

DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-116-122

УДК 579.841.95:579.25

А.А. Ковалевич, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, В.М. Сорокин

Генотипирование штаммов *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* с использованием маркерных SNP

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель исследования – генотипирование штаммов *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* с использованием маркерных SNP на основе данных полногеномного секвенирования. **Материалы и методы.** В работе использовали 50 полных геномов (WGS) штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* из базы данных NCBI и 25 геномов, секвенирование которых проведено специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Выделение отдельных кластеров на дендрограмме проводили при значении бутстреп-поддержки как минимум >90 % (при использовании 1000 репликаций). **Результаты и обсуждение.** На репрезентативной выборке из 75 геномов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* были отобраны 5251 SNP, встречающиеся минимум у двух штаммов. В ходе биоинформационного анализа исключены геномы с более чем 500 SNP в участках, не охваченных WGS. На основе филогенетического анализа построена дендрограмма и выделены 11 крупных кластеров, названных по географическим локациям ранних или доминирующих штаммов, при бутстреп-поддержке >90 % (1000 репликаций). Для типирования штаммов в кластерах определены «маркерные» SNP, характерные для каждого кластера и его дочерних групп, но отсутствующие у остальных. Разработана программа «SNP Genotyper» для автоматического определения генотипа штаммов на основе маркерных SNP. Проведено изучение генетической вариабельности *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* различного происхождения методом анализа wgSNP. Выявлено генетическое разнообразие штаммов subsp. *mediasiatica*, выделенных на территориях Алтайского края (Российская Федерация) и Республики Казахстан. На основе маркерных SNP разработан алгоритм для оперативного анализа WGS-данных геномов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Разработанная методика определения генетических линий может стать полезным инструментом как для оперативного анализа при выделении свежих штаммов, определения филогенетического родства штаммов, изучения генетического разнообразия популяции, так и при проведении ретроспективных исследований.

Ключевые слова: *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*, генотипирование, wgSNP, маркерные SNP.

Корреспондирующий автор: Ковалевич Алексей Александрович, e-mail: kovalevich_aa@antiplague.ru.

Для цитирования: Ковалевич А.А., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Сорокин В.М. Генотипирование штаммов *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* с использованием маркерных SNP. Проблемы особо опасных инфекций. 2026; 1:116–122. DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-116-122

Поступила 28.05.2025. Отправлена на доработку 27.06.2025. Принята к публикации 27.08.2025.

А.А. Kovalevich, R.V. Pisanov, A.S. Vodop'yanov, V.M. Sorokin

Genotyping of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* Strains Using Marker SNPs

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was the genotyping of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* strains using marker SNPs based on whole genome sequencing data. **Materials and methods.** The work used 50 complete genomes (WGS) of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* strains from the NCBI database and 25 genomes, which were sequenced directly by specialists from the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor. The allocation of individual clusters on the dendrogram was carried out with a bootstrap support value of at least >90 % (when using 1000 replications). **Results and discussion.** A total of 5,251 SNPs identified in a representative sample of 75 *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* genomes were selected, with each SNP detected in at least two strains. During the bioinformatics analysis, genomes with more than 500 SNPs in regions not covered by whole-genome sequencing (WGS) were excluded. Phylogenetic analysis resulted in a dendrogram that identified 11 major clusters named after the geographic locations of early or dominant strains. These clusters were supported by bootstrap values >90 % (1,000 replicates). For strain typing within the clusters, “marker” SNPs specific to each cluster and its subgroups – but absent in others – were identified. A software tool, “SNP Genotyper”, was developed to automate genotype determination based on those marker SNPs. Genetic variability of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* isolates of diverse origins was studied using whole-genome SNP (wgSNP) analysis. Genetic diversity was observed among subsp. *mediasiatica* strains isolated in Altai Territory (Russian Federation) and the Republic of Kazakhstan. Based on marker SNPs, an algorithm has been developed for the operational analysis of WGS data from *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* genomes. The developed method for determining genetic lineages can be a useful tool both for operational analysis when isolating fresh strains, determining the phylogenetic relationships of strains, studying the genetic diversity of a population, and conducting retrospective studies.

Key words: *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*, genotyping, wgSNP, marker SNPs.

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

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

Acknowledgements: The authors are grateful to E.N. Rozhdestvensky, G.Kh. Bazarova, P.P. Sanarov, and M.V. Tsimbalistova for assistance in conducting this study.

Corresponding author: Alexey A. Kovalevich, e-mail: kovalevich_aa@antiplague.ru.

Citation: Kovalevich A.A., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Sorokin V.M. Genotyping of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* Strains Using Marker SNPs. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2026; 1:116–122. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-116-122

Received 28.05.2025. Revised 27.06.2025. Accepted 27.08.2025.

