и поиска уникальных мутаций, специфичных для вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS. В результате обнаружено дополнительно шесть новых SNPs (табл. 2).

Из одиннадцати полиморфных нуклеотидов шесть приводят к замене аминокислоты, один – к сдвигу рамки считывания, остальные – синонимичные мутации.

Мутация в гене *AAX59_01085*, кодирующем фосфорибозил-формилглицинамидин синтазу PurL, функционирует на ранней стадии биосинтеза пуринов [19]. Есть данные, что при мутациях генов, принадлежащих к пуриновому пути, происходит снижение роста/вирулентности человеческих бактериальных патогенов. Например, у мутанта *Brucella melitensis* по гену *purE* ослабевает рост в клетках человека [20]. Мутанты пуринового пути у *Francisella tularensis* [21], а также у *Bacillus anthracis* [22] и *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* [23] демонстрировали перспективность для индукции иммунологической защиты против заражения диким типом.

Гликозилтрансферазы (ген *AAX59_02355*) способствуют вирулентности многочисленных патогенов либо путем содействия синтезу полисахаридной капсулы [24], либо путем изменения углеводного компонента липополисахарида (ЛПС) [25]. Поэтому вероятно, что локус может способствовать ослаблению вирулентности за счет потери внеклеточного углевода. Отмечено, что в ЛПС вакцинного штамма LVS отсутствует галактозамин-1-фосфат, в отличие от ЛПС другого штамма типа В [26]. Наблюдаемое различие вполне может быть связано с инактивацией гена [19].

Предполагается, что ген *AAX59_04735*, кодирующий 3-оксоацил-[ацил-переносящий-белок] синтазу, может быть важен для некоторых этапов естественного жизненного цикла бактерии, включая вирулентность. Он является частью пути удлинения насыщенных жирных кислот на основе сильных гомологий с 3-оксоацил-(ацил-переносящий белок) синтазами III, кодируемыми *fabH*, многочисленных видов бактерий [19].

Таблица 2 / Table 2

Выявленные SNPs, характерные для вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS
Identified SNPs characteristic of *F. tularensis* vaccine strains 15 NIEG and LVS

Позиция SNP от старт-кодона SNP position from start codon	Замены в аминокислотной последовательности Substitutions in amino acid sequence	Наименование гена по <i>F. tularensis holarctica</i> OR96-0246 (CP011488) Gene name by <i>F. tularensis holarctica</i> OR96-0246 (CP011488)	Продукт Product
Выявленные ранее специфичные SNPs [5] Specific SNPs identified earlier			
C3115T	T1038I	<i>AAX59_01085, purL</i>	Фосфорибозил-формилглицинамидин синтаза Phosphoribosyl-formylglycinamide synthase
G697A	A233T	<i>AAX59_02630</i>	Неохарактеризованный консервативный мембранный белок Uncharacterized conserved secreted membrane protein
G245T	R82I	<i>AAX59_05100</i>	2-кето-4-пентеноат гидратаза 2-keto-4-pentenoate hydratase
T491G	I164S	<i>AAX59_09600</i>	Ацилтрансфераза биосинтеза липида А Acyltransferase for lipid A biosynthesis
C225T	–	<i>AAX59_03990, fmt</i>	Метионил-тРНК формилтрансфераза Methionyl-tRNA formyltransferase
Выявленные в данной работе специфичные SNPs Specific SNPs identified within the frames of the current work			
GT269T	Сдвиг рамки считывания, другая последовательность после 90 АМК Frame shift, another sequence after 90 amino acid	<i>AAX59_00075</i>	Потенциал-управляемый H(+)/2Cl(–) транспортер ClcA Voltage-gated H(+)/2Cl(–) exchange transporter ClcA
A236T	Q80L	<i>AAX59_02355</i>	Гликозилтрансфераза Glycosyltransferase
C210T	–	<i>AAX59_03910</i>	Гипотетический белок Hypothetical protein
C537A	–	<i>AAX59_07355</i>	Формил-трансфераза Formyltransferase
G240A	–	<i>AAX59_08060</i>	Гипотетический белок Hypothetical protein
A889C Определяет B.24 Determines B.24 [14]	N297H	<i>AAX59_04735</i>	3-оксоацил-[ацил-переносящий-белок] синтаза 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASIII

2-кето-4-пентеноат гидратаза (*AAX59_05100*) предположительно участвует в катаболизме ароматических соединений. В условиях голода ароматические соединения могут служить альтернативным источником углерода, а потеря способности катаболизма этих соединений может ограничивать рост бактерий в организме хозяина [19].

