

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-59-65

УДК 616.98:579.841.95

А.С. Водопьянов, Р.В. Писанов, С.О. Водопьянов, М.В. Цимбалистова, Н.Л. Пичурина,
В.М. Сорокин, Н.В. Павлович, А.К. Носков**Сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов *Francisella tularensis*, изолированных в Ростовской области в 2020 г., и последовательностей геномов штаммов, выделенных в различных регионах мира**

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

В 2020 г. при проведении эпизоотологического мониторинга в очаге степного типа на юго-востоке Ростовской области на фоне разлитой эпизоотии в популяциях обыкновенной полевки *Microtus arvalis obscurus* и общественной полевки *Microtus socialis* изолировано шесть культур туляремийного микроба от павших и отловленных живыми животными. Цель работы состояла в разработке схемы SNP-типирования и сравнительном изучении филогенетических связей штаммов *Francisella tularensis*, изолированных в Ростовской области (2020 г.), со штаммами из других регионов. Материалы и методы. Полногеномное секвенирование проводили на платформе MiSeq Illumina. Для анализа применяли авторское программное обеспечение GeneExpert, PrimerM и VirtualPCR, написанное на языке программирования Java. Результаты и обсуждение. Штаммы возбудителя туляремии, выделенные на территории Ростовской области в 2020 г., можно распределить между двумя различными кластерами. Установлено, что два штамма возбудителя туляремии (F0884 и F0889), выделенные на территории Турции, генетически близки к некоторым изолятам, циркулирующим в Ростовской области. Выявлен уникальный INDEL-маркер, характерный для данной группы штаммов. Проведенное сравнение предлагаемой нами схемы типирования со схемой «канонических» SNP показало довольно хорошее схождение результатов в пределах больших кластеров, при этом использование набора из 6626 SNP позволяет дифференцировать штаммы внутри одного canSNP-типа. Выявлено, что вакцинный штамм имеет общий canSNP-тип с клиническими и природными штаммами. Подобран набор SNP-маркеров для проведения сравнительного анализа. Обнаружен новый INDEL-маркер, позволяющий проводить внутривидовое типирование *F. tularensis*, и доказана возможность его использования *in vitro* и *in silico*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, INDEL, полногеномное секвенирование, ПЦР, генотипирование, SNP.

Корреспондирующий автор: Водопьянов Алексей Сергеевич, e-mail: vodopyanov_as@antiplague.ru.

Для цитирования: Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Цимбалистова М.В., Пичурина Н.Л., Сорокин В.М., Павлович Н.В., Носков А.К. Сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов *Francisella tularensis*, изолированных в Ростовской области в 2020 г., и последовательностей геномов штаммов, выделенных в различных регионах мира. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 3:59–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-59-65
Поступила 04.04.2022. Отправлена на доработку 18.05.2022. Принята к публ. 06.02.2023.

A.S. Vodop'yanov, R.V. Pisanov, S.O. Vodop'yanov, M.V. Tsimbalistova, N.L. Pichurina, V.M. Sorokin,
N.V. Pavlovich, A.K. Noskov**Comparative Molecular-Genetic Analysis of *Francisella tularensis* Strains Isolated in the Rostov Region in 2020 and Genome Sequences of the Strains Collected in Various Regions of the World**

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

Abstract. Six cultures of tularemia microbe from fallen and captured live animals were isolated during epidemiological monitoring in the steppe focus in the south-east of the Rostov Region in 2020 against the background of extensive epizootics in the populations of the common vole *Microtus arvalis obscurus* and the public vole *Microtus socialis*. The aim of the work was to develop an SNP-typing scheme and to conduct a comparative study of the phylogenetic relations between *Francisella tularensis* strains isolated in the Rostov Region (2020) and strains from other regions. **Materials and methods.** Genome-wide sequencing was performed on the MiSeq Illumina platform. The author's software GeneExpert, PrimerM and VirtualPCR, written in the Java programming language, were used for the analysis. **Results and discussion.** The strains of tularemia agent, isolated on the territory of the Rostov Region in 2020, can be allocated to two different clusters. It is established that two strains of tularemia pathogen (F0884 and F0889) isolated in Turkey are genetically close to some isolates circulating in the Rostov Region. A unique INDEL marker characteristic of this group of strains has been identified. The comparison of our proposed typing scheme with the scheme of "canonical" SNPs has showed a fairly good consistency and convergence of results within large clusters, meanwhile using a set of 6626 SNPs allows for differentiating the strains within one canSNP type. It is revealed that the vaccine strain has a common canSNP type with clinical and natural strains. A set of SNP markers has been selected for comparative analysis. A new INDEL marker that enables intraspecific typing of *F. tularensis* has been discovered and the possibility of its application *in vitro* and *in silico* has been confirmed.