Kovalevich A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6926-0239>

Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Sorokin V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1835-1496>

Туляремия – зоонозное заболевание, вызываемое бактериями *Francisella tularensis*. В зависимости от пути проникновения в организм человека *F. tularensis* вызывает до шести клинических форм заболевания: от тяжелой пневмонии с высокой степенью летальности до менее летальной язвенно-бубонной туляремии. Особую опасность данный возбудитель представляет для занятого в сельском и лесном хозяйстве населения, проживающего вблизи эндемичных очагов [1–4].

В настоящее время вид *F. tularensis* подразделяют на четыре подвида: *tularensis (nearctica)*, *holarctica (palaearctica)*, *mediasiatica* и *novicida*, – которые различаются по распространению и вирулентности для человека [5, 6].

F. tularensis subsp. *mediasiatica* по-прежнему является самым малочисленным и наименее изученным из эпидемиологически значимых подвидов возбудителя туляремии [7]. Изначально подвид *mediasiatica* был описан М.А. Айкимбаевым и обнаружен в Среднеазиатском регионе СССР (Казахстан, Узбекистан) [8, 9]. На сегодняшний день среднеазиатский подвид обнаруживается и циркулирует в Центральной Азии, в некоторых малонаселенных регионах Казахстана (вдоль рек Шу и Или), Узбекистана (вдоль реки Амударья) и Туркменистана [10].

До 2011 г. на территории России не было выделено ни одного штамма subsp. *mediasiatica* [6]. Начиная с 2011 г. регистрируются случаи выделения и установлен факт циркуляции штаммов subsp. *mediasiatica* в Алтайском крае и Республике Алтай, а также в Красноярском крае [6, 10, 11]. Наличие штаммов subsp. *mediasiatica* в России можно объяснить несколькими альтернативными гипотезами: выявление новых очагов на территории Сибирского федерального округа указывает на распространение этого подвида за пределами естественной среды обитания или недооценку его распространения либо недостаточность проведения диагностики ранее.

Кроме этого, отсутствие зарегистрированных случаев заражения человека привело к ограниченному количеству публикаций о генетическом разнообразии штаммов subsp. *mediasiatica* [6, 12]. По мнению некоторых исследователей, отсутствие клинических случаев является косвенным доказательством того, что вирулентность для людей низкая [6]. Однако, согласно данным главного государственного санитарного врача Алтайского края, случаи туляремии у людей выявляются в этом регионе почти каждый год без выделения культуры [13]. Медицинские и эпидемиологические службы обычно не могут установить подвид возбудителя, а лишь идентифицируют видовую принадлежность *F. tularensis* [6]. Исследование

штаммов subsp. *mediasiatica* на животных моделях позволило установить у них промежуточный уровень вирулентности между видами *tularensis* и *holarctica*, что способствует повышению интереса к изучению этого подвида [14]. В настоящее время полногеномное генотипирование проведено для штаммов, циркулирующих в России, и штаммов, выделенных в Центральной Азии, которые хранятся в коллекциях микроорганизмов в России и/или Швеции [10, 15].

Хотя *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* известен в Центральной Азии с 1960-х гг., информация о его генетическом разнообразии в регионах распространения весьма ограничена.

Целью исследования стало генотипирование штаммов *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* с использованием маркерных SNP на основе данных полногеномного секвенирования.