Мутация в гене *AAX59_09600*, кодирующем ацилтрансферазу биосинтеза липида А в структуре липополисахарида, может сказываться на нарушении процесса синтеза и, как следствие, на структуре ЛПС. Лабораторные штаммы *F. tularensis* с измененной структурой ЛПС отличаются от природных изолятов *F. tularensis* по способности размножаться в макрофагах и в органах экспериментальных животных [27].

Сдвиг рамки считывания в гене *AAX59_00075*, кодирующем антипортер $Cl^{-}:H^{+}$, может способствовать нарушению выживаемости при низком pH

либо другом стрессе, встречающемся в фагосомах макрофагов. Было показано, что гомолог этого гена в *Escherichia coli* важен для выживания бактерий в среде с низким pH (желудочной). Он работает совместно с одной из систем экстремальной кислотоустойчивости [19].

На следующем этапе мы оценили наличие обнаруженных специфичных для вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS единичных полиморфизмов (табл. 3) у выявленных штаммов возбудителя туляремии, дефектных по RD-18 и/или RD-19. Установлено, что все 11 мутаций выявлены у штаммов кластера I, куда входят *F. tularensis* 15 НИИЭГ, LVS и их производные, а также природные штаммы патогена 08-1281, М-18, М-29, М-96, М-97. Все эти штаммы принадлежат к филогенетической линии В.12 В.24.

Четыре мутации в генах *AAX59_01085* (С3113Т), *AAX59_02630* (G697А), *AAX59_03990* (С225Т),

Таблица 3 / Table 3

Наличие единичных мутаций, специфичных для вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS у штаммов туляремийного микроба, дефектных по областям RD-18 и RD-19

The presence of single mutations specific to vaccine strains of *F. tularensis* 15 НИИЭГ and LVS in strains of the tularemia microbe defective in the RD-18 and RD-19 regions

Штаммы Strains	Кластер Cluster	Филогенетическая группа Phylogenetic group	Наличие делеций в RD-18/RD-19 Presence of deletions in RD-18/RD-19	C3113T_ <i>AAX59_01085</i>	G697A_ <i>AAX59_02630</i>	C225T_ <i>AAX59_03990</i>	G245T_ <i>AAX59_05100</i>	A890C_ <i>AAX59_04735</i>	T491G_ <i>AAX59_09600</i>	GT269T_ <i>AAX59_00075</i>	G240A_ <i>AAX59_08060</i>	C537A_ <i>AAX59_07355</i>	A236T_ <i>AAX59_02355</i>	C210T_ <i>AAX59_03910</i>
LVS, NR-28537, 15 НИИЭГ, Tul-161, 08-1281, М-18, М-29, М-96, М-97	I	B.12 B.24	RD-18 ⁺ /RD-19 ⁺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-1, М-26	II	B.12 B.20	RD-18 ⁺ /RD-19 ⁺	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
M-2, М-45, FSC937		B.12 B.20	RD-18 ⁺ /RD-19 [–]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
M-44, М-128		B.12 B.20	RD-18 [–] /RD-19 ⁺	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
B-8367, B-8366	III	B.4	RD-18 ⁺ /RD-19 [–]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
M-62		B.4	RD-18 [–] /RD-19 ⁺	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
242		B.6 B.10	RD-18 [–] /RD-19 ⁺	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CHUGA-Fi70		B.6 B.10	RD-18 ⁺ /RD-19 [–]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
B-8365, М-58, М-49		B.6 B.7	RD-18 ⁺ /RD-19 [–]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FDC186	IV	B.12 B.24	RD-18 ⁺ /RD-19 [–]	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–
FDC179, FDC184	V	B.12 B.24	RD-18 [–] /RD-19 ⁺	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–
MAX	VI	B.12 B.24	RD-18 [–] /RD-19 ⁺	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
M-41	VII	B.12 B39	RD-18 [–] /RD-19 ⁺	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: серым цветом выделены положительные результаты, сиреневым отмечены штаммы, несущие делеции в обеих областях (RD-18⁺/RD-19⁺), розовым – только в одной области RD-18 (RD-18⁺/RD-19[–]), зеленым – RD-19 (RD-18[–]/RD-19⁺), ярко-розовым отмечена мутация A890C в гене *AAX59_04735*, характерная для штаммов туляремийного микроба филогенетической линии B.12 В.24 [15].

