

# Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, выделенных во время эпизоотии 2022–2023 гг. в Ростовской области и Донецкой Народной Республике

В.М.Сорокин, Н.В.Павлович, М.В.Цимбалистова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов, А.К.Носков

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Существование на территории Российской Федерации стабильных природных очагов бактериальных и вирусных инфекций определяет риск возникновения эпидемических осложнений и обосновывает одну из основных задач общественного здравоохранения – обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Туляремия является природно-очаговой инфекцией и отнесена к особо опасным заболеваниям человека. В силу географических и климатических условий Ростовская область является территорией, эндемичной по данной инфекции. Следует учитывать также существование трансграничных очагов туляремии. Цель нашего исследования заключалась в изучении биологических свойств и генетических характеристик штаммов возбудителя туляремии, изолированных из природных очагов Ростовской области и Донецкой Народной Республики в 2022–2023 гг. Во время эпизоотии 2022–2023 гг. выделено 16 культур возбудителя туляремии. Установлено, что все выделенные штаммы относятся к виду *Francisella tularensis* подвида *holarctica* биовара Ery<sup>R</sup>. Применение методов INDEL-типирования позволило подтвердить, что все изолированные штаммы относятся к подвиду *holarctica*, и установить их принадлежность к основной генетической подгруппе В.12. Проведено полногеномное секвенирование 16 штаммов *F. tularensis* и показано, что они относятся к двум разным генотипам – В.170 и В.203, согласно схеме «канонических SNP». Расширенное генотипирование с использованием 6626 SNP подтвердило разделение штаммов 2022–2023 гг. на два кластера. Штаммы *F. tularensis*, выделенные в ДНР, оказались генетически близки штаммам, изолированным на территории трех районов Ростовской области, что позволяет подтвердить гипотезу о существовании трансграничного очага туляремии. Анализ результатов VNTR-генотипирования подтвердил разделение 16 штаммов 2022–2023 гг. на два разных VNTR-генотипа и позволил выявить более тонкие различия в генотипах штаммов в данной популяции туляремийного микроба. Простой и быстрый метод VNTR является методом выбора для проведения филогенетического анализа.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, полногеномное секвенирование, SNP, INDEL, VNTR, полимеразная цепная реакция, филогенетический анализ

**Для цитирования:** Сорокин В.М., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Носков А.К. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, выделенных во время эпизоотии 2022–2023 гг. в Ростовской области и Донецкой Народной Республике. Бактериология. 2023; 8(3): 68–74. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-68-74

## Molecular genetic characteristics of *Francisella tularensis* strains during the 2022–2023 epizooty in the Rostov region and the Donetsk People's Republic

V.M.Sorokin, N.V.Pavlovich, M.V.Tsimbalistova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov, A.K.Noskov

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

The existence of stable natural foci of bacterial and viral infections on the territory of the Russian Federation determines the risk of epidemic complications and substantiates one of the main tasks of public health – ensuring the sanitary and epidemiological well-being of the population. Tularemia is a natural focal infection and is classified as a particularly dangerous human disease. Due to geographical and climatic conditions, the Rostov region is a territory endemic for this infection. The existence of cross-border foci of tularemia should also be taken into account. The purpose of our study was to study the biological properties and genetic characteristics of tularemia pathogen strains isolated from natural foci of the Rostov region and the DPR in 2022–2023. During the

### Для корреспонденции:

Сорокин Владимир Михайлович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40  
Телефон: (863) 240-91-13  
E-mail: soroka53@mail.ru

Статья поступила 10.07.2023, принята к печати 29.09.2023

### For correspondence:

Vladimir M. Sorokin, PhD in Biological Sciences, senior researcher of the natural focal and zoonotic infections laboratory of Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: (863) 240-91-13  
E-mail: soroka53@mail.ru

The article was received 10.07.2023, accepted for publication 29.09.2023

2022–2023 epizootic, 16 cultures of the tularemia pathogen were isolated. It was established that all isolated strains belong to the species *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* biovar Ery<sup>R</sup>. The use of INDEL-typing methods made it possible to confirm that all isolated strains belong to the subspecies *holarctica* and to establish their belonging to the main genetic subgroup B.12. Whole genome sequencing of 16 strains of *F. tularensis* was carried out and it was shown that they belong to two different genotypes B.170 and B.203, according to the «canonical SNP» scheme. Extended genotyping using 6626 SNPs confirmed the separation of the 2022–2023 strains into two clusters. The strains of *F. tularensis* isolated in the DPR turned out to be genetically close to the strains isolated in the territory of three districts of the Rostov region, which allows us to confirm the hypothesis of the existence of a transboundary focus of tularemia. Analysis of the results of VNTR-genotyping confirmed the division of 16 strains of 2022–2023 years into two different VNTR genotypes and revealed more subtle differences in strain genotypes in this tularemia microbe population. The simple and fast VNTR method is the method of choice for phylogenetic analysis.