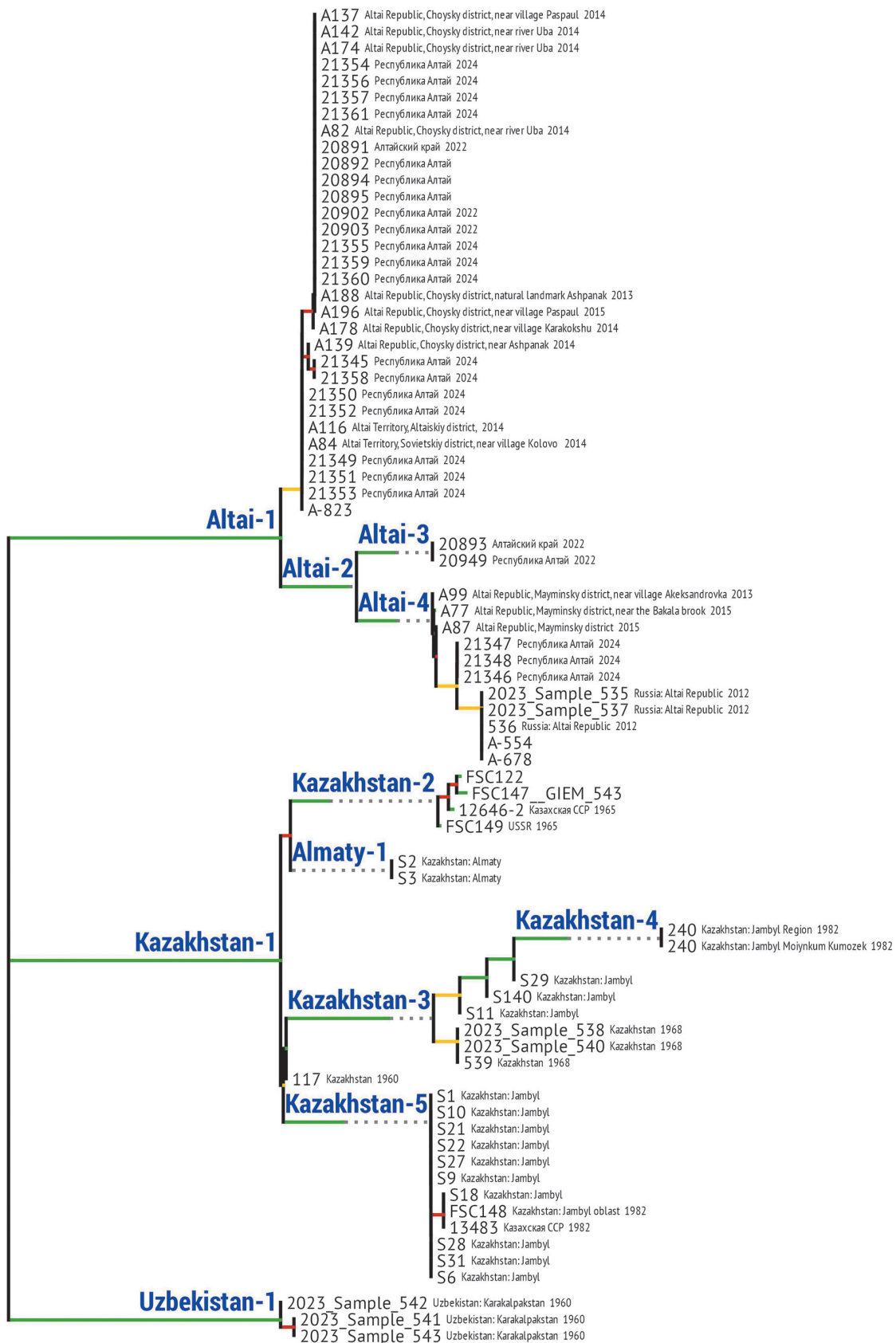
Материалы и методы

В работе использовали 50 полных геномов (WGS) штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* из базы данных NCBI и 25 геномов, секвенирование которых проведено непосредственно специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. В качестве референсного использован геном штамма *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 (NCBI accession number NC_006570). Сборку геномов проводили с использованием программы Spades 3.13.0 [16]. Средний размер генома составлял 1,8 Мб. Первичный поиск единичных нуклеотидных замен (SNP) проводили с помощью программы Snippy 4.6.0 [17] и авторских программ. Для филогенетического анализа использовали метод присоединения соседей (Neighbor Joining), представленный в программе MEGA11 [18]. Выделение отдельных кластеров на дендрограмме проводили при значении бутстреп-поддержки как минимум >90 % (при использовании 1000 репликаций). Визуализацию дендрограммы осуществляли с использованием пакета ete3 [19].

Результаты и обсуждение

Биоинформационный анализ проведен на 75 геномах *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* по 5251 однонуклеотидным полиморфизмам (wgSNP), отобранным в ходе исследования.

В ходе исследования с применением филогенетического анализа построена дендрограмма, отражающая степень генетической близости между различными штаммами подвида *mediasiatica* (рисунок). Идентифицированы 11 наиболее крупных кластеров,



Дендрограмма, отражающая степень филогенетической близости среди штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, с указанием выявленных генетических линий. На дендрограмме цветными линиями отображена бутстреп-поддержка:

зеленые линии – более 90 %; желтые – 70–90 %; красные – менее 70 % при использовании 1000 репликаций

Dendrogram reflecting the degree of phylogenetic proximity among *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* strains, indicating the identified genetic lines. Dendrogram shows bootstrap support in colored lines:

green lines – more than 90 %; yellow lines – 70–90 %; red lines – less than 70 % when using 1000 replications

для которых в качестве названия использовалось географическое наименование места выделения наиболее раннего или доминирующего штамма в кластере. Порядковый номер кластера присваивался его одно-типному наименованию (рисунок). Выделение отдельных кластеров на дендрограмме проводили при значении бутстреп-поддержки как минимум >90 % (при использовании 1000 репликаций).

