



## Дифференциация подвидов *Francisella tularensis* методом INDEL-типирования

Сорокин В.М.<sup>✉</sup>, Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В.

Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

### Аннотация

**Введение.** *Francisella tularensis*, этиологический агент туляремии, относится к факультативным внутриклеточным патогенам, вызывающим тяжёлое заболевание у многих видов животных и человека, и является агентом биотерроризма категории А. В настоящее время *F. tularensis* делится на четыре подвида: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (*nearctica*), *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, которые различаются по патогенности и географическому распределению. Исторически такое разделение было обусловлено различным ареалом циркуляции штаммов, их отличиями в биохимической активности и патогенностью для разных хозяев. Биохимическое определение подвидов весьма трудоёмко и требует работы с живыми культурами микроорганизма, что и определяет необходимость разработки новых молекулярно-генетических подходов для генотипирования штаммов *F. tularensis*.

**Целью** настоящего исследования является разработка способа дифференциации подвидов и отдельных групп *F. tularensis* на основе INDEL-типирования. Задачи исследования: создание локальной базы данных нуклеотидных последовательностей штаммов *F. tularensis* разных подвидов, поиск INDEL-маркеров, значимых для дифференциации подвидов возбудителя туляремии, конструирование праймеров для детекции INDEL-маркеров с помощью ПЦР, оптимизация набора INDEL-маркеров и выяснение филогенетических связей между изученными штаммами.

**Материалы и методы.** Локальную базу данных нуклеотидных последовательностей штаммов *F. tularensis* разных подвидов, представленных в базе данных GenBank, создавали с помощью авторского программного обеспечения. Детекцию INDEL-маркеров в геномах штаммов локальной базы данных проводили с помощью программы «GeneExpert». Конструирование праймеров и ПЦР *in silico* осуществляли при помощи программы «Primer3Plus» и авторской программы «VirtualPCR», кластерный анализ и построение филогенетического дерева — программы «GrapeTree».

**Результаты и обсуждение.** Использование предложенных 5 INDEL-маркеров для генотипирования 29 изученных штаммов разных подвидов из базы данных GenBank позволило обнаружить 9 индивидуальных генотипов с высоким индексом разнообразия (DI = 0,85). Отмечено не только соответствующее разделение подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* по разным кластерам, но и внутривидовое деление на группы штаммов. Дифференциация подвидов *F. tularensis* подтверждена *in vitro* на коллекции штаммов разных подвидов музея живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института.

**Заключение.** Впервые разработана схема дифференциации подвидов *F. tularensis* на основе метода INDEL-типирования, позволяющая *in vitro* без необходимости секвенирования штаммов идентифицировать как подвиды *F. tularensis* (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), так и группы штаммов внутри подвидов. Метод защищен патентом. Топология филогенетического дерева INDEL-генотипов штаммов *F. tularensis* коррелирует со схемами эволюции туляремийного микроба, представленными ранее. Предлагаемый метод может быть применён для комбинированного типирования штаммов *F. tularensis* совместно с MLVA- или SNP-типированием.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, subspecies, INDEL, MLVA, SNP, филогенетический анализ

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Дифференциация подвидов *Francisella tularensis* методом INDEL-типирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2022;99(2):193–202.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-189>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-189>

## Differentiation of the *Francisella tularensis* subspecies by the INDEL typing method

Vladimir M. Sorokin<sup>✉</sup>, Aleksey S. Vodopyanov, Marina V. Tsimbalistova, Natalya V. Pavlovich

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

### Abstract

**Background.** *Francisella tularensis*, the etiological agent of tularemia, belongs to the facultative intracellular pathogens that cause severe disease in humans and many species of animals, and is a category A bioterrorism agent. Currently, *F. tularensis* is divided into four subspecies: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (nearctica), *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, which differ in their pathogenicity and geographical distribution. Historically, this division was due to the different distribution area of strains, their differences in biochemical activity and pathogenicity for different hosts. The biochemical identification of subspecies is very laborious and requires work with live cultures of the microorganism, which determines the need to develop new molecular genetic approaches for genotyping *F. tularensis* strains.

The aim of this study is to develop a method for differentiating subspecies and individual groups of *F. tularensis* based on INDEL typing. Research objectives: creation of a local database of nucleotide sequences of *F. tularensis* strains of different subspecies, search for INDEL markers that are significant for the differentiation of subspecies of the causative agent of tularemia, designing primers for the detection of INDEL markers using PCR, optimization of the set of INDEL markers and elucidation of phylogenetic relationships between the studied strains based on the proposed INDEL typing method.

**Materials and methods.** The local database of nucleotide sequences of *F. tularensis* strains of different subspecies for comparative analysis of *F. tularensis* genomes presented in the GenBank database was created using the author's software. Detection of INDEL markers in the genomes of strains of the local database was carried out using the GeneExpert program. Primer design and *in silico* PCR were performed using the Primer3Plus software and the proprietary VirtualPCR software. Cluster analysis and construction of a phylogenetic tree were performed using the GrapeTree program.

**Results and discussion.** The implementation of the proposed five INDEL markers for genotyping of 29 studied strains of different subspecies from the GenBank database made it possible to detect 9 individual genotypes with a high diversity index (DI = 0.85). Not only the corresponding division of the *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, and *novicida* subspecies into different clusters was noted, but also the intraspecific division into groups of strains was observed. Differentiation of *F. tularensis* subspecies was confirmed *in vitro* for the collection of strains of different subspecies of the Collection of Living Cultures of the Rostov-on-Don Plague Control Research Institute.