**Key words:** *Francisella tularensis*, whole genome sequencing, SNP, INDEL, VNTR, PCR, phylogenetic analysis

**For citation:** Sorokin V.M., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Noskov A.K. Molecular genetic characteristics of *Francisella tularensis* strains during the 2022–2023 epizooty in the Rostov region and the Donetsk People's Republic. *Bacteriology*. 2023; 8(3): 68–74. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-68-74

**С**уществование на территории Российской Федерации (РФ) стабильных природных очагов бактериальных и вирусных инфекций определяет риск возникновения эпидемических осложнений и обосновывает одну из основных задач общественного здравоохранения – обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения. В настоящее время в РФ реализуется Федеральная программа «Санитарный щит», направленная на противодействие завозу и распространению возбудителей инфекционных заболеваний. Кроме того, в рамках программы предусматривается постоянный мониторинг активности очагов природно-очаговых и зоонозных инфекций, расположенных на территории РФ и сопредельных регионов.

Туляремия является природно-очаговой инфекцией и отнесена к особо опасным заболеваниям человека. Эндемичные очаги инфекции широко распространены в северном полушарии земного шара: в Европе заболевание встречается практически во всех странах, включая Россию. Особого внимания заслуживает тот факт, что в последние десятилетия прослеживается четкая тенденция не только к активизации известных очагов, но и к формированию новых на территориях, ранее благополучных по туляремии.

В силу географических и климатических условий Ростовская область (РО) является территорией, эндемичной по данной инфекции. Поэтому проблема туляремии на сегодняшний день остается актуальной для области, так как природные очаги пойменно-болотного и степного типов зарегистрированы в 36 муниципальных образованиях [1]. На территории Украины существует 51 природный очаг туляремии [1–3]. Следует учитывать также существование трансграничных очагов туляремии, в частности, на границе РО и Донецкой Народной Республики (ДНР) [4]. Следует подчеркнуть, что с 1996 по 2017 г. эпидемическая ситуация по туляремии в области оценивалась как стабильно благополучная [1]. В 2020 г. было проведено эпизоотологическое обследование территории РО и выделены 6 культур возбудителя туляремии от мелких грызунов, собранных в Сальском и Ремонтненском районах РО. В 2022–2023 гг. зафиксирована эпизоотия среди грызунов в трех районах РО (Целинский, Ремонтненский, Неклиновский) и одном районе ДНР (Новоазовский) с выделением 16 культур возбудителя туляремии.

**Цель исследования** заключалась в изучении биологических свойств и генетических характеристик штаммов возбудителя туляремии, изолированных из природных очагов Ростовской области и ДНР в 2022–2023 гг.

## Материалы и методы

Штаммы *Francisella tularensis*, использованные в работе, были выделены во время эпизоотии 2022–2023 гг. в РО и ДНР.

Бактерии *F. tularensis* выращивали на среде Т в течение 24 ч при 37°C. Культурально-морфологические, биохимические и биологические свойства туляремийного микроба изучали в соответствии с МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией» [5]. Антибиотикочувствительность исследуемых культур изучали диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам» [6].

Полногеномное секвенирование проводили на платформе MiSeq Illumina. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [7]. 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. Для определения «канонических SNP» использовано свободное программное обеспечение CanSNPer2 [8]. Алгоритм выбора SNP для анализа WGS описан ранее [9].

Конструирование праймеров и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) *in silico* осуществляли при помощи программ Primer3Plus и авторской программы VirtualPCR. Кластерный анализ и построение филогенетического дерева проводили с использованием программы GrapeTree (алгоритм NJ) [10]. Для оптимизации набора VNTR-локусов с целью получения максимального числа индивидуальных генотипов была использована программа AuSeTTS (Automated Selection of Typing Target Subsets) [11].

Для детекции VNTR-локусов ПЦР проводили отдельно для каждого из 5 локусов. Температура отжига составляла 55°C для всех локусов (M3, M6, M10, M20A, M24). Продукты амплификации анализировали в 8%-м полиакриламидном геле и определяли размер амплифицированных фрагментов по стандарту молекулярных масс с помощью программы Quantity One.