Следующей стадией исследования был поиск «маркерных» SNP среди всех wgSNP, которые присутствовали у штаммов каждого из выделенных кластеров (и всех дочерних кластеров) и при этом отсутствовали у остальных штаммов. Эта задача осуществлена с целью быстрого типирования штаммов, присвоения штамму наименования генетической линии независимо от того, какое количество штаммов будет взято, а также добавлено или удалено при их анализе (таблица). По итогам проведенной работы разработана программа «SNP Genotyper» (www.antiplague.ru/scientific-activity/publication/snp-genotyper/). Программа помогает установить маркерные SNP для присвоения им именования в соответствии с присвоенным каждому генотипу (таблица).

В настоящее время при классификации генетических линий возбудителя туляремии используется буквенно-цифровое обозначение: группы, содержащие штаммы *subsp. nearctica*, обозначают А.І и А.ІІ, в то время как для штаммов *subsp. holarctica* исполь-

зуют обозначения В.І – В.У [20]. Особенностью нашей классификации, использующей в своей основе дендрограмму, является вложенность групп. Данный аспект не является абсолютно новаторским, он был ранее применен исследователями для вируса SARS-CoV-2 [21]. Однако, чтобы обойти неудобство обозначения длинных цифровых и буквенных аббревиатур, было принято решение дать каждому кластеру имена собственные с порядковыми номерами.

До сегодняшнего дня было принято считать, что *subsp. mediasiatica* может разделяться только на три кластера: М.І, М.ІІ и М.ІІІ. При этом штаммы кластера М.І происходят из Казахстана, М.ІІ – из Алтайского края, М.ІІІ – из Республики Каракалпакстан Узбекистана вдоль реки Амударья [6, 10, 12]. Генотипирование этих кластеров осуществлялось методом MLVA. Стоит заметить, что данная система генотипирования не отражает всего генетического разнообразия, так как разделяет штаммы *subsp. mediasiatica* на три кластера, в то время как наша система маркерных SNP позволила разделить на 11 кластеров. При этом в недавнем исследовании А.Б. Шевцова и соавт. была использована система wgSNP, в которой линия М.І разделена на четыре кластера: М.І_1 – М.І_4 [12]. В нашей системе идентифицированы пять константных кластеров. Важно подчеркнуть, что подход wgSNP корректно воспроизводит филогенетические и эволюционные взаимо-

Маркерные SNP для кластеров *F. tularensis subsp. mediasiatica*
 Marker SNPs for *F. tularensis subsp. mediasiatica* clusters