**Conclusion.** For the first time, the *F. tularensis* subspecies differentiation system based on the INDEL typing method has been developed, which allows *in vitro* identification of both *F. tularensis* subspecies (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* and *novicida*) and groups of strains within subspecies without the need for strain sequencing. The method is protected by a patent.

The topology of the INDEL phylogenetic tree of genotypes of *F. tularensis* strains correlates with the patterns of evolution of the tularemia microbe presented earlier. The proposed method can be used for combined typing of *F. tularensis* strains together with MLVA or SNP typing.

**Keywords:** *Francisella tularensis*, subspecies, INDEL, MLVA, SNP, phylogenetic analysis

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Sorokin V.M., Vodopyanov A.S., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Differentiation of the *Francisella tularensis* subspecies by the INDEL typing method. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology* = *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):193–202.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-189>

### Введение

*Francisella tularensis*, этиологический агент туляремии, относится к факультативным внутриклеточным патогенам, вызывающим тяжёлое заболевание у многих видов животных и человека [1], и является агентом биотерроризма категории А [2]. В настоящее время *F. tularensis* делится на четыре подвида: *tularensis* (*nearctica*), *holarctica*, *mediasiatica*,

*novicida*, которые различаются по патогенности и географическому распределению [3]. Исторически такое разделение было обусловлено различным ареалом циркуляции штаммов, отличиями в их биохимической активности и патогенности для разных хозяев [4, 5]. *F. novicida*, официально признанный четвёртым подвидами вида *F. tularensis*, обладает высокой гомологией ДНК с другими подвидами

*F. tularensis*, но не является возбудителем типичной туляремийной инфекции [3]. Высоковирулентные штаммы *F. tularensis* subsp. *tularensis* (тип А) распространены только в Северной Америке, а менее патогенные штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* (тип В) циркулируют в основном в Северном полушарии. *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* по степени вирулентности близка *F. tularensis* subsp. *holarctica*, но географически ограничена только Центральной Азией [3]. Однако недавно выявлено расширение ареала её обитания с изоляцией штаммов на территории России [6]. *F. tularensis* subsp. *novicida* относится к слабопатогенному для человека подвиду, который редко выделяется в Северной Америке [3] и в одном случае был выделен в Австралии [7].

Все упомянутые подвиды различаются по степени их генетического полиморфизма. Редко встречающиеся подвиды (*F. tularensis* subsp. *mediasiatica* и *F. tularensis* subsp. *novicida*) проявляют высокий полиморфизм [8], но из-за небольшого количества исследованных штаммов их реальное генетическое разнообразие до сих пор в полной мере не изучено. Доминирующие и высоковирулентные подвиды (*F. tularensis* subsp. *tularensis* и *F. tularensis* subsp. *holarctica*) значительно различаются по уровню генетического полиморфизма. Например, *F. tularensis* subsp. *tularensis* представлен двумя генетически различными субпопуляциями (А.І и А.ІІ) с различным географическим распространением [3, 8–11]. Это подтверждено с помощью многих молекулярно-генетических методов, включая полногеномный анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) [3], мультилокусное секвенирование-типирование [11], риботипирование [12], пульс-гель-электрофорез (PFGE) [10, 12], анализ регионов различия [13], полиморфизма длины амплификационных фрагментов [12, 14] и канонических INDEL-маркеров [15], мультилокусный анализ полиморфизма числа tandemных повторов (MLVA) [8, 16]. Напротив, с помощью этих же методов было показано, что *F. tularensis* subsp. *holarctica* проявляет гораздо меньший генетический полиморфизм, что, наряду с широким географическим распространением, позволяет предположить более позднее происхождение этого подвида с дальнейшим его распространением по Северному полушарию [3, 8, 9, 13, 17]. Развитие метода MLVA-типирования позволило создать инструменты для адекватной дифференциации штаммов возбудителя туляремии и упростило межлабораторное сравнение полученных данных [8, 16, 18, 19]. Ранние методы молекулярного генотипирования *F. tularensis* обладали рядом недостатков: низкими чувствительностью и разрешающей способностью, слабой межлабораторной воспроизводимостью. Современный метод SNP-типирования требует предварительного секвенирования ДНК, что до сих пор не стало рутинным методом

исследования вследствие высокой трудоёмкости и затрат. Важное ограничение, присущее MLVA-типированию, — это риск ошибочной оценки родства между штаммами на больших генетических расстояниях. К тому же ни один из этих методов не предусматривает алгоритма дифференциации подвидов *F. tularensis*.

В последние годы значительно выросло число публикаций, посвящённых как модификации существующих методов дифференциации штаммов *F. tularensis*, так и их практическому применению для анализа популяций возбудителя туляремии, циркулирующих на различных территориях [20–28]. Тем не менее до настоящего времени актуальной остаётся разработка методов дифференциации подвидов и отдельных групп *F. tularensis* [26].

**Целью** настоящего исследования является разработка способа дифференциации подвидов и отдельных групп *F. tularensis* на основе INDEL-типирования.

## Материалы и методы

Локальную базу данных нуклеотидных последовательностей штаммов *F. tularensis* разных подвидов для сравнительного анализа геномов *F. tularensis*, представленных в базе данных GenBank, создавали с помощью авторского программного обеспечения.

Детекцию всех INDEL-маркеров в геномах штаммов локальной базы данных с предустановленным размером более 7 п.н. осуществляли с помощью программы «GeneExpert». Конструирование праймеров и проведение ПЦР *in silico* осуществляли при помощи программы «Primer3Plus» и авторской программы «VirtualPCR». Кластерный анализ и построение филогенетического дерева проводили с использованием программы «GrapeTree» (алгоритм NJ) [29]. Для оптимизации набора INDEL-локусов с целью получения максимального числа индивидуальных генотипов была использована программа «Automated Selection of Typing Target Subsets» («AuSeTTS») [30].