**Результаты исследования и их обсуждение**

При изучении выделенных культур с помощью традиционных микробиологических методов (культурально-морфологические, биохимические, антигенные свойства, патогенность для лабораторных животных) установлено, что все они относятся к виду *F. tularensis*. С помощью разработанных ранее биохимических экспресс-тестов дополнительно проведена внутривидовая дифференциация культур [12–14]. Установлено, что все выделенные штаммы относились к виду *F. tularensis* подвида *holarctica* биовара Ery<sup>R</sup>. В настоящее время молекулярно-биологические методы исследования инфекционных агентов приобретают все большее значение в связи с их информативностью и возможностью определить филогенетическое родство тех или иных штаммов. Применение методов INDEL-типирования [15, 16] позволило подтвердить, что все изолированные штаммы относятся к подвиду *holarctica*, и установить их принадлежность к основной генетической подгруппе В.12.

Проведено полногеномное секвенирование 16 штаммов *F. tularensis*, выделенных в трех районах РО (Целинский, Ремонтненский, Неклиновский) и одном районе ДНР (Новоазовский). Использование схемы «канонических SNP» [8] показало, что они относятся к двум разным генотипам – В.170 и В.203 (таблица).

Штаммы *F. tularensis*, выделенные в Новоазовском районе ДНР, представлены генотипом В.203, в то время как штаммы из трех районов РО принадлежат к обоим установленным генотипам.

Проведение расширенного генотипирования с использованием 6626 SNP позволило построить дендрограмму, отражающую генетическую близость между различными штаммами (рис. 1). Анализ дендрограммы подтвердил разделение штаммов 2022–2023 гг. на два кластера – А и В.

Штаммы *F. tularensis*, выделенные в ДНР (Новоазовский район), оказались генетически близки штаммам, изолированным на территории трех районов РО, что позволяет подтвердить гипотезу о существовании трансграничного очага туляремии [4] (рис. 2).

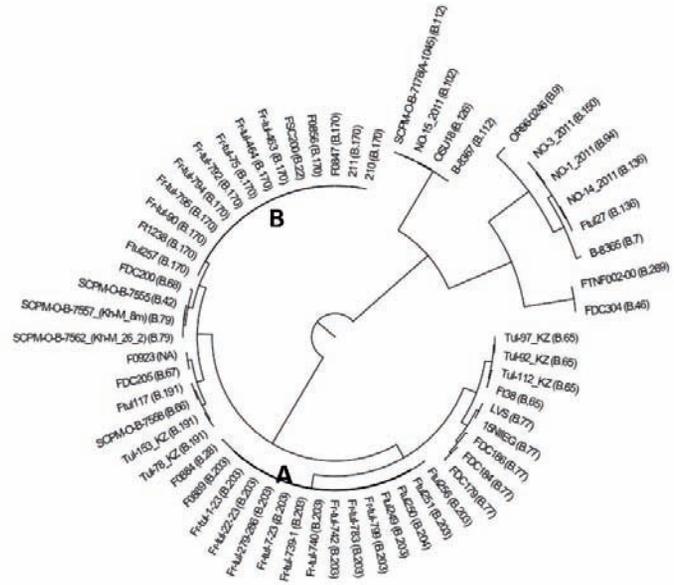


Рис. 1. Фрагмент дендрограммы, построенной по итогам анализа 6626 SNP.  
 Fig. 1. Fragment of a dendrogram constructed based on the results of the analysis of 6626 SNPs.

С целью выявления корреляции результатов генотипирования *F. tularensis* разными методами было проведено MLVA-типирование по 5 VNTR-локусам штаммов *F. tularensis*, выделенных во время эпизоотии 2022–2023 гг., а также из природных очагов России и Европы. VNTR-анализ российских штаммов, включая 13 выделенных до 2022 г. в Ростовской области, проводили *in vitro*. Типирование европейских штаммов проводили *in silico* с использованием базы данных GenBank. Дендрограмма сформирована с использованием программы GrapeTree по алгоритму NJ и приведена на рис. 3.