Кластер Cluster	Маркерные SNP Marker SNPs
1	2
Altai-1	NC_006570:466496:A>A, NC_006570:662000:C>C, NC_006570:920183:A>A, NC_006570:1864263:T>T, NC_006570:12791:C>T, NC_006570:14790:A>G, NC_006570:81959:C>A, NC_006570:113880:A>G, NC_006570:153336:C>T, NC_006570:181160:G>A, NC_006570:226844:T>C, NC_006570:272370:T>C, NC_006570:292125:T>C, NC_006570:300716:G>A, NC_006570:388072:A>C, NC_006570:388438:C>T, NC_006570:394232:C>T, NC_006570:420753:G>A, NC_006570:429215:G>A, NC_006570:436938:C>T, NC_006570:499639:G>A, NC_006570:584914:C>T, NC_006570:654498:G>A, NC_006570:682404:A>G, NC_006570:793619:G>A, NC_006570:841095:T>C, NC_006570:918543:G>C, NC_006570:922245:C>T, NC_006570:986764:T>A, NC_006570:995194:C>T, NC_006570:1007817:T>C, NC_006570:1076154:G>A, NC_006570:1080235:C>T, NC_006570:1149052:T>C, NC_006570:1292938:G>A, NC_006570:1328768:G>A, NC_006570:1535066:C>T, NC_006570:1669173:T>C, NC_006570:1729689:C>G, NC_006570:1813262:C>A, NC_006570:1819322:C>T, NC_006570:1836421:G>A, NC_006570:1847706:G>A, NC_006570:1850507:G>A
Altai-2	NC_006570:221207:C>T, NC_006570:539125:G>A, NC_006570:825085:A>G, NC_006570:1193829:G>A, NC_006570:1488934:C>T
Altai-3	NC_006570:44866:G>A, NC_006570:63745:C>T, NC_006570:602169:C>A
Altai-4	NC_006570:136450:G>T, NC_006570:802596:C>T, NC_006570:1296187:G>A
Kazakhstan-1	NC_006570:32096:C>T, NC_006570:32399:G>A, NC_006570:124189:A>G, NC_006570:141697:C>T, NC_006570:145609:G>A, NC_006570:155916:A>T, NC_006570:161463:T>C, NC_006570:214612:C>T, NC_006570:271592:C>T, NC_006570:282586:G>A, NC_006570:303884:A>C, NC_006570:320058:A>G, NC_006570:323209:C>T, NC_006570:344869:A>G, NC_006570:391815:C>T, NC_006570:449390:G>A, NC_006570:469618:C>T, NC_006570:485396:A>G, NC_006570:540199:G>A, NC_006570:567658:G>A, NC_006570:604845:T>C, NC_006570:646568:A>G, NC_006570:662558:T>C, NC_006570:662874:C>T, NC_006570:668349:T>C, NC_006570:759980:C>T, NC_006570:832613:C>T, NC_006570:899895:A>G, NC_006570:1001145:C>T, NC_006570:1039947:C>T, NC_006570:1082388:G>A, NC_006570:1082948:A>G, NC_006570:1095543:C>A, NC_006570:1116325:T>C, NC_006570:1130295:G>A, NC_006570:1134410:T>C, NC_006570:1140383:T>C, NC_006570:1173156:G>A, NC_006570:1216917:C>T, NC_006570:1289775:T>C, NC_006570:1324718:C>T, NC_006570:1413689:C>T, NC_006570:1414862:G>A, NC_006570:1420279:C>T, NC_006570:1486397:G>A, NC_006570:1538770:G>A, NC_006570:1567828:A>C, NC_006570:1604142:T>C, NC_006570:1617421:G>A, NC_006570:1686541:T>C, NC_006570:1695663:G>A, NC_006570:1856787:A>G, NC_006570:1867001:G>A
Kazakhstan-2	NC_006570:760410:T>C, NC_006570:1010181:A>G, NC_006570:1675683:C>T
Almaty-1	NC_006570:1645686:T>-, NC_006570:1645691:C>-, NC_006570:1646045:T>-, NC_006570:1646212:T>N
Kazakhstan-3	NC_006570:501629:T>C, NC_006570:1112165:T>C, NC_006570:1145924:A>G, NC_006570:1235306:G>A, NC_006570:1422084:G>T, NC_006570:1473665:C>T, NC_006570:1742627:A>G, NC_006570:1765853:T>C

Окончание таблицы / Ending of the table

1	2
Kazakhstan-4	NC_006570:111926:G>T, NC_006570:281620:G>T, NC_006570:621153:G>T, NC_006570:1319510:C>A
Kazakhstan-5	NC_006570:565027:A>G, NC_006570:982998:C>T, NC_006570:1493970:A>G, NC_006570:1706696:G>A, NC_006570:1745065:G>A
Uzbekistan-1	NC_006570:73540:A>G, NC_006570:101658:G>C, NC_006570:110447:G>A, NC_006570:136965:G>T, NC_006570:139593:C>T, NC_006570:140089:C>T, NC_006570:148273:C>T, NC_006570:175777:C>T, NC_006570:203452:T>C, NC_006570:207746:C>T, NC_006570:209007:G>A, NC_006570:214100:C>T, NC_006570:236642:C>A, NC_006570:241053:G>A, NC_006570:248301:A>T, NC_006570:264636:C>T, NC_006570:300363:C>T, NC_006570:312125:C>T, NC_006570:314406:C>G, NC_006570:343216:G>A, NC_006570:413014:C>T, NC_006570:436578:G>A, NC_006570:436831:C>T, NC_006570:441887:C>T, NC_006570:461503:C>T, NC_006570:471146:G>A, NC_006570:484967:A>G, NC_006570:496174:A>G, NC_006570:502517:G>A, NC_006570:519997:G>A, NC_006570:522025:G>A, NC_006570:536166:G>A, NC_006570:541569:G>A, NC_006570:546209:G>A, NC_006570:581501:T>C, NC_006570:658712:G>A, NC_006570:678584:A>G, NC_006570:682376:G>A, NC_006570:701864:G>A, NC_006570:703728:G>A, NC_006570:795253:A>G, NC_006570:808182:G>A, NC_006570:820009:C>T, NC_006570:852405:C>T, NC_006570:884167:G>A, NC_006570:914855:A>G, NC_006570:922017:T>C, NC_006570:928663:G>C, NC_006570:937923:G>A, NC_006570:943170:C>T, NC_006570:972747:G>A, NC_006570:1001872:C>T, NC_006570:1027022:T>C, NC_006570:1030505:G>A, NC_006570:1049610:A>G, NC_006570:1055259:G>T, NC_006570:1088905:T>G, NC_006570:1115146:T>C, NC_006570:1115953:C>T, NC_006570:1135879:G>A, NC_006570:1139790:C>T, NC_006570:1172855:T>C, NC_006570:1176221:G>A, NC_006570:1207822:G>A, NC_006570:1245835:G>A, NC_006570:1317292:C>T, NC_006570:1364866:G>T, NC_006570:1409165:C>T, NC_006570:1427393:G>A, NC_006570:1432241:C>T, NC_006570:1437129:A>G, NC_006570:1442984:G>A, NC_006570:1472706:A>G, NC_006570:1475210:G>A, NC_006570:1486403:G>A, NC_006570:1500998:T>C, NC_006570:1501481:C>T, NC_006570:1526759:C>T, NC_006570:1559613:G>A, NC_006570:1569597:G>A, NC_006570:1654172:C>T, NC_006570:1660223:T>A, NC_006570:1681662:G>A, NC_006570:1693945:A>G, NC_006570:1727101:G>A, NC_006570:1809125:T>C, NC_006570:1812463:C>T, NC_006570:1859329:G>A, NC_006570:1872901:C>T, NC_006570:1874508:T>C

связи, что подтверждается устойчивой кластеризацией изолятов в соответствии с источниками их изоляции и хронологией выделения, описанной авторами исследования [12]. Это указывает на то, что методы SNP-типирования являются наиболее предпочтительными для выявления филогенетических связей между штаммами, что и было использовано в рамках настоящего исследования. Таким образом, следует с осторожностью интерпретировать выявленное с помощью MLVA генетическое разнообразие штаммов, особенно если они были изолированы в рамках одной вспышки. Стоит отметить, что сами авторы работы [12] признают ограниченную применимость метода MLVA в филогенетическом анализе, подчеркивая его недостаточную надежность для реконструкции эволюционных связей между штаммами.

В ходе анализа нами выделено четыре кластера среди алтайских штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (рисунок). Данный аспект ставит под сомнение тезис о том, что генетическое разнообразие штаммов в этом регионе недостаточное [10], скорее причина в недостаточной дискриминирующей способности выбранных ранее методов или разработанности проблематики исследования.

В отношении генетической линии М.Ш можно сказать следующее: из-за ограничения количества штаммов, выделенных на территории Республики Каракалпакстан Узбекистана выявить дополнительные линии кроме Uzbekistan-1 не удалось (рисунок). Возможно, это и не удивительно, так как в открытом доступе нет данных полногеномного секвенирования штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* последних лет, а есть только штаммов 60-х гг. прошлого века. С другой стороны, численность населения в данном регионе составляет только 5,6 % населения Республики Узбекистан при 38 % от общей площади страны [22]. Кроме этого, данные о вспышках или заболеваниях туляремией на данной территории так-

же отсутствуют. В этом случае можно сделать теоретические предположения о сложившейся ситуации: недостаточность эпидемиологического мониторинга по туляремии на территории Узбекистана, гиподиагностика или, как уже говорилось выше, отсутствие диагностики подвида возбудителя, а лишь идентификация до *F. tularensis*.

Также необходимо отметить, что разработанное программное обеспечение способно анализировать неограниченное количество WGS-данных с выдачей результата в табличном виде. По завершении анализа для каждого генома выдается итоговый кластер и все родительские кластеры, в которые входит анализируемый штамм. Таким образом, это позволит унифицировать методику генотипирования штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* для других исследователей без ограничения включаемых/исключаемых штаммов из анализа.

Таким образом, проведено изучение генетической вариабельности *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* различного происхождения методом анализа wg-SNP. Выявлено генетическое разнообразие штаммов subsp. *mediasiatica*, выделенных на территориях Алтайского края (Российская Федерация) и Республики Казахстан.

По результатам wgSNP-анализа выделено 11 генетических линий (кластеров), для каждой из них найдены и валидированы маркерные SNP. На основе маркерных SNP разработан алгоритм для оперативного анализа WGS-данных геномов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

Разработанная методика определения генетических линий может являться полезным инструментом как для оперативного анализа при выделении свежих штаммов, определения филогенетического родства штаммов, изучения генетического разнообразия популяции, так и при проведении ретроспективных исследований.

Полногеномное секвенирование проведено в рамках федеральной программы «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

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

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

Благодарности. Авторы выражают благодарность Е.Н. Рождественскому, Г.Х. Базаровой, П.П. Санарову, а также М.В. Цимбалистовой за помощь в проведении исследования.