Note: positive results are highlighted in gray color, strains carrying deletions in both regions (RD-18⁺/RD-19⁺) are marked in purple, only in one region RD-18 (RD-18⁺/RD-19[–]) are marked in pink, RD-19 (RD-18[–]/RD-19⁺) – in green, and the A890C mutation in the gene *AAX59_04735*, characteristic of strains of the tularemia microbe of the phylogenetic line B.12 В.24 [15], is marked in bright pink.

AAX59_04735 (A890C) обнаружены у трех штаммов возбудителя туляремии, принадлежащих к филогенетической линии B.12 B.24: кластер IV – FDC186 (RD-18⁺/RD-19⁻), кластер V – FDC179, FDC184 (RD-18⁺/RD-19⁺). Только одна мутация, специфичная для филогенетической линии B.12 B.24 – в гене *AAX59_04735* (A890C), детектировалась у штамма MAX этой филогенетической линии (кластер VI), дефектного по области RD-18 (RD-18⁺/RD-19⁻).

У всех остальных исследованных штаммов, несущих делеции как в обеих областях RD-18 и RD-19, так и в одной из них, и принадлежащих к филогенетическим группам B.12 B.20, B.12 B.39, B.4, B.6 B.7, B.6 B.10, ни одного из указанных SNPs, специфичных для вакцинных штаммов, не обнаружено. Полученные результаты позволяют предположить возможность использования единичных полиморфизмов в генах *AAX59_01085* (C3113T), *AAX59_02630* (G697A), *AAX59_03990* (C225T) как дополнительных маркеров принадлежности к филогенетической группе B.12 B.24.

Особый интерес вызывают мутации в генах *AAX59_05100* (G245T), *AAX59_09600* (T491G), *AAX59_03910* (C210T), *AAX59_00075* (GT269T), *AAX59_08060* (G240A), *AAX59_07355* (C537A), *AAX59_02355* (A236T), которые выявлены только у штаммов кластера I, несущего делеции в обеих областях дифференциации. Возможно, появление этих мутаций сопровождает процесс аттенуирования культур туляремиального микроба, как это происходит у вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ, LVS.

Остается актуальным поиск специфичных мутаций у культур туляремиального микроба, дефектных по областям дифференциации RD-18 и/или RD-19, которые принадлежат к другим филогенетическим группам.

Таким образом, выявлено 11 мутаций, специфичных для вакцинных штаммов туляремиального микроба, которые в полной мере встречаются у штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ, LVS и их производных, а также природных – 08-1281, M-18, M-29, M-96, M-97. Три из этих мутаций: *AAX59_01085* (C3113T), *AAX59_02630* (G697A), *AAX59_03990* (C225T) – в дополнение к *AAX59_04735* (A890C) характерны практически для всех дефектных по областям RD-18 и RD-19 штаммов возбудителя туляремии, относящихся к филогенетической линии B.12 B.24 (12 из 13 штаммов). Семь мутаций: *AAX59_05100* (G245T), *AAX59_09600* (T491G), *AAX59_03910* (C210T), *AAX59_00075* (GT269T), *AAX59_08060* (G240A), *AAX59_07355* (C537A), *AAX59_02355* (A236T) – характерны только для штаммов возбудителя туляремии, имеющих делеции в областях RD-18 и RD-19. Эти мутации могут приводить к изменению синтеза липополисахарида возбудителя, перестройке метаболических путей ароматических соединений и защитных систем патогена, что, вероятно, играет определенную роль в аттенуировании штаммов туляремиального микроба голарктического подвида.