Анализ результатов VNTR-генотипирования подтвердил разделение 16 штаммов 2022–2023 г. на два разных VNTR-генотипа (А и В), соответствующих кластерам, выявленным при SNP-типировании. При этом следует особо подчеркнуть

Таблица. Фрагмент таблицы генотипов выделенных штаммов, согласно схеме «канонических SNP» [8]  
 Table. Fragment of the table of genotypes of isolated strains, according to the «canonical SNP» scheme [8]

Номер штамма / Strain number	Место выделения / Selection site	Тип CanSNP / CanSNP tipe	CanSNP-путь / CanSNP pass
464	Целинский р-н, п. Северный / Tselinsky district, Severny village	В.170	В.12;В.72;В.13;В.26;В.42;В.168;В.21;В.170
740	Новоазовский р-н, с. Роза-Люксембург / Novoazovsky district, Rosa-Luxembourg village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
742	Новоазовский р-н, с. Кузнецы / Novoazovsky district, Kuznetsy village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
279-286	Новоазовский р-н, с. Кузнецы / Novoazovsky district, Kuznetsy village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
739-1	Новоазовский р-н, с. Порохня / Novoazovsky district, Porokhny village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
783	Неклиновский р-н, пос. Приморка / Neklinovsky district, Primorka village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
794	Целинский р-н, п. Сладкая Балка / Tselinsky district, Sladkaya Balka village	В.170	В.12;В.72;В.13;В.26;В.42;В.168;В.21;В.170
795	Целинский р-н, с. Лопанка / Tselinsky district, Lopanka village	В.170	В.12;В.72;В.13;В.26;В.42;В.168;В.21;В.170

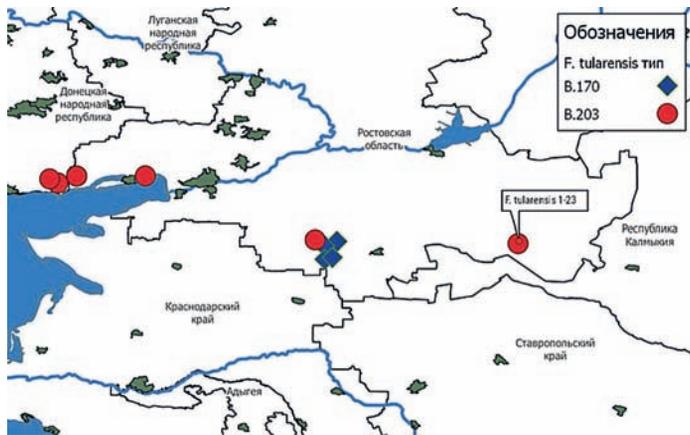


Рис. 2. Районы выделения штаммов *F. tularensis*.  
Fig. 2. *F. tularensis* isolation areas.

тот факт, что обнаружены различия во взаимном расположении генотипов некоторых штаммов по версии SNP и VNTR-типирования. Штаммы, входящие в кластер А по версии SNP (рис. 1), представлены тремя группами близкородственных штаммов по версии VNTR (рис. 3). Такое же распределение наблюдается и для кластера В. Таким образом, метод VNTR-типирования позволяет выявить более тонкие различия в генотипах штаммов, по крайней мере в данной популяции туляремийного микроба.

Метод VNTR-генотипирования позволил ранее определить 4 VNTR-генотипа при анализе штаммов, изолированных в РО во время эпизоотии 2020 г. [17], причем 2 из этих 4 генотипов выявлены также и в 2022–2023 г., а другие два относятся к тем же кластерам А и В по версии SNP-типирования (рис. 1, 3).