Key words: *Francisella tularensis*, INDEL, whole-genome sequencing, PCR, genotyping, SNP.

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

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

Corresponding author: Aleksey S. Vodop'yanov, e-mail: vodopyanov_as@antiplague.ru.

Citation: Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., Tsimbalistova M.V., Pichurina N.L., Sorokin V.M., Pavlovich N.V., Noskov A.K. Comparative Molecular-Genetic Analysis of *Francisella tularensis* Strains Isolated in the Rostov Region in 2020 and Genome Sequences of the Strains Collected in Various Regions of the World. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 3:59–65. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-59-65
Received 04.04.2022. Revised 18.05.2022. Accepted 06.02.2023.

Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>
Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>
Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>
Tsimbalistova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>

Pichurina N.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1876-5397>
Sorokin V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1835-1496>
Pavlovich N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Туляремия относится к вакциноконтролируемым болезням, однако ежегодно регистрируемые спорадическая и вспышечная заболеваемости определяют актуальность этой инфекции для общественного здравоохранения. Возбудитель туляремии – *Francisella tularensis* – характеризуется высокой патогенностью для человека и широкого круга животных и относится к микроорганизмам II группы патогенности (опасности). В связи с этим он включен в список А наиболее опасных потенциальных агентов биотерроризма, что требует более пристального внимания к исследованию различных аспектов биологии данного микроорганизма [1].

Широкое распространение природных очагов на территории Российской Федерации диктует необходимость постоянного эпизоотологического мониторинга с целью своевременного проведения противоэпидемических и профилактических мероприятий. Современная эпидемиологическая обстановка по туляремии в ряде регионов страны оценивается как неблагоприятная. Так, в 2020 г. на территории России зарегистрирован 41 случай заболевания людей, а эпизоотические проявления зарегистрированы в 55 субъектах РФ [2].

На базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в течение многих лет проводится мониторинг природных очагов туляремии Ростовской области. При этом необходимо отметить, что на протяжении последних десятилетий при сохранении активности природных очагов пойменно-болотного и степного типов, подтверждаемых периодическими обнаружениями маркеров туляремиального микроба в пробах от носителей и переносчиков, выделить культуры *F. tularensis* удалось только в 2017 и 2020 гг.

В 2020 г. при проведении эпизоотологического мониторинга в очаге степного типа на юго-востоке Ростовской области на фоне разлитой эпизоотии в популяциях обыкновенной полевки *Microtus arvalis obscurus* и общественной полевки *Microtus socialis* изолировано шесть культур туляремиального микроба из проб указанных носителей, найденных павшими и отловленных живыми.

Для получения всесторонней характеристики изолированных штаммов актуальным является проведение молекулярно-генетического анализа с целью определения их родственных связей. Использование подобного подхода позволит выявить особенности циркуляции в природном очаге на территории Ростовской области различных популяций возбудителя, что может быть полезным при проведении эпидемиологических исследований. Например,

при генотипировании штаммов, выделенных в Финляндии, установлено различное географическое распространение разных генотипов [3]. Ранее на примере Ростовской области с помощью метода анализа вариабельных тандемных повторов было показано, что на ограниченной территории чаще всего циркулируют штаммы одного либо близкородственных генотипов [4]. Вместе с тем во время разлитых эпизоотий происходит резкое увеличение генетической гетерогенности выделяемых штаммов [5]. Однако существенным недостатком такого типирования является сложность определения генотипа при анализе данных полногеномного секвенирования, что ограничивает возможность сопоставления данных, полученных из базы данных NCBI (ГенБанк).