Подводя итоги, отметим, что для профилактики туляремии в СССР была получена живая туляремиальная вакцина на основе аттенуированного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ голарктического подвида [28]. В США на основе этой культуры создан вакцинный штамм *F. tularensis* LVS [29].

Исследования, проведенные зарубежными исследователями и нами, показали, что вакцинные штаммы туляремиального микроба относятся к филогенетической группе B.12 B.24 и несут в геноме делеции в областях дифференциации RD-18, RD-19 и несколько однонуклеотидных мутаций [7–10, 19]. В то же время у ряда природных штаммов возбудителя туляремии отмечена возможность наличия делеций только в одной из указанных областей дифференциации [7, 8]. Однако таксономическое положение этих штаммов не определено. Данные о встречаемости генетических маркеров, ассоциированных с аттенуированием, у штаммов туляремиального микроба всех подвидов получены при изучении незначительного количества культур патогена.

В связи с этим нами проведена оценка наличия указанных мутаций на широкой выборке штаммов возбудителя, нуклеотидные последовательности которых представлены в настоящее время в базе данных GenBank NCBI и получены нами при изучении штаммов патогена из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», а также определение филогенетического положения найденных культур, дефектных по областям дифференциации RD-18, RD-19.

Среди исследованных 1184 штаммов туляремиального микроба всех подвидов делеции в областях дифференциации RD-18 и/или RD-19 отмечены только у 29 культур патогена, принадлежащих к голарктическому подвиду. Среди них вакцинные и их производные (4), а также семь природных штаммов были дефектны по обеим областям дифференциации (RD-18⁺, RD-19⁺), десять – по RD-18 (RD-18⁺, RD-19⁻), восемь – по RD-19 (RD-18⁻, RD-19⁺). Причины возникновения этих мутаций не ясны. Они могут быть связаны либо с негативными воздействиями на культуру возбудителя при его персистенции в носителе или переносчике, либо при ее лиофилизации, поскольку эти штаммы не пассировались на плотных питательных средах, как это было с вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Все это указывает на то, что ряд штаммов возбудителя туляремии имеют более высокий потенциал к возникновению делеций в областях дифференциации RD-18, RD-19, который может быть связан с наличием единичных мутаций, в том числе ассоциированных с филогенетическим положением патогена.

Из одиннадцати культур возбудителя, имеющих делеции в обеих областях, девять относились к филогенетической группе B.12 B.24 и формировали отдельный кластер I (вакцинные штаммы и их производные – 4, природные – 5), две – к B.12 B.20 (все

природные). Из 10 штаммов, дефектных по RD-18, в одном случае культуры относились к группе В.12 В.24, в трех – В.12 В.20, в двух – В.4, в трех – В.6 В.7, в одном – В.6 В.10. Штаммы, имеющие делецию в области RD-19, принадлежали к группе В.12 В.24 – 3 культуры, В.12 В.20 – 2, В.12 В.39 – 1, В.4 – 1, В.6 В.10 – 1.

Хотелось бы отметить, что возникновение делеций в обеих областях дифференциации RD-18, RD-19 характерно только для эритромицин-резистентных штаммов возбудителя туляремии двух филогенетических групп: преимущественно В.12 В.24 и реже В.12 В.20, – тогда как мутации только в одной из областей встречаются как у эритромицин-резистентных культур групп В.12 В.24, В.12 В.20, В.12 В.39, так и эритромицин-чувствительных штаммов групп В.4, В.6 В.10, В.6 В.7. Полученные результаты указывают на то, что возникновение мутаций в указанных областях по отдельности – признак, характерный для более широкого ряда филогенетических групп тулярийного микроба, тогда как формирование делеций в обеих областях присуще только двум филогенетическим группам.