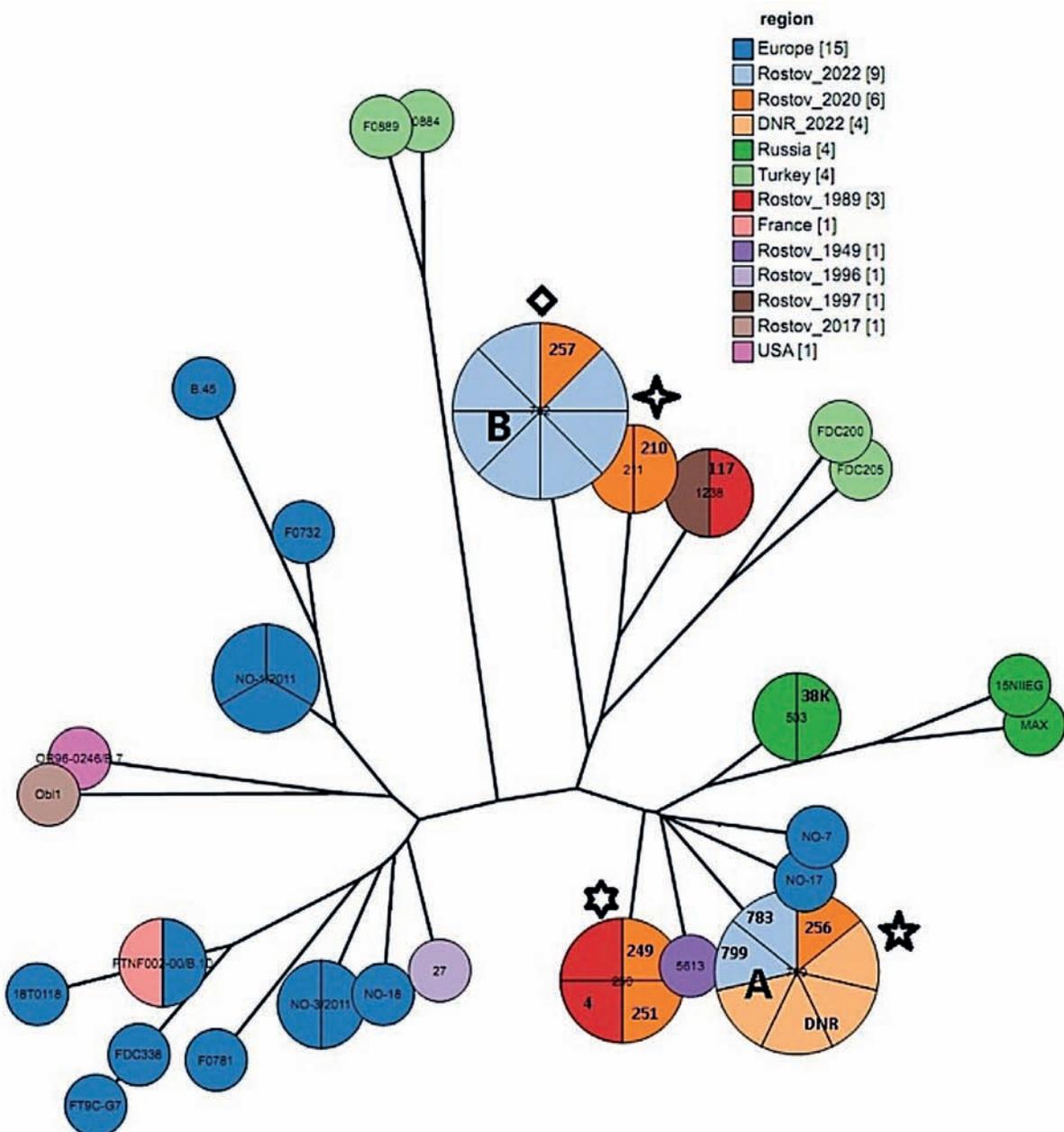


Рис. 3. Филогенетическое дерево VNTR-генотипов европейских и российских штаммов *F. tularensis*, построенное по алгоритму NJ. Символы обозначают общие генотипы штаммов 2020 и 2022–2023 гг.  
Fig. 3. Phylogenetic tree of VNTR-genotypes of European and Russian strains of *F. tularensis* built using the NJ algorithm. The symbols indicate the common genotypes of the 2020 and 2022–2023 strains.



Рис. 4. Карта распределения VNTR-генотипов штаммов *F. tularensis*.  
Fig. 4. Distribution map of VNTR-genotypes of *F. tularensis* strains.

Для филогенетического анализа популяций различных микроорганизмов успешно применяются как SNP-, так и VNTR-методы (рис. 4). Так, например, для популяций *Bacillus anthracis* применяется комбинация SNP- и VNTR-маркеров [18, 19], включающая набор из 14 диагностически значимых SNP (canSNP) на первом этапе. С другой стороны, при анализе вспышки заболевания, вызванного бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, проведенном с применением методов VNTR-типирования и полногеномного секвенирования, авторы пришли к выводу о целесообразности применения на первом этапе простого и быстрого метода MLVA с последующим секвенированием изолятов с одинаковым MLVA-профилем [20].