Альтернативным методом является анализ единичных нуклеотидных замен (SNP). Так, например, G.A. Pandya *et al.* [6] использовали около 20 тыс. SNP, обнаруженных в геномах 40 штаммов возбудителя туляремии, и разработали 32 пары праймеров для дифференциации клад и субклад *F. tularensis*.

В настоящее время широкое распространение получил способ оценки данных полногеномного секвенирования штаммов *F. tularensis* на основе небольшого перечня «канонических» SNP. Данная схема впервые предложена A.J. Vogler *et al.* [7] и в дальнейшем дополнена другими исследователями, причем пополнения происходят за счет зарубежных штаммов [3, 8, 9]. Существенным недостатком данной схемы является весьма сложная номенклатура – довольно сложно понять по номеру группы родственные отношения между различными штаммами [10]. Вместе с тем наличие данных полногеномного секвенирования позволяет использовать значительно большее количество SNP для анализа, что, на наш взгляд, повышает точность и достоверность результатов. В связи с этим **цель** настоящей работы состояла в разработке схемы SNP-типирования на основе данных полногеномного секвенирования и сравнительном изучении филогенетических связей штаммов *F. tularensis*, изолированных в Ростовской области (2020 г.), со штаммами из других регионов.

Материалы и методы

В работе использовали девять штаммов возбудителя туляремии, выделенных из различных источников в Ростовской области.

Полногеномное секвенирование проводили на платформе MiSeq Illumina в лаборатории диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [11]. Для сравнительного анализа использовали данные, полученные из базы данных NCBI.

Для анализа применяли авторское программное обеспечение GeneExpert, PrimerM и VirtualPCR, написанное на языке программирования Java. Кластерный анализ проводили с использованием метода UPGMA, для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 [12]. Для определения «канонических» SNP использовано свободное программное обеспечение CanSNPer2 [13].

Выделение ДНК проводили коммерческими наборами реагентов «Проба НК» (ООО «ДНК-Технология», Россия) и «ДНК-Сорб-В» («АмплиСенс®», Россия).

Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 15 мкл в полистироловых микроцентрифужных пробирках на программируемом многоканальном термоциклере «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

Инкубационная смесь (15 мкл) для ПЦР содержала 20 mM трис-HCl, pH 8,6; 2 mM MgCl₂; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 0,5 mM ЭДТА; 100 мкг/мл БСА; по 250 мкМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,1–1 мкМ соответствующего праймера, 2 ед. Taq-полимеразы и 1–10 нг хромосомальной ДНК исследуемого штамма. Режим амплификации после внесения минерального масла: денатурация – плюс 94 °С, 35 с; отжиг – плюс 60 °С, 25 с; синтез – плюс 72 °С, 35 с (всего 40 циклов).

Валидацию размера ампликонов INDEL-маркера «1095» проводили с помощью автоматической электрофорезной станции Experion™ (Bio-Rad, США) с применением набора реагентов Experion DNA 1K на 10 чипов согласно инструкции производителя.

Визуализацию ампликонов и разделение аллелей по заданному локусу проводили в неденатурирующем 11 % полиакриламидном геле (ПААГ) (2 мкл постреакционной смеси на дорожку геля, длина геля – 15 см, 15–20 В/см). В качестве аллельного маркера использовали «аллельную лестницу», представляющую собой смесь всех выявленных аллелей анализируемого локуса. Определение генотипа штамма проводили путем сопоставления длины пробега полученных ампликонов аллелей с маркерной ДНК после окрашивания геля бромистым этидием (1 мкг/мл) и визуализации в проходящем ультрафиолете (220 нм) GelDoc EZ Imager (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждение

В рамках настоящего исследования проведено полногеномное секвенирование шести штаммов (№ 210, 211, 249, 251, 256 и 257), выделенных в 2020 г., и трех штаммов (№ 27 – 1996 г.; № 1238 – 1997 г.; № 250 – 1988 г.), изолированных в Ростовской области в предыдущие годы.

С использованием традиционных методов и ПЦР-анализа установлено, что выделенные в сезон 2020 г. культуры туляремийного микроба являются типичными представителями *F. tularensis* subsp. *holarctica* биовара Ery^R.

Дальнейшее исследование посвящено анализу распределения единичных нуклеотидных замен (SNP, single nucleotide polymorphism). Данный метод на сегодняшний день является трудоемким, но одним из самых точных методов генотипирования микроорганизмов. Важным моментом подобного подхода, влияющим на его результативность, является подбор перечня SNP, используемых для анализа.

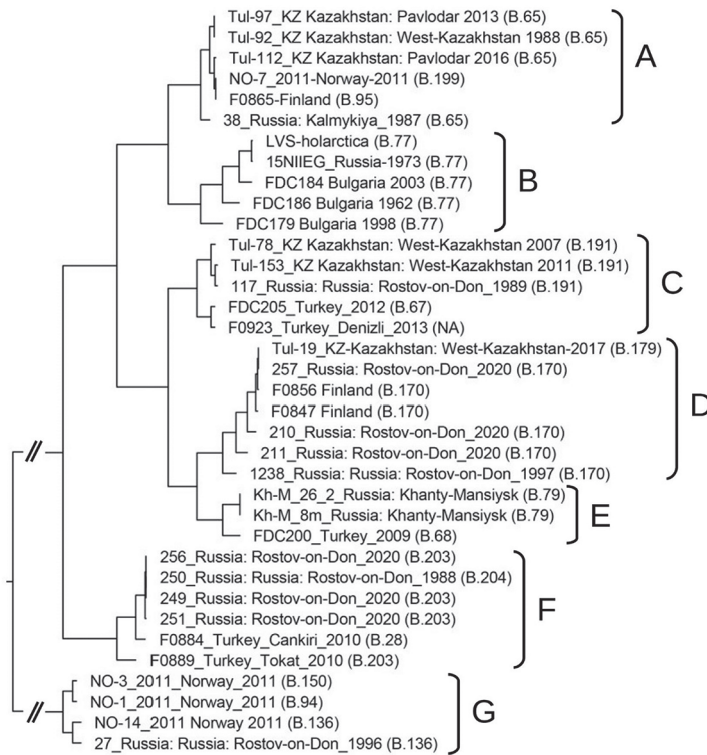
В рамках настоящего исследования нами использован метод отбора SNP, основанный на анализе первичных данных секвенирования (ридах), показавший ранее достоверные результаты на модели холерного вибриона [14]. Это позволило для дальнейшего изучения и выявления филогенетических связей между штаммами отобрать 6626 SNP.

Для сравнительного анализа составлена коллекция геномов возбудителя туляремии голарктического подвида, содержащая как имеющиеся в нашем распоряжении штаммы, так и последовательности из базы данных NCBI. Проведение генотипирования по подобранному перечню SNP показало довольно высокую разрешающую способность – количество уникальных генотипов практически совпало с количеством изучаемых геномов. По итогам кластерного анализа построена дендрограмма, что позволило объединить изучаемые штаммы в 7 условных групп, обозначенных буквами с А по G (рисунок).

Одновременно проведено генотипирование по схеме «канонических» SNP (canSNP), результаты которого отражены в таблице. Для каждого штамма определен полный SNP-путь (SNP path), при этом последнее значение и является canSNP-типом. Для удобства визуального анализа для каждого штамма на дендрограмме в скобках указан canSNP-тип.

Проведение сравнительного анализа показало довольно хорошую сопоставимость результатов. Так, две основные ветви на дендрограмме соответствовали делению на группы В12 и В6 в схеме «канонических» SNP.

На наш взгляд, построение дендрограммы по большому количеству SNP является более удобным инструментом для проведения анализа по сравнению со схемой «канонических» SNP, так как дает возможность оценивать как взаимосвязи между различными группами, так и близость штаммов внутри кластеров. Например, штамм 38 (Россия, Республика Калмыкия, 1987 г.) имеет одинаковый canSNP-тип со штаммами из Казахстана, однако исходя из дендрограммы видно, что они далеко не идентичны друг с другом. И наоборот, два штамма, также входящие в этот кластер, имеют canSNP-типы В.199 и В.95, однако оба этих типа являются дочерними для canSNP-типа В.65. Фактически все пять штаммов, входящих в кластер А, имеют canSNP-тип В.65 (таблица).