Для всех штаммов патогена, относящихся к филогенетической линии В.12 В.24, характерно наличие единичной замены А889С в гене *AAX59_04735*, что определяет принадлежность к данной филогенетической линии [14]. У культур патогена этой же филогенетической группы в большинстве случаев присутствуют единичные полиморфизмы *AAX59_01085* (С3113Т), *AAX59_02630* (G697А), *AAX59_03990* (С225Т), которые можно рассматривать как дополнительные маркеры этой линии.

Наибольший интерес представляют семь мутаций, характерных исключительно для штаммов филогенетической линии В.12 В.24, несущих делеции в обеих областях дифференциации RD-18, RD-19. Эти мутации затрагивают процесс формирования липополисахарида, метаболизма ароматических соединений и размножения в макрофагах и, скорее всего, наряду с делециями участвуют в процессе аттенуирования штаммов тулярийного микроба. Тот факт, что такие же мутации выявлены у природных, дефектных по обеим областям, штаммов патогена, позволяет предположить существование определенного пути аттенуации культур возбудителя туляремии по аналогии с *F. tularensis* 15 НИИЭГ/LVS, который связан с двумя типами мутаций – единичные полиморфизмы и делеции в RD-18, RD-19. В то же время выявление двух штаммов возбудителя туляремии, имеющих делеции в обеих областях дифференциации, принадлежащих к филогенетической группе В.12 В.20 и не содержащих специфичные единичные мутации для вакцинных штаммов, указывает на возможность другого пути аттенуации возбудителя, который предстоит определить.

Таким образом, нами определены 29 штаммов возбудителя туляремии, несущих в разном количестве генетические маркеры аттенуирования, среди которых эритромицин-резистентные культуры

филогенетических групп В.12 В.24 и В.12 В.20, дефектные по RD-18 и RD-19, а также эритромицин-резистентные и эритромицин-чувствительные культуры групп В.12 В.24, В.12 В.20, В.12 В.39 и В.4, В.6 В.10, В.6 В.7 соответственно, имеющие делецию только в одной из этих областей. Вакцинные штаммы, их производные и ряд природных штаммов группируются в отдельный кластер, для которого характерно наличие делеций в RD-18 и RD-19, а также семи уникальных мутаций. Для штаммов филогенетической группы В.12 В.24 определены три дополнительные специфичные мутации.

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. Karlsson E., Golovliov I., Lärkeryd A., Granberg M., Larsson E., Öhrman 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.
2. Colquhoun D.J., Larsson P., Duodu S., Forsman M. The family *Francisellaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F., editors. *The Prokaryotes. Gammaproteobacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. P. 287–314. DOI: 10.1007/978-3-642-38922-1_236.
3. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Куликалова Е.С., Холин А.В., Мазепа А.В., Борзенко М.А., Черепанова Е.А., Матвеева В.А., Транквиловский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Анализ эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по туляремии на территории Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; (1):17–29. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-17-29.
4. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2006; (2):18–24.
5. Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Олефир Ю.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (2):107–110. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110.
6. Саяпина Л.В., Хорева И.И., Байдалова Н.П., Горяев А.А., Давыдов Д.С., Поступайло В.Б., Саяпинов Л.В., Бондарев В.П. Оценка остаточной вирулентности вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ по данным многолетних наблюдений. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (1):98–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-98-102.
7. Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Альхова Ж.В., Баданин Д.В., Осин А.В., Ляшова О.Ю., Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Меркулов В.А., Олефир Ю.В., Кутырев В.В. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2):91–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97.
8. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005.
9. Jaing C.J., McLoughlin K.S., Thissen J.B., Zemla A., Gardner S.N., Vergez L.M., Bourguet F., Mabery S., Fofanov V.Y., Koshinsky H., Jackson P.J. Identification of genome-wide mutations in ciprofloxacin-resistant *F. tularensis* LVS using whole genome tiling arrays and next generation sequencing. *PLoS One*. 2016; 11(9):e0163458. DOI: 10.1371/journal.pone.0163458.
10. Samrakandi M.M., Zhang C., Zhang M., Niefeldt J., Kim J., Iwen P.C., Olson M.E., Fey P.D., Duhamel G.E., Hinrichs S.H., Cirillo J.D., Benson A.K. Genome diversity among regional populations of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* isolated from the US. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 237(1):9–17. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.008.
11. Larsson P., Svensson K., Karlsson L., Guala D., Granberg M., Forsman M., Johansson A. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(11):1725–32. DOI: 10.3201/eid1311.070603.

12. Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., Beckstrom-Sternberg J.S., Johansson A., Clare A., Buchhagen J.L., Petersen J.M., Pearson T., Vaissaire J., Dempsey M.P., Foxall P., Engelthaler D.M., Wagner D.M., Keim P. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* 2009; 191(8): 2474–84. DOI: 10.1128/JB.01786-08.
13. Karlsson E., Svensson K., Lindgren P., Byström M., Sjödin A., Forsman M., Johansson A. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of Euro Siberian tularaemia. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(2):634–45. DOI: 10.1111/1462-2920.12052.
14. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005.
15. Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 2017; 13(6):e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
16. Player R.A., Verratti K.J., Grady S.L., Beck L.C., Goodwin B.G., Earnhart C.G., Sozhamannan S. Complete genome sequence of *Francisella tularensis* live vaccine strain NR-28537 (BEI Master Cell Bank). *Microbiol. Resour. Announc.* 2020; 9(50):e01248-20. DOI: 10.1128/MRA.01248-20.
17. Shevtsov V., Kairzhanova A., Shevtsov A., Shustov A., Kalendar R., Abdrakhmanov S., Lukhnova L., Izbanova U., Ramankulov Y., Vergnaud G. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419.
18. Rohmer L., Brittnacher M., Svensson K., Buckley D., Haugen E., Zhou Y., Chang J., Levy R., Hayden H., Forsman M., Olson M., Johansson A., Kaul R., Miller S.I. Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison. *Infect. Immun.* 2006; 74(12):6895–906. DOI: 10.1128/IAI.01006-06.
19. Crawford R.M., Van De Verg L., Yuan L., Hadfield T.L., Warren R.L., Drazek E.S., Hough H.H., Hammack C., Sasala K., Polsinelli T., Thompson J., Hoover D.L. Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.* 1996; 64(6):2188–92. DOI: 10.1128/iai.64.6.2188-2192.1996.
20. Karlsson J., Prior R.G., Williams K., Lindler L., Brown K.A., Chatwell N., Hjalmarsson K., Loman N., Mack K.A., Pallen M., Popek M., Sandström G., Sjöstedt A., Svensson T., Tamas I., Andersson S.G., Wren B.W., Oyston P.C., Titball R.W. Sequencing of the *Francisella tularensis* strain Schu 4 genome reveals the shikimate and purine metabolic pathways, targets for the construction of a rationally attenuated auxotrophic vaccine. *Microb. Comp. Genomics.* 2000; 5(1):25–39. DOI: 10.1089/10906590050145249.
21. Ivánovics G., Marjai E., Dobozy A. The growth of purine mutants of *Bacillus anthracis* in the body of the mouse. *J. Gen. Microbiol.* 1968; 53(2):147–62. DOI: 10.1099/00221287-53-2-147.
22. O'Callaghan D., Maskell D., Tite J., Dougan G. Immune responses in BALB/c mice following immunization with aromatic compound or purine-dependent *Salmonella typhimurium* strains. *Immunology.* 1990; 69(2):184–9.
23. DeAngelis P.L. Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: Implications for the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria. *Anat. Rec.* 2002; 268(3):317–26. DOI: 10.1002/ar.10163.
24. Kahler C.M., Carlson R.W., Rahman M.M., Martin L.E., Stephens D.S. Two glycosyltransferase genes, *lgtF* and *rfaK*, constitute the lipooligosaccharide ice (inner core extension) biosynthesis operon of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 1996; 178(23):6677–84. DOI: 10.1128/jb.178.23.6677-6684.1996.
25. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2004; 72(9):5340–8. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5340-5348.2004.
26. Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. М.; 2012. 267 с.
27. Iyer R., Williams C., Miller C. Arginine-agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2003; 185(22):6556–61. DOI: 10.1128/jb.185.22.6556-6561.2003.
28. Гайский Н.А. Туляремияльная вирус-вакцина. 2-е изд. Иркутск: Иркутское обл. изд-во; 1948. 111 с.
29. Sandström G. The Tularaemia vaccine. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1994; 59(4):315–20. DOI: 10.1002/jctb.2805.
2. Colquhoun D.J., Larsson P., Duodu S., Forsman M. The family *Francisellaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F., editors. *The Prokaryotes. Gammaproteobacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. P. 287–314. DOI: 10.1007/978-3-642-38922-1_236.
3. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Kulikova E.S., Kholin A.V., Mazepa A.V., Borzenko M.A., Cherepanova E.A., Matveeva V.A., Trankvilevsky D.V., Khranov M.V., Dyatlov I.A. [Analysis of the epizootiological and epidemiological situation on tularaemia in the Russian Federation in 2023 and forecast for 2024]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; (1):17–29. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-17-29.
4. Kutyrev V.V., Devdariani Z.L., Sayapina L.V. [Current state of scientific research in the field of vaccine prevention of particularly dangerous bacterial infections]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2006; (2):18–24.
5. Sayapina L.V., Bondarev V.P., Olefir Yu.V. [Current state of the vaccine prophylaxis of particularly dangerous infections]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (2):107–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110.
6. Sayapina L.V., Khoreva I.I., Baidalova N.P., Goryaev A.A., Davydov D.S., Postupailo V.B., Merkulov V.A. [Assessment of residual virulence of the *Francisella tularensis* 15 NIEG vaccine strain based on long-term observations]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (1):98–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-98-102.
7. Naryshkina E.A., Krasnov Ya.M., Al'khova Zh.V., Badanin D.V., Osin A.V., Lyashova O.Yu., Sayapina L.V., Bondarev V.P., Merkulov V.A., Olefir Yu.V., Kutyrev V.V. [Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of the *Francisella tularensis* 15 NIEG vaccine strain]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):91–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97.
8. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005.
9. Jaing C.J., McLoughlin K.S., Thissen J.B., Zemla A., Gardner S.N., Vergez L.M., Bourguet F., Mabery S., Fofanov V.Y., Koshinsky H., Jackson P.J. Identification of genome-wide mutations in ciprofloxacin-resistant *F. tularensis* LVS using whole genome tiling arrays and next generation sequencing. *PLoS One.* 2016; 11(9):e0163458. DOI: 10.1371/journal.pone.0163458.
10. Samrakandi M.M., Zhang C., Zhang M., Nijfeldt J., Kim J., Iwen P.C., Olson M.E., Fey P.D., Duhamel G.E., Hinrichs S.H., Cirillo J.D., Benson A.K. Genome diversity among regional populations of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* isolated from the US. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 237(1):9–17. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.008.
11. Larsson P., Svensson K., Karlsson L., Guala D., Granberg M., Forsman M., Johansson A. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(11):1725–32. DOI: 10.3201/eid1311.070603.
12. Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., Beckstrom-Sternberg J.S., Johansson A., Clare A., Buchhagen J.L., Petersen J.M., Pearson T., Vaissaire J., Dempsey M.P., Foxall P., Engelthaler D.M., Wagner D.M., Keim P. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* 2009; 191(8): 2474–84. DOI: 10.1128/JB.01786-08.
13. Karlsson E., Svensson K., Lindgren P., Byström M., Sjödin A., Forsman M., Johansson A. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of Euro Siberian tularaemia. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(2):634–45. DOI: 10.1111/1462-2920.12052.
14. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Byström M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11):3903–8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005.
15. Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 2017; 13(6):e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
16. Player R.A., Verratti K.J., Grady S.L., Beck L.C., Goodwin B.G., Earnhart C.G., Sozhamannan S. Complete genome sequence of *Francisella tularensis* live vaccine strain NR-28537 (BEI Master Cell Bank). *Microbiol. Resour. Announc.* 2020; 9(50):e01248-20. DOI: 10.1128/MRA.01248-20.
17. Shevtsov V., Kairzhanova A., Shevtsov A., Shustov A., Kalendar R., Abdrakhmanov S., Lukhnova L., Izbanova U., Ramankulov Y., Vergnaud G. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419.
18. Rohmer L., Brittnacher M., Svensson K., Buckley D., Haugen E., Zhou Y., Chang J., Levy R., Hayden H., Forsman M.,