В то же время данные по сравнительному изучению результатов совместного VNTR-и SNP-типирования штаммов *F. tularensis* весьма немногочисленны. В работе [21] показано, что кластеризация по VNTR-генотипам согласуется с таковой по SNP-генотипам, при этом метод SNP обладает большей разрешающей способностью – 45 изученных штаммов представлены 23 SN-генотипами и лишь 6 VNTR-генотипами. Только лишь в одном случае один SNP-генотип делится на два VNTR-генотипа. Шевцовым с соавт. [22] представлены результаты генотипирования 39 штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica*, выделенных в Казахстане, включая вакцинный штамм 15 НИИЭГ, с использованием MLVA, canSNP и wgSNP. Генотипирование MLVA проводили по классической схеме генотипирования, включающей 25 локусов, из них только 5 локусов оказались вариабельными для данной популяции. В

набор были включены еще два VNTR-локуса, обнаруженные авторами *in silico*. Изученные штаммы представлены 19 MLVA-генотипами, причем кластеризация по MLVA-генотипам коррелирует с таковой для canSNP и wgSNP-типирования и разрешающая способность методов примерно одинакова. Анализ ридов длиной 300 п.н. позволил корректно идентифицировать все VNTR-аллели у 39 изученных штаммов. Авторы делают вывод о том, что ПЦР-анализ с использованием MLVA7-набора совместим с анализом WGS *in silico* и должен облегчить выбор штаммов для секвенирования и контроля качества идентичности штаммов.

Еще одним доводом в пользу примененного набора VNTR-локусов служат данные Нарышкиной с соавт. [23], полученные при полногеномном секвенировании вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Для проведения филогенетического анализа из базы данных NCBI GenBank были взяты 229 геномов *F. tularensis*. В итоге в анализируемой группе, состоящей из 230 геномов *F. tularensis*, всего выявлено 31 294 коровых SNP. Филогенетический анализ показал, что максимально близко к исследуемому штамму расположены два варианта штамма *F. tularensis* LVS. Следующим по филогенетической близости к штамму *F. tularensis* 15 НИИЭГ оказался штамм *F. tularensis* ssp. *holarctica* MAX, Россия, 1928 г. Далее следует группа из трех штаммов *F. tularensis* ssp. *holarctica*, выделенных в 2011 г. в Норвегии от больных людей, – NO17, NO18 и NO7, отличающихся от штамма 15 НИИЭГ на 23, 23 и 24 коровых SNPs соответственно. Наиболее удаленным по филогенетическому родству от

штамма 15 НИИЭГ из рассматриваемой группы является штамм 503, Россия, 1939 г., отличающийся от него на 29 коровых SNP. В нашем исследовании наблюдается практически то же распределение родственных штаммов (рис. 3).

Таким образом, предлагаемый нами набор из 5 VNTR-локусов при филогенетическом анализе дает сходный профиль кластеризации по сравнению с данными, полученными при использовании разных наборов SNP.

Проведено полногеномное секвенирование 16 штаммов *F. tularensis*, выделенных в трех районах РО (Целинский, Ремонтненский, Неклиновский) и одном районе ДНР (Новоазовский). Использование схемы «канонических SNP» показало, что они относятся к двум разным генотипам – В.170 и В.203. Расширенное генотипирование с использованием 6626 SNP позволило подтвердить разделение штаммов 2022–2023 гг. на два кластера – А и В.

Анализ результатов VNTR-генотипирования подтвердил разделение 16 штаммов 2022–2023 гг. на два разных VNTR-генотипа (А и В), соответствующих кластерам, выявленным при SNP-типировании.

Штаммы *F. tularensis*, выделенные в ДНР (Новоазовский район), оказались генетически близки штаммам, изолированным на территории трех районов РО, что позволяет подтвердить гипотезу о существовании трансграничного очага туляремии.

Простой и быстрый метод VNTR является методом выбора для проведения филогенетического анализа. Преимуществами метода являются возможность генотипирования возбудителя непосредственно в полевом материале без выделения чистой культуры, а также отсутствие необходимости в выполнении трудоемкой и затратной процедуры полногеномного секвенирования.

#### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

#### Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rosпотребнадзор.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

#### Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

#### Литература

1. Ковалев ЕВ, Карпущенко ГВ, Швагер ММ, Полонский АВ, Сидельников ВВ, Гончаров АЮ, и др. Особенности распространения туляреминой инфекции в Ростовской области. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017;16(6):37-40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40

2. Мокриевич АН, Кравченко ТБ, Фирстова ВВ, Титарева ГМ, Дятлов ИА, Тимофеев ВС. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования. Оболонск, М.: Династия, 2019.