Для детекции INDEL-локусов реакцию проводили отдельно для каждого из 5 локусов. Температура отжига — 55°C для всех локусов: ft263, ft278, ft502, ft1779, ft09. Продукты амплификации анализировали в 8% полиакриламидном геле и определяли размер амплифицированных фрагментов по стандарту молекулярных масс с помощью программы «Quantity One».

## Результаты

Для сравнительного анализа геномов *F. tularensis*, представленных в базе данных GenBank, с помощью авторского программного обеспечения создана локальная база данных нуклеотидных последовательностей 29 штаммов *F. tularensis* разных

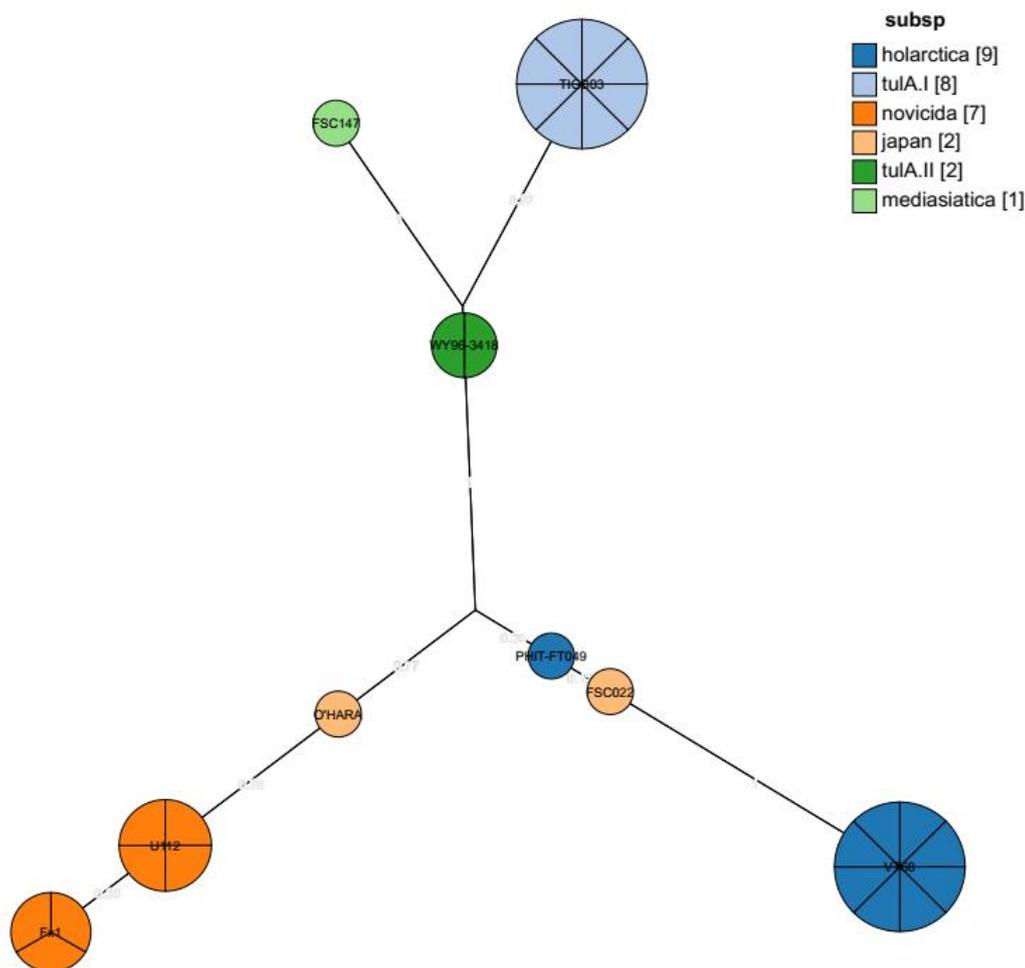
**Таблица 1.** Праймеры, использованные в исследовании**Table 1.** Primers used in the study

INDEL-локус / INDEL locus	Праймеры / Primers	Фрагмент, п.н. / Fragment, bp
ft263	AAAAATACTGGTACTGTTAATGTTATCTTTC TATTTACCAGCAGCAACGA	62/69
ft278	TTTGTGATGATTATGATTTTGCAG TGGTTGAGTTTATCACTATGCTCA	59/74
ft502	ATCATTGGTTTTGCCTACGG TGCAACACCTAAAGCTGCAA	201/339
ft1779	GCCTTTTCAGTTCTTGAAATTGT TTTGAGATTCGTGTAGTGTACTTGTG	98/107/950
ft09	CCGCAGAAGTTATTGGCTGT ACAGGATCACCTAACGCAGT	134/235

подвидов. С помощью программы «GeneExpert» проведено попарное сравнение более 1800 открытых рамок считывания в геномах штаммов локальной базы данных для детекции всех INDEL-маркеров с предустановленным размером более 7 п.н. Обнаружено 13 локусов, содержащих INDEL-маркеры, значимые для дифференциации подвидов воз-

будителя туляремии. Были сконструированы праймеры, позволяющие детектировать INDEL-маркеры в 13 локусах.