References

1. Karlsson E., Golovliov I., Lärkeryd A., Granberg M., Larsson E., Öhrman 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.

- Olson M., Johansson A., Kaul R., Miller S.I. Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison. *Infect. Immun.* 2006; 74(12):6895–906. DOI: 10.1128/IAI.01006-06.
19. Crawford R.M., Van De Verg L., Yuan L., Hadfield T.L., Warren R.L., Drazek E.S., Houng H.H., Hammack C., Sasala K., Polsinelli T., Thompson J., Hoover D.L. Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.* 1996; 64(6):2188–92. DOI: 10.1128/iai.64.6.2188-2192.1996.
20. Karlsson J., Prior R.G., Williams K., Lindler L., Brown K.A., Chatwell N., Hjalmarsson K., Loman N., Mack K.A., Pallen M., Popek M., Sandström G., Sjöstedt A., Svensson T., Tamas I., Andersson S.G., Wren B.W., Oyston P.C., Titball R.W. Sequencing of the *Francisella tularensis* strain Schu 4 genome reveals the shikimate and purine metabolic pathways, targets for the construction of a rationally attenuated auxotrophic vaccine. *Microb. Comp. Genomics.* 2000; 5(1):25–39. DOI: 10.1089/10906590050145249.
21. Ivánovics G., Marjai E., Dobozy A. The growth of purine mutants of *Bacillus anthracis* in the body of the mouse. *J. Gen. Microbiol.* 1968; 53(2):147–62. DOI: 10.1099/00221287-53-2-147.
22. O'Callaghan D., Maskell D., Tite J., Dougan G. Immune responses in BALB/c mice following immunization with aromatic compound or purine-dependent *Salmonella typhimurium* strains. *Immunology.* 1990; 69(2):184–9.
23. DeAngelis P.L. Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: Implications for the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria. *Anat. Rec.* 2002; 268(3):317–26. DOI: 10.1002/ar.10163.
24. Kahler C.M., Carlson R.W., Rahman M.M., Martin L.E., Stephens D.S. Two glycosyltransferase genes, *lgtF* and *rfaK*, constitute the lipooligosaccharide ice (inner core extension) biosynthesis operon of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 1996; 178(23):6677–84. DOI: 10.1128/jb.178.23.6677-6684.1996.
25. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2004; 72(9):5340–8. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5340-5348.2004.
26. Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Molecular Genetic Studies of Bacteria of the Genus *Francisella* and Their Applied Significance]. Moscow; 2012. 267 p.
27. Iyer R., Williams C., Miller C. Arginine-arginine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2003; 185(22):6556–61. DOI: 10.1128/jb.185.22.6556-6561.2003.
28. Gaisky N.A. [Tularemia Virus Vaccine. 2nd ed]. Irkutsk: Irkutsk regional publishing house; 1948. 111 p.
29. Sandström G. The Tularaemia vaccine. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1994; 59(4):315–20. DOI: 10.1002/jctb.2805.

Authors:

Naryshkina E.A., Osina N.A., Katyshev S.D., Krasnov Ya.M., Sharapova N.A., Fedorov A.V., Katyshev A.D., Lyashova O.Yu., Osin A.V., 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:

Нарышкина Е.А., Осина Н.А., Катышев С.Д., Краснов Я.М., Шаропова Н.А., Федоров А.В., Катышев А.Д., Ляшова О.Ю., Осин А.В., Девдариани З.Л., Щербакowa С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.