3. Кудрявцева ТЮ, Мокриевич АН. Туляремия в мире. Инфекция и иммунитет. 2021;11(2):249-264. DOI: 10.15789/2220-7619-TTW-1380

4. Добровольский ОП, Пичурина НЛ, Орехов ИВ, Полонский АВ, Гончаров АЮ, и др. Сравнительный анализ биоценотической структуры носителей возбудителя туляремии в очагах степного типа приграничных территорий Ростовской области. Пест-Менеджмент. 2020;3:13-19. DOI: 10.25732/pm.2020.115.3.002
5. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сеп, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.2495–09. М., 2009.
6. Эпидемиологический надзор за туляремией. Методические указания МУ 3.1.2007-05. М., 2005.
7. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
8. Larkeryd A, Myrtennas K, Karlsson E, Dwibedi CK, Forsman M, Larsson P, et al. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. Bioinformatics. 2014 Jun 15;30(12):1762-4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113
9. Водопьянов АС, Писанов РВ, Водопьянов СО, Мишанькин БН, Олейников ИП, Кругликов ВД, и др. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* – разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016;21(3):146-52.
10. Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. Genome Res. 2018 Sep;28(9):1395-1404. DOI: 10.1101/gr.232397.117
11. O'Sullivan MV, Sintchenko V, Gilbert GL. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. BMC Bioinformatics. 2013 May 1;14:148. DOI: 10.1186/1471-2105-14-148
12. Родионова ИВ. Дифференциация географических рас *Francisella tularensis* на основании активности цитруллинуреидазы. Лабораторное дело. 1970;1:42-3.
13. Цимбалистова МВ, Павлович НВ. Фосфатазная активность у представителей рода *Francisella*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1998;1:10-3.
14. Цимбалистова МВ, Павлович НВ. Особенности формирования устойчивости *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* к β-лактамам антибиотикам. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014;1:3-8.
15. Сорокин ВМ, Водопьянов АС, Павлович РВ, Цимбалистова МВ. Способ определения подвидов *Francisella tularensis* методом мультипраймажной ПЦР. RU 2 765 495 С1 от 2022.01.31.
16. Кудрявцева ТЮ, Мокриевич АН. 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/molgen20224001112
17. Цимбалистова МВ, Сорокин ВМ, Аронова НВ, Анисимова АС, Пичурина НЛ, Пасюкова НИ, и др. Биологические свойства и генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, изолированных на территории Ростовской области в 2020 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;3:134-140.
18. Timofeev VS, Bakhteeva IV, Dyatlov IA. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. Russ J Genet. 2018;54(1):1-11. DOI: 10.1134/S1022795418010118
19. Анисимова ЕА, Фахрутдинов НА, Миргазов ДА, Додонова ЕА, Елизарова ИА, Горбунова МЕ, Хаммадов НИ, Зайнуллин ЛИ, Осянин КА. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(6):560-567. DOI 10.18699/VJGB-22-68
20. Bidet P, Birgy A, Brethon B, Dalle JH, Mariani-Kurkdjian P, Courroux C, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates including multidrug-resistant serogroup O12 isolates, by use of a rapid and simplified multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis and whole genome sequencing. J Hosp Infect. 2022 Dec;130:56-62. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.012
21. Myrtennas K, Escudero R, Zaballos Á, González-Martín-Niño R, Gyuranecz M, Johansson A. Genetic Traces of the *Francisella tularensis* Colonization of Spain,

- 1998–2020. *Microorganisms*. 2020 Nov 14;8(11):1784. DOI: 10.3390/microorganisms8111784
22. Shevtsov V, Kairzhanova A, Shevtsov A, Shustov A, Kalendar R, Abdrakhmanov S, et al. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 May 17;15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419
23. Нарышкина ЕА, Краснов ЯМ, Альхова ЖВ, Баданин ДВ, Осин АВ, Ляшова ОЮ, и др. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Проблемы особо опасных инфекций. 2020;2:91–97. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97
16. Kudryavtseva TYu, Mokrievich AN. Molecular and genetic bases of differences in subspecies of the causative agent of tularemia and typing of strains of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2022;40(1):12–20. DOI: 10.17116/molgen20224001112 (In Russian).
17. Tsimbalistova MV, Sorokin VM, Aronova NV, Anisimova AS, Pichurina NL, Pasyukova NI, et al. Biological properties and genetic characteristics of *Francisella tularensis* strains isolated on the territory Rostov region in 2020. *Problems of Especially Dangerous Infections*. 2021;3:134–140. (In Russian).
18. Timofeev VS, Bakhteeva IV, Dyatlov IA. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. *Russ J Genet*. 2018;54(1):1–11. DOI: 10.1134/S1022795418010118
19. Anisimova EA, Fakhrutdinov NA, Mirgazov DA, Dodonova EA, Elizarova IA, Gorbunova M, et al. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii*. 2022 Oct;26(6):560–567. DOI: 10.18699/VJGB-22-68
20. Bidet P, Birgy A, Brethon B, Dalle JH, Mariani-Kurkdjian P, Courroux C, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates including multidrug-resistant serogroup O12 isolates, by use of a rapid and simplified multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis and whole genome sequencing. *J Hosp Infect*. 2022 Dec;130:56–62. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.012
21. Myrtenäs K, Escudero R, Zaballos Á, González-Martín-Niño R, Gyuranecz M, Johansson A. Genetic Traces of the *Francisella tularensis* Colonization of Spain, 1998–2020. *Microorganisms*. 2020 Nov 14;8(11):1784. DOI: 10.3390/microorganisms8111784
22. Shevtsov V, Kairzhanova A, Shevtsov A, Shustov A, Kalendar R, Abdrakhmanov S, et al. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 May 17;15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419
23. Naryshkina EA, Krasnov YaM, Alkhova ZhV, Badanin DV, Osin AV, Lyashova OYu, et al. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG. *Problems of Especially Dangerous Infections*. 2020;2:91–97. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97 (In Russian).