Тестирование результатов ПЦП *in silico* по 13 локусам с помощью программы «AuSeTTs» позволило обнаружить у 29 изученных штаммов из базы данных GenBank 9 индивидуальных генотипов с вы-



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево INDEL-генотипов 29 штаммов *F. tularensis* разных подвидов, построенное по алгоритму NJ.

**Fig. 1.** Phylogenetic tree of INDEL genotypes for 29 *F. tularensis* strains of different subspecies, built using the NJ algorithm.

**Таблица 2.** Распределение INDEL-маркеров в геноме 29 штаммов *F. tularensis* разных подвидов  
**Table 2.** Distribution of INDEL markers in the genome of 29 *F. tularensis* strains of different subspecies

Штаммы Strains	Подвид Subspecies	INDEL-локусы (фрагмент, п.н.) / INDEL loci (fragment, bp)				
		ft263	ft278	ft502	ft1779	ft09
AL97-2214	<i>novicida</i>	69	74	0	107	0
AZ06-7470	<i>novicida</i>	69	74	0	107	235
D9876	<i>novicida</i>	69	74	0	107	235
F6168	<i>novicida</i>	69	74	0	107	0
Fx1	<i>novicida</i>	69	74	0	107	0
PA10-7858	<i>novicida</i>	69	74	0	107	235
U112	<i>novicida</i>	69	74	0	107	235
425	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
F92	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
FSC200	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
FTNF002-00	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
FTT1	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
LVS	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
OSU18	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
PHIT-FT049	<i>holarctica</i>	69	0	339	950	235
VT68	<i>holarctica</i>	62	0	339	950	235
FSC147	<i>mediasiatica</i>	69	59	339	98	134
MA00-2987	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
NE061598	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
NR-21734(SchuS4)	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
NR-21736(SchuS4)	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
NR-21737(SchuS4)	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
SHU-S4	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
TI0902	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
TIGB03	<i>tular.A.I</i>	69	59	201	98	235
WY-00W4114	<i>tular.A.II</i>	69	59	339	98	235
WY96-3418	<i>tular.A.II</i>	69	59	339	98	235
FSC022	<i>hol.bv jap.</i>	69	74	339	950	235
O-HARA	<i>hol.bv jap.</i>	69	74	339	0	235

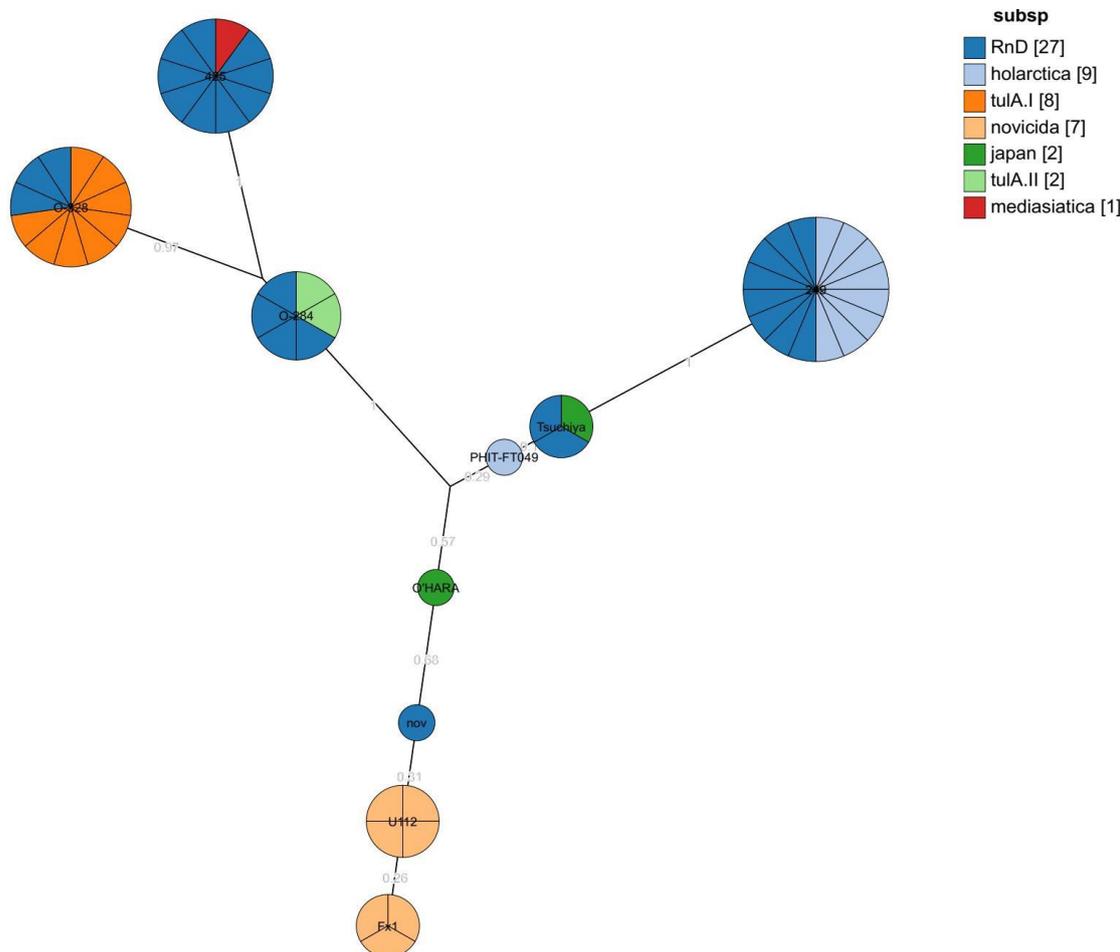
соким индексом разнообразия ( $DI = 0,85$ ) [36]. Для оптимизации набора INDEL-локусов с целью получения максимального числа индивидуальных генотипов была использована программа «AuSeTTS» [30]. В результате удалось сократить число используемых INDEL-локусов до 5 без потери разрешающей способности метода (9 индивидуальных генотипов с индексом разнообразия  $DI = 0,85$ ). Все праймеры, использованные в данном исследовании, и размер соответствующих продуктов амплификации приведены в **табл. 1**.

Для каждого локуса разные аллели четко разделяются при использовании электрофореза в 8% полиакриламидном геле и могут быть легко идентифицированы.

Результаты виртуального ПЦР-типирования 29 штаммов *F. tularensis* из базы данных GenBank разных подвидов по пяти избранным INDEL-локусам представлены в **табл. 2**.

Проведена кластеризация выявленных INDEL-генотипов 29 штаммов из базы данных GenBank и построено филогенетическое дерево с помощью программы «GrapeTree» (алгоритм NJ) [29] (**рис. 1**).

Отмечено соответствующее разделение подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* по разным кластерам, причём подвид *tularensis* чётко разделён на подгруппы А.І и А.ІІ. Штаммы подвида *novicida* образуют кластер, разделённый на 2 группы, 3 штамма *holarctica bv japonica* представлены



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево INDEL-генотипов 29 штаммов *F. tularensis* из базы данных GenBank и 27 штаммов *F. tularensis* (МЖК), построенное по алгоритму NJ.

**Fig. 2.** Phylogenetic tree of INDEL genotypes for 29 strains of *F. tularensis* from the GenBank database and 27 strains of *F. tularensis* (Collection of Living Cultures), constructed using the NJ algorithm.

3 индивидуальными генотипами, 2 из которых принадлежат генетической линии *holarctica*. Точную принадлежность штамма O'HARA трудно определить из-за отсутствия данных по одному из локусов в базе данных GenBank.

Для верификации *in vitro* предлагаемой схемы INDEL-типирования исследованы 27 штаммов *F. tularensis* разных подвидов из музея живых культур (МЖК) Ростовского-на-Дону противочумного института методом ПЦР с использованием сконструированных праймеров. Для определения филогенетических связей между штаммами из базы данных GenBank и 27 штаммами *F. tularensis* из МЖК проведён кластерный анализ INDEL-генотипов и построено совместное филогенетическое дерево (рис. 2).

Итак, INDEL-генотип всех 9 штаммов подвида *holarctica* из МЖК совпадает с таковым у штаммов из базы данных GenBank, генотип всех 9 штаммов (МЖК) подвида *mediasiatica* идентичен генотипу единственного штамма из базы данных GenBank

этого подвида (FSC147), что подтверждает особенность штаммов этого подвида. Штаммы подвида *tularensis* (МЖК) впервые удастся *in vitro* разделить на группы А.І и А.ІІ (табл. 3). Генотип двух «японских» штаммов (*holarctica* bv *jaronica*) идентичен генотипу штамма FSC022 и представляет, наряду со штаммом PHIT-FT049, отдельный кластер bv *jaronica*. Единственный штамм *F. novicida* из МЖК относится к кластеру штаммов подвида *novicida*, представленному 2 группами штаммов. Принадлежность штамма O'HARA по-прежнему остаётся неопределённой.

### Обсуждение

INDEL-типирование штаммов *F. tularensis* было впервые предложено в 2007 г. [15], когда MLVA являлся единственным методом с высокой разрешающей способностью на уровне штаммов по сравнению с методом PFGE. Метод MLVA был успешно применён во многих эпидемиологических исследованиях [8, 9, 31]. В методе используется обезза-

**Таблица 3.** Распределение подвидов и групп 27 штаммов *F. tularensis* разных подвидов при анализе 5 INDEL-маркеров *in vitro*

**Table 3.** Distribution of subspecies and groups of 27 strains of *F. tularensis* of different subspecies in the analysis of 5 INDEL markers *in vitro*

Штаммы (МЖК) Strains (Collection of Living Cultures)	Подвид по паспорту до типирования Subspecies according to passport before typing	Подвид после типирования Subspecies according to passport after typing
Schu	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.I
503	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
15vac	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
nov	<i>novicida</i>	<i>novicida</i>
240	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
543	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
210	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
211	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
251	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
256	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
257	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
249	<i>holarctica</i>	<i>holarctica</i>
261	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.II
Acole	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.II
Nevada	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.II
O-402	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.I
O-328	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.I
O-284	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i> A.II
122	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
120	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
150	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
60	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
A-61	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
148	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
425	<i>mediasiatica</i>	<i>mediasiatica</i>
Japonica	<i>hol. bv japonica</i>	<i>hol. bv japonica</i>
Tsuchiya	<i>hol. bv japonica</i>	<i>hol. bv japonica</i>

раженная культура и, в противоположность PFGE, результаты MLVA представляют собой дискретные цифровые значения, обеспечивающие сравнительный анализ данных, полученных в разных лабораториях. Важное ограничение, присущее MLVA, — это риск ошибочной оценки родства между штаммами на больших генетических расстояниях. Высокая мутабельность MLVA-маркеров [32, 33] может вызывать эффекты гомоплазии, т.е. мутационные изменения по причинам, отличным от общего происхождения. INDEL-маркеры проявляют более низкую степень вариабельности и, следовательно, могут быть использованы при создании иерархической схемы типирования наряду с методом MLVA,

тем более что оба метода основаны на фрагментарном анализе, минимизируя время и затраты на исследование. При анализе нуклеотидных последовательностей 5 штаммов *F. tularensis* разных подвидов авторами [15] были обнаружены 280 INDEL-маркеров, из них более 70% не превышали размер 20 п.н. Для окончательного варианта схемы INDEL-типирования было отобрано 38 INDEL-локусов. Комбинированный способ объединил INDEL-типирование по 38 локусам и MLVA-типирование по 25 VNTR-локусам, ранее предложенное А. Johansson и соавт. [8]. Это исследование показало, что канонические INDEL-маркеры могут быть интегрированы в эволюционный анализ на больших генетических расстояниях, тогда как MLVA-типирование обеспечивает хорошую разрешающую способность для родственных штаммов. Позднее INDEL-типирование совместно с SNP-типированием было широко использовано для дифференциации штаммов *F. tularensis* в различных регионах мира [34, 35].

На наш взгляд, эта схема при всей своей эффективности чрезвычайно трудоёмкая и затратная для текущих исследований, поэтому мы предприняли усилия по её модификации для упрощённого и ускоренного определения подвидов штаммов *F. tularensis*. Для отбора INDEL-маркеров мы использовали расширенный набор штаммов (29) разных подвидов из базы данных GenBank, включающий единственный штамм подвида *mediasiatica* (FSC147). Основными условиями для выбора INDEL-маркеров являлись размер не менее 7 п.н. и значимость для дифференциации подвидов. На завершающем этапе были отобраны 5 маркеров, позволивших выявить у 29 штаммов *F. tularensis* из базы данных GenBank 9 индивидуальных генотипов с индексом разнообразия (DI = 0,85). Филогенетический анализ продемонстрировал разделение подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* по разным кластерам, причём подвид *tularensis* чётко разделен на подгруппы А.І и А.ІІ. Не удалось установить точную принадлежность штамма O'HARA, очевидно, из-за отсутствия данных по одному из локусов в базе данных GenBank. Важно отметить, что топология разных подвидов полностью коррелирует со схемами эволюции туляремийного микроба, построенными ранее при анализе постепенной утраты регионов различия и при полногеномном секвенировании [3].

Предлагаемая нами схема INDEL-типирования была апробирована *in vitro* на 27 штаммах *F. tularensis* разных подвидов из МЖК (табл. 3). Показано, что штаммы подвида *holarctica* составляют единый кластер со штаммами этого подвида из базы данных GenBank, а штаммы подвида *mediasiatica* подтверждают существование обособленного кластера этого подвида, включающего единственный штамм из базы данных GenBank (рис. 2). При кла-

стеризации подвида *tularensis* штаммы из МЖК впервые удаётся *in vitro* разделить на группы А.I и А.II (табл. 3). Генотип «японских» штаммов *holarctica* bv *японика* (МЖК) совпадает с генотипом штамма FSC022, который вместе со штаммом RHIT-FT049 входит в отдельный кластер bv *японика*. Музейный штамм *F. novicida* принадлежит кластеру штаммов подвида *novicida*.

### Заключение

Таким образом, нами впервые разработана схема дифференциации подвигов *F. tularensis* на основе метода INDEL-типирования, позволяющая *in vitro* без необходимости секвенирования штаммов идентифицировать как подвигов *F. tularensis* (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), так и группы штаммов внутри подвигов. Топология филогенетического дерева INDEL-генотипов штаммов *F. tularensis* коррелирует со схемами эволюции туляремийного микроба [3]. Способ защищён патентом [37]. Предлагаемый метод может быть применён для комбинированного типирования штаммов *F. tularensis* совместно с MLVA- или SNP-типированием.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Hopla C.E., Hopla A.K. Tularemia. In: Beran G.W., ed. *Handbook of Zoonoses*. Boca Raton, FL.: CRC Press; 1994: 113–26.
- Centers for Disease Control and Prevention, Office of Inspector General, Department of Health and Human Services (HHS). Possession, use, and transfer of select agents and toxins. Final rule. *Fed. Regist.* 2017; 82(12): 6278–94.
- Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1105: 30–66. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.011>
- Олсуфьев Н.Г., Мешерякова И.С. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis*. *Журнал гигиены эпидемиологии микробиологии иммунологии*. 1982; (26): 291–9.
- Олсуфьев Н.Г. *Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии*. М.: Медицина; 1975.
- Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И. и др. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; (1): 66–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-66-69>
- Whipp M.J., Davis J.M., Lum G., de Boer J., Zhou Y., Bearden S.W., et al. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52(Pt. 9): 839–42. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05245-0>
- Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Bystrom M., et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186(17): 5808–18. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004>
- Farlow J., Wagner D.M., Dukerich M., Stanley M., Chu M., Kubota K., et al. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(12): 1835–41. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050728>
- Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G., Mead P.S., Petersen J.M. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(7): 1113–8. <https://doi.org/10.3201/eid1207.051504>
- Svensson K., Larsson P., Johansson D., Bystrom M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11): 3903–8. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005>
- Fey P.D., Dempsey M.M., Olson M.E., Chrustowski M.S., Engle J.L., Jay J.J., et al. Molecular analysis of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *holarctica*. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 128(6): 926–35. <https://doi.org/10.1309/JN3NTHK4VVVWVKJT4A>
- Dempsey M.P., Niefeldt J., Ravel J., Hinrichs S., Crawford R., Benson A.K. Paired-end sequence mapping detects extensive genomic rearrangement and translocation during divergence of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* and *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* populations. *J. Bacteriol.* 2006; 188(16): 5904–14. <https://doi.org/10.1128/JB.00437-06>
- García Del Blanco N., Dobson M.E., Vela A.I., De La Puente V.A., Gutiérrez C.B., Hadfield T.L., et al. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(8): 2964–72. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2964-2972.2002>
- Larsson P., Svensson K., Karlsson L., Guala D., Granberg M., Forsman M., et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(11): 1725–32. <https://doi.org/10.3201/eid1311.070603>
- Farlow J., Smith K.L., Wong J., Abrams M., Lytle M., Keim P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3186–92. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3186-3192.2001>
- Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* 2009; 191(8): 2474–84. <https://doi.org/10.1128/jb.01786-08>
- Johansson A., Goransson I., Larsson P., Sjostedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3140–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001>
- Vogler A.J., Birdsell D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 48(1): 140–4. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02484.x>
- Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christy D., Mokrievich A., et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. *PLoS One*. 2017; 12(9): e0183714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183714>
- Sissonen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmila H., Henttonen H., Isomursu M., et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis.* 2015; 47(10): 701–6. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1049657>
- Dwibedi C., Birdsell D., Larkeryd A., Myrtennas K., Ohrman C., Nilsson E., et al. Long-range dispersal moved *Francisella tularensis* into Western Europe from the East. *Microb. Genom.* 2016; 2(12): e000100. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000100>
- Myrtennas K., Marinov K., Johansson A., Niemcewicz M., Karlsson E., Bystrom M., et al. Introduction and persistence of tularemia in Bulgaria. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2016; 6: 32838. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.32838>
- Schulze C., Heuner K., Myrtennas K., Karlsson E., Jacob D., Kutzer P., et al. High and novel genetic diversity of *Francisel-*

- la tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(12): 3025–36. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001175>
25. Pilo P. Phylogenetic lineages of *Francisella tularensis* in animals. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8: 258. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00258>
26. Larson M.A., Sayood K., Bartling A.M., Meyer J.R., Starr C., Baldwin J., et al. Differentiation of *Francisella tularensis* subspecies and subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(4): e01495–19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01495-19>
27. Öhrman C., Sahl J.W., Sjödin A., Unekliint I., Ballard R., Karlsson L., et al. Reorganized genomic taxonomy of *Francisellaceae* enables design of robust environmental PCR assays for detection of *Francisella tularensis*. *Microorganisms.* 2021; 9(1): 146. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010146>
28. Koene M., Rijks J., Maas M., Ruuls R., Engelsma M., van Tulden P., et al. Phylogeographic distribution of human and hare *Francisella tularensis* subsp. *Holarctica* strains in the Netherlands and its pathology in European brown hares (*Lepus europaeus*). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00011>
29. Zhou Z., Alikhan N.F., Sergeant M.J., Luhmann N., Vaz C., Francisco A.P., et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.* 2018; 28(9): 1395–404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>
30. O'Sullivan M.V., Sintchenko V., Gilbert G.L. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14: 148. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-148>
31. Johansson A., Göransson I., Larsson P., Sjöstedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3140–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001>
32. Vogler A.J., Keys C., Nemoto Y., Colman R.E., Jay Z., Keim P. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 2006; 188(12): 4253–63. <https://doi.org/10.1128/JB.00001-06>
33. Vogler A.J., Keys C.E., Allender C., Bailey I., Girard J., Pearson T., et al. Mutations, mutation rates, and evolution at the hypervariable VNTR loci of *Yersinia pestis*. *Mutat. Res.* 2007; 616(1-2): 145–58. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.007>
34. Svensson K., Granberg M., Karlsson L., Neubauerova V., Forsman M., Johansson A. A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008360>
35. Karlsson E., Svensson K., Lindgren P., Byström M., Sjödin A., Forsman M., et al. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of *Eurosi-berian tularaemia*. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(2): 634–45. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12052>
36. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11): 2465–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
37. Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Способ дифференциации штаммов *Francisella tularensis* путем молекулярно-генетического типирования. Патент РФ № 2 756 854С1; 2021.
3. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1105: 30–66. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.011>
4. Olsuf'ev N.G., Meshcheryakova I.S. Intraspecific taxonomy of the causative agent of tularemia *Francisella tularensis*. *Zhurnal gigieny epidemiologii mikrobiologii immunologii.* 1982; (26): 291–9. (in Russian)
5. Olsuf'ev N.G. *Taxonomy, Microbiology and Laboratory Diagnostics of the Causative Agent of Tularemia [Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika vzbudatelya tulyaremii]*. Moscow: Meditsina; 1975. (in Russian)
6. Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Kudryavtseva T.Yu., Ulanova G.I., Karbysheva S.B., Mironova R.I., et al. Isolation of central asian subspecies of tularemia agent in the altai territory. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2013; (1): 66–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-66-69> (in Russian)
7. Whipp M.J., Davis J.M., Lum G., de Boer J., Zhou Y., Bearden S.W., et al. Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52(Pt. 9): 839–42. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05245-0>
8. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Bystrom M., et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186(17): 5808–18. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004>
9. Farlow J., Wagner D.M., Dukerich M., Stanley M., Chu M., Kubota K., et al. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(12): 1835–41. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050728>
10. Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G., Mead P.S., Petersen J.M. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(7): 1113–8. <https://doi.org/10.3201/eid1207.051504>
11. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Bystrom M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(11): 3903–8. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005>
12. Fey P.D., Dempsey M.M., Olson M.E., Chrustowski M.S., Engle J.L., Jay J.J., et al. Molecular analysis of *Francisella tularensis* subspecies tularensis and holarctica. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 128(6): 926–35. <https://doi.org/10.1309/JN3NTHK4VVWVKJT4A>
13. Dempsey M.P., Nietfeldt J., Ravel J., Hinrichs S., Crawford R., Benson A.K. Paired-end sequence mapping detects extensive genomic rearrangement and translocation during divergence of *Francisella tularensis* subsp. tularensis and *Francisella tularensis* subsp. holarctica populations. *J. Bacteriol.* 2006; 188(16): 5904–14. <https://doi.org/10.1128/JB.00437-06>
14. García Del Blanco N., Dobson M.E., Vela A.I., De La Puente V.A., Gutiérrez C.B., Hadfield T.L., et al. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(8): 2964–72. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2964-2972.2002>
15. Larsson P., Svensson K., Karlsson L., Guala D., Granberg M., Forsman M., et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(11): 1725–32. <https://doi.org/10.3201/eid1311.070603>
16. Farlow J., Smith K.L., Wong J., Abrams M., Lytle M., Keim P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3186–92. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3186-3192.2001>
17. Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* 2009; 191(8): 2474–84. <https://doi.org/10.1128/jb.01786-08>

#### REFERENCES

18. Johansson A., Goransson I., Larsson P., Sjöstedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3140–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001>
19. Vogler A.J., Birdsell D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009; 48(1): 140–4. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02484.x>
20. Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christyany D., Mokrievich A., et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. *PLoS One.* 2017; 12(9): e0183714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183714>
21. Sissonen S., Rossow H., Karlsson E., Hemmila H., Henttonen H., Isomursu M., et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Finland, 1993–2011. *Infect. Dis.* 2015; 47(10): 701–6. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1049657>
22. Dwibedi C., Birdsell D., Larkeryd A., Myrtennas K., Ohrman C., Nilsson E., et al. Long-range dispersal moved *Francisella tularensis* into Western Europe from the East. *Microb. Genom.* 2016; 2(12): e000100. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000100>
23. Myrtennas K., Marinov K., Johansson A., Niemcewicz M., Karlsson E., Bystrom M., et al. Introduction and persistence of tularemia in Bulgaria. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2016; 6: 32838. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.32838>
24. Schulze C., Heuner K., Myrtennas K., Karlsson E., Jacob D., Kutzer P., et al. High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(12): 3025–36. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001175>
25. Pilo P. Phylogenetic lineages of *Francisella tularensis* in animals. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8: 258. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00258>
26. Larson M.A., Sayood K., Bartling A.M., Meyer J.R., Starr C., Baldwin J., et al. Differentiation of *Francisella tularensis* subspecies and subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(4): e01495–19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01495-19>
27. Öhrman C., Sahl J.W., Sjödin A., Unekint I., Ballard R., Karlsson L., et al. Reorganized genomic taxonomy of Francisellaceae enables design of robust environmental PCR assays for detection of *Francisella tularensis*. *Microorganisms.* 2021; 9(1): 146. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010146>
28. Koene M., Rijks J., Maas M., Ruuls R., Engelsma M., van Tulden P., et al. Phylogeographic distribution of human and hare *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains in the Netherlands and its pathology in European brown hares (*Lepus europaeus*). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00011>
29. Zhou Z., Alikhan N.F., Sergeant M.J., Luhmann N., Vaz C., Francisco A.P., et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.* 2018; 28(9): 1395–404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>
30. O'Sullivan M.V., Sintchenko V., Gilbert G.L. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14: 148. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-148>
31. Johansson A., Göransson I., Larsson P., Sjöstedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 3140–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001>
32. Vogler A.J., Keys C., Nemoto Y., Colman R.E., Jay Z., Keim P. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 2006; 188(12): 4253–63. <https://doi.org/10.1128/JB.00001-06>
33. Vogler A.J., Keys C.E., Allender C., Bailey I., Girard J., Pearson T., et al. Mutations, mutation rates, and evolution at the hyper-variable VNTR loci of *Yersinia pestis*. *Mutat. Res.* 2007; 616(1–2): 145–58. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.007>
34. Svensson K., Granberg M., Karlsson L., Neubauerova V., Forsman M., Johansson A. A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008360>
35. Karlsson E., Svensson K., Lindgren P., Byström M., Sjödin A., Forsman M., et al. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of *Eurosiiberian tularaemia*. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(2): 634–45. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12052>
36. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11): 2465–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
37. Sorokin V.M., Vodopyanov A.S., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Method of differentiation of *Francisella tularensis* strains by molecular genetic typing. Patent RF № 2 756 854C1; 2021. (in Russian)

### Информация об авторах

Сорокин Владимир Михайлович<sup>✉</sup> — к.б.н., с.н.с. лаб. туляремии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, [soroka53@mail.ru](mailto:soroka53@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1835-1496>

Водопьянов Алексей Сергеевич — к.м.н., и.о. зав. группой вирусологии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Цимбалистова Марина Викторовна — к.м.н., с.н.с. лаб. туляремии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>

Павлович Наталья Владимировна — д.м.н., г.н.с., и.о. зав. лаб. туляремии Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 12.08.2021;  
принята к публикации 07.04.2022;  
опубликована 30.04.2022

### Information about the authors

Vladimir M. Sorokin<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of tularemia, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, [soroka53@mail.ru](mailto:soroka53@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1835-1496>

Alexey S. Vodopyanov — Cand. Sci. (Med.), Deputy head, Group of virology, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Marina V. Tsimbalistova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of tularemia, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>

Natalya V. Pavlovich — D. Sci. (Med.), major researcher, Deputy head, Laboratory of tularemia, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 12.08.2021;  
accepted for publication 07.04.2022;  
published 30.04.2022