Дендрограмма, построенная на основе 6626 SNP. Для каждого штамма указаны название, место и год выделения (при наличии). В скобках указан canSNP-тип

Dendrogram based on 6626 SNP. The designation, site and year of isolation are indicated for each strain (if available). The canSNP type is indicated in parentheses

Не менее интересным является кластер В на дендрограмме, образованный двумя вакцинными (LVS и 15NIEG) и тремя природными штаммами. При этом все эти штаммы имеют идентичный canSNP-тип В.77, что может привести к ошибочному выводу об идентичности этих штаммов. В то время как использование предлагаемой нами схемы SNP-типирования показало, что данные штаммы формируют отдельные ветки внутри кластера, что может быть связано с образованием у природных штаммов делеций областей дифференциации туляремийного микроба.

По данным Е.А. Нарышкиной и соавт. [15], у вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ выявлено пять уникальных SNP и две протяженные делеции (RD18 и RD19), отличающие его от всех остальных изолятов туляремийного микроба. У трех природных штаммов, входящих в кластер В (FDC179, FDC184 и FDC186), обнаружены три мутации, идентичные вакцинному штамму, и две – характерные для вирулентных штаммов, а также наличие одной из указанных делеций: RD18 – штамм FDC186, RD19 – штаммы FDC179 и FDC184.

Штаммы возбудителя туляремии, выделенные на территории Ростовской области в 2020 г., распределились между двумя различными кластерами. Так, штаммы *F. tularensis* № 210, 211 и 257 попали в общий кластер со штаммом *F. tularensis* № 1238, изолированным в Ростовской области в 1997 г. В этот же кластер попали штаммы из Финляндии и Казахстана. Это не противоречит схеме «канонических» SNP, согласно которой все они имеют тип В.170 (тип В.179 является дочерним для В.170).

Штаммы № 249, 251 и 256 сгруппировались со штаммом *F. tularensis* № 250, изолированным

также в этом же субъекте РФ в 1988 г. Интересно отметить, что в этот же кластер попали два штамма возбудителя туляремии (F0884 и F0889), циркулировавшие в 2010 г. на достаточно удаленной территории Турции. Причем пять из шести этих штаммов имеют одинаковый canSNP-тип (тип В.204 входит в тип В.203). Данная ситуация (выявление близкородственных штаммов с разницей в 32 года) побудила нас более прицельно изучить данные геномы, что позволило выявить короткую делецию 6 п.о. в гене *BZ14_825*, кодирующем *glucosyl hydrolases 18 family protein*. Нами сконструированы праймеры, фланкирующие указанную делецию (прямой – 5'-ttgtgcacttatcttagcctact-3'; обратный – 5'-gggtgctgacatcataaacaagg-3'). При этом у штаммов № 249, 250, 251 и 256, входящих в кластер F по результатам ПЦР, образовывался ампликон размером 93 п.о., в то время как у всех других штаммов из Ростовской области ампликон имел длину 99 п.о.

Для подтверждения размера получаемых ампликонов проведены дополнительные эксперименты с использованием автоматической электрофорезной станции Experion™, которые подтвердили наличие делеции в гене *glucosyl hydrolases 18 family protein*.

Важным преимуществом INDEL-типирования является возможность проведения анализа штаммов *in silico* на основе данных полногеномного секвенирования. С этой целью нами были использованы для анализа все полногеномные последовательности штаммов возбудителя туляремии, имеющиеся в базе данных NCBI, что позволило создать локальную коллекцию из 997 геномов. Проведение «виртуальной ПЦР» среди этих геномов позволило выявить указанную делецию только у двух (штаммы F0884 и F0889, выделенные в Турции и также входящие в кластер F)

**Результаты определения «канонических» SNP
Results of determination of the “canonical” SNPs**

Штамм / Strain	Группа и «путь» на основе «канонических» SNP / canSNP path and group
Tul-97_KZ	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.65
Tul-92_KZ	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.65
Tul-112_KZ	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.65
NO-7_2011	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.65; B.199
F0865	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.65; B.199; B.201; B.95
Ft38	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.65
LVS	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.24; B.77
15NIEG	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.24; B.77
FDC184	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.24; B.77
FDC186	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.24; B.77
FDC179	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.23; B.196; B.24; B.77
Tul-78_KZ	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.66; B.190; B.191
Tul-153_KZ	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.66; B.190; B.191
Ftul117	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.66; B.190; B.191
FDC205	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.66; B.190; B.67
F0923	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.13; B.26; B.42; B.168; B.66; B.190
Kh-M_26_2	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.79
Kh-M_8m	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.79
FDC200	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.79; B.68
Tul-19_KZ	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.21; B.170; B.179
257	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.21; B.170
F0847	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.21; B.170
F0856	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.21; B.170
Ft1238	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.21; B.170
210	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.21; B.170
211	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.26; B.42; B.168; B.21; B.170
256	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.27; B.203
250	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.27; B.203; B.204
249	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.27; B.203
251	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.27; B.203
F0884	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.27; B.28
F0889	B.1; B.2; B.3; B.5; B.12; B.72; B.13; B.27; B.203
NO-3_2011	B.1; B.2; B.3; B.5; B.6; B.7; B.133; B.81; B.135; B.139; B.150
NO-1_2011	B.1; B.2; B.3; B.5; B.6; B.7; B.133; B.81; B.135; B.139; B.94
NO-14_2011	B.1; B.2; B.3; B.5; B.6; B.7; B.133; B.81; B.136
27	B.1; B.2; B.3; B.5; B.6; B.7; B.133; B.81; B.136

из 997 геномов. Таким образом, полученный результат полностью совпал с данными SNP-типирования, согласно которому ростовские (№ 249, 250, 251, 256) и турецкие (№ F0884, F0889) штаммы образуют отдельную обособленную группу, имеющую редко встречающийся генотип. На наш взгляд, полученные данные показывают возможность циркуляции близкородственных штаммов туляремийного микроба в природных очагах инфекции, располагающихся в отдаленных ландшафтно-географических районах, что определяет перспективы дальнейшего изучения.

Согласно существующей классификации, подвид *holarctica* разделен на три биовара: различаю-

щиеся по чувствительности к эритромицину bv.I EryS, bv.II EryR и bv.japonica (штаммы, выделенные в Японии). На территории России циркулируют в основном штаммы EryR, а штаммы EryS встречаются только на Дальнем Востоке и в Сибири.

Современная схема генетического типирования *F. tularensis* subsp. *holarctica* определяет четыре основные филогенетические группы в пределах этого подвида (B.4, B.6, B.12 и B.16). Группа B.12 представлена исключительно EryR-штаммами, а EryS-штаммы распределены по другим группам. Распространение штаммов группы B.12 носит глобальный характер, на европейской тер-

ритории они преобладают в Восточной Европе, а в Западной Европе доминируют штаммы группы B.6. В Центральной Европе представлены как штаммы B.12, так и B.6. Группа B.16 состоит из штаммов bv.japonica. Групповая принадлежность российских EryS-штаммов пока не определена.

Штамм 27, выделенный в природном очаге степного типа на юго-востоке Ростовской области в 1996 г., попал в отдельный кластер (G), образованный геномами из группы B6 (эритромицин-чувствительные варианты). Причем он оказался генетически близок норвежскому штамму NO-14_2011 как по нашим данным, так и по результатам «канонического» SNP-анализа. Интересно, что исследованная нами ранее культура штамма 20198, изолированная от зайца-русака *Lepus europaeus* в 2017 г. в том же очаге, также характеризовалась уникальным генотипом, отличающимся от других штаммов, и чувствительностью к эритромицину [16].

Таким образом, в ходе настоящего исследования проведено полногеномное секвенирование шести штаммов возбудителя туляремии. Подобран набор SNP-маркеров для проведения сравнительного анализа, что позволило установить одновременную циркуляцию двух генетически разнородных популяций *F. tularensis* в природном очаге степного типа на юго-востоке Ростовской области. Выявленные нами сходные генотипы у штаммов при интервале их изоляции в 23 и 32 года свидетельствуют как об устойчивости в пространстве и времени паразитарной системы природных очагов инфекции, так и о генетической стабильности микроба. Предлагаемый метод упрощает процедуры дифференциации штаммов *F. tularensis* с использованием SNP-маркеров, описанных ранее.

Проведенный сравнительный анализ предлагаемой нами схемы типирования и схемы «канонических» SNP показал сопоставимость результатов в пределах больших кластеров, при этом использование набора из 6626 SNP позволяет дифференцировать штаммы внутри одного canSNP-типа.

Выявлено, что вакцинные штаммы имеют общий canSNP-тип с некоторыми клиническими и природными штаммами, однако использование предлагаемой схемы генотипирования позволяет обнаружить различия между этими штаммами.

Обнаружен новый INDEL-маркер, характерный для группы российско-турецких штаммов, позволяющий выявлять штаммы данной группы как *in silico* (при анализе данных полногеномного секвенирования), так и *in vitro* (в ПЦР с электрофоретическим учетом результатов).

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

- Skottman T., Piiparinen H., Hyytiäinen H., Mylly V., Skurnik M., Nikkari S. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 26(3):207–11. DOI: 10.1007/s10096-007-0262-z.
- Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Куликалова Е.С., Холин А.В., Мазепа А.В., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по туляремии на территории России в 2020 г., прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 1:32–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-32-42.
- Sissonen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmälä H., Henttonen H., Isomursu M., Kinnunen P.M., Pelkola K., Pelkonen S., Tarkka E., Myrtennäs K., Nikkari S., Forsman M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis. (Lond).* 2015; 47(10):701–6. DOI: 10.3109/23744235.2015.1049657.
- Водопьянов А.С., Павлович Н.В., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Пичурина Н.Л., Мишанькин Б.Н. Генотипирование методом мультилокусного VNTR-анализа штаммов *Francisella tularensis*, выделенных из природных очагов туляремии Ростовской области. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2004; 2:24–8.
- Водопьянов А.С., Мишанькин Б.Н., Павлович Н.В., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю. VNTR-генотипирование штаммов *Francisella tularensis*, выделенных на территории бывшего СССР и некоторых стран Европы во время эпизоотий 1988–1989 годов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2006; 3:22–7.
- Pandya G.A., Holmes M.H., Petersen J.M., Pradhan S., Karamycheva S.A., Wolcott M.J., Molins C., Jones M., Schriefer M.E., Fleischmann R.D., Peterson S.N. Whole genome single nucleotide polymorphism based phylogeny of *Francisella tularensis* and its application to the development of a strain typing assay. *BMC Microbiol.* 2009; 9:213. DOI: 10.1186/1471-2180-9-213.
- 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.
- 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 EuroSiberian tularaemia. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(2):634–45. DOI: 10.1111/1462-2920.12052.
- Kevin M., Girault G., Caspar Y., Cherfa M.A., Mendy C., Tomaso H., Gavrier-Widen D., Escudero R., Maurin M., Durand B., Ponsart C., Madani N. Phylogeography and genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in France (1947–2018). *Front. Microbiol.* 2020; 11:287. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00287.
- Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н. Молекулярно-генетические основы различий подвидов возбудителя туляремии и типирования штаммов *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2022; 40(1):12–20. DOI: 10.17116/molgen2022400112.
- 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.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10):2731–9. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
- Lärkeryd A., Myrtennäs K., Karlsson E., Dwibedi C.K., Forsman M., Larsson P., Johansson A., Sjödin A. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics.* 2014; 30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113.
- Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Совершенствование методики SNP-типирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(6):587–93. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-9.
- 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.

16. Цимбалистова М.В., Сорокин В.М., Аронова Н.В., Анисимова А.С., Пичурина Н.Л., Пасюкова Н.И., Селянская Н.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Павлович Н.В., Ковалев Е.В., Носков А.К. Биологические свойства и генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, изолированных на территории Ростовской области в 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:134–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-134-140.

References

1. Skottman T., Piiparinen H., Hyytiäinen H., Myllys V., Skurnik M., Nikkari S. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 26(3):207–11. DOI: 10.1007/s10096-007-0262-z.

2. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Kholin A.V., Mazepa A.V., Kulikalova E.S., Trankvilevsky D.V., Khranov M.V., Dyatlov I.A. [Epidemiological and epizootiological situation on tularemia in Russia and neighboring countries in 2019, the forecast for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):21–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-21-32.

3. Sissonen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmilä H., Henttonen H., Isomursu M., Kinnunen P.M., Pelkola K., Pelkonen S., Tarkka E., Myrtennäs K., Nikkari S., Forsman M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis. (Lond)*. 2015; 47(10):701–6. DOI: 10.3109/23744235.2015.1049657.

4. Vodop'yanov A.S., Pavlovich N.V., Vodop'yanov S.O., Suchkov I.Yu., Pichurina N.L., Mishan'kin B.N. [Genotyping of *Francisella tularensis* strains isolated from natural foci of tularemia in the Rostov Region using multilocus VNTR analysis]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2004; (2):24–8.

5. Vodop'yanov A.S., Mishan'kin B.N., Pavlovich N.V., Vodop'yanov S.O., Suchkov I.Yu. [VNTR genotyping of *Francisella tularensis* strains isolated on the territory of the former USSR and some European countries during epizootics of 1988–1989]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2006; (3):22–7.

6. Pandya G.A., Holmes M.H., Petersen J.M., Pradhan S., Karamycheva S.A., Wolcott M.J., Molins C., Jones M., Schriefer M.E., Fleischmann R.D., Peterson S.N. Whole genome single nucleotide polymorphism based phylogeny of *Francisella tularensis* and its application to the development of a strain typing assay. *BMC Microbiol.* 2009; 9:213. DOI: 10.1186/1471-2180-9-213.

7. 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.

8. 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 Eurosiberian tularemia. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(2):634–45. DOI: 10.1111/1462-2920.12052.

9. Kevin M., Girault G., Caspar Y., Cherfa M.A., Mendy C., Tomaso H., Gavrier-Widen D., Escudero R., Maurin M., Durand B.,

Ponsart C., Madani N. Phylogeography and genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in France (1947–2018). *Front. Microbiol.* 2020; 11:287. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00287.

10. Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N. [Molecular genetic basis of differences in tularemia causative agent subspecies and typing of strains of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2022; 40(1):12–20. DOI: 10.17116/molgen2022400112.

11. 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.

12. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10):2731–9. DOI: 10.1093/molbev/msr121.

13. Lärkeryd A., Myrtennäs K., Karlsson E., Dwibedi C.K., Forsman M., Larsson P., Johansson A., Sjödin A. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics*. 2014; 30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113.

14. Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., Oleinikov I.P. [Improvement of the method of SNP-typing of *Vibrio cholerae* strains based on the analysis of primary data of whole-genome sequencing]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2020; 97(6):587–93. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-9.

15. Naryshkina E.A., Krasnov Y.M., Alhova Z.V., Badanin D.V., Osin A.V., Lyashova O.Yu., Sayapina L.V., Bondarev V.P., Merkulov V.A., Olefir Yu.V., Kuttyrev V.V. [Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of *Francisella tularensis* vaccine strain 15 NIEG]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):91–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97.

16. Tsimbalistova M.V., Sorokin V.M., Aronova N.V., Anisimova A.S., Pichurina N.L., Pasyukova N.I., Selyanskaya N.A., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Pavlovich N.V., Kovalev E.V., Noskov A.K. [Biological properties and genetic characteristics of *Francisella tularensis* strains isolated in the territory of the Rostov Region in 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (3):134–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-134-140.

Authors:

Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., Tsimbalistova M.V., Pichurina N.L., Sorokin V.M., Pavlovich N.V., Noskov A.K. 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:

Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Цимбалистова М.В., Пичурина Н.Л., Сорокин В.М., Павлович Н.В., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.