Список литературы

1. Gürçan Ş. Epidemiology of tularemia. *Balkan Med. J.* 2014; 31(3):3–10. DOI: 10.5152/balkanmedj.2014.13117.
2. Kilic S., Birdsell D.N., Karagöz A., Çelebi B., Bakkaloglu Z., Arıkan M., Sahl J.W., Mitchell C., Rivera A., Maltinsky S., Keim P., Üstek D., Durmaz R., Wagner D.M. Water as source of *Francisella tularensis* infection in humans, Turkey. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12):2213–6. DOI: 10.3201/eid2112.150634.
3. Dennis D.T., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Friedlander A.M., Hauer J., Layton M., Lillibridge S.R., McDade J.E., Osterholm M.T., O’Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Tonat K.; Working Group on Civilian Biodefense. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA.* 2001; 285(21):2763–73. DOI: 10.1001/jama.285.21.2763.
4. Degabriel M., Valeva S., Boisset S., Henry T. Pathogenicity and virulence of *Francisella tularensis*. *Virulence.* 2023; 14(1):2274638. DOI: 10.1080/21505594.2023.2274638.
5. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1105(1):30–66. DOI: 10.1196/annals.1409.011.
6. Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christiany D., Mokrievich A., 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.
7. Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N. Molecular-genetic bases of differences between tularemia pathogen subspecies and *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strain typing. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2022; 37(1):10–8. DOI: 10.3103/S0891416822010049.
8. Aikimbaev M.A. Taxonomy of genus *Francisella*. *Rep. Acad. Sci. Kaz. SSR. Ser. Biol.* 1966; 5:42–4.
9. Olsufjev N.G., Meshcheryakova I.S. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1983; 33(4):872–4. DOI: 10.1099/00207713-33-4-872.
10. Timofeev V., Bakhteeva I., Mokrievich A., Vakhrameeva G., Gritskova E., Anisimov Yu., 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.
11. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; (1):66–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-66-69.
12. Shevtsov A., Izbanova U., Amirgazin A., Kairzhanova A., Dauletov A., Kiyan V., Vergnaud G. Genetic homogeneity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* strains in Kazakhstan. *Pathogens.* 2024; 13(7):581. DOI: 10.3390/pathogens13070581.
13. Борзенко М.А., Зарва И.Д., 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., Иванчица Ю.Н., Сбитнева С.В., Красильникова Н.Ю., Пащенко И.Г. Современная эпидемиологическая ситуация по туляремии на Алтае. В кн.: Санитарно-эпидемиологическое благополучие населения и защита прав потребителей: региональные аспекты. Материалы Всероссийской научно-практической конференции. Иркутск: ООО «Типография «ИРКУТ»; 2022. С. 223–6.
14. 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.
15. Larsson P., Elfsmark D., Svensson K., Wikström P., Forsman M., Brettin T., Johansson A. Molecular evolutionary consequences of niche restriction in *Francisella tularensis*, a facultative intracellular pathogen. *PLoS Pathog.* 2009; 5(6):e1000472. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000472.
16. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
17. Seemann T. Snippy: Fast Bacterial Variant Calling from NGS Reads. GitHub; 2022. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/snippy>.
18. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol. Boil. Evol.* 2021; 38(7):3022–7. DOI: 10.1093/molbev/msab120.
19. Huerta-Cepas J., Serra F., Bork P. ETE 3: reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data. *Mol. Boil. Evol.* 2016; 33(6):1635–8. DOI: 10.1093/molbev/msw046.
20. Lärkeryd A., Myrtenäs K., Karlsson E., Dwibedi C.K., Forsman M., Larsson P., Sjödin A. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics.* 2014; 30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113.
21. Di Giallonardo F., Puglia I., Curini V., Cammà C., Mangone I., Calistri P., Cobbin J.C.A., Holmes E.C., Lorusso A. Emergence and spread of SARS-CoV-2 lineages B.1.1.7 and P.1 in Italy. *Viruses.* 2021; 13(5):794. DOI: 10.3390/v13050794.
22. Алиева Б., Ходжаева Г.А. Основные демографические показатели Республики Каракалпакстан. *Экономика и социум.* 2024; 6-2(121):843–6.

References

1. Gürçan Ş. Epidemiology of tularemia. *Balkan Med. J.* 2014; 31(3):3–10. DOI: 10.5152/balkanmedj.2014.13117.
2. Kilic S., Birdsell D.N., Karagöz A., Çelebi B., Bakkaloglu Z., Arıkan M., Sahl J.W., Mitchell C., Rivera A., Maltinsky S., Keim P., Üstek D., Durmaz R., Wagner D.M. Water as source of *Francisella tularensis* infection in humans, Turkey. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12):2213–6. DOI: 10.3201/eid2112.150634.
3. Dennis D.T., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Friedlander A.M., Hauer J., Layton M., Lillibridge S.R., McDade J.E., Osterholm M.T., O’Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Tonat K.; Working Group on Civilian Biodefense. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA.* 2001; 285(21):2763–73. DOI: 10.1001/jama.285.21.2763.
4. Degabriel M., Valeva S., Boisset S., Henry T. Pathogenicity and virulence of *Francisella tularensis*. *Virulence.* 2023; 14(1):2274638. DOI: 10.1080/21505594.2023.2274638.
5. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1105(1):30–66. DOI: 10.1196/annals.1409.011.
6. Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christiany D., Mokrievich A., 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.
7. Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N. Molecular-genetic bases of differences between tularemia pathogen subspecies and *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strain typing. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2022; 37(1):10–8. DOI: 10.3103/S0891416822010049.
8. Aikimbaev M.A. Taxonomy of genus *Francisella*. *Rep. Acad. Sci. Kaz. SSR. Ser. Biol.* 1966; 5:42–4.
9. Olsufjev N.G., Meshcheryakova I.S. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1983; 33(4):872–4. DOI: 10.1099/00207713-33-4-872.
10. Timofeev V., Bakhteeva I., Mokrievich A., Vakhrameeva G., Gritskova E., Anisimov Yu., 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.
11. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; (1):66–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-66-69.
12. Shevtsov A., Izbanova U., Amirgazin A., Kairzhanova A., Dauletov A., Kiyan V., Vergnaud G. Genetic homogeneity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* strains in Kazakhstan. *Pathogens.* 2024; 13(7):581. DOI: 10.3390/pathogens13070581.
13. Борзенко М.А., Зарва И.Д., 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., Иванчица Ю.Н., Сбитнева С.В., Красильникова Н.Ю., Пащенко И.Г. Современная эпидемиологическая ситуация по туляремии на Алтае. В кн.: Санитарно-эпидемиологическое благополучие населения и защита прав потребителей: региональные аспекты. Материалы Всероссийской научно-практической конференции. Иркутск: ООО «Типография «ИРКУТ»; 2022. С. 223–6.
14. Timofeev V., Titareva G., Bahtejeva I., Kombarova T., Kravchenko T., Mokrievich A., Dyatlov I. The comparative virulence of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* for vaccinated

13. Borzenko M.A., Zarva I.D., Holin A.V., Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Synggeeva A.K., Naumova K.V., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Sanarov P.P., Polkovnikov E.S., Ivanitskaya Yu.N., Sbitneva S.V., Krasil'nikova N.Yu., Pashhenko I.G. [Current epidemiological situation on tularemia in Altai]. In: [Sanitary and Epidemiological Welfare of the Population and Consumer Rights Protection: Regional Aspects. Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference]. Irkutsk: LLC Publishing House "IRKUT"; 2022. P. 223–6.
14. 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.
15. Larsson P., Elfsmark D., Svensson K., Wikström P., Forsman M., Brettin T., Johansson A. Molecular evolutionary consequences of niche restriction in *Francisella tularensis*, a facultative intracellular pathogen. *PLoS Pathog.* 2009; 5(6):e1000472. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000472.
16. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
17. Seemann T. Snippy: Fast Bacterial Variant Calling from NGS Reads. GitHub; 2022. [Internet]. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy>.
18. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol. Boil. Evol.* 2021; 38(7):3022–7. DOI: 10.1093/molbev/msab120.
19. Huerta-Cepas J., Serra F., Bork P. ETE 3: reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data. *Mol. Boil. Evol.* 2016; 33(6):1635–8. DOI: 10.1093/molbev/msw046.
20. Lärkeryd A., Myrtenäs K., Karlsson E., Dwibedi C.K., Forsman M., Larsson P., Sjödin A. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics*. 2014; 30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113.
21. Di Giallonardo F., Puglia I., Curini V., Cammà C., Mangone I., Calistri P., Cobbin J.C.A., Holmes E.C., Lorusso A. Emergence and spread of SARS-CoV-2 lineages B.1.1.7 and P.1 in Italy. *Viruses*. 2021; 13(5):794. DOI: 10.3390/v13050794.
22. Alieva B., Hodzhaeva G.A. [Main demographic indicators of the Republic of Karakalpakstan]. *Ekonomika i Sotsium [Economics and Society]*. 2024; 6-2(121):843–6.

Authors:

Kovalevich A.A., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Sorokin V.M. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Ковалевич А.А., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Сорокин В.М. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.