## References

1. Kovalev EV, Karpuschenko GV, Schwager MM, Polonsky AV, Sidelnikov VV, Goncharov AYu, et al. Features of the spread of tularemia infection in the Rostov region. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017;16(6):37–40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40 (In Russian).
2. Mokrievich AN, Kravchenko TB, Firstova VV, Titareva GM, Dyatlov IA, Timofeev VS. Tularemia: state of the problem and research methods. *Obolensk, M.: Dynast Publ.*, 2019. (In Russian).
3. Kudryavtseva TYu, Mokrievich AN. Tularemia in the world. *Infection and immunity*. 2021;11(2):249–264. DOI: 10.15789/2220-7619-TTW-1380 (In Russian).
4. Dobrovolsky OP, Pichurina NL, Orekhov IV, Polonsky AV, Goncharov AYu, et al. Comparative analysis of biocenotic structure of tularemia agents in natural foci of steppe type in boundary territories of Rostov region. *Pest Management*. 2020;3:13–19. DOI: 10.25732/pm.2020.115.3.002 (In Russian).
5. Determination of the sensitivity of pathogens of dangerous bacterial infections (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis) to antibacterial drugs. *Guidelines MUK 4.2.2495-09. M.*, 2009. (In Russian).
6. Epidemiological surveillance of tularemia. *Guidelines MU 3.1.2007-05. M.*, 2005. (In Russian).
7. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May;19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
8. Larkeryd A, Myrtenäs K, Karlsson E, Dwibedi CK, Forsman M, Larsson P, et al. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics*. 2014 Jun 15;30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113
9. Vodopyanov AS, Pisanov RV, Vodopyanov SO, Mishankin BN, Oleinikov IP, Kruglikov VD, et al. Molecular Epidemiology of *Vibrio cholerae* – Development of an Algorithm for Whole Genome Sequencing Data Analysis. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2016;21(3):146–52. (In Russian).
10. Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res*. 2018 Sep;28(9):1395–1404. DOI: 10.1101/gr.232397.117
11. O'Sullivan MV, Sintchenko V, Gilbert GL. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics*. 2013 May 1;14:148. DOI: 10.1186/1471-2105-14-148
12. Rodionova IV. Differentiation of geographical races of *Francisella tularensis* based on citrulline ureidase activity. *Laboratory Work*. 1970;1:42–3. (In Russian).
13. Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Phosphatase activity in representatives of the genus *Francisella*. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1998;1:10–3. (In Russian).
14. Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Features of resistance formation in *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2014;1:3–8. (In Russian).
15. Sorokin VM, Vodopyanov AS, Pavlovich RV, Tsimbalistova MV. Method for determining subspecies of *Francisella tularensis* by multiprimer PCR. *RU 2 765 495 C1* of 2022.01.31. (In Russian).

## Информация о соавторах:

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, и.о. заведующего отделом природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Цимбалистова Марина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Носков Алексей Кимович, кандидат медицинских наук, директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

## Information about co-authors:

Natalia V. Pavlovich, MD, PhD, DSc, Chief Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Marina V. Tsimbalistova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Alexey S. Vodopyanov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Chief Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Alexey K. Noskov, PhD, MD, Director of Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор