

Казахский агротехнический исследовательский университет имени
С. Сейфуллина

УДК 579.25: 579.26:579.8: 616-036.22

На правах рукописи

КАИРЖАНОВА АЛМА ДУЙСЕНБАЙКЫЗЫ

**Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis* циркулирующих
на территории Казахстана**

8D09101 – Ветеринарное благополучие животных

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант
кандидат биологических наук
ассоциированный профессор,
А.Б. Шевцов

Научный консультант
доктор ветеринарных наук,
профессор
С.К. Абдрахманов

Зарубежный научный консультант
доктор ветеринарных наук,
профессор
Christa Ewers
(Германия)

Республика Казахстан
Астана, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Возбудитель туляремии - <i>Francisella tularensis</i>	14
1.1.2 Геном возбудителя туляремии.....	19
1.2 Природные очаги туляремии	21
1.2.1 Природные очаги туляремии в Казахстане.....	21
1.2.1.1 Очаги предгорно-ручьевого типа.....	22
1.2.1.2 Очаги тугайного типа.....	23
1.2.1.3 Очаги степного типа.....	24
1.2.1.4 Пойменно-болотные очаги.....	25
1.2.1.5 Синантропные (антропургические) очаги туляремии.....	27
1.3 Природные резервуары и переносчики бактерии <i>F. tularensis</i>	27
1.3.1 Беспозвоночные животные – переносчики и хранители туляремийной инфекции.....	32
1.3.1.1 Иксодовые клещи.....	32
1.3.1.2 Гамазовые клещи.....	35
1.3.1.3 Блохи.....	37
1.3.1.4 Вши.....	38
1.3.1.5 Клещи.....	38
1.3.1.6 Слепни.....	39
1.3.1.7 Комары.....	40
1.3.1.8 Гидробионты.....	41
1.3.2 Клинические проявления туляремии у животных.....	42
1.4 Диагностика и генетическое типирование штаммов <i>F. tularensis</i>	44
1.5 Влияние природно-климатических, географических и социально-экономических факторов на проявление и распространение данных инфекций на территории республики.....	51
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	54
2.1 Материалы исследований.....	54
2.2 Методы исследований.....	54
2.2.1 Выделение ДНК.....	54
2.2.2 Количественное и качественное определение концентрации ДНК.....	55
2.2.3 Подтверждение чистоты ДНК методом анализа нуклеотидной последовательности <i>16S rRNA</i> гена.....	55
2.2.4 Идентификация подвидов <i>Francisella tularensis</i>	56
2.2.5 Электрофоретический анализ продуктов амплификации.....	56
2.2.6 MLVA типирование штаммов <i>Francisella tularensis</i>	56
2.2.7 Полногеномное секвенирование, определение однонуклеотидного	

полиморфизма (SNP) и назначение canSNP.....	58
2.2.8 Биоинформатический анализ результатов полногеномного секвенирования.....	59
2.2.9 <i>In silico</i> MLVA на сборках генома и на считывании необработанных последовательностей.....	59
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	61
3.1 Создание коллекций образцов ДНК штаммов <i>Francisella tularensis</i> пригодных для генотипирования методом MLVA и полногеномного секвенирования.....	61
3.2 Видовая идентификация штаммов <i>F. tularensis</i>	63
3.3 Внутривидовая идентификация штаммов <i>F. tularensis</i>	64
3.4 Разработка протокола генотипирования <i>Francisella tularensis</i> методом мультилокусного анализа VNTR повторов.....	65
3.4.1 Оптимизация условий постановки MLVA типирования <i>Francisella tularensis</i>	65
3.5 Проведение MLVA типирование штаммов <i>Francisella tularensis</i> по гипервариабельным VNTR маркерам и получение MLVA профилей.....	69
3.6 Полногеномное секвенирование штаммов <i>Francisella tularensis</i>	78
3.6.1 Анализ результатов полногеномного секвенирования 40 штаммов <i>Francisella tularensis</i>	83
3.6.1.2 Анализ результатов полногеномного секвенирования штамма <i>F. tularensis</i> subsp <i>mediasiatica</i>	83
3.6.1.3 Полногеномный SNP анализ подвида <i>holarctica</i>	85
3.7 MLVA генотипирование <i>in vitro</i>	90
3.8 <i>In silico</i> MLVA для <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> из Казахстана.....	91
3.9 Кластеризация <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> с использованием MLVA и соответствие с canSNP.....	93
4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	101
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Методические рекомендации по генотипированию возбудителя туляремии.....	115
ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Результаты MLVA типирования 148 штаммов <i>Francisella tularensis</i> по 11 VNTR локусам.....	117
ПРИЛОЖЕНИЕ В – Полногеномные данные штаммов <i>Francisella tularensis</i> внесенные в международную базу данных.....	123

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 7.32-2001. Межгосударственный стандарт. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 12.4.113-82. Система стандартов безопасности труда. Работы учебные лабораторные. Общие требования безопасности.

ГОСТ 1770-89. Посуда и оборудование лабораторные, стеклянные.

ISO 4142:2002. Посуда лабораторная. Пробирки.

ISO 12771:1997. Посуда лабораторная пластмассовая. Одноразовые серологические пипетки.

Ветеринарные (ветеринарно-санитарные) правила: утв. приказом Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 29 июня 2015 года, №7-1/587.

Кодекс здоровья наземных животных МЭБ. 29 издание. Том 1, Том 2, 2021 г.

Методическая инструкция «Порядок оформления и написания докторской диссертации», МИ СМК 110.26 – 2016.

Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан. Правила отбора проб перемещаемых (перевозимых) объектов и биологического материала: утв. 30 апреля 2015 года, №7-1/393.

Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан. Правила проведения диагностических исследований: утв. 11 июня 2014 года, №16-07/296.

Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан. Правила планирования и проведения ветеринарных мероприятий против особо опасных болезней животных: утв. 30 июня 2014 года, №16-07/332.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Ареал возбудителя – область распространения природных очагов – все пространство земли, занятое природными очагами данного заболевания.

Бактериемия – присутствие бактерий в кровотоке.

Варибельные тандемные повторы (Variable-Number Tandem Repeat) – участки ДНК с переменным количеством прямых повторов.

Геном – совокупность генов клеточного ядра.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – высокомолекулярное органическое соединение, кодирует генетическую информацию.

Колониеобразующие единицы – это показатель количества жизнеспособных микроорганизмов в единице объема (1 см³), в жидкости (1 мл), или в твердом / сухом материале (1 г).

Мультилокусный анализ переменных тандемных повторов (MLVA, Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) – анализ числа повторов в геноме, основанный на ПЦР, позволяет выявлять участки бактериальной ДНК, которые в результате проскальзывания репликационной вилки подвергаются ошибочному копированию, приводящему к их укорочению или удлинению.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Полногеномное секвенирование – расшифровка всей последовательности ДНК бактерий, включая как белок-кодирующие (экзом), так и некодирующие «молчащие» регионы генома.

Праймер – короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени; служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы (при репликации ДНК).

Природный очаг (синоним автономный очаг) – географически или экологически ограниченный участок поверхности земли, в пределах которого в современных условиях циркуляция возбудителя осуществляется без заноса извне неопределенно долгое время (десятки следующих друг за другом эпизоотических циклов).

Трансовариальная передача – способность самок кровососущих членистоногих животных передавать полученных возбудителей потомству, откладывая заражённые яйца, из которых затем выходят заражённые личинки.

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) – семейство компьютерных программ, служащих для поиска гомологов белков или нуклеиновых кислот, для которых известна первичная структура (последовательность) или её фрагмент.

Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) – метод

попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением.

in silico – термин, обозначающий компьютерное моделирование (симуляцию) эксперимента, чаще биологического.

in vitro – это технология выполнения экспериментов, когда опыты проводятся «в пробирке» - вне живого организма.

Штамм – чистая культура бактерий, грибов, риккетсий и иных микроорганизмов, выделенная из определённого источника и идентифицированная по тестам современной классификации.

Эпизоотология – наука, изучающая эпизоотии, проявление эпизоотического процесса, во время которого инфекция поражает большое количество животных, изучает объективные закономерности возникновения, проявления, распространения и угасания эпизоотий (инфекционных болезней) и на этой основе разрабатывает методы профилактики и меры борьбы с ними.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

гг.	– годы
°С	– показатель температуры по градуснику Цельсия
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
НАО	– некоммерческое акционерное общество
Нг	– нанограмм
ННЦООИ	– Национальный научный центр особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева
п. н.	– пар нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РК	– Республика Казахстан
мкл	– микролитр равен 10 ⁻⁶ литра
нг/мкл	– нанограмм на микролитр
КРС	– крупный рогатый скот
КОЕ	– колониеобразующие единицы
МРС	– мелкий рогатый скот
МЭБ	– Международное Эпизоотическое Бюро
НИИЭГ	– Научно исследовательский институт эпидемиологии и гигиены
СНГ	– Содружество Независимых Государств
дНТФ	– дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
ТАЕ	– Трис-ацетатный буфер
AFLP	– англ. Amplified fragment length polymorphism/полиморфизм длин амплифицированных фрагментов
BLAST	– англ. Basic Local Alignment Search Tool/средство поиска основного локального выравнивания
canSNP	– англ. Canonical single nucleotide polymorphism/канонические единичные полиморфизмы
GFt	– англ. Genotype of <i>Francisella tularensis</i> /Генотип <i>Francisella tularensis</i>
INDEL	– англ. Insertion-deletion polymorphisms/инсерционно-делеционные полиморфизмы
MLST	– англ. Multilocus sequence typing/мультилокусное типирование последовательностей
MLVA	– англ. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis/мультилокусный анализ тандемных повторов с переменным числом.
NGS	– англ. Next generation sequencing/секвенирование нового поколения
PFGE	– англ. Pulsed-field gel electrophoresis/гель-электрофорез в импульсном поле
RD	– англ. Region of difference/области различий
RFLP	– англ. Restriction fragment length polymorphism/полиморфизм

	длин рестрикционных фрагментов
SNP	– англ. Single Nucleotide Polymorphism/однонуклеотидный полиморфизм
WGS	– англ. Whole genome sequencing/полногеномное секвенирование
wgSNP	– англ. Whole Genome Single Nucleotide Polymorphism/ полногеномный однонуклеотидный полиморфизм
FPI	– англ. Francisella pathogenicity island/остров патогенности <i>Francisella</i>
mglA	– англ. Macrophage growth locus protein A/белок А локуса роста макрофагов

ВВЕДЕНИЕ

Туляремия – зооантропонозная инфекция, вызванная гамма-протеобактерией *Francisella tularensis* (*F. tularensis*). У данного острого инфекционного заболевания выражена природная очаговость с периодически возникающими эпизоотиями. *F. tularensis* – высоковирулентная, грамтрицательная внутриклеточная коккобацилла, не образующая спор, аэробная или микроаэрофильная бактерия. Бактерия *F. tularensis* отнесена к 6-ти самым опасным патогенам имеющим потенциал использования в качестве бактериологического оружия [1]. Возбудитель туляремии относится к семейству *Francisellaceae*, рода *Francisella*. Данный микроорганизм впервые выявлен Дж. Мак-Койном и Ч. Чепином в 1911 году в округе Туларе, штат Калифорния, от чумоподобных бубонов сусликов [2]. В настоящее время существует четыре признанных подвида *F. tularensis*: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*. В основном все подвиды *F. tularensis* распространены во многих странах Северного полушария.

В Казахстане природные очаги туляремии выявлены в 15 из 17 областей, общая территория очагов составляет около четверти территории страны (552 тыс. км²). В период с 1928 по 2018 гг. в Казахстане зарегистрировано около 10 тысяч случаев заболевания людей туляремией, большинство из которых зарегистрированы в 50-х годах прошлого века и связаны с трудовой миграцией непривитого населения в эндемичные районы [3]. В 1928-1970-х годах основная регистрация случаев наблюдалась во вспышках с вовлечением от 105 до 1791 человек. Для туляремии характерны широкий круг хозяев и разнообразие путей передачи. Основным источником и резервуаром *Francisella tularensis* являются грызуны, при котором в поддержании циркуляции возбудителя в природных очагах участвуют кровососущие насекомые. Улучшение санитарных условий и плановая вакцинация позволили сократить заболеваемость до спорадических единичных случаев [4, 5]. Тем не менее, высокая активность природных очагов остается в Восточно-Казахстанской, Акмолинской, Западно-Казахстанской, Актюбинской, Северо-Казахстанской и Павлодарской областях, которая периодически приводит к эпизоотиям среди грызунов [6]. Штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* выделяются от людей, грызунов, зайцеобразных и переносчиков (кровососущие насекомые и членистоногие) с природных очагов по всей территории Казахстана. Штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* ранее выделялись в Алматинской и Жамбылской областях от грызунов, зайцеобразных и кровососущих переносчиков. Важно подчеркнуть, что нет примерных границ распространения подвида *mediasiatica*. Незученность данного вопроса подтверждается недавними выделениями штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* на территории Алтая (Южная Сибирь), что на 1500 км северо-западнее ранее установленных границ циркуляции в Казахстане и Туркменистане [7, 8].

Знание генотипов циркулирующих штаммов важно для эпидемиологического и эпизоотического мониторинга на локальном и

глобальном уровнях. На локальном уровне генотипирование позволяет проследить источник и пути распространения инфекции. На глобальном – позволяет дифференцировать естественную вспышку от искусственно созданной вспышки в результате злого умысла, позволяет проследивать эволюционные изменения. Только изучив циркулирующие штаммы, можно делать какие-либо выводы [9].

Международные базы данных содержащие информацию по циркулирующим генотипам способствуют развитию глобального мониторинга за патогенами и позволяют отслеживать эволюционные изменения [10]. Для этого используются различные методы генотипирования, такие как мультилокусное типирование последовательностей (MLST), полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), гель-электрофорез в импульсном поле и мультилокусный анализ переменных тандемных повторов (MLVA). Наиболее широко используется метод MLVA типирования, который способен дифференцировать подвиды *Francisella tularensis* и выявляет географическую особенность циркулирующих штаммов. Полногеномное секвенирование и последующий анализ однонуклеотидных полиморфизмов является методом генотипирования с самым высоким разрешением и мощной филогенетической способностью [11].

Туляремийные бактерии обладают полиадаптивными свойствами, дающими им возможность паразитировать среди широкого круга животных, как позвоночных, так и беспозвоночных. Эпизоотии, сопровождающиеся заметной гибелью животных, свойственны обыкновенной полевке, водяной крысе, домовый мыш, ондатре. Чаще, чем у других видов, обнаруживаются больные особи у хомяков, зайцев, полевок-экономок. Различия в степени восприимчивости и инфекционной чувствительности определяют роль млекопитающих как источников инфекции – дальнейших распространителей возбудителя. Санитарное благополучие можно достичь только контролем заболеваемости среди животных, в том числе и домашних, так как имеется возможность частого соприкосновения с зараженными дикими млекопитающими и кровососущими насекомыми.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы является изучение генетического разнообразия штаммов *Francisella tularensis* циркулирующих в Казахстане с использованием высоко дискриминационных методов и составление карты распределения генотипов для усовершенствования контроля за туляремией.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Создание коллекций образцов ДНК штаммов *Francisella tularensis* пригодных для генотипирования методом MLVA и ПЦР.
2. Разработка протокола генотипирования *Francisella tularensis* методом мультилокусного анализа VNTR повторов.
3. Проведение MLVA типирования штаммов *Francisella tularensis* по гипервариабельным VNTR маркерам. Получение MLVA профилей.

4. Определение генетического разнообразия штаммов *Francisella tularensis*, проведение кластерного анализа и построение минимальных островных деревьев. Определение географического распределения генотипов в Казахстане.

5. Полногеномное секвенирование штаммов *Francisella tularensis*. Анализ полученных результатов. Построение минимальных островных деревьев на основании данных SNP.

Объекты исследования: В данной диссертационной работе материалом исследований служат образцы ДНК, выделенные из коллекционных штаммов *Francisella tularensis* РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева» (ННЦООИ).

Предмет исследования: Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis* циркулирующих на территории Казахстана.

Методы исследования. В научной работе используются микробиологические, генетические и биоинформатические методы исследований.

Научная новизна выполненной работы состоит в следующем:

– впервые проведено MLVA генотипирование 148 штаммов *Francisella tularensis* циркулирующих в Казахстане. Идентифицировано 30 генотипов, установлено, что крупные генотипы объединяют в себе штаммы, выделенные на разных географических территориях;

– впервые получены полногеномные данные 39 штаммов *Francisella tularensis subsp. holarctica*, выделенных в Казахстане из природных водоемов, от клещей, грызунов, хищников и от одной перелетной птицы. Было идентифицировано две линии подвида *Francisella tularensis subsp. holarctica*, В.4 и В.12. Исследование демонстрирует более широкое распространение генотипа В.4 в Азии и выявило базальную точку ветвления в этой субкладе. Полученные данные подтверждают гипотезу азиатского происхождения *F. tularensis*. Обнаружение идентичных генотипов у штаммов, разделенных во времени десятилетиями и тысячекилометровым географическим расстоянием, подтверждает способность бактерий к длительному сохранению и быстрому распространению на большие расстояния. Изоляция *Francisella tularensis subsp. holarctica* от птицы (каменка-плясунья) позволяет предположить участие птиц в филогеографии возбудителя;

– на основании MLVA типирования и полногеномных данных составлены карты распределения генотипов на территории Казахстана. Полученные результаты указывают на обширное распространение штаммов с идентичными генотипами, что мы связываем с эндемичностью заболевания и беспрепятственным передвижением диких животных и птиц с эктопаразитами по территории Казахстана.

Практическая и теоретическая значимость.

Полученные полногеномные данные штаммов *F. tularensis* депонированы в международную базу данных, определена оптимальная схема MLVA типирования из семи локусов, которая позволяет сократить затраты и время на

первичное генотипирование штаммов. Составлены карты распределения генотипов на территории Казахстана, что визуально показывает распространение штаммов *F. tularensis*.

Изучение ареала распространения и генетического разнообразия бактериальных штаммов является краеугольным камнем в молекулярной эпидемиологии при отслеживании и контроле за инфекционным процессом. Знание генотипов и геномов циркулирующих штаммов важно для понимания эволюции, адаптации патогена и контроля за распространением инфекции. Анализ wgSNP (англ. Whole Genome Single Nucleotide Polymorphism/ полногеномных однонуклеотидных полиморфизмов) штаммов, изолированных из разных географических регионов Казахстана, позволил сформировать карту распределения генотипов. Полученные результаты могут в дальнейшем использоваться при эпидемиологическом мониторинге на локальном и глобальном уровне, с отслеживанием вероятного географического происхождения изолятов. Анализ wgSNP штаммов, циркулирующих в Казахстане, позволил лучше понять эволюционные изменения и распространение штаммов *F. tularensis*.

Молекулярные методы позволяют исследовать различные патогены с помощью одних и тех же инструментов, в то время как классический микробиологический анализ требует более специализированных навыков. В Казахстане контроль за бактериальными патогенами с использованием современных методов генетического анализа только начинает внедряться. Исследования носят спорадический характер, ограничены в выборке. Молекулярная эпизоотология с использованием данных всего генома является самым перспективным и дискриминационным методом. Данный метод позволяет одновременно ответить на некоторые вопросы. Например: происхождение штамма, генетические особенности, связанных с вирулентностью и лекарственной устойчивостью. Данные легко архивируются для долгосрочных исследований. Производство и хранение высококачественных данных секвенирования и связанных с ними метаданных станут важным ресурсом для будущих исследований по инфекционным болезням и опасным патогенам.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. MLVA генотипирование штаммов *F. tularensis* по гипервариабельным VNTR маркерам.
2. Определение географического распределения генотипов штаммов *F. tularensis* в Казахстане.
3. Полногеномное секвенирование штаммов *F. tularensis* с построением минимальных остовных деревьев на основании данных SNP.

Апробация работы. Основные положения диссертации были опубликованы в материалах научно-практических конференций: Международной научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 17: «Современная аграрная наука: цифровая трансформация»», посвященной 30-летию независимости Республики Казахстан на тему: «Генетическая

идентификация *Francisella tularensis*» (Нур-Султан, 2021); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и тенденции развития современной аграрной науки и ветеринарии», посвященной памяти доктора ветеринарных наук, профессора Пионтковского Валентина Ивановича на тему: «Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis*, циркулирующих на территории Казахстана» (Костанай, 2021).

Публикация результатов исследования.

По материалам диссертационной работы опубликованы три научные работы, в том числе в редакциях, рекомендованных Комитетом по контролю в образовании и науке Министерства образования и науки Республики Казахстан: Научно-практический журнал «Наука и образование» Западно-Казахстанского аграрно-технического университета имени Жангир хана (Уральск, 2020), опубликованы методические рекомендации «MLVA типирование штаммов *Francisella tularensis*» ISBN 978-601-332-968-0 (Нур-Султан, 2020) (Приложение А), 1 публикация в журнале «Microbiology Resource Announcement», входящем в базу научных журналов Web of Science Core Collection и Scopus (Q4, 2020), 1 публикация в журнале «PLOS Neglected Tropical Diseases», входящем в базу научных журналов Web of Science Core Collection и Scopus. (Q1, 2021).

Связь диссертации с госпрограммами. Исследования проводились в рамках программы грантового финансирования Комитета науки МОН РК по проекту: «Сравнительный анализ молекулярно-генетических особенностей геномов у возбудителей сибирской язвы и туляремии в Казахстане», AP05131460, 2018-2020 гг.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 123 страницах компьютерного текста и включает обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований, обсуждение результатов, заключение, список использованных источников, 3 приложения. Список использованных источников состоит из 204 наименований отечественных и зарубежных авторов. Работа содержит 12 таблиц, 21 рисунок.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Возбудитель туляремии - *Francisella tularensis*

Туляремия – это бактериальное зооантропонозное заболевание. Этиологическим агентом туляремии является *Francisella tularensis* (*F. tularensis*), высоковирулентная грамотрицательная коккобацилла, которая может передаваться человеку различными путями, в том числе при обработке зараженных животных, проглатывании зараженной пищи или воды, вдыхании инфекционных аэрозолей и укусах членистоногих (клещей и насекомых).

Инфекция впервые была описана в 1911 г. в районе озера Туларе (Калифорния, США) при обследовании грызунов и сусликов, у которых возникали бубоны, напоминавшие чумные [12]. В 1912 г. Г.В. Маккой и К.В. Чапин выделили грамотрицательную бактерию и назвали ее *Bacterium tularensis* [13]. Затем Эдвард Фрэнсис, во время расследования вспышки случаев язв с лимфаденитом и лихорадкой у жителей Юты, укушенных мухами, выявил, что бактерия *B. tularensis* являлась этиологическим агентом, предложив название «туляремия» для данного заболевания. Более поздние исследования классифицировали бактерию туляремии как *Bacterium tularensis*, *Bacillus tularensis*, *Brucella tularensis*, *Pasteurella tularensis*. В 1947-1959 годах достигнуто окончательное соглашение по систематике биологических агентов, при котором род был назван *Francisella* в честь доктора Эдварда Фрэнсиса [14].

Изучение туляремии имеет большую историю в бывшем Советском Союзе. Основные этапы изучения данного зоонозного заболевания тесно связаны с такими именами как: Е.Н. Павловский, Н.Г. Олсуфьев, Н.А. Гайский, Б.Я. Эльберт, Г.П. Руднева, И. Мещерякова, Б. Черкасский, И.В. Домарадский, С.В. Суворов, Г.И. Захри, В.М. Туманский, Т.Н. Дунаева, М.А. Айкимбаев и ряда других советских исследователей. В сравнительно короткий срок были накоплены фундаментальные знания по этиологии, лабораторной диагностике, патологии и клинике туляремии, по полноте не уступавшие, а в ряде случаев намного превосходившие данные зарубежных исследователей. Глубокое и всестороннее изучение эпидемиологии и эпизоотии, а также природной очаговости туляремии – одно из важнейших достижений в изучении этой инфекции в СССР.

Международным признанием достижений советской науки в области изучения и борьбы с туляремией может служить опубликованная в США обширная монография Pollitzer R. «История и заболеваемость туляремией в Советском Союзе» [15]. Автор указал, что советские ученые ретроспективно установили связь между вспышками сибирской язвы и туляремии (которая первоначально считалась проявлением кожной сибирской язвы) в XVIII и XIX веках. Учитывая низкую смертность, связанную с некоторыми вспышками болезней в Сибири, летальность от сибирской язвы была намного выше. Интерпретация исторических вспышек позволяет предположить, что туляремия долгое время поражала людей по всему Советскому Союзу с запада на восток и

с севера на юг, таким образом, инфекция является очень старой и не была введена недавно.

В Европе туляремия обнаружена в следующих странах (в скобках показан год обнаружения): Франции (1945), Германии (1936), Австрии (1935), Швейцарии (1951), Польше (1941), Норвегии (1929), Швеции (1931), Финляндии (1933), а в странах бывшего Советского Союза в 1926 году. Из стран Азии туляремия обнаружена в Турции в 1936 году, в этой стране туляремия имеет широкое распространение. В Японии туляремия впервые обнаружена в 1924 году в южной части острова Хоккайдо, большей части острова Хонсю и на севере острова Кюсю. В 1958 году в Китае туляремия обнаружена в северо-восточной части (Тунляо, Цицикар), но вероятно, инфекция распространена в стране шире. Впервые туляремия в Казахстане была установлена в 1928 г. Д.А. Головым, А.Н. Князевским, В.А. Бредниковым и В.Е. Тифловым [16], которые описали вспышку туляремии в пойме реки Урала на территории бывших Уральской и Оренбургской губерний. Заболевания совпали с начавшейся массовой заготовкой шкур водяных полевок, ранее являвшихся объектом промысла. За несколько дней было зарегистрировано более 100 больных. В 1930 году зарегистрирована крупная трансмиссивная вспышка в окрестностях г. Уш-Тобе Алма-Атинской области среди рабочих Караталстроя, у которых язвы располагались на открытых частях тела (в 60 %), что характерно при укусах комаров. Полевые исследования выявили больных водяных полевок и других грызунов [17].

Бактерия *F. tularensis* относится к типу *Proteobacteria*, классу *Gammaproteobacteria*, отряду *Thiotrichales*, семейству *Francisellaceae* [18, 19]. Внутри рода *Francisella* выделено 14 видов: *F. philomiragia*, *F. marina*, *F. orientalis*, *F. adeliensis*, *F. persica*, *F. hispaniensis*, *F. tularensis*, *F. uliginis*, *F. noatunensis*, *F. frigiditurris*, *F. salimarina*, *F. halioticida*, *F. opportunistica*, *F. salina* [20]. В настоящее время различают четыре подвида *F. tularensis*: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*. Два подвида *F. tularensis* вызывают наибольшую опасность для животных и человека, подвид *tularensis*, также известный как «тип А» и подвид *holarctica*, называемый «типом Б». Инфекция вызванная «типом Б» встречается повсюду в северном полушарии. Распространение *F. tularensis* subsp. *tularensis* (тип А), заражающий людей и животных, часто передающийся трансмиссивным путем, до недавнего времени ограничивалось только территорией Северной Америки. Недавние сообщения указывают на выявление данного подвида в Австралии [21].

F. tularensis относится к биологически опасным агентам класса А согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний [22]. Подвид *F. tularensis* subsp. *tularensis* потенциально может быть использован в качестве биологического оружия из-за крайне высокой вирулентности, низкой инфекционной дозы, легкости распространения в аэрозолях и тяжести заболевания. Вдыхание 10 колониеобразующих единиц (КОЕ) достаточно для заражения людей, при этом от 30 до 60% случаев без определенной терапии, могут закончатся летальным исходом [23]. Следовательно, легочная форма

туляремии считается основной проблемой в сценарии преднамеренного высвобождения микроба [24]. *F. tularensis* subsp. *holarctica* – тип Б, распространен по всему северному полушарию, хотя недавно обнаружен в Австралии [25]. Штаммы данного подвида вызывают эпизоотии туляремии у бобров и ондатр в легкой форме. В подвиде *holarctica* выделяют отдельную группу штаммов - биовар *japonica* выделенный на территории Японии. Подвид *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* изолирован от иксодовых клещей семейства *Ixodidae* [7, p. 2] и грызунов в Центральной Азии. Опубликованы небольшое количество данных, свидетельствующие о способности данного подвида вызывать инфекцию у человека и кроликов [26]. *Francisella novicida* считается подвидом *F. tularensis*, но эта бактерия фактически является отдельным видом [27]. *F. tularensis* subsp. *novicida* является оппортунистическим патогеном, заражающим людей со сниженным иммунным статусом. Данный подвид выделен только из соленой или солоноватой воды, но не от грызунов и членистоногих. Тем не менее, подвид *F. subsp. novicida* вирулентен для экспериментальных грызунов, вызывает типичную туляремию. Данный подвид может передаваться алиментарным путем, трансстадиально или при укусе представителей иксодовых клещей, например *Dermacentor andersoni* [28]. На сегодняшний день отнесение *F. subsp. novicida* к подвиду *F. tularensis* все еще остается предметом споров и обсуждений [14, p. 7]. При этом резервуар и пути передачи четко не определены.

На территории Казахстана циркулируют два подвида туляремийного микроба: *F. tularensis holarctica* (biovar I (*erys*) и biovar II (*eryR*) и *F. tularensis mediaasiatica* [29, 30].

Недавнее появление новых технологий и улучшений в системе типирования *F. tularensis* открыли новые перспективы молекулярно-генетического анализа, улучшилось понимание эпидемиологической ситуации туляремия. За последние десятилетия выполнено большое количество исследований охарактеризовавшие популяционную генетику коллекционных штаммов *F. tularensis*. При этом в некоторые из них были включены штаммы, выделенные от животных.

Подвид *F. tularensis* subsp. *tularensis* разделены на две различные генетические субпопуляции АI и АII, которые отличаются в отношении клинической степени тяжести [31]. Штаммы АI встречаются преимущественно в восточной половине США, а штаммы АII встречаются только в западной части США [32]. В исследовании, опубликованном Kugeler K. J. с соавторами, было охарактеризовано 184 линии выделенных от животных, при котором авторы наблюдали неслучайное распределение подвидов *F. tularensis* у животных. В случае зайцеобразных, имеется ассоциация с определенными линиями передачи в 31 случаях: восемь штаммов А.I выделены от восточных американских кроликов (*S. floridanus*) и 23 штамма, выделенных от пустынных кроликов (*S. audubonii*) относились к А.II [33]. Все штаммы, выделенные от зайцев в Квебеке (Канада) относились к А.I [34]. Шесть штаммов, выделенные от зайцев на Аляске, также относятся к субпопуляции А.I. Kugeler K.J. с

коллегами проанализировали 44 штаммов *F. tularensis* выделенных от кошек, при котором 41 образцов принадлежали к подвиду *tularensis*, 80% из них оказались представителями субпопуляции А.І. Интересно, что еще одно исследование показало, что все протестированные изоляты, выделенные от кошек, кроме одного (всего N = 27) относились к А.І. [35].

Относительно подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica*, описано четыре клады: В.16 (*F. tularensis* subsp. *holarctica*, биотип японский), В.4, В.6 и В.12 [36, 37]. Клада В.16 преобладает в Японии и Австралии, В.4 присутствует в Евразии и в Северной Америке, В.6 циркулирует в Северной Америке и в Европе, а клада В.12 в Евразии и в Северной Америке. Недавно, Lu Y. с соавторами описали дополнительную кладу *F. tularensis* subsp. *holarctica* из Тибета (Китай) [38]. Хотя штаммы подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* распространены в Северной Америке, Евразии и Австралии, более глубокое внимание к родословным этого подвида недавно описано в Евразии. В отличие от подвида *F. tularensis* subsp. *tularensis*, различия в вирулентности среди линии *F. tularensis* subsp. *holarctica* менее четкие. Четко определенная склонность специфических линий *F. tularensis* subsp. *holarctica* для конкретных видов хозяев не идентифицирована. Имеются некоторые исследовательские работы, которые более подробно описали подвид *F. tularensis* subsp. *holarctica*, изолированного от зайца-русака *Lepus europaeus* [39, 40]. В Швеции первый животный случай туляремии диагностирован в 1931 г. у зайца-беляка [41]. Morner T. с коллегами также исследовали наличие *F. tularensis* у *L. europaeus* и *L. timidus* в Швеции, но им не удалось обнаружить возбудитель туляремии у *L. europaeus* [42]. Первый случай туляремии у европейского зайца-русака в Швеции выявлен только в 2002 году. Причина этого позднего открытия все еще неизвестна и требует дальнейшего изучения. В 2010 году Gyuranecz M. с коллегами опубликовали исследование с описанием патологических образований вызванные подвидом *F. tularensis* subsp. *holarctica*, линией В.13 у зайца-русака *L. europaeus*. В результате этого исследования основными пораженными органами являются легкие и почки, а также выявлен перикардит на фоне полисерозита [43]. Однако авторы Origgi F. С. и Pilo P. обнаружили, что наиболее пораженными органами у *L. europaeus*, инфицированные *F. tularensis* subsp. *holarctica* линия В.FTNF002-00 (В.6, подлиния В18, эта подгруппа специфична для Западной Европы) были селезенка и печень [44]. Следует отметить, что зайцы, исследованные Gyuranecz M. с коллегами пойманы во время охоты, а Origgi F.С. и Pilo P. исследовали неизлечимо больных зайцев. Впоследствии группа исследователей под руководством Gyuranecz провела экспериментальное заражение крыс Fischer 344 штаммами, принадлежащими к обеим линиям. Они не наблюдали разницы в патологических поражениях, вызванных данными штаммами, но обнаружили различия в показателях потери веса, времени восстановления и смертности [43, p. 962]. В исследовании, опубликованном Hestvik С. с коллегами, описаны патологии, возникшие в результате естественного заражения горного зайца и европейского зайца-русака подвидом *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Они нашли

схожие патологические поражения у зайцев обоих видов. Охарактеризованы линии 23 штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica*, семь из них принадлежали к В.6 (подгруппа В.7), а 16 относились к В.12 (базальная подлиния В.26, подгруппы В.23, В.39 и В.20) и произошли от 21 особей вида *L. europaeus* и двух *L. timidus*. Не наблюдались различия в патологических поражениях обеих линий. Sissonen S. с коллегами сообщили, что среди штаммов, проанализированных в их исследовании, один штамм, выделенный от зайца *L. timidus* принадлежал к линии В.4, и один штамм выделенный от зайца *L. europaeus* к подлинии В.6 В.7. Кроме того, 50 штаммов относились к линий В.12 (24 от *L. timidus* и 26 от *L. europaeus*) [45].

Изначально считалось, что линия В.16 (*F. tularensis* subsp. *holarctica* biotype *japonica*) распространена только в Японии, где часто выделяется от японского зайца *L. brachyurus*. Однако позднее в Турции были выявлены штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica*, которые по фенотипическим характеристикам соответствуют линии В.16 [46]. Более того, распространение данной линии могло бы быть более обширным, чем считалось ранее, поскольку *F. tularensis* subsp. *holarctica* биотип *japonica* недавно изолирован в Австралии от кольчатых опоссумов (*Pseudocheirus peregrinus*) [25, p.1198]. Наконец, Wang Y. с коллегами опубликовали исследование, включающее изоляты *F. tularensis* Тибетского региона, идентифицированного анализом *canSNP* принадлежащие к линии В.16 [47]. Zhang F. с коллегами впоследствии исследовали изоляты того же региона, а некоторые также идентифицированы как В.16. Однако эти изоляты не ферментируют глицерин, который является отличительным фенотипом *F. tularensis* subsp. *holarctica* биотипа *japonica*. Анализ региона области различий в геноме *F. tularensis* и MLVA типирование дополнительно показали промежуточное положение тибетских изолятов между линией В.16 и другими линиями В.4, В.6, В.12. Поэтому авторы предложили добавить основную линию к подвиду *holarctica* [48].

Четвертый подвид *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, наименее изучен из-за его ограниченного распространения и воздействия на здоровье человека. Данный подвид обнаружен только в малонаселенных регионах Средней Азии. Подвид *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* впервые был выделен и описан казахским ученым М. Айкимбаевым в 1966 году. Позднее данный подвид регистрировался в Туркменистане [8, p. 872]. Штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* ранее выделялись в Алматинской и Жамбылской областях от грызунов, зайцеобразных и кровососущих переносчиков. Важно подчеркнуть, что нет примерных границ распространения подвида *mediasiatica*. Незнание данного вопроса подтверждается недавними выделениями штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* на территории Алтая (Южная Сибирь), что на 1500 км северо-западнее ранее установленных границ циркуляции в Казахстане и Туркменистане. Отсутствие информации о генетическом разнообразии штаммов выделенных в Казахстане указывает на упущение возможностей от исторического приоритета в изучении подвида *mediasiatica*. В недавней статье, опубликованной Тимофеевым В. с коллегами описывается

первое обнаружение естественно циркулирующего подвида *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* в России. Авторами выделено и охарактеризовано 18 штаммов данного подвида в Алтайском крае. Все штаммы показали высокую вирулентность для мышей. Вирулентность *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* в модели вакцинированных мышей занимала промежуточное положение между подвидом *tularensis* и subsp. *holarctica*. На основе данных MLVA типирования выявлено, что алтайская популяция *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* генетически отличается от классической среднеазиатской популяции и, вероятно, является эндемиком в Южной Сибири. Авторы предложили разделить подвид *mediasiatica* на три филогеографические группы, М.І, М.ІІ и М.ІІІ. Среди этих штаммов 18 выделены от клещей, семь выделены от животных. Один штамм М.ІІ был выделен из сибирской красной полевки и шесть других принадлежали к линиям М.І изолированы от зайцев и песчанок [7, p. 10].

Эти результаты подчеркивают необходимость расширения и интенсификации отбора проб от животных, особенно в Азии и Океании, чтобы лучше понять географическое распределение и распространение линии подвидов *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

1.1.2 Геном возбудителя туляремии

Геном бактерии *F. tularensis* небольшой, составляет примерно 1,9 Мб, и содержит 1804 последовательности кодирующие белки, 302 из которых являются уникальными для возбудителя туляремии [49]. Геном *F. tularensis* высококонсервативен с низкой степенью генетической изменчивости. Пять белковых кодирующих последовательности, уникальные для возбудителя туляремии, образуют новое семейство белков. Поскольку в геноме не имеются явных факторов вирулентности, но относительно большое количество белков кодирующих последовательностей специфичных для *Francisella*, могут обеспечить бактерии с новыми факторами, ответственными за высокую вирулентность данного микроорганизма. Таким образом, интересно, что *F. tularensis* subsp. *tularensis* не имеет плазмид, которые обнаружены в живой туляремийной вакцине на основе штамма *F. tularensis* LVS и *F. tularensis* subsp. *novicida* [50].

Большая доля инактивированных генов характеризует референтный геном штамма SCHU S4. В результате вставок, делеций и замещающих мутаций более 10% всех генов являются псевдогенами или генными фрагментами; 14% всех псевдогенов, представлены пятью инсерционными элементами (IS-Ftu 1–5) которые разбросаны по всему геному [51]. В геноме *F. tularensis* нарушено более половины предполагаемых метаболических путей, что объясняет особые условия роста микроорганизма. Необходимо четырнадцать соединений для поддержания роста *Francisella* из-за отсутствия или неполного функционирования ферментативных путей.

Уникальная 33,9-килобайтная область ДНК продублирована в геноме SCHU S4 [49, p. 154]. В этой области закодированы 25 генов не имеющие известных бактериальных гомологов, которые могут кодировать пока

неизвестные детерминанты вирулентности. Тем не менее, наличие данного геномного острова у вакцинного штамма и подвида *F. tularensis* subsp. *novicida* доказывают, что одни эти гены не могут объяснить высокую вирулентность *F. tularensis* subsp. *tularensis* [52]. Нарушение генов в данном регионе генерирует мутантные бактерии, которые ослаблены для выживания в макрофагах, эта область хромосомы названа островом патогенности *Francisella* (FPI- *Francisella* pathogenicity island) [53]. FPI *Francisella* представляет собой кластер из 16–19 генов, которые дублированы в большинстве секвенированных геномов *Francisella*. Хотя 16 генов FPI высоко консервативны, есть 2-3 предполагаемых гена, которые отсутствуют или прерываются стоп-кодонами в некоторых штаммах. У штаммов *Francisella* с экспериментально индуцированными мутациями в генах FPI сильно ослаблена вирулентность и обнаруживаются дефекты роста внутри макрофагов. Существуют экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что на регуляцию большинства генов FPI влияет наличие регулятора вирулентности *mgIA* (macrophage growth locus protein A-белок А локуса роста макрофагов) и концентрация железа в питательной среде. Хотя исследования экспрессии мРНК показывают, что практически все гены FPI транскрибируются, биохимическими методами была обнаружена лишь небольшая часть белков, кодирующих FPI. Накопленные биохимические и генетические данные на сегодняшний день еще не смогли описать биохимическую функцию всех генов кодирующей область FPI. Тем не менее, биоинформатический анализ предполагает, что некоторые из кодируемых FPI белков являются частью системы секреции VI типа [54].

По сравнению с другими бактериями *F. tularensis* имеет относительно мало регуляторов транскрипции. Белок MglA является единственным регуляторным белком, описанным до настоящего времени. Кодирующие белки, гомологичны с *E. coli*, регуляторы стационарной фазы *SspA* и *SspB*, оперон *mgIAB* *F. tularensis* subsp. *novicida* необходимы для внутриклеточного роста и выживания внутри амеб [55], *MglA* регулирует экспрессию нескольких генов FPI, включая *iglC*, *iglA*, *pdpA* и *pdpD* [56].

Бактерия *F. tularensis* не секретирует токсины, при этом гены, кодирующие секрецию типа III, IV и V системы не идентифицированы в геноме референтного штамма SCHU S4. Однако присутствуют гены гомологов пилина и псевдопилина, связанные с секрецией типа II, а также 15 потенциальных АТФ-связывающие кассетные системы, которые могут участвовать в секреции I типа [49, p. 157].

Хотя железо является важным питательным веществом для роста *F. tularensis*, гены, кодирующие *TonB*, и рецепторы для сидерофора, трансферрина, лактоферрина и других железосодержащих соединений не присутствуют в геноме SCHU S4. Тем не менее, присутствие гена, кодирующий белок усвоения железа, *Fur* и регуляторные гены *Fur* (FTT0030), указывает на то, что экспрессия некоторых генов может зависеть от железа.

1.2 Природные очаги туляремии

Заболееваемость туляремией у животных регистрируется в виде спорадических случаев, с нерегулярными вспышками. Природные очаги туляремии существующие в Северной Америке, Европе, Австралии и значительной части Азии, характеризуются стойкостью и способностью аккумулировать данный вид бактерии, таким образом, образуя потенциальную угрозу животным и людям проживающие в эндемичных районах. Швеция и Финляндия являются эндемичными странами по туляремии, в которых регистрируются спорадические случаи заболевания. В 2019 году в северных и центральных районах Швеции произошла самая крупная вспышка туляремии за последние 50 лет в этой стране, зарегистрировано в общей сложности 979 случаев заболевания. Большинство зараженных лиц оказались инфицированы в результате комариных укусов. [57]. В Турции с 2005 по 2016 год зарегистрировано 6568 случаев, основными источниками данного заболевания являлись контаминированная вода и пища [58]. В 2015 году в США обнаружено 235 случаев туляремии с одним смертельным исходом [59]. В Германии ежегодно регистрируется 20–40 случаев туляремии, причем с 2005 года их число увеличивается, что указывает на то, что туляремия является редким, но вновь возникающим заболеванием [60].

На территории СНГ можно считать обоснованным выделение не менее 6 основных ландшафтных типов природных очагов туляремии: степного, луго-полевого, лесного, пойменно-болотного, предгорно (горно)- ручьевого и тугайного (долины пустынных рек). Три первых ландшафтных типа могут быть объединены в группу сухопутных (плакорных) очагов, следующие два – в группу водных, тогда как тугайный тип занимает промежуточное положение.

1.2.1 Природные очаги туляремии в Казахстане

На территории Казахстана выделяют четыре типа природных очагов: предгорно-ручьевые, пойменно-болотные, тугайные и степные, различающиеся по типу ландшафтов, видовому набору носителей и переносчиков возбудителя туляремии, особенностям штаммов *F. tularensis* (рисунок 1) [61].

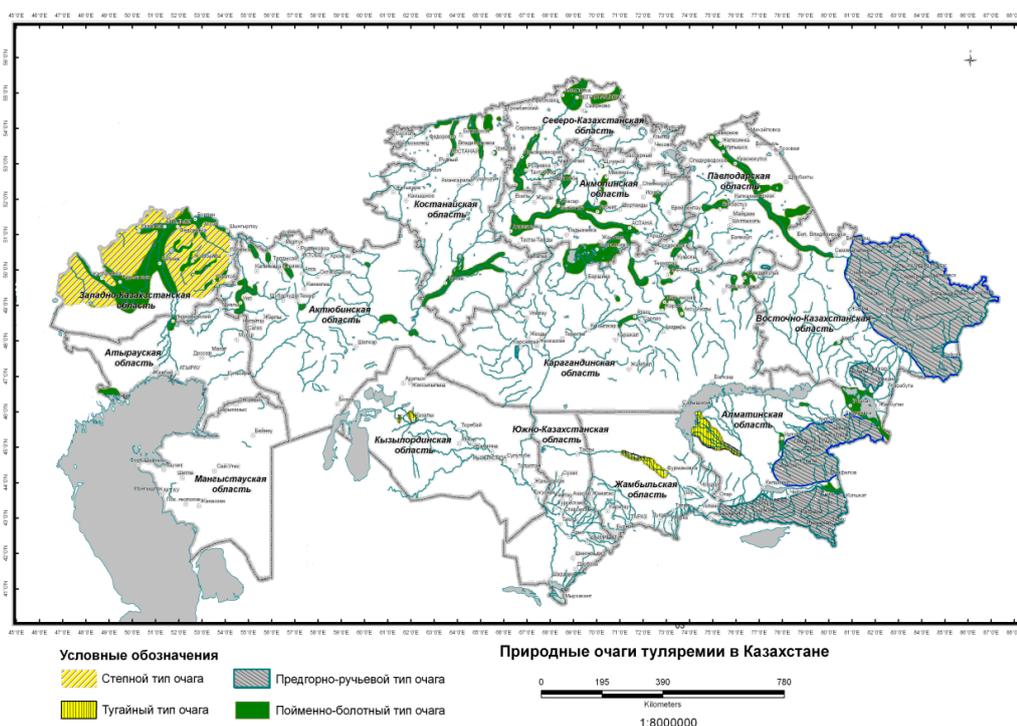


Рисунок 1 – Природные очаги туляремии на территории Казахстана

1.2.1.1 Очаги предгорно-ручьевого типа

Очаги данного типа обнаружены на склонах Алтая, Тарбагатая, Джунгарского Алатау и Заилийского Алатау (окрестности Алматы).

На юго-востоке и юге Казахстана расположены крупные очаги предгорно-ручьевого типа. Очаги данного типа приурочены к ручьям и мелким речкам по предгорьям и низкогорьям, реже встречаются в горах до высоты 3000 метров. Очаги данного типа обнаружены в Восточно-Казахстанской области, которые расположены в части Алтайской горной системы – Южный Алтай и небольшой части Рудного Алтая. Они являются местами концентрации грызунов и эктопаразитов, и интенсивно используются для выпаса скота. Основной носитель в очаге водяная полевка. В эпизоотию вовлекаются также другие виды полевок, а также грызуны, относящиеся ко 2 (серая крыса, полевая мышь) и 3 группе (хорь степной) по степени восприимчивости и инфекционной чувствительности к туляремии, что указывает на высокую эпизоотическую активность очага.

Саурский предгорно-ручьевого очаг расположен на северной части одноименного горного хребта, тянется вдоль южного берега реки Черный Иртыш и озера Зайсан. На территории данного природного очага встречаются среднегорные луга и леса, в которых растут сибирская лиственница, тьяншанская ель с примесью сибирской пихты, ниже и на южном склоне Саурского хребта встречаются степи, полупустыни. Основной носитель в очаге водяная полевка.

Тарбагатайский предгорно-ручьевого природный очаг туляремии расположен на южном склоне Тарбагатайского хребта, с которого стекает

большое количество относительно полноводных рек (Урджар, Хатынсу, Алет, Теректы, Кызыкты, Тамырсык), которые вместе с многочисленными притоками в предгорьях образуют густую речную сеть. В эпизоотическом процессе основную роль играет водяная полевка, также вовлечены обыкновенные и узкочерепные полевки, полевки экономки, домовые и лесные мыши [62, 63]. Фауна иксодовых клещей представлена 14 видами (*Dermacentor marginatus*, *D. daghestanicus*, *D. pictus*, *Rhipicephalus rossicus*, *Rh. pumilio*, *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes persulcatus*, *I. stromi*, *I. desertus*, *I. crenulatus*, *H. numidiana taurica*, *Rh. turanicus*), гамазовых 30 видами.

Жунгарский очаг туляремии расположен в предгорной зоне Тянь-Шанской горной системы. В круговороте инфекции в очаге основную роль играют водяные полевки, численность которых в исследуемом районе относительно постоянна [64]. Кроме того, в эпизоотии вовлечены массовые виды мелких млекопитающих – обыкновенная, Тянь-Шаньская и лесная полевки, лесная мышь. Признаки циркуляции возбудителя туляремии отмечены среди синантропных грызунов. К числу основных переносчиков и длительных хранителей инфекции отнесены клещи *D. marginatus*, *D. pictus*. Очаг имеет микроочаговую структуру с независимым течением эпизоотий на различных участках. Стойкие проявления эпизоотий обнаружены во влажных биотопах, прилегающих к рекам и ручьям от предгорий до альпийских лугов.

В очагах предгорно-ручьевого типа в предгорьях Заилийского Алатау основным носителем является водяная полевка. Инфицирование воды и ила в ручьях первично происходит от больных туляремией водяных полевок, эпизоотии среди которых отмечают в теплое время года и связаны с переносчиками – иксодовыми клещами, а также с передачей через воду. В настоящее время ландшафт данной территории подвергается значительному изменению в результате хозяйственной деятельности человека, которая привела к депрессии численности клещей. Несмотря на это до настоящего времени очаг проявляет эпизоотическую и эпидемическую активность.

1.2.1.2 Очаги тугайного типа

Очаги данного типа полигостальны и в основном приурочены к лесокустарникам (тугаям) долин пустынных рек, например, р. Или в Балхашском районе Алматинской области с сохранившейся системой старых русел и протоков. Тугайные очаги обнаружены так же на территории Кызылординской области, в дельте реки Сыр-Дарья и Жамбылской, в пойменной части реки Шу. В данном типе очага встречается среднеазиатская раса туляремийного микроба *Francisella tularensis subsp. mediaasiatica*, несвойственная другим природным очагам туляремии Евразии, хотя в последнее время данный подвид возбудителя туляремии был отмечен в России, на территории Алтайского края. Одной из отличительных особенностей данного типа очага является отсутствие в них водяных полевок.

Туляремийная инфекция обнаруживается в основном у зайцев – песчаников *Lepus tolai* и гребенщиковой песчанки *Meriones tamariscinus*,

которые играют основную роль в поддержании очага. В эпизоотии вовлекаются также обитающие в тугаях другие виды животных, например домовые мыши, лесные мыши, полуденные песчанки, а по смежным с тугаями водоемам – иногда ондатры. В 1984 г. выделено 43 штамма туляремии от клещей *D. niveus* и от полуденной песчанки. Начиная с 1985 по 1992 гг. был отмечен спад эпизоотического процесса, выделялись единичные культуры от больших песчанок (в 1986 г., 1987, 1989 и 1992 гг.). В 1993 году была зарегистрировано обострение эпизоотического процесса, который продолжался в течение пяти лет до 1998 года. В 2003, 2004 гг. выделялись единичные культуры от клещей. Очаг имеет низкий эпизоотический потенциал.

Основными переносчиками и длительными хранителями инфекции в данном типе очага являются многочисленные клещи *Rhipicephalus pumilio*, *Dermacentor niveus*, а также *Haemaphysalis asiaticum*, из которых на территории тугайных очагов неоднократно выделяли культуры тулярийного микроба. Особо важное значение имеет клещ *Rhipicephalus pumilio*, паразитирующий в трех подвижных стадиях развития на зайцах и гребенщиковой песчанке. По заключению М.А. Айкимбаева, основанному на лабораторных экспериментах, данные виды клещей способны передавать инфекцию восприимчивым животным как в процессе кровососания, так и в тех случаях, когда клещи поедаются грызунами [65]. Туляремия среди мелких млекопитающих в тугаях чаще отмечается в виде спорадических случаев, что соответствует преимущественной передаче инфекции через клещей.

Тугайные и степные очаги являются более древними по сравнению с очагами других типов Евразии и возможно представляют собой реликты плиоцена-плейстоцена. В историческое время хозяйственное освоение речных долин Казахстана и усиленная охота на зайцев, несомненно сильно сократили территории, занимаемые этими очагами.

1.2.1.3 Очаги степного типа

Очаги степного типа охватывают северные и центральные районы Западно-Казахстанской области. В этих очагах установлено заражение туляремией 16 видов млекопитающих, наибольшее значение имеют обыкновенные полевки *Microtus arvalis*, домовые мыши *Mus musculus*, заяц-русак *Lepus europaeus*, малый суслик *Spermophilus pygmaeus*, лесная мышь *Apodemus sylvaticus*, обыкновенный *Cricetus cricetus* и серый хомячок *Cricetulus migratorius*, а также степная пеструшка *Lagurus lagurus*. Перечисленные выше виды животных неоднократно обнаруживались спонтанно зараженными возбудителем туляремии *Francisella tularensis*. В эпизоотии может вовлекаться ряд других восприимчивых животных I группы и отчасти II группы, например суслики. Основными переносчиками и длительными хранителями инфекции в данном типе очага (но без трансвариальной ее передачи) являются различные виды иксодовых клещей, особенно пастбищные – *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus rossicus*, *Haemaphysalis otophila* и норовые *Ixodes redikorzevi* и *I. laguri*. Пастбищные клещи *Dermacentor marginatus* и другие виды клещей,

паразитирующие на полевках и других мелких млекопитающих, почти исключительно встречаются в фазе личинки и нимфы, тогда как имаго выкармливается на более крупных животных, не имеющих значения в циркуляции возбудителя туляремии в очаге (за исключением зайцев). Передача инфекции мелким млекопитающим I группы осуществляется либо нимфами в процессе их паразитирования, либо взрослыми клещами при поедании их зверьками, приводящие к заражению и гибели.

Клещи обеспечивают заражение восприимчивых животных туляремией в течение теплого сезона года, при этом эпизоотический процесс чаще имеет вялый характер, ограничиваясь спорадическими случаями или локальными эпизоотиями.

1.2.1.4 Пойменно-болотные очаги

Очаги данного типа приурочены к поймам и дельтам рек, таких как Иртыш, Тобол, Ишим, Нура, Убаган, Тургая, Урал, Большой и Малый Узень, а также котловин ряда озер – Алаколь, Сасыкколь и др. Очаги данного типа расположены в основном в лесостепной, степной, полупустынной зонах, при этом существование возбудителя туляремии *Francisella tularensis* поддерживается в основном за счет популяции водяной крысы *Arvicola terrestris*, в эпизоотии данной инфекции вовлечены также представители других видов животных, такие как обыкновенные полевки, ондатры, зайцы и другие животные I группы. Инфекция может передаваться различными способами: от больной водяной крысы здоровой водным путем, через комаров, при каннибализме, а в некоторых местах и при участии иксодовых клещей. Особо важную роль в передаче данной инфекции водяным крысам играет норовый клещ *Ixodes apronophorus*, кроме них другие виды иксодовых клещей *D. marginatus*, *D. pictus*, *I. ricinus* являются основными переносчиками возбудителя туляремии. Также во время эпизоотии гамазовые клещи и вши обнаруживались спонтанно зараженными *Francisella tularensis*, но они не имеют значения для длительного поддержания инфекции. Эпизоотии туляремии среди водяных крыс связаны в основном с теплым периодом года, когда зверьки ведут полуводный образ жизни, особенно в период весеннего паводка, а также в июле-августе, когда количество крыс увеличивается в результате размножения. Зимой, когда водяные крысы покидают водоемы, инфекция имеет минимальное распространение среди данных видов животных. В популяции ондатр туляремия встречается круглогодично, при этом учащается с наступлением холодов. Характерной и довольно частой чертой пойменно-болотных очагов туляремии является иногда высокая инфицированность возбудителем туляремии *Francisella tularensis* воды, ила ручьев и речек.

В последнее десятилетие в природных очагах туляремии Западно-Казахстанской области эпизоотическая активность увеличилась, что обусловлено ростом численности грызунов, таких как обыкновенная полевка и домовая мышь, показатель численности в степных очагах колеблется от 4,4 до 12% в весенний и 12,9 до 21,9% в осенний период. Также заметен рост

численности малого суслика после затяжной длительной депрессии, которая достигла 2130 особей на 1 км², а также малой песчанки. Кроме этого по всей территории ЗКО значительно увеличилась численность пастбищных клещей, в частности *D. marginatus*, вызванных благоприятными погодными условиями. Совокупность всех выше перечисленных факторов способствовало распространению туляремии из оптимальных мест локализации данной инфекции. В 2001 году наблюдались эпизоотии в долинах рек Урала, Урало-Кушумского междуречья, Большого и Малого Узеня. А 2002 году зафиксирована эпизоотия в Жанибекском районе, при котором установлена инфицированность микробом туляремии домовый и лесной мышей. В 2003 г. эпизоотия распространилась на Зауралье, в 2004 г. в районе Саралджин-Самарских озер наблюдалась эпизоотическая активность. Но в 2005 г. эпизоотическая активность значительно снизилась и регистрировалась по долинам рек. В весенние периоды 2008 - 2009 годов выявлены 2 ранее нерегистрируемых эпизоотических участка: в Таскалинском и Сырымском районах ЗКО [61, с. 47].

В период времени 2011-2017 гг. в Джангалинском и Бокейординском районах наблюдалась крупнейшая эпизоотия туляремии среди обыкновенной полевки, кроме них в эпизоотический процесс вовлечены были домовые мыши, гребенчиковые и полуденные песчанки, землеройки, малые и большие суслики.

Юго-восточная часть Волго-Ахтубинского пойменно-болотного очага в Атырауской области занимает рукава дельты реки Волги и приморскую часть Каспия [66, 67]. Данный очаг считался неблагополучным по туляремии до 1965 года, так как проходили ежегодные эпизоотии среди водяных полевок с вовлечением домовый, полевой мышей и обыкновенной полевки. В 1961 году зарегистрирована последняя эпизоотия туляремии на данной территории, где было выделено 22 культуры возбудителя. Массовая гибель водяной полевки, которая является основным носителем данной инфекции, во время туляремийных эпизоотии привела практически к самоликвидации очага. Кроме того, нерегулируемые зимние паводки, затопление обширных площадей вследствие наступления вод Каспийского моря, способствовали к резкому снижению популяции иксодовых клещей [68]. Начиная с 1988 года, ежегодно отмечаются находки туляремийного антигена в пробах погадок и помете хищных млекопитающих из дельты реки Волга и Приморской зоны района, что предполагает возможность существования микроочагов туляремийной инфекции.

Пойменно-болотные очаги туляремии также подвергаются влиянию хозяйственной деятельности человека. Интенсивный промысел водяной крысы и ондатры, разрежая популяцию зверьков, уменьшает возможность развития среди них туляремийных эпизоотий. Постройка гидростанций и создание водохранилищ влекут за собой затопление значительных участков поймы рек, а вместе с ними и очаговых территорий. Наконец, проводимая местами мелиорация речных пойм и осушка болот сокращают места, пригодные для

обитания водяных крыс и других грызунов. Хотя все выше перечисленные мероприятия затрагивают лишь часть территорий очагов пойменно-болотного типа; во многих местах эти очаги сохраняют свою высокую активность, представляя опасность заражения туляремией населения. Можно отметить, что при интенсивном росте наших городов отдельные пойменно-болотные очаги туляремии, приуроченные к незначительным по размерам водоемам, оказались охвачены в окраины этих городов, представляя эпидемиологическую и эпизоотическую опасность. Этот пример указывает на большую стойкость пойменно-болотных очагов и их способность удерживаться при подходящих условиях на ограниченной популяции водяных крыс.

1.2.1.5 Синантропные (антропургические) очаги туляремии

При туляремии эти очаги всегда бывают временными. Они возникают в поселках или в окраинах города как вторичные в результате миграции больных туляремией домовых мышей, полевок или других грызунов из окружающих естественных биотопов. От мигрировавших больных зверьков заражаются домовые популяции мышей, а также популяции серых и черных крыс, которые относятся к II группе восприимчивых животных к туляремии. Передача инфекции среди грызунов происходит главным образом в результате каннибализма. Обычно такие очаги возникают осенью или в начале зимы и затухают после разреживания популяции зверьков зимой или к весне.

1.3 Природные резервуары и переносчики бактерии *F. tularensis*

В связи с многообразием рельефа, климата и растительности разнообразен и видовой состав животного мира Казахстана. По данным А.А. Слудского с соавт. [69] на территории республики встречаются 155 видов млекопитающих, на долю грызунов приходится около половины видов фауны млекопитающих. В настоящее время на территории Казахстана естественная зараженность туляремией установлена у 39 видов позвоночных животных из отрядов грызунов, зайцеобразных, насекомоядных, хищных, класса рыб и птиц и 27 видов беспозвоночных (клещи, двукрылые, блохи, клопы, моллюски) [63, с. 8]. Большое значение в поддержании природных очагов имеет водяная и другие виды полевок, зайцы, ондатра, гребенщикова песчанка.

С момента первого описания туляремии и последующей изоляции *F. tularensis* ряд исследователей изучили ареал хозяина, переносчиков и распространение этого микроорганизма. В самом начале стало понятно, что эпидемиология туляремии жестко связана биологическим и физическим показателями и невероятному разнообразию экологических циклов *F. tularensis*. Однако, несмотря на большое количество опубликованных исследований по экологии *F. tularensis* мало что известно о его жизненном цикле в природе и о специфической роли биологических и физических параметров.

В Северной Америке характеризуется два основных цикла: наземный (лесной) и водный циклы. В наземном цикле основную роль играют зайцеобразные, а точнее *Sylvilagus sp.* и клещи. В то время как в водном цикле

особую роль играют полуводные грызуны, такие как Американский бобр *Castor canadensis* и ондатра *Zibethicus* [70]. Позже выяснилось, что подвид *F. tularensis* subsp. *tularensis* вовлечен в лесной цикл и *F. tularensis* subsp. *holarctica* изолирован от видов животных водного цикла.

В Евразии большинство исследований проводилось в бывшем СССР и Скандинавии. В бывшем СССР клещи, такие грызуны, как водяная полевка *Arvicola terrestris*, обыкновенная полевка *Microtus arvalis*, хомяк *Cricetus sp.*, домовая мышь *Mus musculus* и зайцеобразные, *Lepus sp.*, в основном поражаются *F. tularensis* subsp. *holarctica* [71]. В Скандинавии комары, горные зайцы *Lepus timidus*, европейский заяц *L. europaeus*, лемминг *Lemmus lemmus* и полевка *M. agrestis* наиболее часто встречающиеся виды животных способствующие, биологическому циклу данной бактерии [41, p. 104]. В восточной и в западной Европе подвид *F. tularensis* subsp. *holarctica* более часто изолируется или идентифицируется в клещах, заяце-русаке *L. europaeus* и обыкновенной полевке *M. arvalis* [72, 73]. В Японии клещи японский и заяц *L. brachyurus* являются подтвержденными хозяевами *F. tularensis* subsp. *holarctica* [74]. Ареал-хозяина подвида *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, изолированный в Средней Азии, практически неизвестен, из-за очень ограниченного количества штаммов, которые были пока изолированы.

Помимо видов, регулярно определяемые как инфицированные *F. tularensis*, данный микроорганизм также выделен у сотни других видов животных. Однако определенная роль каждого из этих видов в экологии *F. tularensis* четко не определена и может отличаться и/или ограничиваться в определенных географических районах. В частности, существует некоторая путаница в отношении понятий случайных и резервуарных хозяев туляремии. Действительно, все случайные хозяева не требуются для сохранения (долгосрочного содержания) инфекционного агента и некоторые случайные хозяева животные могут представлять собой только «мост» для переноса *F. tularensis* между дикой природой и людьми [75].

Туляремия у животных чрезвычайно сложна из-за многочисленных видов описанных как восприимчивые к этому заболеванию. Кроме того, могут быть различия между наблюдениями, проведенные в естественных и экспериментальных условиях, которые важны для относительно эпидемиологической значимости экспериментальных результатов в окружающей среде. Несмотря на выполненные бесчисленные эксперименты и публикации с описанием развития туляремии у животных, пути передачи, затронутые органы, прогресс поражения и воспалительные реакции хозяина, а также ряд видов животных, действующих как резервуар между эпизоотиями необходимо уточнить в отношении различных линий (подвидов) *F. tularensis*.

Исторически виды животных, пораженные *F. tularensis*, классифицированы на три группы в зависимости от их восприимчивости (к инфекции) и чувствительности (тяжести клинического проявления) [76]:

I группа – виды высоковосприимчивые и высокочувствительные к туляремии (инфицируются при попадании в организм животного единичных

туляремийных бактерий, остро болеют и быстро погибают). К I группе относятся следующие виды животных: большинство видов семейства хомякообразных, а именно подсемейство хомяков (*Cricetinae*) относятся 6 видов (*Cricetus cricetus*, *Mesocricetus raddei*, *Cricetulus migratorius*, *C. barabensis*, *C. tryton*, *Phodopus sungorus*); в подсемействе полевок (*Microtinae*) выделяются следующие рода *Clethrionomys*, *Arvicola*, *Lagurus*, *Ellobius*, *Lemmus*, *Myospalax*, *Ondatra*; подсемейство песчанок (*Gerbillinae*), представители рода *Marmota* (сурки); семейство заячьих (*Leporidae*) беляк, русак и толай заяц; представители отряда насекомоядных (*Insectivora*) рода *Sorex*, *Talpa*.

II группа – высоковосприимчивые, но малочувствительные (заражаются при попадании в организм животного единичных бактерий *Francisella tularensis*, болезнь переносят тяжело, но быстро восстанавливаются благодаря приобретению устойчивого иммунитета): в семействе мышеобразных входят крысы (*R. rattus*, *R. norvegicus*, *R. turkestanicus*, *Nesokia indica*) и полевая мышь (*A. agrarius*); семейство беличьих – белка (*Sciurus vulgaris*), бурундук (*Eutamias sibirica*), тонкопалый суслик (*Spermophilopsis leptodactylus*), 7 видов сусликов рода *Citellus*; представители родов *Neomys*, *Desmana*, *Crocidura* из отряда насекомоядных обладают различной степенью выраженной малой инфекционной чувствительности к туляремии.

К III группе относятся маловосприимчивые и практически нечувствительные животные к туляремии. Данная группа представлена большинством хищными млекопитающими и сельскохозяйственными животными. К данной группе отнесены представители отряда хищных из семейств куньих (ласка, горноста́й, хорь черный, хорь степной, барсук), собачьих (лисица, енотовидная собака, собака), кошачьих (кошка). Малочувствительны к возбудителю туляремии и копытные животные (коровы, буйволы, овцы, козы, свиньи, лошади, косули и верблюды).

Для возбудителя туляремии характерен широкий круг хозяев и различные пути передачи. Кроме того, выполнение обмена возбудителя *Francisella tularensis* между восприимчивыми животными зависит от особенностей патогенеза инфекции, интенсивности накопления микроорганизма в органах больного животного, связанной с этим бактериемии и обсемененности выделений, обеспечивающих инфицирование эктопаразитов и окружающей среды. Развитие эпизоотий в популяциях высокочувствительных видов в природных очагах является основой поддержания эпизоотического процесса, при этом высокая вирулентность бактерии *Francisella tularensis*, обеспечивающая интенсивность размножения в организме этих видов животных является необходимым свойством возбудителя туляремии, сформировавшееся под воздействием механизма передачи.

Многочисленные виды грызунов, принадлежащих к семействам *Cricetidae* и *Muridae* очень восприимчивы и чувствительны к *F. tularensis*. У них развивается острая туляремия, при этом животные быстро умирают после заражения [77]. У некоторых зайцеобразных схожи данные симптомы

затронутые этим заболеванием [74, p. 1631]. Стоит отметить, что известна вариативность по чувствительности к *F. tularensis* среди восприимчивых видов. Например, кролик обыкновенный (*Oryctolagus cuniculus*) использован для дифференциации *F. tularensis* subsp. *tularensis* и *F. tularensis* subsp. *holarctica* и обычно считается восприимчивым, но менее чувствителен к *F. tularensis* subsp. *holarctica* [78]. Хотя *O. cuniculus* оказался естественным инфицированным *F. tularensis* subsp. *holarctica*, для подробной информации о состоянии здоровья кроликов и патологических поражениях необходимо проведение дальнейших исследований. Более того, было высказано предположение, что чувствительность животных видов меняется в зависимости от влияния родентицидов или пестицидов, выпущенных в окружающую среду, но этот аспект требует подтверждения [79]. Спорадические случаи или вспышки у грызунов и зайцеобразных часто встречаются, у тех видов, которые вовлечены в часть жизненного цикла *F. tularensis* в окружающей среде. Однако не все виды могут быть случайными хозяевами, при этом восприимчивость и чувствительность разных видов следует тщательно изучить. Ситуация с участием бобров примечательна и заслуживает большего внимания в будущем. Бобры (*Castor canadensis*) в Северной Америке известны как часть энзоотического цикла *F. tularensis*, при этом штаммы, выделенные от данных видов животных, принадлежат к подвиду *F. tularensis* subsp. *holarctica* [33, p. 868]. Однако лишь несколько штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* изолированы от бобров в Европе [45, p. 704]. *C. fiber* – местный вид бобра в Евразии, и это открытие вызывает вопросы о восприимчивости *C. fiber* к бактерии *F. tularensis*. Бобры вида *C. canadensis* были намеренно завезены в Евразию в 1937 году, точнее в Финляндию, при этом популяция данного вида бобра все еще существует на территории Финляндии и России [80]. Интересно, что два изолята бобра охарактеризованы Сиссонен с его коллегами из Финляндии, при котором выделены от *Castor sp.*, но точный вид не опознан. Однако авторы заявили, что эти бобры обнаружены в районах, где обитали только *C. canadensis*. Недавно, подвид *F. tularensis* subsp. *holarctica* изолированы от туши евразийского бобра *C. fiber*, найденного в регионе города Берлина и провинции Бранденбург в Германии [81]. Ранее было показано, что *C. fiber* повышает уровень антител против *F. tularensis*, но выделение микроорганизма не проводилось [82]. Исследования, направленные на оценку восприимчивости и чувствительности *C. fiber* к бактерии *F. tularensis*, а точнее, исследования, оценивающие их причину смерти, ассоциированные с серологическими исследованиями необходимы для дальнейшего изучения.

Некоторые другие виды диких животных отряда *Soricomorpha* (ранее называвшиеся *Insectivora*), такие как *Talpa sp.* и порядок *Eulipotyphla*, как *Sorex sp.* также были описаны как естественно инфицированные *F. tularensis* [83]. Кроме того, некоторые нечеловекообразные виды приматов оказались очень восприимчивым видом к *F. tularensis* subsp. *tularensis* и *F. tularensis* subsp. *holarctica* [84]. Сообщалось о случайных заражениях птиц, в основном в Северной Америке и в Швеции. Птицы обычно считаются устойчивыми к

инфекциям *F. tularensis*, которые не имеют существенной роли в эпидемиологии этой бактерии [85]. Считается, что вовлечение в эпизоотический процесс птиц, земноводных и рыб носит случайных характер и не оказывает влияние на поддержание очаговости туляремии. Тем не менее, птицы могут длительно сохранять возбудителя и оказывать влияние на изменения в ареале распространения возбудителя [86].

За последнее десятилетие количество исследований, обнаруживающих *F. tularensis* у диких животных и в окружающей среде необычайно увеличилось. Повышенная осведомленность и количество протестированных животных, привели к изоляции *F. tularensis* от видов ранее описанных как не особо чувствительные к этой бактерии например, виды, принадлежащие к отряду *Carnivora*, такие как рыжая лисица *Vulpes vulpes*, или каменная куница *Martes foina* [81, p. 3029]. Актуальность этих видов в жизненном цикле *F. tularensis* и их эпидемиологическое значение, еще предстоит изучить, но это могут быть единичные случаи.

Производственные и домашние животные, кроме грызунов и зайцеобразных, вызывают особую озабоченность из-за их близости к людям. Имеются сообщения о появлении туляремии у домашней кошки (*Felis catus*) в Северной Америке. В основном это связано с *F. tularensis subsp. tularensis*, но также подвидом *F. tularensis subsp. holarctica* выделенный в нескольких кошачьих случаях [87, 88]. За пределами Северной Америки о кошачьих случаях туляремии не сообщалось. Важно расследовать случаи туляремии, пропущенные в других странах, при этом кошачья туляремия главным образом вызвана подвидом *F. tularensis subsp. tularensis*, который является эндемичным для Северной Америки. Собаки (*Canis familiaris*) более устойчивы к *F. tularensis* и до недавнего времени большая часть о спорадических случаях туляремии сообщалось из Северной Америки [89]. Однако в 2014 году опубликовано сообщение о туляремии у собаки в Норвегии. У собаки развились клинические проявления после охоты на зайца-русака (*L. timidus*). Как отмечено авторами, данный случай исследован серологически, при котором выявлено 32-кратное увеличение титра на второй неделе. Однако, данный случай бактериологически не подтвержден, но подвид *F. tularensis subsp. holarctica* выделен из костного мозга горного зайца [90]. Вспышки туляремии у овец (*Ovis aries*) были зарегистрированы в Северной Америке, которые связаны с подвидом *F. tularensis subsp. tularensis* [91]. Необходимы исследования в отношении животных, используемых в производстве, а также домашних животных, с особым упором на специфичность всех подвидов *F. tularensis* к различным хозяевам. Это необходимо для подтверждения или опровержения, участия таких видов животных, которые могут быть естественно инфицированы, а также могут действовать как случайные или резервуарные хозяева. Эта информация имеет решающее значение для понимания поддержания и сохранения бактерии *F. tularensis*, а также для оценки реального риска передачи к человеку и другим видам животным.

1.3.1 Беспозвоночные животные – переносчики и хранители туляремийной инфекции

В передаче бактерии *F. tularensis* от одного теплокровного хозяина к другому вовлечен широкий круг членистоногих. Клещи, играют важную роль в поддержании туляремии в природе, часто передавая возбудитель туляремии между мелкими млекопитающими, такими как зайцеобразные, для поддержания резервуара [92]. Передача *F. tularensis* в природе документирована другими менее распространенными членистоногими переносчиками, включая блох, вшей, мошек и клопов [71, p. 27]. Для членистоногих переносчиков, передающих *F. tularensis*, были отмечены географические различия. Эти различия связаны с географическим положением и обилием видов их хозяев, обычно мелких млекопитающих. В США, Швеции, Финляндии и России укусы членистоногих, особенно клещей, являются распространенным способом передачи туляремии человеку. Передача инфекции, особенно оленьей мухой, *Chrysops discalis*, и лошадиными мухами, была документирована в западных регионах США и России. На западе США основными переносчиками инфекции считаются олени мухи, в то время как на востоке США важными переносчиками считаются только клещи. В северных странах - Швеции, Финляндии и России - комары определены как основные переносчики, заражения туляремией человеком. В Центральной Европе контакт с инфицированными животными и употребление зараженной пищи или воды являются более распространенными способами передачи инфекции в этом регионе, чем передача через членистоногих [93].

1.3.1.1 Иксодовые клещи

На территории СНГ к настоящему времени естественная зараженность возбудителем туляремии установлена для 20 видов иксодовых клещей: *Dermacentor marginatus*, *D. pictus*, *D. silvarum*, *D. nuttalli*, *D. daghestanicus*, *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*, *I. apronophorus*, *I. laguri*, *I. redikorzevi*, *Haemaphysalis otophila*, *H. punctata*, *H. concinna*, *H. sulcata*, *Rhipicephalus rossicus*, *Rh. turanicus*, *Rh. pumilio*, *Rh. schulzei*, *Hyalomma plumbeum* и *H. asiatica*. Клещи могут сохранять в себе туляремийных бактерий пожизненно. Например, доказано советскими учёными сохранение возбудителя туляремии в половозрелых клещах *Dermacentor marginatus* в течение 710 дней без изменения его основных биологических свойств, включая вирулентность. Пассаж или длительное сохранение *F. tularensis* в клещах данного вида с пониженной вирулентностью не сопровождается ее усилением. Балашов Ю. заявил, что клещи являются "наиболее эффективным естественным переносчиком и резервуаром", учитывая многочисленные демонстрации передачи инфекции путем питания, интенсивного размножения бактерии, длительное выживание в клещах без потери жизнеспособности или вирулентности бактерии, а также частое обнаружение инфекции при исследовании клещей, ищущих хозяина [94].

В Казахстане роль клещей как активных переносчиков туляремии впервые была определена Д.А. Головым (1934) в опытах с *I. apronophorus*, Д.А. Головым и В.Н. Федоровым – в опытах с *D. marginatus* [17, с. 23; 95]. Этими же авторами впервые установлена естественная зараженность указанных клещей возбудителем туляремии. Наибольшее значение в циркуляции возбудителя туляремии на территории Казахстана имеют *I. apronophorus*, *I. persulcatus*, *Rh. pumilio*, *Rh. rossicus*, *D. marginatus*, *D. niveus*, *D. pictus*. Активный переносчик и хранитель туляремийного микроба *D. marginatus* является фоновым видом в очагах туляремии пойменно-болотного и предгорно-ручьевого типа в Казахстане. Клещи вида *D. pictus* распространены в лесных и лесостепных ландшафтах, характерны для широколиственных лесов. Два вида клещей *D. niveus* и *Rh. pumilio* широко распространены в природном очаге туляремии тугайного типа. *I. persulcatus* встречается в предгорьях Алатау (Джунгарского, Заилийского и Терскей), Саура и Алтая. Клещи вида *I. apronophorus* встречаются в Алматинской, Восточно-Казахстанской, Акмолинской областях в основном, на полянках в туляремийных очагах предгорно-ручьевого типа [61, с. 21].

В других странах Европы и Азии спонтанная зараженность туляремийным микробом была установлена у следующих видов клещей: *D. marginatus* (Румыния, Франция), *D. pictus* (Чехия, Словакия и Франция), *Ixodes ricinus* (Польша, Норвегия, Чехия, Словакия и Франция), в Японии встречаются следующие виды клещей: *I. persulcatus*, *I. japonensis* и *Haemaphysalis flava*. В США укусы клещей являются преобладающим способом передачи инфекции. Три вида клещей, которые наиболее важны для передачи инфекции человеку, включают *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* и *A. americanum*. *D. variabilis* и *A. americanum* - два вида клещей, встречающихся в регионах США, где зарегистрирована самая высокая заболеваемость клещевой туляремией (Арканзас, Миссури, Оклахома) [92, р.6]. Иксодовые клещи являются компетентными переносчиками *F. tularensis*, что было продемонстрировано лабораторными исследованиями или сообщениями о случаях заражения этими видами.

Компетентность *D. variabilis* в отношении *F. tularensis* была измерена в двух образцовых современных исследованиях. Реалистичные дозы (100 КОЕ) были использованы для заражения двумя штамма типа А (А1b, А2) и одним штаммом типа Б. Экспериментальные клещи были взяты из лабораторной коллекции с точным происхождением и известным специфическим патогеном. Неинфицированные когорты были получены из тех же партий клещей для сравнения с инфицированными. Размеры выборок были такими, чтобы статистические сравнения были адекватными. Эксперименты показали, что штаммы А2 вызывали быструю гибель нимф, но не взрослых клещей. Инфицирование любым из трех штаммов в той или иной степени влияло на нимф, уменьшая размер тела, прикрепление или успешность питания. Штамм А1b не передавался мышам от инфицированных нимф, а передача была слабой для штаммов А2 и Б (8-12% успеха). Мыши могли заразиться, поедая

зараженных нимф. Хотя взрослые особи *D. variabilis* никогда не питаются на грызунах, это ограничение хозяина было преодолено путем помещения клещей в капсулы на мышах; из тех самок клещей, которые питались и, как было показано, содержали в себе инфекцию в 58-89% случаях. Соответственно, компетентность одного охарактеризованного штамма *D. variabilis* различалась в зависимости от инфицирующего типа *F. tularensis*, но все три типа передавались при укусе взрослых клещей, а два – при укусе нимфы. Предполагается, что *F. tularensis* передается в течение одного дня после прикрепления инфицированных клещей, некоторые мыши заболели в течение четырех дней после питания [96].

Опубликовано множество исследований, изучавшие клещей как основных переносчиков данной инфекции. Как и в случае многих других клещевых инфекций, стандартизация анализов отсутствует; при использовании ПЦР-анализа необходимо продемонстрировать специфичность, чтобы для предотвращения обнаружения *Francisella* подобных эндосимбионтов или других видов *Francisella spp.* Размеры выборки часто таковы, что доверительные интервалы между оценками распространенности очень широки. Почти 8000 особей *D. reticulatus* были использованы в работе из природного очага в Чешской Республике в течение 1995-2013 годов [97]; 64 изолята *F. tularensis* были выделены при инокуляции мышей, минимальный уровень инфицирования составил 0,83%. Бактериологическим золотым стандартом является выделение возбудителя. Goethert Н.К. с коллегами наблюдали за природным очагом на Винограднике Марты, с 2001 по 2011 годы была обнаружена бактерия *F. tularensis* в клещах при помощи постановки ПЦР (в среднем 1 572 взрослых клещей *D. variabilis*, тестирование проводили каждый год) с годовой распространенностью приблизительно 3,1% [98]. Обнаружение генетического материала, однако, не означает жизнеспособность возбудителя.

В результате многочисленных опытов установлено, что иксодовые клещи являются специфическими переносчиками возбудителя туляремии. Они сохраняют возбудителя в своем организме по ходу метаморфоза – от личинки до половозрелой особи. Передачу инфекции осуществляют нимфы и имаго, но известны случаи передачи инфекции личинками при прерванном кормлении. Выяснено, что в клещах происходит интенсивное размножение туляремийных бактерий. Последнее носит «ступенчатый» характер: количество бактерий увеличивается в момент кровососания, чему способствует тепло тела хозяина и поступление в клеща крови, и уменьшается при переходе (линьке) последнего из одной фазы в другую. Эти данные получены при изучении разных видов клещей. Иксодовые клещи ввиду своей долговечности являются не только переносчиками, но и длительными хранителями туляремийной инфекции в природе в межэпизоотические периоды. Выяснено также, что виды клещей, относящиеся к различным родам, не равноценны как переносчики туляремии, причем более эффективно передачу осуществляют клещи рода *Dermacentor*.

1.3.1.2 Гамазовые клещи

В СНГ естественная зараженность туляремиными бактериями отмечена среди следующих видов гамазовых клещей: *Haemolaelaps glasgowi*, *Laelaps muris*, *L. clethrionomydis*, *L. hilaris*, *Haemogamasus serdjukovae*, *Hyperlaelaps amphibious*, *Macrolaelaps multispinosus*. В большинстве случаев находки зараженных клещей относились к периоду разлитых эпизоотий среди грызунов, причем инфицированных клещей обычно снимали с больных туляремией грызунов или их трупов, а также обнаруживали в гнездах погибших грызунов.

В очень подробных опытах с облигатным гематофагом *Hirstionyssus musculi* установлено, что этот клещ воспринимает и сохраняет возбудителя туляремии, но не передают его путем кровососания восприимчивому животному [99]. Размножение в клещах данного вида не происходит, в том числе при повторных кровососаниях на теплокровном животном, а сроки хранения инфекции зависят от окружающей температуры: при комнатной температуре (18-20⁰С) бактерия *F. tularensis* обнаруживается в клещах до 20-30 дней, а при температуре 4-6⁰С до 98 дней. Свойство возбудителя при этом не изменяются. На жизнеспособность гамазовых клещей туляреминые бактерии не оказывают заметного влияния.

Кропотливые исследования, проведенные Клаффом Хопла, продемонстрировали вероятную роль *Ornithonyssus bacoti* (крысиный клещ) в поддержании *F. tularensis*. Хопл К. определил, что протонимфы приобретали инфекцию от септических мышей, при котором бактерии передавались транстадийно в некормлящую дейтонимфу [100]. При этом бактерия *F. tularensis* может быть передана взрослым клещом здоровым мышам. Также были получены четкие доказательства трансвариальной передачи, хотя только для приблизительно одной пятой части взрослых клещей, питавшихся на зараженных мышах. Клещ вида *O. bacoti* не передавал инфекции восприимчивым животным в процессе кровососания на них; заражение происходило лишь в случае поедания клещей животными. Анализы на заражение включали как инокуляцию мышей и культивирование на глюкозо-красном агаре. Культивирование позволяло оценить бактериальное поражение, которое в среднем, превышало 6 log CFU (число колоний образующих единиц) на клеща даже после продолжительного голодания. Учитывая большое разнообразие кровососущих клещей, необходимо приложить определенные усилия для лучшего описания ассоциаций переносчик-патоген в лаборатории и в природе.

Установил, что *Ornithodoros turicata* и *Ornithodoros parkeri* могут оставаться инфицированными *F. tularensis* в течение более 600 дней, но не передают инфекцию при укусе. Детальные исследования инфицированных *Ornithodoros moubata*, *O. parkeri*, *Ornithodoros hermsi* и *O. turicata*, включая заражение известным штаммом типа А (Schu), обнаружили жизнеспособные бактерии в течение 450 дней и продемонстрировали жизнеспособность *F. tularensis* в ректальных выделениях и коксальной жидкости, а также передачу через укус [101]. Заражение через коксальную жидкость

представляется наиболее вероятным способом передачи, поскольку *O. hermsi*, который не выделяет коксальной жидкости во время кормления, был наименее компетентным переносчиком. Несмотря на то, что многочисленные бактерии колонизировали практически все ткани клеща, смертность от инфекции не была зарегистрирована. Тот факт, что мягкие клещи могут поддерживать жизнеспособную инфекцию в течение столь длительного времени, предполагает, что они могут поддерживать природный очаг туляремии там, где они эндемичны (южная, юго-центральная и запад США и центральная Азия).

В итоге всех проведенных исследований следует признать гамазовых клещей лишь механическими переносчиками туляремии. Они могут лишь иметь некоторое значение в передаче инфекции грызунам при скученном обитании последних, а в отдельных случаях, возможно, служить источником заражения зверьков после затухания эпизоотии. Однако нет оснований для того, чтобы отводить гамазовым клещам самостоятельную роль в сохранении туляремийной инфекции в межэпизоотический период. Случаи заражения людей туляремией в результате нападения гамазовых клещей неизвестны.

В литературе имеются противоречия в отношении наследования *F. tularensis* клещами. Имеются сообщения, в которых продемонстрирована транстадийная передача инфекции взрослой особью, в тех случаях когда личинки и нимфы питаются на неинфицированных хозяевах.

Паркер К. и Спенсер Ф. также продемонстрировали передачу инфекции по наследству потомству 2 из 15 самок *D. andersoni*, питавшихся личинками без хозяев. Клещи *D. andersoni* питающиеся кровью инфицированных кроликов, также показали передачу инфекции через укус личинки или нимфы. Еще 6 из 15 самок указывали на наследственность, но типичная инфекция (смерть хозяина) не была доказана; заражение предполагалось только при передаче селезеночного материала от кроликов, питавшихся потомством, к неинфицированным животным. Калхун А. и Алфорд Е. обнаружили заражение личинок *A. americanum*, ищущих хозяина, когда животных инокулировали пулами гомогената [102]. В отличие от этого, советские ученые предположили, что любая демонстрация трансвариальной инфекции была вызвана заражением закрытых личинок выделениями инфицированной самки клеща и отвергли возможный вклад наследования от клеща [103]. Другие ученые тоже не смогли продемонстрировать наследование у *D. variabilis*. Более поздние исследования, проведенные Генчи М. с коллегами не обнаружили трансвариальной передачи от самок *D. reticulatus* и *I. ricinus*, при этом бактерии по-видимому, погибли в превителлогенных ооцитах. Они отметили, что 17-30% всех самок, откладывающих яйца, погибли или не откладывают яйца. Возможно, эффективность этого процесса может варьироваться среди штаммов *F. tularensis* и даже может быть связана с генетическим фоном клеща (коадаптация переносчика и патогена) [104].

1.3.1.3 Блохи

В СНГ естественная зараженность туляремийным микробом зарегистрирована у 17 видов блох: *Ctenophthamus assimilis*, *Ct. acuminatus*, *Ct. pollex*, *Ct. orientalis*, *Ct. truncus*, *Ct. wagneri*, *Ct. secundus*, *Ct. arvalis*, *Amphipsylla rossica*, *Neopsylla setosa*, *Ceratophyllus mokrzecky*, *C. tesquorum*, *C. consimillis*, *C. calcarifer*, *C. penicilliger*, *C. walker* и *Pulex irritans*. В других странах спонтанная зараженность туляремийным микробом отмечена у следующих видов блох: *Cediopsylla simplex*, *Malaracus telchinum* (США) и *Megabothris rectangulatus* (Швеция), *Ceratophyllus acutus*, *Ceratophyllus fasciatus*, *Xenopsylla cheopis*.

Во время первых исследований биологии *F. tularensis*, проведенных МакКоем и Чапином, блохи были привлечены в качестве переносчиков инфекции. Как *Ceratophyllus acutus* (*Diamanus montanus*), так и *Ceratophyllus fasciatus* были экспериментально заражены, питаясь туляремийными морскими свинками и сухопутными белками, но инфекционность в течение более чем одного-двух дней после кормления не проверялась. Кроме того, хотя 100 блох, снятых с морской свинки, умершей от туляремии, были помещены в чистую клетку со здоровой белкой, что привело к смерти белки, было неясно, приобрела ли эта белка инфекцию через укус блохи или проглатывая блох. Конечно, любой из этих способов может быть эффективным для поддержания энзоотии. Экспериментальные данные показывают, что блохи (*Xenopsylla cheopis* и *D. montanus*) могут приобретать бактерии от зараженных мышей и сохранять жизнеспособную инфекцию более месяца, но не передают его при питании [105]. Более ранние исследования с тремя дополнительными видами блох, включая *Pulex irritans*, показали выживание в течение только одного дня и отсутствие передачи [106]. Личиночные блохи, питавшиеся культивированным *F. tularensis*, могли сохранять инфекцию в течение не более трех дней и не заражались питаясь сухой кровью, в которую была добавлена культура. Ранние исследования различных видов блох продемонстрировали естественное заражение чумой в Западных регионах Соединенных Штатах. Используя метод инокуляции гомогенатов блох грызунам, передача туляремии происходило редких случаях, это позволяет предположить, что блохи вносят очень незначительный вклад в поддержание этой инфекции, по крайней мере, в Америке [107].

В организме блохи не происходит размножение *F. tularensis*, в том числе и при подкормке зараженных блох кровью здорового животного, а наблюдается лишь их отмирание или выделение с фекалиями. Процесс очищения блох от туляремийных бактерий происходит тем быстрее, чем выше окружающая температура. На жизненный цикл блох туляремийный микроб не оказывает заметного влияния.

Вышеизложенные данные показывают, что блохи могут быть лишь случайными механическими переносчиками туляремии, причем их роль может преимущественно выступать в период разлитых эпизоотий туляремии. Соответственно блохи могут учитываться как индикаторы текущих эпизоотий.

1.3.1.4 Вши

Вши грызунов участвуют в распространении туляремии в природных очагах, особенно в условиях скученного обитания своих хозяев. Кроличья вошь (*Haemodipsus ventricosus*) передавала *F. tularensis* экспериментальным кроликам, но передача вшей от инфицированного животного к неинфицированному должна была произойти в течение трех часов, иначе инфекция обычно не передавалась. Однако несколько кроликов были заражены вшами, которые содержались в течение 2-3 дней. Френсис был очень осторожен, чтобы исключить возможность того, что заражение произошло из-за заражения выделениями или экскрементами умирающих кроликов, помещая волосы со вшами от кроликов и помещая их в только что очищенные клетки. Более короткие, но аналогичные эксперименты, проведенные группой Фрэнсиса с использованием *Polyplax serratus*, также продемонстрировали передачу инфекции даже через неделю после удаления вшей из зараженных хозяев. Фрэнсис был осторожен и не утверждал, что инфекция была вызвана укусами вшей (признавая, что мыши будут поедать вшей), и просто указал, что заражение мышью привело к передаче инфекции в условиях, исключающих контакт здоровой мыши с экскрементами зараженных мышей [108]. Price R.D. экспериментально заразил человеческих вшей (*Pediculus humanus corporis*) путем кормления ими кроликов, которые внутривенно получали большую дозу культивированного *F. tularensis* непосредственно перед тем, как стать хозяином, а также когорту, зараженную путем интрацеломической инокуляции. Серийные срезы инфицированных вшей были исследованы для определения течения инфекции во времени. Интересно, что у вшей, зараженных при кормлении, наблюдалось относительно небольшое размножение бактерий (проглатывание $6 \log$ колониеобразующие единицы и измерение не более $6 \log$ колониеобразующих единиц через несколько дней после этого). У тех, кто был инокулирован $3 \log$ колониеобразующих единиц, в течение четырех дней наблюдалось размножение $3 \log$ колониеобразующих единиц, что быстро привело к смерти. Price R.D. предположил, что оставшиеся бактерии в кишечнике у вшей имеют больше шансов выжить, чем в гемолимфе, так как питательные факторы позволяют быстро увеличить количество бактерий, вследствие этого происходит интоксикация организма, что быстро приводит к гибели вшей [109]. Учитывая специфичность хозяина большинства вшей, тот факт, что новые хозяева заражаются только при очень тесном контакте (вши не сохраняются в фомитах), и очень короткую жизнь вшей в отсутствие хозяина. Вши могут в лучшем случае способствовать усилению инфекции во время эпизоотии, но не будут поддерживать возбудителя после того, как все хозяева данного вида вшей погибнут. Конечно, сами вши вскоре вымерли бы на местном уровне, в случаях гибели хозяева.

1.3.1.5 Клопы

Постельный клоп *Cimex lectularius* оказался способным весьма длительно сохранять туляремиальные бактерии – до 6-8 месяцев. Но через укус клопы

передают инфекцию лишь в первые сутки после инцифирования и редко позднее. Заражение восприимчивых к туляремии животных легко осуществляется при раздавливании инфицированного насекомого с последующим растиранием его тканей на коже. У инфицированных клопов туляремиальные бактерии обнаруживаются в гемолимфе, в протоплазме эпителиальных клеток желудка и отчасти мальпигиевых сосудов, но не найдены в слюнных железах, органах размножения, мозге и мускулатуре. Испажнения инфицированных клопов содержат туляремиальные бактерии, но трансовариальная передача возбудителя отсутствует.

Francis E. и Lake G.C. кормили клопов (*Cimex lectularius*) кровью зараженных мышей и морских свинок, при котором подтвердили три способа передачи туляремии. Первый способ путем прерывистого кормления (клопа удаляли с зараженного животного до повторного кормления и позволяли повторно заразить незараженное животное). Вторым способом путем укуса через 71 день (заражение при укусе обеспечивалось тем, что клопы питались хвостами мышей). Последний способ путем предоставления возможности мышам поедать клопов, зараженных за 100 дней до этого [110]. Возможная роль цимицидов или триатоминов в качестве потенциальных межэпизоотических хозяев не изучалась. Впервые исследователи из Мадагаскара описали молекулярно - генетическое обнаружение *F. tularensis* подобной бактерии в постельных клопах из образцов, собранных в сельской местности. Эта находка предполагает потенциальное участие постельных клопов в экологии *Francisella*. Роль постельных клопов как возможных хозяев, резервуаров или переносчиков *Francisella spp.* должна быть изучена в дальнейшем [111].

1.3.1.6 Слепни

Естественная зараженность туляремиальным микробом установлена в СНГ для 6 видов слепней: *Chrysops relictus*, *Ch. italicus*, *Tabanus bromius*, *T. autumnalis*, *Atylotus flavoguttatus* и *Haematopota pluvialis* [112]. В США спонтанное заражение было обнаружено у *Chrysops fulvaster* и *Ch. aestuans*, а на основании эпидемиологических данных переносчиком также считается *Chrysops discalis*. Частота заражения слепней варьирует в зависимости от интенсивности эпизоотии среди диких млекопитающих, от которых насекомые заражаются.

Туляремия была впервые описана как болезнь Фрэнсисом во время расследования вспышки заболевания, переданного оленьей мухой в штате Юта. Используя собранные данные о *Chrysops discalis* в полевых условиях, Фрэнсис и Мэйн сделали важный вывод, что данная инфекция передается через укус мух, которые питались в течение короткого времени (прерванное питание) на инфицированной морской свинке или кролике. Затем данные слепни, спустя несколько часов или дней питались кровью неинфицированных морских свинок, которые умирали от типичной туляремии. Впоследствии его команда проверила мух, которые питались инфицированными морскими свинками.

Ежедневно, вводя гомогенаты мух неинфицированным морским свинкам. "До 5 дней мухи оставались постоянно инфицированными", но Фрэнсис и Мэйн утверждали, что инфекция, как правило, теряется к 10-му дню после заражения и, следовательно, репликации, скорее всего, не происходит. Таким образом, мухи считались механическими переносчиками [113]. Павловский Е. четко признал векторную роль мух табанид и фактически приравнял их роль в поддержании туляремии к их роли в поддержании сибирской язвы. Мухи скапливались на мертвых животных и распространяли инфекцию с помощью зараженных ротовых аппаратов и прерванным питанием на новых хозяевах. Интересно, что сообщения о туляремии, передаваемой мухами, очень редки в других местах, кроме американского запада и, действительно, Джеллисон В. зашел так далеко, что заявил, что единственным видом, имеющим какое-либо значение в качестве переносчика туляремии является - *C. discalis*. Слепни могут инфицироваться от воды, содержащей туляремиальные бактерии, и передавать далее инфекцию укусом хоботка восприимчивому животному. Установлено, что *F. tularensis* не размножаются в слепнях и передача осуществляется механическим путем. В туляремиальных очагах пойменно-болотного типа слепни играют важную роль (вместе с комарами) в передаче туляремии людям, обуславливая трансмиссивные вспышки. Мелкие слепни (*Chrysops*, *Haematopota*), участвуют в передаче инфекции водяным крысам, зайцам и другим животным, доступным для нападения млекопитающим [114].

1.3.1.7 Комары

В СНГ естественная зараженность туляремиальным микробом отмечена у 11 видов комаров: *Aedes vexans*, *Ae. excrucians*, *Ae. communis*, *Ae. punctor*, *Ae. flavescens*, *Culex modestus*, *C. pipiens*, *Anopheles hyrcanus*, *A. maculipennis* и *A. bifarius*. В странах дальнего зарубежья туляремиальная инфекция была обнаружена у следующих родов комаров *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* и *Coquilletidia*.

Филип К.Б. и Паркер Р.Р. впервые исследовали возможность передачи *F. tularensis* через укус, используя местные виды *Aedes*, а также *Aedes aegypti*. Ни один комар не передал *F. tularensis* через укус во время второго приема крови, но небольшая часть комаров сделала это после прерывания питания (это было интерпретировано как механическая передача). Прихлопывание инфицированных комаров на коже морских свинок также передавало инфекцию. Экскременты, оставшиеся после инфицированного приема крови, были заразны при инокуляции морским свинкам. Филип и Паркер также отметили, что *F. tularensis* выживает в мертвых комарах в течение как минимум четырех дней, и предположили, что это может служить средством загрязнения водоемов, что напоминает классические результаты, полученные Мэнсоном при изучении филяриоза [115]. Советские ученые считали комаров переносчиками туляремии, но их значение в поддержании активности природных очагов было незначительным по сравнению с клещами и табанидами.

Поскольку инокуляционные язвы чаще всего обнаруживаются на туловище, шее и ушах пациентов, туляремия в Швеции, по-видимому, передается в основном комарами [116]. Бактерия *F. tularensis* выделена от комаров, а личинки комаров, собранные из эндемичных мест, которым позволили развиться и стать взрослыми особями в лаборатории, содержали ДНК *F. tularensis* [117]. Из 791 комара, собранных в эндемичных местах Швеции, 18 оказались положительными на ДНК *F. tularensis subsp. holarctica*; инфекция была обнаружена у *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* и *Coquilletidia* [118]. В окончательном эксперименте личинки *A. aegypti* второго поколения подвергались воздействию $7 \log$ CFU (число колоний образующих единиц) вируса типа В, затем промывали и давали развиться до взрослых особей. Одна четверть взрослых комаров содержала ДНК *F. tularensis*, третья часть мышей заражали гомогенатами внутрибрюшинно. Это доказало, что вирулентные бактерии передаются транстадийно [119]. Личинки *Culex quinquefasciatus* охотно питались биопленками *F. tularensis subsp. holarctica*, но их окукливание задерживалось, а появляющиеся взрослые комары были меньше, чем те, которые не питались данными биопленками [120]. Необходимы дополнительные исследования по изучению переносчиков *F. tularensis* комарами, особенно для уточнения способа передачи; на сегодняшний день исследования, как правило, не выявили передачу бактерии через укус, и ведущая гипотеза заключается в том, что люди заражаются, прихлопнув кормящегося комара, тем самым загрязняя свою кожу. Короткоживущие антитела к слюнным или кишечным белкам комара следует искать у больных туляремией для дальнейшего подтверждения передачи комарами [121]. Хотя экспериментальные показатели передачи инфекции от комаров представляются небольшими, огромное количество комаров в природе компенсирует маловероятные события. Учитывая доказательства того, что люди заражаются от комаров, можно с уверенностью сказать, что и другие животные в энзоотичных местах также заражаются. Роль комаров может быть специфичной для некоторых природных очагов. Более 9000 комаров были обследованы с отрицательными результатами в одном из очагов в Чешской Республике, и до 2% клещей-хозяев, которые были собраны одновременно, дали изоляты *F. tularensis* [122].

Наблюдения в естественных условиях показывают, что комары имеют большое значение в распространении туляремии в летнее время в пойменно-болотных очагах среди водяных крыс и других доступных для их нападения зверьков.

1.3.1.8 Гидробионты

Туляремийные бактерии обнаруживались в природных условиях в организме различных беспозвоночных животных – обитателей водоемов. Известно спонтанное заражение 6 видов моллюсков (*Limnea peregra*, *L. ovata*, *L. truncatula*, *Pisidium caesartanum*, *Planorbis contortus*, *P. albus*), 2 видов ракообразных (*Gammarus pulex*, *G. balcanicus*), пресноводных крабов (*Potamion*

potamios), личинок ручейников (*Limnophilus stigma*, *L. rhombicus*, *Anabolia sororcula*) и водяного скорпиона (*Nepa cinerea*).

Креветки и улитки могут сохранять жизнеспособные организмы в течение 20 дней [123]. Советские ученые первые описали беспозвоночных, способствующих выживанию *F. tularensis* в воде. Павловский утверждает, что "туляремийный микроб... может быть найден в телах... моллюсков, крабов и раков, личинок водяных клопов...". Раки были связаны с заражением человека, и *F. tularensis*, очевидно, заражает их [124], что позволяет предположить, что дополнительные исследования водных беспозвоночных с использованием современных методов оправдано в известных природных очагах.

Моллюски могут инфицироваться в природных условиях, находясь в зараженной воде, причем успешно – при обглаживании тканей трупов животных, попавших в водоемы. В эксперименте установлено, что прудовики (*Limnea stagnalis*) и катушки (*Planorbis corneus*), инфицировавшиеся на трупе мыши, получают большее количество бактерий и дольше удерживают их, чем особи, находившиеся в той же воде, но без доступа к трупу. Моллюски, инфицировавшиеся на трупе мыши, павшие от туляремии, чаще и с большей интенсивностью инфицируют воду, выделяя возбудителя с экскрементами. В экскрементах моллюсков, скапливающихся на дне аквариума, обнаруживали бактерии через 30 дней после инфицирования моллюсков, при этом в воде и в самих моллюсках бактерий уже не было отмечено.

Оценивая эпизоотологическое значение беспозвоночных в природных очагах туляремии, следует заключить, что все изученные группы так или иначе могут участвовать в поддержании циркуляции возбудителя. Наиболее важное значение имеют иксодовые клещи и кровососущие двукрылые, причем первые являются не только переносчиками, но и длительными хранителями инфекции в межэпизоотические периоды. Блохи, гамазовые клещи, вши приобретают значение переносчиков в периоды высокой численности своих хозяев – мелких млекопитающих, усиливая развитие эпизоотий среди них. Наконец, гидробионты, в особенности моллюски, могут способствовать инфицированности отдельных водоемов.

1.3.2 Клинические проявления туляремии у животных

Из обширного списка млекопитающих, у которых зарегистрирована естественная зараженность туляремией, лишь у немногих видов наблюдаются эпизоотии, поражающие значительную часть популяции. Такие эпизоотии, сопровождающиеся заметной гибелью зверьков, свойственны обыкновенной полевке, водяной крысе, домовый мыш, ондатре. Чаще, чем у других видов, обнаруживаются больные особи у хомяков, зайцев, полевок - экономок. Различия в характере проявления эпизоотического процесса у разных видов зависят от взаимоотношения их с возбудителем инфекции и особенностей биологии животных, определяющих возможность вовлечения в эпизоотии и их роль в дальнейшем распространении инфекции.

Эпизоотологические наблюдения в очагах и экспериментальные исследования показывают, что значение различных видов млекопитающих в передаче возбудителя туляремии зависит от особенностей течения инфекции. Туляремия может проявляться очень острой фазой заболевания у животных с высокой степенью восприимчивости (например, домовая мышь, *Mus musculus*), с развитием сепсиса, увеличением селезенки и печени, а также скоплением белых очагов инфекции в пострадавшем органе. Заболевание может быть подострым у умеренной степени восприимчивых видов (например, европейский бурый заяц в центральной Европе), с гранулематозными поражениями в основном в легких, перикарде и почках. Подострая фаза заболевания зафиксирована у горных зайцев в Швеции [125].

Инкубационный период составляет 1–10 дней. Наиболее серьезным и часто поражаемым видом домашнего скота являются овцы. Передача происходит через вдыхание инфицированных капель, контакт с инфицированными животными, укусы членистоногих переносчиков или пероральное поглощение контаминированной пищи или воды [126].

Выделение возбудителя туляремии от европейских плотоядных ограничивается единичными случаями среди свободно живущих диких животных. Среди зарегистрированных случаев - каменная куница в Швейцарии (2012) [127] енотовидная собака (2012) и рыжая лисица (2008) в Германии [128]. Что касается домашних плотоядных, туляремия sporadически встречается у кошек в Северной Америке, где она почти исключительно вызывается подвидом *tularensis*. В Северной Америке возникновение туляремии у кошек считается важным фактором для заражения людей туляремией [35, p. 2068].

Туляремия типа А является особенно патогенной для зайцеобразных, а также имеются сообщения об инфицировании кошек и нечеловекообразных приматов. Клиническая картина зависит от вида хозяина, подвида бактерий и пути заражения. Овцы и кошки могут быть субклинически инфицированы или иметь бактериемию, лихорадку и респираторную инфекцию. У кошек также может развиваться язвенно-гландулярное или ротоглоточное заболевание, предположительно, в результате воздействия зараженных предметов. Клинические признаки включают увеличение частоты пульса и дыхания, кашель, диарею и поллакиурию с лимфаденопатией и гепатоспленомегалией. Прострация и смерть могут произойти через несколько часов или дней. Sporadические случаи лучше всего распознаются по признакам септицемии. Вспышки у новорожденных ягнят могут привести к смертности до 15%.

Наиболее частыми очагами поражения являются очаги некроза в печени, а также в селезенке, легких и лимфатических узлах. Организмы могут быть легко выделены из образцов вскрытия с помощью специальных сред. Инфекционная доза, необходимая для передачи этого патогена, чрезвычайно мала; таким образом, риск заражения во время вскрытия или для персонала лаборатории является значительным, при котором специальные процедуры и средства защиты имеют важное значение.

1.4 Диагностика и генетическое типирование штаммов *F. tularensis*

Самыми распространенными методами диагностики туляремии являются обнаружение агглютинирующих антител в сыворотке с помощью агглютинации в пробирке, микроагглютинация, гемагглютинация и иммуноферментный анализ [129], хотя антитела не могут быть обнаружены до второй или третьей недели болезни. Окончательный диагноз туляремии ставится при выделении чистой культуры *F. tularensis* из клинических образцов (кровь, экссудаты или материалы биопсии пораженных органов или лимфатических узлов). *F. tularensis* является строгим аэробом, для культивирования требуются среды с добавлением сульфгидрильных соединений (цистеин или цистин) для оптимального роста. Для культивирования не подходят обычные лабораторные среды, но *Francisella* могут быть успешно культивированы на цистеиновом кровяном агаре с глюкозой, тиогликолевом бульоне, шоколадном агаре, агаре для гонококков, модифицированная среда Тейера-Мартина, или забуференный угольно-дрожжевой агар. Оптимальная температура роста составляет 37°C, при которой колонии могут появиться на 2-4 день. На глюкозо-цистеиновом кровяном агаре колонии серые или средне-зеленоватые, достигающие 4 мм в диаметре, хотя морфологические характеристики колонии могут варьировать в зависимости от штамма и в пределах штамма.

По определению Центров по контролю и профилактике заболеваний, подтвержденная туляремия - это когда *F. tularensis* выделена из клинического образца или наблюдается четырехкратное или более значительное изменение титра антител в сыворотке к *F. tularensis*. В то время как вероятный случай туляремии признается когда *F. tularensis* обнаруживается в образце с помощью флуоресцентного анализа или однократном повышении титра антисыворотки *F. tularensis*. Наибольший риск заражения *Francisella* для лабораторных работников является воздействие инфекционных аэрозолей при манипуляциях с культурами *Francisella*. Хотя культивирование *F. tularensis* проводится в хорошо специализированных и укомплектованных лабораториях из-за требований санитарной безопасности по работе с возбудителем. Штаммы *F. tularensis* имеют сходный антигенный состав, поэтому невозможно отличить различные подвиды друг от друга с помощью серологических методов [130]. Ограничения как в культивировании и серологии привели к значительным исследованиям в области разработки новых методов диагностики *F. tularensis*.

Точное знание генетического разнообразия микроорганизмов полезно для множества целей, таких как понимание появления патогенов, отслеживание и контроль их распространения, а также сертификации и патентования штаммов. Возможность точного обнаружения и диагностики туляремии играет значительную роль в эпидемиологии и эпизоотологии. Из-за различных патогенных профилей и биогеографии различных подвидов *F. tularensis*, важно иметь возможность точно различать их [131]. Молекулярно-генетические методы могут быть использованы для дифференциации подвидов и дактилоскопии штаммов *F. tularensis*, включая полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP - amplified fragment length

polymorphism) [132], полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP - restriction fragment length polymorphism), канонические вставки-делеции (INDEL - Insertion-deletion polymorphisms), ПЦР, гель-электрофорез в импульсном поле (PFGE - pulsed-field gel electrophoresis) [33, p. 864], мультилокусное типирование последовательностей (MLST - Multilocus sequence typing) [133], мультилокусного анализа тандемных повторов с переменным числом (MLVA - Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis) [134], риботипирование, анализ региональных различий (RD), анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) на основе всего генома и даже анализ секвенирования всего генома, полногеномное секвенирование на основе MLST+. Среди них ПЦР является доминирующим методом прямого выявления бактерии *F. tularensis* с низким уровнем дискриминации на уровне штаммов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) стала оптимальным методом для идентификации различных патогенов, поскольку ПЦР обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Обнаружение и дифференциация подвидов *F. tularensis* с помощью ПЦР осложняется отсутствием значительной изменчивости в их геномах [135]. За последнее десятилетие были проделаны большое количество работ по выявлению бактерии *F. tularensis* с помощью ПЦР из изолированного штамма или непосредственно из клинических образцов [136, 137]. Анализ, разработанный Broekhuijsen M с коллегами способен различать четыре подвида *F. tularensis*. Однако он не обладает удобством определения в режиме реального времени и требует прогона продуктов ПЦР в геле для визуализации ампликонов длиной до 3 килобаз. Кроме того, этот анализ не является мультиплексным и не позволяет различать *F. tularensis subsp. tularensis* А.І и А.ІІ. [138]. Kugeler K.J. с сотрудниками разработали анализ ПЦР в реальном времени для *F. tularensis*, который был способен отличать тип А от типа В, но не мог отличить подлинии А.І от А.ІІ, а также не мог определить подвид *novicida* [139]. Наконец, Molins-Schneekloth с коллегами смогли разработать мультиплексный анализ ПЦР, который мог отличить подлинии А.І от А.ІІ, но этот анализ не работал в режиме реального времени и не мог дифференцировать тип В или подвиды *novicida* [140]. В работе Gunnell M.K. описан первый мультиплексный ПЦР-анализ в реальном времени для характеристики основных типов *F. tularensis*, встречающихся в США и по всему миру: Тип А.І, Тип А.ІІ, тип В и подвид *novicida* [141].

Основным препятствием для создания ПЦР-анализов для диагностики *Francisella tularensis*, специфичных для подвидов, является то, что их геномы очень схожи между собой. Гены 16S рРНК, которые обычно используются для идентификации микроорганизмов, имеют сходство от 98,5 до 99,9% у всех подвидов, что соответствует различиям от 2 до 23 нуклеотидов [142]. Недавнее исследование еще больше подчеркнуло сходство подвидов *F. tularensis*. Их результаты показали, что попарное выравнивание секвенированных черновых геномов подвидов с низкой и высокой вирулентностью имеют сходство более 95% [143]. Используя регионы различий, исследователи смогли определить геномные регионы, благоприятные для создания ПЦР анализа в реальном

времени, это позволило охарактеризовать основные подвиды бактерии *F. tularensis*, встречающихся в США и по всему миру: Тип А.І, Тип А.ІІ, Тип В и подвид *novicida* [144].

Для дифференциации подвидов в чистых бактериальных культурах *F. tularensis* используются такие методы как AFLP и RFLP основанные на ферментативном распаде ДНК всего генома. AFLP анализ - это метод геномной дактилоскопии, основанный на селективной амплификации подмножества фрагментов ДНК, образующихся при расщеплении ферментами рестрикции. Использование данного метода помогло дифференцировать подвиды *tularensis* и *holarctica*, а также субпопуляции в рамках подвида *holarctica* [145]. Были выявлены различия среди изолятов подвида *holarctica*, которые разделились на американские и европейские штаммы. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с использованием ДНК-зондов подобранные на элементы инсерционной последовательности ISFtu1 или ISFtu2 показал, что данный метод позволяет определить подвиды *F. tularensis*, а также японские штаммы В5 по сравнению с другими штаммами *holarctica* [146]. К недостаткам выше указанных методов относятся трудоемкость, относительно высокая себестоимость, сложная воспроизводимость и необходимость большого количества ДНК бактерий для проведения данных методов.

Метод гель-электрофорез в импульсном поле обеспечивает высоко воспроизводимый профиль рестрикции, который обычно показывает отдельные, хорошо разрешенные фрагменты, представляющие всю бактериальную хромосому в одном геле. PFGE также использовался для разделения подвида *tularensis* на две основные субпопуляции А1 и А2, и дальнейшего разделения на А1а, А1б, А2а и А2б субпопуляции [132, р. 926-934]. Основная субпопуляция подвида *holarctica* японского биовара В5 также выявлена методом PFGE. Дальнейшее разрешение до уровня штамма путем PFGE-типирования в двух подвидах *subsp. tularensis* и *subsp. holarctica* ограничено. Несмотря на полезность PFGE-характеристик, это трудоемкий длительный метод. Кроме того, результаты PFGE подвержены субъективной интерпретации, что затрудняет межлабораторное сравнение [147].

Выше упомянутые методы, такие как AFLP, RFLP и PFGE не выявляют достоверные генетические отличия, при этом являются сложно воспроизводимыми. Высокая генетическая стабильность бактерии *F. tularensis* послужила причиной низкой дискриминационной способности данных методов.

Делеции в геноме бактерии *F. tularensis* полезны для разработки схем типирования, которые были выявлены как с помощью микрочипов, так и с помощью анализа последовательности генома *in silico*. Первый микрочип *F. tularensis* разработан на основе продуктов ПЦР, представляющих геном SCHU S4. Исследования сравнительной гибридизации генома продемонстрировали небольшие различия между популяциями подвидов *F.t. tularensis* и *F.t. holarctica*. Восемь регионов различий (RD - regions of difference), которые различают все подвиды *Francisella subsp. tularensis* от

Francisella subsp. *holarctica*, протестированны на географически разнообразных коллекциях [138, p. 2926; 148]. Эти регионы различия включают специфический для подвида *tularensis* RD6, сегмент острова патогенности *Francisella* (FPI), охватывающий ген *pdpD*, который, как было показано, вовлечен в различия в вирулентности между подвидами *F. tularensis* [52, p. 34], который является усеченным и не функционирующим у подвида *F.t. holarctica*. Кроме того, другие сравнительные геномные исследования показали обширные геномные перестройки включая транслокации и инверсии между подвидами *F.t. tularensis* и *F.t. holarctica* [135, p. 6977; 149].

В свете этих выводов был проведен *in silico* анализ черновой последовательности первого генома *F. tularensis*, который проведен с целью выявления дополнительных прямых повторяющихся последовательностей, способствующие возникновению делеций, а также полезных для типирования. Посредством скрининга более чем 70 предсказанных *in silico* регионов, идентифицированы 17 новых RDs *F. tularensis*, которые используются для типирования и описания эволюционного сценария на основе делеции. Также было замечено, что фланкирующие повторяющиеся последовательности в *F. tularensis* могут передавать не только делецию, но и амплификации генов в некоторых из 45 исследованных штаммов *F. tularensis*. Этот факт следует учитывать при интерпретации результатов типирования, чтобы избежать неверных выводов относительно родства штаммов [133, p. 3905]. Более современная схема, основанная на делеции, нацелена только на небольшие события делеции не фланкированные повторяющимися последовательностями, чтобы избежать использования генетических маркеров для типирования с любым потенциалом обратной мутации, опосредованной повторно-опосредованной амплификации. Это типирование на основе делеции выявляет подвиды, а также основные субпопуляции *F. tularensis* subsp. *tularensis* (A1 и A2) и *F. tularensis* subsp. *holarctica* (обнаружение B5, B2 и B4 против субпопуляций B1/B3).

В качестве побочного продукта анализа на основе делеций выявлены два региона различия, которые специфически различаются между живым вакцинным штаммом (LVS), аттенуированным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica*, происходящим из России и другими штаммами *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Аттенуация LVS была первоначально достигнута после пассажа природного изолята на синтетической среде. Два региона различия, вероятно, возникли во время этого повторного пассажа, которые стали причиной ослабления. Повторное введение этих двух удаленных локусов в LVS восстанавливает вирулентность дикого типа [150].

Регионы различий выбраны для разработки специфических ПЦР-анализов для идентификации подвидов или субпопуляций *F. tularensis*. ПЦР-анализ в реальном времени, специфичный для *F. tularensis* subsp. *holarctica* разработан на основе уникальной делеции 30 п.н. [151]. Ген *pdpD*, присутствующий у подвида *F. tularensis* subsp. *tularensis* и удаленный у *F. tularensis* subsp. *holarctica*, был направлен для идентификации подвида *tularensis*. Делеция

размером 1,59 кб, названная RD23, была использована для разработки ПЦР анализа для дифференциации штаммов типа Б из Центральной и Западной Европы [152]. ПЦР-анализы, специфичные для двух основных субпопуляций типа А-А1 и А2, также были разработаны на основе идентификации регионов различия с помощью субтрактивной гибридизации [153].

Одним из наиболее широко используемых методов внутривидовой субтипизации бактериальных штаммов *F. tularensis* является мультилокусный анализ переменных тандемных повторов (MLVA, Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) с использованием 25 переменных локусов, предложенных А. Johansson с соавторами в 2004 году. Анализ 192 изолятов бактерии туляремии выявил существование 20 генотипов и позволил дифференцировать подвиды и группы *F. tularensis*, как и отдельные генотипы внутри подвида. MLVA анализ показал наличие двух генетически различных групп подвида *tularensis* и пяти генетически различных групп среди изолятов подвида *holarctica*. Отдельная группа в подвиде *holarctica* сформирована изолятами, выделенными в Японии. В исследовании проведенном А. Johansson, в основном использовались штаммы туляремии, выделенные на территории Европы и Северной Америки. Принцип метода основан на ПЦР амплификации VNTR локусов, с помощью фланкирующих праймеров, с последующим определением размеров амплифицированных фрагментов в агарозном или полиакриламидном геле или при капиллярном разделении. Различия в размере ампликонов в отдельных локусах, как предполагается, вызваны вариациями в количестве копий повторов в данном локусе. Максимальная панель MLVA локусов для типирования *F. tularensis* состоит из 25 VNTR-локусов, которые обеспечивают высокий уровень дискриминационной способности среди мировых изолятов *F. tularensis*. Однако эта система MLVA не очень хорошо подходит для рутинного лабораторного анализа, так как она требует, чтобы все 25 локусов были анализированы, что значительно увеличивает время и стоимость анализа. Кроме того, некоторые из локусов не отличаются особым разнообразием, при котором дискриминируют только подвиды, но не линии внутри подвида [134, p. 5812].

Vogler A.J. с коллегами усовершенствовали эту систему MLVA, переработав 25 ранее идентифицированных VNTR локусов и сформировали новую оптимизированную, мультиплексную систему MLVA. Данный метод обеспечивает сохранение высокой дискриминационной способности, но при меньших затратах времени и средств, что делает ее гораздо более подходящей системой для рутинного лабораторного субтипирования *F. tularensis*. Авторы выбрали 10 локусов наиболее высокой дискриминационной способности внутри подвида, отобранные локусы включали VNTR маркеры Ft-M02, Ft-M03, Ft-M04, Ft-M05, Ft-M06, Ft-M10, Ft-M20, Ft-M22, Ft-M23 и Ft-M24. Локус Ft-M20 был разделен на два локуса, Ft-M20A и Ft-M20B, для того чтобы учесть VNTR-содержащую вставку длиной около 200 п.н., присутствующую в изолятах типа А.П и *F. tularensis* subspecies *novicida*, которая затрудняла подсчет оригинального локуса Ft-M20. Локус Ft-M20A содержит

первоначально описанный повтор длиной 12 п.н., который позволяет дифференцировать подвиды. В то время как локус Ft-M20B содержит инсерцию с повтором 15 п.н. Ft-M20B разнообразен только среди типа А.П и изолятов *F. tularensis* подвида *novicida*, давая мономорфный продукт длиной 153 п.н. в других подвидах *F. tularensis*. MLVA-11 обеспечивает дискриминационную способность, очень схожую с таковой у оригинальных 25 VNTR-маркеров, но при значительно меньших затратах времени и средств за счет уменьшения количества маркеров и мультиплексирования. Это делает данный метод идеальным для приложений, требующих высокого уровня дискриминации штаммов, таких как молекулярные эпизоотологические или судебно-медицинские исследования. В частности, количество необходимых ПЦР сократилась в 5 раз, а количество электрофоретических прогонов сократилось в 8 раз [154].

Прогресс наших знаний в эпидемиологии и эпизоотологии туляремии достигнуты за счет развития методов генотипирования. Несмотря на быстрое накопление знаний, филогеография возбудителя все еще плохо изучена, и дискуссии о географическом и временном происхождении продолжаются. Одной из важных причин является плохая характеристика возбудителя во многих странах, эндемичных по туляремии. Учитывая клональный характер патогена [155], только молекулярные методы с высокой дискриминационной способностью позволяют различать близкородственные субпопуляции на уровне штамма. Генотипирование штаммов *F. tularensis* в настоящее время в основном основано на идентификации «канонических» единичных нуклеотидных полиморфизмов (canSNP) в пределах всего генома, в результате которого значительно снижаются затраты на секвенирование. Данный метод может быть использован для исследования глубоких филогенетических взаимоотношений, позволяющий проводить дискриминацию бактериальных штаммов [156]. Описаны четыре основные клады для бактерии *Francisella tularensis*: В.4, В.6, В.12 и В.16 [154, р. 2478]. Клада В.4 описана в основном в Северной Америке, но также изолирована в Норвегии, Швеции и Германии [157]. В Европе большинство штаммов принадлежат к базальным кладам В.6 и В.12. Клада В.6 встречается в Западной Европе и Северной Америке, тогда как клада В.12 была выделена в основном в Восточной Европе, и объединяет штаммы, устойчивые к эритромицину. В Германии, Швейцарии, Швеции, Норвегии и Финляндии обнаружены обе эти основные клады [158-160]. Клада В.16 коррелирует с биоваром *japonica*, выделенным в Японии и недавно в Турции [161], Китае и Австралии.

Высокой дискриминационной способностью на видовом и биоварном уровнях обладает метод мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), при котором фрагменты генов, амплифицируются и секвенируются. Обычно анализируется около 7 генов как правило «домашнего хозяйства», нуклеотидные полиморфизмы формируют генотип. Каждому полиморфному нуклеотиду присваивается цифровой аллель, все аллели штамма определяют аллельный профиль или тип последовательности (ST). Таким образом, каждый

изолят характеризуется серией целых чисел, которые соответствуют аллелям в локусах, и дискриминационная способность может быть изменена путем выбора различного количества локусов. Создано несколько публичных баз данных для обмена данными MLST, например, pubmlst.org и mlst.net. Показано, что MLST с использованием семи генов домашнего хозяйства *F. tularensis* позволяет различать подвиды, но не разделять отдельные изоляты [162]. Анализ однонаправленных делеции и MLST типирование позволили предположить филогению, в которой *F. novicida* разветвляется раньше всех, а самым молодым подвидом является *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Японская ветвь *F. tularensis* subsp. *holarctica* дивергировала раньше, чем другие изоляты подвида *holarctica*.

Используя новую недорогую технологию секвенирования для обнаружения SNP, можно использовать огромные объемы данных для характеристики изолятов и его отношения с другими. Полногеномное типирование последовательности является мощным инструментом для генотипирования и молекулярно-эпидемиологического анализа [163-165]. Тем не менее, метод достаточно дорогой для рутинной эпидемиологии и требует знаний биоинформатического анализа. Чтобы воспользоваться новой низкочастотной технологией секвенирования, информация о последовательности должна быть представлена и проанализирована таким образом, чтобы специалисты могли легко интерпретировать полученные результаты.

Исследование высокопатогенных штаммов необходимо для определения биологических свойств, выявления генетических особенностей, схожесть генотипов с известными вариантами для обоснования эпидемиологических и эпизоотических данных, получения представления о генетических взаимоотношениях штаммов с установлением их места в глобальной популяции.

Полногеномное секвенирование необходимо для выяснения структуры генома и филогенетического и эволюционного контекста бактерий. Анализ бактерий с очень консервативной структурой генома, таких как *F. tularensis*, требует надежных данных о последовательности.

Для изучения геномов можно использовать технологии секвенирования с коротким и длинным прочтением. Однако реконструкция сборки генома сложна, особенно когда речь идет о дупликации генетического элемента, как в *F. tularensis*. Для штамма *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 имеется эталонный геном, секвенированный по методу Сэнгера, и результаты сборки можно оценить и сравнить путем прямого картирования [166].

В настоящее время полногеномное секвенирование (WGS) бактериальных штаммов является самым дискриминационным методом генотипирования, однако все еще высокая стоимость самого секвенирования не позволяет использовать WGS в качестве основного метода генотипирования, особенно в развивающихся странах. Полногеномное секвенирование позволяет с высоким разрешением характеризовать бактериальные патогены с точки зрения таких

свойств, как устойчивость к антибиотикам, молекулярная эпизоотология и вирулентность.

В текущем переходном периоде высоко дискриминационные и дешевые методы генотипирования на основе ДНК могут быть использованы в качестве первичного метода отбора штаммов для проведения WGS, особенно в высокоэндемичных регионах, и в качестве недорогого метода для анализа контроля качества коллекций штаммов [167]. Доступность постоянно растущих геномных данных, позволяет более рационально проектировать и лучше выбирать праймеры для ПЦР и маркеров типирования на основе оценки ранее опубликованных генетических маркеров, что позволит еще больше сократить лабораторные затраты и время на разработку следующего поколения методов молекулярной дифференциации бактерий. Полногеномное секвенирование (WGS), несмотря на высокую информативность, все же должно использоваться в качестве вспомогательного, а не решающего метода эпидемиологического и эпизоотического расследования в отношении вспышек связанных с *F. tularensis* [168]. Данный метод WGS также использовался для генотипирования 18 штаммов *F. tularensis*, выделенных от 180 пациентов во время вспышки туляремии в Норвегии, при этом они были отнесены к кладу В.6 (субкладу В.7), кладу В.12 и кладу В.4 subsp. *holarctica* [159, p. 10]. WGS показывает, что менее вирулентные штаммы А.ІІ обладают большей геномной пластичностью, чем штаммы А.І, что может быть источником их различий в вирулентности и приспособленности [169]. Усовершенствованная версия мультилокусной системы типирования последовательностей под названием MLST+ основанная на WGS 15 штаммов *F. holarctica* и подхода "ген за геном" разработана и опробована для исследования летальной эпидемии туляремии среди нечеловеческих приматов. MLST+-результаты хорошо совпадали с результатами, полученными с помощью современных стандартных методов canSNP или MLVA, которые также показали два и три различных паттерна. Также был проанализирован эпидемиологически неродственный изолят, который до сих пор был неотличим от кластера, обнаруженного в Сенникероде. В отличие от иерархического подхода к типированию по SNP и MLVA, MLST+ смог определить отдельный генотип для этого штамма. Это говорит о том, что MLST+ может превосходить существующий стандартный метод, даже если для проведения биоинформационного анализа были выбраны настройки по умолчанию. Этот алгоритм позволяет немедленно классифицировать новый изолят и сравнить его со штаммами в базах данных [170].

1.5 Влияние природно-климатических, географических и социально-экономических факторов на проявление и распространение данных инфекций на территории республики

Благоприятствующие для укоренения возбудителя туляремии *Francisella tularensis* климатические условия способствуют широкому распространению данного заболевания в Казахстане. Степень распределения возбудителя туляремии на территории Казахстана различна, это связано с наличием

уникальной совокупности природных комплексов степей, пустынь, гор, крупных водоемов с впадающими в них реками и обширными дельтами, характеризуется большим разнообразием экосистем и соответствующих им типов растительности. Очаги туляремии в основном располагаются в поймах рек, берегах озер и других водоемах, которые имеют огромную ценность для проживания людей, промышленного и сельскохозяйственного освоения данных территорий. Мегалополисы нашей страны, города Астана и Алматы, расположены на природно-очаговой территории. Животный мир урбанизированных территорий, сезонная миграция мелких мышевидных грызунов дает основу для образования синантропных очагов туляремии. Подъем социального и экономического развития нашей страны вызвал изменение природных ландшафтов, рост городов, при котором значительно увеличилась площадь урбанизированных территорий, расположенных в природных очагах туляремии. В минувшие годы значительное влияние на эпизоотическую активность природных очагов туляремии имели изменения уровня двух крупных морей: Аральского и Каспийского. Наибольшие изменения концентрируются на границах ареала обитания основных носителей, опустынивание приводит к изменению пищевой базы, падению численности и даже полному вымиранию основных носителей и ликвидации очага (южные районы Уральского пойменного очага, Прикаспийское побережье, Сырдарьинский тугайный очаг туляремии). Для всех крупных водоемов характерны периоды трансгрессий и регрессий, сопровождающихся полной перестройкой состава и структуры сообществ акватории и побережья. Начиная с 2000 г., за 10 лет на 2 м повысился уровень Каспийского моря, в настоящее время он установился на относительно стабильной отметке, идет зарастание обширных мелководий тростником и т.п. Все эти изменения повлияли на активность очагов в Прикаспии [61, с. 88].

Большое влияние на природные очаги туляремии имеет не только естественное изменение климата, но и хозяйственная деятельность человека. Поливное земледелие, проведение искусственных каналов способствуют расселению основных носителей и увеличению территорий природных очагов туляремии. Существует ряд факторов приводящие к снижению эпизоотической и эпидемической активности очагов туляремии. Это – осушение болотистых территорий, проведение агротехнических мероприятий (глубокая вспашка земель, уничтожение огрехов, тщательная и своевременная механизированная уборка урожая без потерь колосьев и зерна), в том числе ликвидация кочек и кустарников, которые являются убежищами для полевок во время весеннего паводка, а осенью и зимой – места укрытия некоторых видов пастбищных клещей.

Организация Урало-Кушумской ирригационной системы лиманного орошения с четырьмя водохранилищами (Кировское, Битикское, Дунгулюкское и Пятимарское) и семью магистральными каналами (Кировский, Первомайский, Бударинский, Фурмановский, Тайпакский, Каракудукский и Борельский) привело к значительному расширению очагов пойменно-болотного

типа Западно-Казахстанской области, повышению уровня грунтовых вод в различных депрессиях, к зарастанию их сообществами погруженно-водных макрофитов. Возникли новые места, благоприятные для обитания пойменных мелких млекопитающих и эктопаразитов. Усиленная ирригация Волго-Уральского междуречья способствовала формированию очагов туляремии в ЗКО, микроочаги которых привязаны главным образом к поймам пустынных рек, лиманам различного происхождения, а также каналам и зонам фильтрации. Одновременно строительство гидротехнических систем значительно уменьшило сток реки Урал и повлекло к качественным изменениям в структуре ландшафтов и биоценологических комплексов мелких млекопитающих и их эктопаразитов в южных районах очага.

В 70-х годах прошлого столетия образовался искусственный очаг туляремии в результате строительства 500-километрового канала от поймы р. Иртыш до г. Караганды, вдоль которого расселилась водяная полевка.

Значительным изменениям подверглись тугайные очаги туляремии. С 1960-х гг. происходило усыхание Аральского моря, за это время в Большом Арале соленость воды увеличилась до 75%, которая отразилась на флоре данной территории, из ранее встречавшихся 25 видов водной растительности осталось лишь два: взморник малый (*Zostera notlii*) и зеленая нитчатая водоросль (*Cladofora rupestris*) [171]. Флора водоемов дельты Сырдарьи к началу 21 века стала очень бедна и насчитывала лишь 12 видов высших растений, относящихся к семействам *Typhaceae*, *Potamo-getonaceae*, *Zosteraceae*, *Zannicheliaceae*, *Najadaceae*, *Cyperaceae*. В связи с деградацией Аральского моря тугайные очаги туляремии находятся в глубокой депрессии, их эпизоотологическое обследование в течение длительного времени не выявляет эпизоотической активности. В связи с освоением дельты р. Или, уменьшилась численность зайцев-песчаников, при этом снизилась эпизоотическая активность данного типа очага.

В настоящее время отмечается увеличение эпизоотической активности природных очагов в Восточно-Казахстанской, Западно-Казахстанской, Жамбылской, Павлодарской, Актюбинской и Алматинской областях. Значительный рост заболеваемости туляремией обусловлен активизацией эпизоотической обстановки в Алтайском предгорно-ручьевом очаге. С начала 2000 годов заболевания в основном были связаны с употреблением воды и продуктов питания, инфицированных мелкими мышевидными грызунами, заселившими жилье. Изредка заражение происходило при разделке туш больных зайцев и укусе клещей.

Активность природных очагов туляремии в различных областях Казахстана по степени риска заражения и неблагоприятности неоднородна. Отмечена высокая активность природных очагов в Восточно-Казахстанской, Акмолинской, Западно-Казахстанской, Актюбинской, Северо-Казахстанской и Павлодарской областях. Природные очаги туляремии Костанайской, Жамбылской и Карагандинской областей в настоящее время малоактивны. В остальных областях эпизоотии туляремии не регистрируются.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследований

В данной диссертационной работе материалом исследований служат образцы ДНК, выделенные из коллекционных штаммов *Francisella tularensis* РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева» (ННЦООИ).

Место проведения исследований. Научно-исследовательская работа выполнялась на базе лаборатории прикладной генетики РГП «Национальный центр биотехнологии», РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева», кафедры «Ветеринарной медицины» НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет им. С. Сейфуллина».

2.2 Методы исследований

В научной работе использовались микробиологические, генетические и биоинформатические методы исследований.

В рамках заключенного договора все работы, связанные с посевом на селективные питательные среды коллекционных штаммов *Francisella tularensis* проводились на базе РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева» (ННЦООИ). Сотрудники центра имеют большой опыт реализации международных проектов, направленных на изучение фенотипических и молекулярно-генетических особенностей возбудителей сибирской язвы и туляремии, а также на проведение эпидемиологических и эпизоотологических исследований в очагах данных заболеваний. Уровень биологической безопасности ННЦООИ позволяет проводить заявленные исследования. Лаборатории ННЦООИ имеют все необходимые разрешения на работу с возбудителями 1 и 2 групп патогенности.

В работе использовано 148 штаммов *F. tularensis*, депонированных в «Республиканской коллекции микроорганизмов и хранилища возбудителей особо опасных инфекций» ННЦООИ. Штаммы были изолированы во время планового мониторинга или в периоды эпизоотологических вспышек. Работа с культурами возбудителей туляремии проводилась в соответствии с действующими нормативно-методическими документами по организации и проведения лабораторной диагностики туляремии в Казахстане.

2.2.1 Выделение ДНК

Лиофилизированные штаммы высевали на прозрачную агаровую питательную среду с витаминами и минеральными добавками («ФТ-агар», Оболенск, Россия) и культивировали в течение 48 часов при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$. Бактериальную суспензию готовили и инактивировали добавлением мертиолата натрия до конечной концентрации 0,01%, нагревали в течение 30 минут при температуре 56°C . ДНК выделяли из инактивированной суспензии с помощью QIAamp DNA Mini Kit согласно инструкции производителя (Qiagen,

Германия).

2.2.2 Количественное и качественное определение концентрации ДНК

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop1000. Метод основан на существовании у ДНК и РНК максимума поглощения при длине волны 260 нм. Это означает, что в растворах нуклеиновых кислот максимальная фотометрическая абсорбция наблюдается при 260 нм и она прямо коррелирует с концентрацией ДНК или РНК.

Образцы ДНК для полногеномного секвенирования измерялись флуориметрическим методом, используя набор Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) на приборе Qubit 2.0 Fluorometer. Метод флуориметрического измерения характеризуется большей точностью в сравнении со спектрофотометрическим методом.

2.2.3 Подтверждение чистоты ДНК методом анализа нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена

Аmplification фрагмента *16S rRNA* гена. Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами [172] 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R-5' ggACTACCAgggTATCTAAT в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 25 нг. ДНК, 1Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 5 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 55°C- 40 секунд, 72°C – 50 секунд; заключительная элонгация 10 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) [173].

Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Нуклеотидные последовательности, полученные с применением прямого и обратного праймеров были проанализированы и объединены в общую последовательность, используя программное обеспечение SeqScape v2.6.0 (Applied Biosystems). Полученные нуклеотидные последовательности *16S rRNA* гена были идентифицированы относительно доступных нуклеотидных последовательностей, депонированных в базах данных GeneBank (www.ncbi.nih.gov), используя алгоритм BLAST [174]. Идентификация была осуществлена относительно инвентарных номеров GeneBank первых трех нуклеотидных последовательностей, имеющих максимальное совпадение.

2.2.4 Идентификация подвидов *F. tularensis*

Для идентификации подвидов *F. tularensis* использовались праймеры RD1/F и RD1/R, амплифицирующие "область дифференциации 1" (таблица 1), при этом получают различные размеры ПЦР продуктов у разных подвидов: *F. tularensis* subsp. *tularensis* - 1522 п.н., *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* - 1453 п.н., *F. tularensis* subsp. *holarctica* - 924 п.н., *F. tularensis* subsp. *novocida* - 3322 п.н. [138, p. 2926].

Таблица 1 – Праймеры для подвидовой дифференциации *Francisella tularensis*

Наименование праймеров	Последовательность праймеров 5'-3'
RD1- Forward	5'-TTTATATAGGTAAATGTTTTACCTGTACCA-3'
RD1-Reverse	5'-GCCGAGTTTGATGCTGAAAA-3'

Состав реакционной смеси для ПЦР включал в себя: 1×Platinum II ПЦР буфер, 0,2 мМ дНТФ, 1 мкл прямого и обратного праймера, 1 Единица Platinum II *Taq* Hot-Start ДНК полимеразы, 3 мкл ДНК. Программа ПЦР амплификации включала: длительную денатурацию 94°C - 5 минуты; 30 циклов: 94°C - 30 секунд, 60°C - 1 минута, 68°C - 3 минуты 30 секунд, финальная элонгация 5 минут при 68°C.

2.2.5 Электрофоретический анализ продуктов амплификации

Анализ амплифицированных целевых фрагментов ДНК проводили методом разделения фрагментов ДНК в 2% агарозном геле, в присутствии интеркалирующего агента – бромистого этидия, который был использован с целью дальнейшей визуализации ДНК. Электрофорез проводили в камере горизонтального электрофореза PowerPac, используя источник тока BioRad Electrophoreticbath. В качестве электродного буфера использовали 1x TAE-буфер. Документирование полученных результатов проводили, используя систему документаций гелей Gel Doc (Bio-Rad), с программным обеспечением Quantity One (Bio-Rad). Анализируемые образцы ДНК, определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности в геле.

2.2.6 MLVA типирование штаммов *Francisella tularensis*

MLVA типирование проводили по протоколу предложенному Vogler A.J. [154, p. 2477] соавторами с оптимизациями, которые связаны с отличиями используемого оборудования и реагентов. В качестве основных изменяемых компонентов был состав реакционной смеси: концентрация ионов магния и присадки повышающие специфичность и эффективность ПЦР реакции. MLVA типирование было проведено по 11 локусам. Локусы были амплифицированы с использованием 4 пар праймеров, последовательность которых и комбинация приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры для MLVA типирования *Francisella tularensis*

Комбинация праймеров	Наименование	Последовательность праймера	Финальная концентрация в растворе в ПЦР смеси, мкМ
Муль типлекс 1А	Ft-M22-2F	6FAM*- gtggaaatgcaaaaacaatatcgaggaacttta	0,075
	Ft-M22-2R	Gtttttctcgtccgctgtagtgatttacatc	0,075
	Ft-M23-2F	VIC*- gctggattattaagcatatgacagacgagtagg	0,12
	Ft-M23-2R	Gttccctcaggtttatccaagtttaaatgttttatt	0,12
	Ft-M24-2F	VIC*- gaatcttaatccatacggctctaataatattcctgcaat	0,6
	Ft-M24-2R	Gttggacttatgggctatagcggatattttcagt	0,6
Муль типлекс 1Б	<i>Ft-M03-2F</i>	<i>PET*-gcacgctgtctcctatcatcctctgtagtc</i>	<i>0,2</i>
	<i>Ft-M03-2R</i>	<i>Gaacacaacaagcaacagcaaaattcacaaaa</i>	<i>0,2</i>
Муль типлекс 2	Ft-M20-2AF	6FAM*- gtatatcttggaaataagccggagtagatggttct	0,1
	Ft-M20-2AFcold	gtatatcttggaaataagccggagtagatggttct	0,1
	Ft-M20-2AR	Gcaataactttatcacccttattgtagactgcttctgc	0,2
	Ft-M10-2F	PET*-gctaatttttcatatttatctccattttactttttgc	0,15
	Ft-M10-2R	Gctcagctcgaactccgtcataccttcttc	0,15
	Ft-M05-2F	VIC*- gtttgtagccaataaacaanaaagtgtaaataatg	0,4
	Ft-M05-2R	Gctcagctcgaactccgtcataccttcttc	0,4
Муль типлекс 3А	<i>Ft-M04-2F</i>	<i>6FAM*- gcgcgctatctaactaatttttatattgaacaat Caaat</i>	<i>0,3</i>
	<i>Ft-M04-2R</i>	<i>Gcaaatataaccgtaatgccacctatgaaaactc</i>	<i>0,3</i>
	<i>Ft-M20-2BF</i>	<i>PET*- gggtgataaagttattgtaatggtgtgacttatgaa</i>	<i>0,2</i>
	<i>Ft-M20-2BR</i>	<i>Gtaactacttgaccgccagtatatgcttgacct</i>	<i>0,2</i>
	<i>Ft-M06-2F</i>	<i>VIC*-gttttggtagaactgccaacaccataactt</i>	<i>0,4</i>
	<i>Ft-M06-2R</i>	<i>Gcaattcagcgaaaccttatcttagcctc</i>	<i>0,4</i>
Муль типлекс 3Б	Ft-M02-2F	6FAM*-gctgctgtggctgtaaatgttgctatgct	0,2
	Ft-M02-2R	Gcagggcacaattcttgaccatcagg	0,2

* – Флуоресцентный краситель

Реакционная смесь готовится в объеме 20 мкл и включает в себя: однократную смесь праймеров, 75 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Твин 20, 2,5 мМ MgCl₂, дезоксинуклеотидтрифосфаты в концентрации 200 нМ каждого, 5% ДМСО, 2 единицы смеси Taq и Pfu полимеразы в соотношении 19:1, 10 нг ДНК. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 3 минут; 35 циклов 95°C – 30 секунд, 58°C – 30 секунд, 72°C – 1,20 минуты; финальная элонгация 20

минут при 72°C.

С целью избегания образования праймеров димеров и неспецифического отжига необходимо реакционные смеси выдерживать на льду и ставить в уже прогретый ПЦР амплификатор. Для этого заблаговременно программируется и запускается амплификатор. Когда температура в ячейке амплификатора достигает 95°C, программа ПЦР циклирования ставится на паузу, а образцы помещаются в ячейки амплификатора.

После проведения амплификации каждую реакционную смесь разводили в 70 раз и 1.5 мкл использовали для электрофоретического разделения. Электрофоретическое разделение проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI3730xl (Applied Biosystems, Tokyo, Japan), с POP 7 и размерным стандартом LIZ 1200. Анализ размеров VNTR повторов проводили с использованием программного обеспечения GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems).

2.2.7 Полногеномное секвенирование, определение однонуклеотидного полиморфизма (SNP) и назначение canSN

Библиотеки для полногеномного секвенирования получали с использованием набора для подготовки ДНК библиотек Nextera® XT DNA Library Preparation Kit (Catalog # FC-131-1024) (Illumina, USA), в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование проводилось на платформе MiSeq (Illumina, USA) с использованием химических реагентов MiSeq Reagent Kit v3, 600 Cycles PE (Catalog # MS-102-3003) (Illumina, USA).

SNP определены путем сопоставления необработанных считываний секвенирования с эталонным геномом с использованием BioNumerics версии 7.6.3 (Applied-Maths, Laethem-Saint-Martin, Бельгия) с параметрами по умолчанию, как описано ранее, за исключением случаев сопоставления данных последовательности Ion Torrent PGM, для которых параметр «позволяет выравнивание с зазором». Общедоступные сборки и необработанные чтения были загружены через EBI-ENA (последняя загрузка - 25 августа 2020 года). Сборки были разделены на искусственные чтения длиной 50 п.н. с 10-кратным покрытием и без модели ошибок. Эти искусственные считывания затем были сопоставлены с эталонным геномом для вызова SNP, как это делается с необработанными считываниями секвенирования. BioNumerics использовался с параметрами по умолчанию (без повторной выборки) для анализа максимальной экономии и построения дендрограммы.

Наборы данных необработанных чтений были собраны с использованием SPAdes [175] версии 3.13.1 и SKESA [176] версии 2.3.0. Назначение canSNP каждого штамма было выведено из геномныхборок с использованием CanSNPer2 (<https://github.com/FOI-Bioinformatics/CanSNPer2>) [177] и доступной схемы canSNPer2 *F. tularensis* [160, p. 4; 178, 179].

2.2.8 Биоинформатический анализ результатов полногеномного секвенирования

Оценка качества сырых данных полногеномного секвенирования проводилась с помощью FastQC v0.11.15 [180], качественный отбор последовательностей производился с помощью MultiQC v3 [181] программ. Доступ к необработанным чтениям можно получить из Европейского архива нуклеотидов под изучаемым доступом PRJNA639508 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJNA639508>; запустите доступ SRR13617503-SRR13617541). Построение минимального остовного дерева (MST) проводилось с использованием коммерческого программного обеспечения BioNumerics v8.0 (Applied Maths, Belgium) [182]. Кластерный анализ был проведен методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Для визуального представления распределения генотипов штаммов *F. tularensis* карта построена с использованием программного обеспечения QGIS версии 3.10.0.

2.2.9 *In silico* MLVA на сборках генома и на считывании необработанных последовательностей

In silico MLVA запускался на сборках генома путем применения сценария MLVA_finder.py с настройками по умолчанию (https://github.com/i2bc/MLVA_finder) и праймеров.

Поскольку размер полиморфных массивов VNTR меньше, чем произведенные здесь чтения 300 бит/с, мы также набрали необработанные данные чтения. Простой скрипт на основе bbduk (BBTools, <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) был разработан для идентификации чтений, содержащих VNTR и обе фланкирующие последовательности (<https://github.com/Vladislav-Shevtsov/search-primers-in-reads/>).

Подбирали праймеры, которые располагались как можно ближе к локусам VNTR (таблица 3).

Таблица 3 – Праймеры *in-silico* MLVA7

Название*	Прямой праймер	Обратный праймер
Ft-M3_9bp_248bp_25u	ttcacaaaataacaacaaga	gctcttgctgatcctatta
Ft-M4_5bp_85bp_3u	cttgattatttcttaaagttttattcatg	gcaaatataccgtaatgccacctatga
Ft-M6_21bp_140bp_4u	gtgaactgccaacaccataacttatatta	tagtgaacagtttagatgtattata
Ft-M20_12bp_90bp_3u	agcataacttttgagacaattggtgcag	ccagttaccggtgatccagcatt
Ft-M22_6bp_73bp_2u	ctgctatatttagacaaagtga	tctgaaagtgctgtgttgat
insilico-FT-4_6bp_97bp_2u	atagtttagtcgttattcaatga	gagcatcaattaatcaactaata
insilico-FT-8_4bp_152bp_3u	aatagttccagaagttacaaagc	aatatgtgggattatctgtt
* – указанное имя локуса включает размер повторяющейся единицы, размер продукта ПЦР <i>in silico</i> в эталонном геноме SCHU_S4 (номер доступа GCA_000008985) при использовании указанных праймеров и соответствующее соглашение о кодировании числа повторений		

При выборе праймеров для детекции *in silico* вместо *in vitro* внимание уделялось только уникальности и образованию только целевого фрагмента. Сценарий объединяет все чтения, содержащие интересующий локус VNTR, в один файл multifasta, к которому впоследствии может быть применен сценарий MLVA_finder.py.

Выявление дополнительных локусов VNTR

Поиск дополнительных маркеров VNTR выполнен с использованием Tandem Repeats Finder, версия 4.07b [183] и программы поиска микросателлитных повторов (http://insilico.ehu.es/mini_tools/microsatellites/). Тандемные повторы искали у *F. tularensis subsp. tularensis* SCHU S4 подстр. NR-28534 (сборочный образец GCA_000628925.1) и *F. tularensis subsp. holarctica* FTNF002-00 (сборочный номер GCF_000017785.1). Новые локусы VNTR, показывающие два аллеля или больше среди двенадцати геномов *F. tularensis subsp. holarctica* (NZ_CP010289, NC_019551, NC_017463, NZ_CP010288 и NC_009749), *F. tularensis subsp. mediasiatica* (NC_010677), *F. novicida* (NC_008601), *F. tularensis subsp. tularensis* (NC_006570, NC_016933, NZ_CP009753, NZ_CP012037 и NC_009257) были дополнительно исследованы *in silico* на 276 сборках *F. tularensis*, депонированных в EBI-ENA. Индекс Хантера-Гастона (HGDI) был использован для оценки генетического разнообразия каждого локуса, а также панелей MLVA-25, MLVA-11 [184]. Вычисления проводили с использованием интернет ресурса (http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Создание коллекций образцов ДНК штаммов *Francisella tularensis* пригодных для генотипирования методом MLVA и полногеномного секвенирования

В работе были использованы 148 штаммов *Francisella tularensis*, депонированные в РГП на ПХВ «ННЦОИ имени Масгута Айкимбаева». Штаммы были выделены из 8 областей Казахстана (рисунок 2). Наибольшее количество штаммов взяты из Западно-Казахстанской (62 шт.), Актюбинской (35 шт.) и Павлодарской областей (22 шт.).

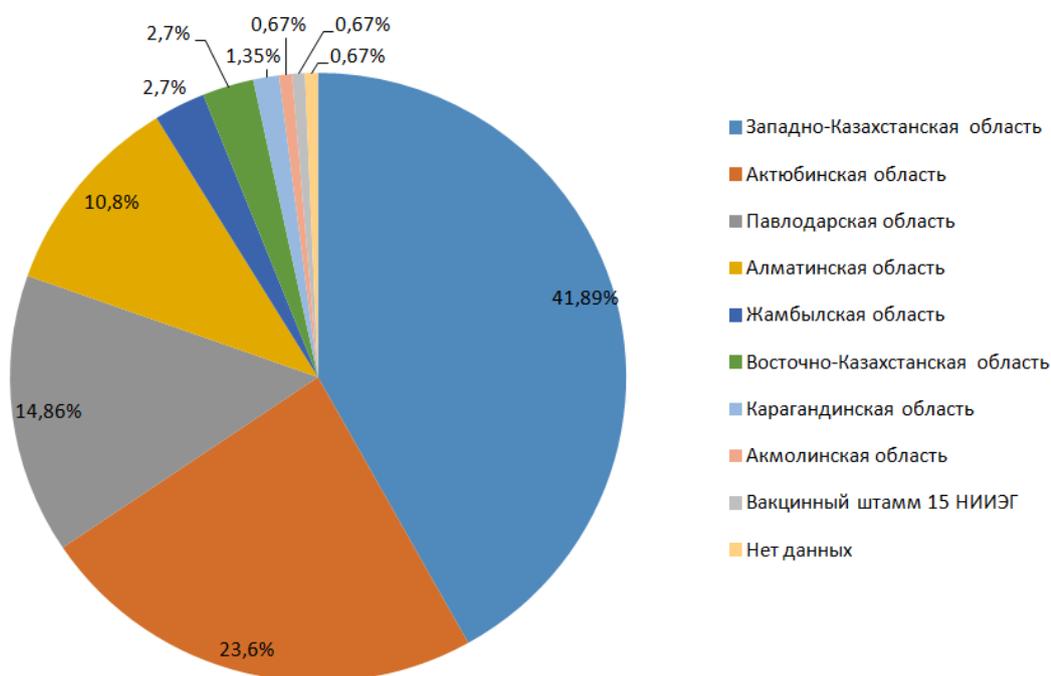


Рисунок 2 – Географическое распределение изоляции штаммов *F. tularensis*

Выборка штаммов представлена двумя подвидами *F. tularensis*, зарегистрированными в Казахстане: *holartica* и *mediasiatica*. Штаммы выделены из разных объектов, включая резервуары (водоемы), переносчиков и окончательных хозяев в период с 1951 по 2018 годы (таблица 4).

Таблица 4 – Объекты выделения штаммов *F. tularensis*

Объект (источник) выделения	Количество штаммов
1	2
Большой суслик (лат. <i>Spermophilus major</i>)	1
Клещ <i>Haemaphysalis concinna</i>	8
Домовая мышь (лат. <i>Mus musculus</i>)	18
Клещ <i>Dermacentor marginatus</i>	51
Клещ <i>Dermacentor daghestanicus</i>	3

Продолжение таблицы 4

1	2
Клещ семейства <i>Ixodidae</i>	28
Клещ рода <i>Dermacentor</i>	4
Большой тушканчик (лат. <i>Allactaga major</i>)	1
Лесная мышь (лат. <i>Apodemus uralensis</i>)	2
Водяная крыса (лат. <i>Arvicola amphibius</i>)	2
Каменка-плясунья (лат. <i>Oenanthe isabellina</i>)	1
Малый суслик (лат. <i>Spermophilus pygmaeus</i>)	2
Ласка (лат. <i>Mustela nivalis</i>)	2
Тамарисковая песчанка (лат. <i>Meriones tamariscinus</i>)	3
Обыкновенная полёвка (лат. <i>Microtus arvalis</i>)	2
Серый хомячок (лат. <i>Cricetulus migratorius</i>)	1
Клещ <i>Dermacentor reticulos</i>	1
Клещ <i>Haemaphysalis punctata</i>	1
Полуденная песчанка (лат. <i>Meriones meridianus</i>)	3
Клещ <i>Dermacenter pictus</i>	2
Малая белозубка (лат. <i>Crocidura suaveolens</i>)	2
Вакцинный штамм 15 НИИЭГ	1
Вода	2
Нет данных	7

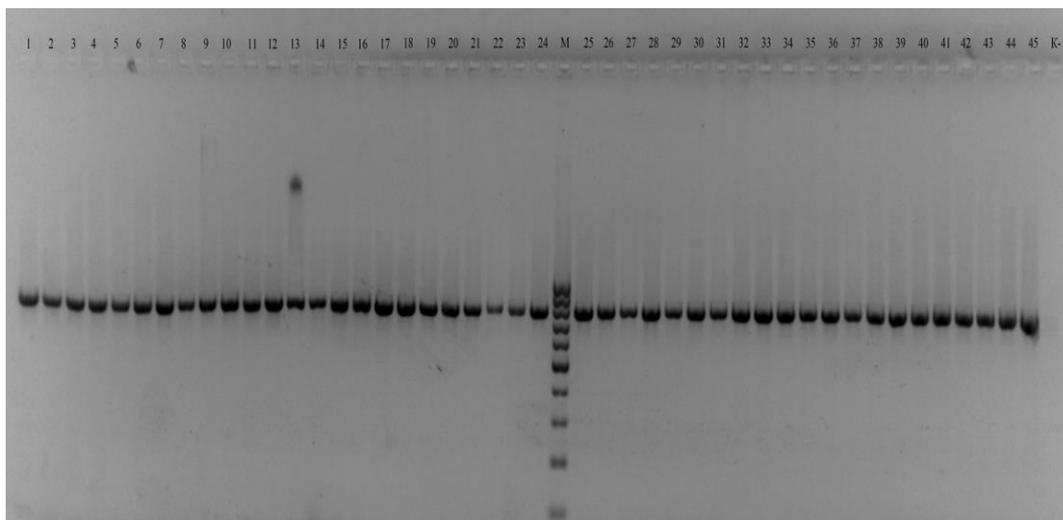
Иксодовые клещи признаны специфическими переносчиками и биологическими хозяевами возбудителя туляремии. Больше всего выделено штаммов от клещей семейства *Ixodidae* в общем количестве 98 образцов, из них 52% от вида *Dermacentor marginatus*. От представителей I группы высокочувствительных животных, которые являются основой поддержания эпизоотического процесса туляремии в природных очагах было выделено от 26 животных (домовая мышь - 18, водяная крыса – 2, тамарисковая песчанка – 3, полуденная песчанка – 3). От II группы, в которую входят большой суслик, большой тушканчик, лесная мышь, малый суслик, обыкновенная полёвка, серый хомячок, малая белозубка были выделены штаммы в общем количестве от 11 животных. Два штамма были выделены от ласки, относящиеся к III группе животных, представители которой малочувствительны к туляремии. Важное значение в распространении туляремии в природных очагах некоторых типов может иметь заражение животных через инфицированную воду. Поэтому в работе были использованы 2 штамма выделенные из воды, а именно горного ручейка на окраине населенного пункта с. Лепсинск и из реки Каргалы в Алматинской области. В наших исследованиях был использован 1 вакцинный штамм 15 НИИЭГ. Один штамм выделен от каменки-плясуни, при этом птицы считаются устойчивыми к туляремии. Птицы могут длительно сохранять *F. tularensis* в своем организме и оказывать влияние на ареал распространения данной инфекции. Для семи исторических штаммов не сохранилась информация об объектах выделения.

Выделенные ДНК из инактивированных штаммов показали хорошее качество, в достаточном количестве для генотипирования.

Концентрации ДНК штаммов варьировала от 2 нг/мкл до 78 нг/мкл полученные спектрофотометрическим методом. Во всех образцах установлена высокая степень очистки, на что указывает соотношение длин волн 260/280 в среднем диапазоне 1,9. Таким образом, была сформирована коллекция ДНК 148 штаммов ДНК *F. tularensis*, пригодных для молекулярно-генетического анализа.

3.2 Видовая идентификация штаммов *F. tularensis*

Для исключения контаминации и видовой идентификации образцов ДНК проведен анализ фрагмента нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена. Результаты ПЦР амплификации приведены на рисунке 3.



(1-45) образцы, нумерация согласно п/н; (M) маркер молекулярного веса (Fermentas) (100 – 1000 п.н., шаг 100 п.н.), (K-) отрицательный контрольный образец

Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР продуктов амплификации фрагмента *16S rRNA* гена ДНК

Как видно на рисунке 3 у всех образцов были амплифицированы специфические фрагменты молекулярной массой около 800 п.н. При визуальном просмотре наложение пиков в хроматограммах отсутствовало, что указывает на отсутствие контаминации ДНК различными видами бактерий (рисунок 4).

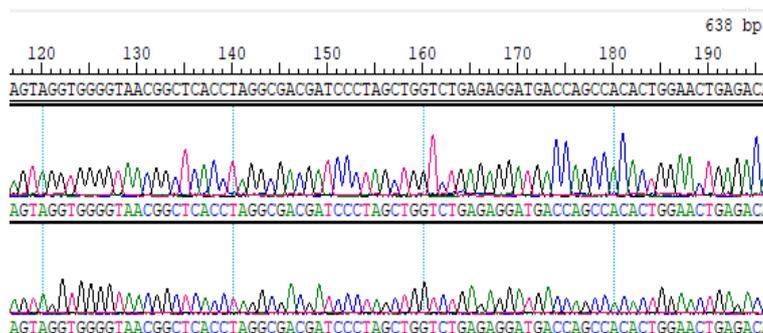
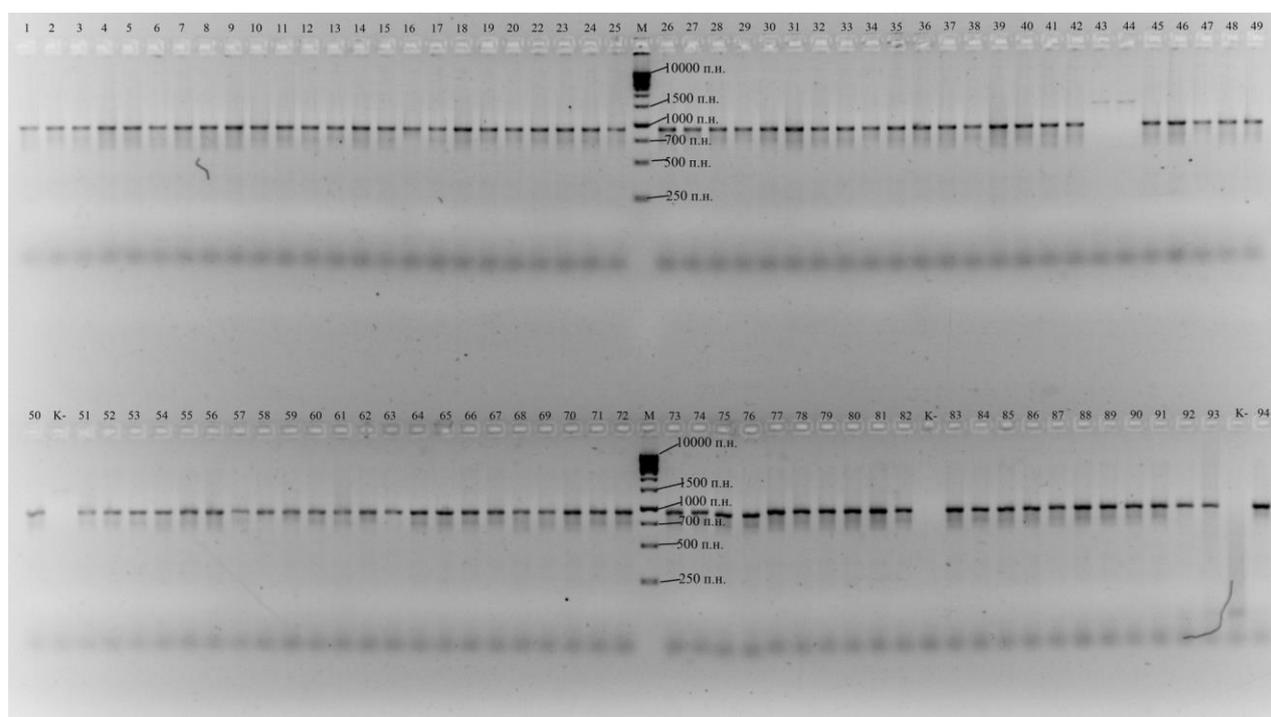


Рисунок 4 – Хроматограмма последовательности *16S rRNA* гена

Полученные нуклеотидные последовательности *16S rRNA* гена были идентифицированы относительно доступных нуклеотидных последовательностей, депонированных в базах данных Gene Bank (www.ncbi.nih.gov), используя алгоритм BLAST. В результате анализа полученные нуклеотидные последовательности имели максимальную идентичность 99-100% с нуклеотидными последовательностями, вида *F. tularensis*. Высокий консерватизм нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена не позволяет проводить подвидовую идентификацию *F. tularensis*, однако позволяет исключить контаминацию ДНК различными видами бактерий.

3.3 Внутривидовая идентификация штаммов *F. tularensis*

В результате исследования штаммов *F. tularensis* при помощи ПЦР с использованием праймеров RD1 получены продукты амплификации ДНК разных размеров: 924 н.п. и 1453 н.п. характерные для подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (рисунок 5).



1-94 – образцы; М – маркер молекулярного веса (Fermentas) 250 – 10000 п.н.; К- – отрицательный контрольный образец

Рисунок 5 – Результаты ПЦР амплификации с праймерами RD1

В результате молекулярно-генетического типирования штаммов *F. tularensis*, с помощью ПЦР с использованием праймеров специфичных к гену RD1, позволило осуществить внутривидовую идентификацию изученных штаммов, которая выявила 2 подвида в нашей коллекции ДНК это – *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

3.4 Разработка протокола генотипирования *Francisella tularensis* методом мультилокусного анализа VNTR повторов

MLVA генотипирование обладает высокой дискриминационной способностью для бактерий с высокой гомологией генома таких как, *F. tularensis*. Несомненным преимуществом метода является возможность анализа нескольких локусов в одной ПЦР реакции с использованием праймеров меченных различными флуоресцентными красителями. Это позволяет анализировать достаточное количество локусов для дискриминации штаммов с использованием нескольких ПЦР реакциях, что сокращает стоимость и время затраченное на генотипирование. Наличие открытых баз данных позволяет находить гомоплазийные аналоги или устанавливать различие между анализируемыми штаммами, что особенно актуально в рамках глобального контроля циркуляции патогенов. Ключевым фактором эпидемиологического контроля на локальном и глобальном уровнях является достоверность получаемых результатов. Несмотря на высокую воспроизводимость получаемых результатов, при капиллярном электрофорезе не редко получаемый размер ПЦР продуктов отличается от фактических значений. Это возможно связано с характеристикой используемого полимера, разницей в движении размерного стандарта и ПЦР продуктов, отличие в движение ПЦР продуктов из-за конформаций. В связи с этим оптимизация и верификация MLVA типирования является краеугольным камнем. Оптимизацию необходимо проводить под тип используемого прибора и реагентов.

3.4.1 Оптимизация условий постановки MLVA типирования *Francisella tularensis*

Для MLVA типирования были сформированы 5 мультиплексов праймеров, в которых имеются разные флуоресцентные метки, такие как 6FAM, VIC, PET.

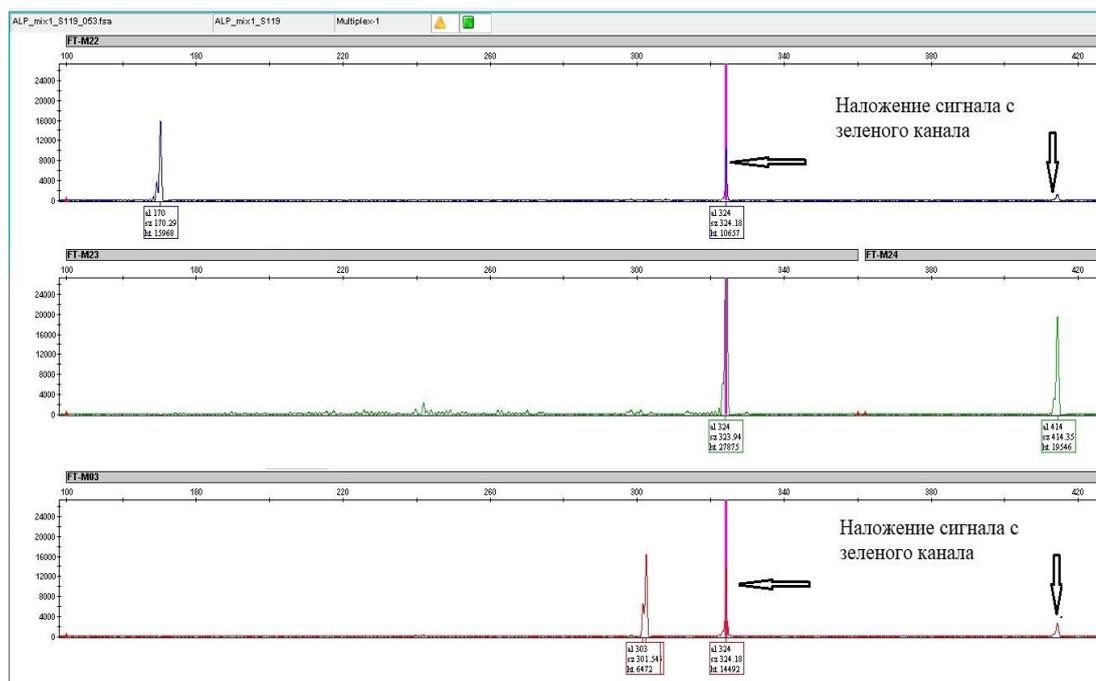
Для MLVA-11 используются маркеры предложенные Vogler A.J. с соавторами [179, p. 141], с возможностью мультиплексирования ПЦР и капиллярного разделения на автоматических генетических анализаторах. Выбор оптимальных концентраций праймеров и используемых флуоресцентных красителей проводили на основании литературных данных и технических характеристик используемых приборов. Разведение праймеров из 100 мМ раствора и финальная концентрация праймеров приведена в таблице 2.

Для повышения эффективности амплификации всех локусов был оптимизирован состав реакционной смеси, который отличался по составу видов ДНК полимераз и их соотношения (таблица 5).

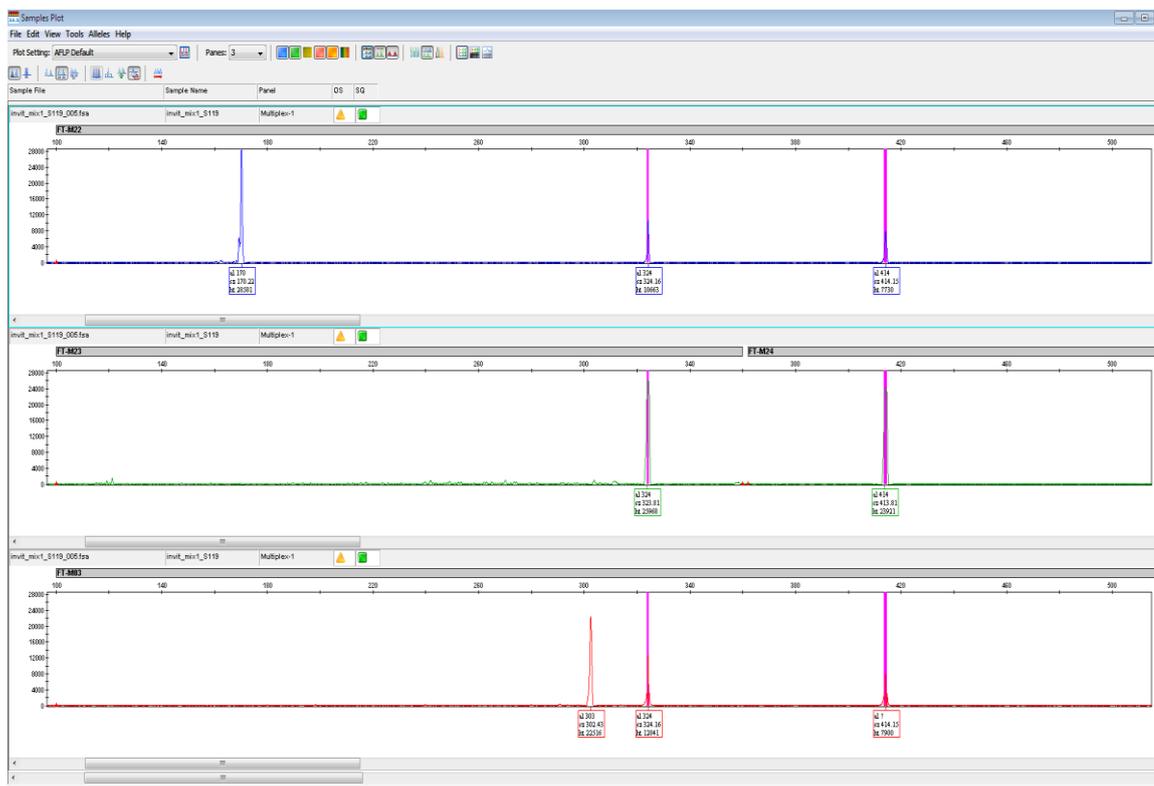
Таблица 5 – Реакционные смеси ПЦР

Реакционная смесь	Программа ПЦР амплификации
Смесь праймеров с финальной концентрацией согласно таблице 2, 75 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 20 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01% Твин 20, 1 мМ MgCl ₂ , дезоксинуклеотидтрифосфаты в концентрации 200 нМ каждого, 5 % ДМСО, 2 единицы смеси <i>Taq</i> и <i>Pfu</i> полимеразы в соотношении 19:1, 10 нг ДНК.	Длительная денатурация 95°C в течение 3 минут; 35 циклов 95°C – 30 секунд, 58°C – 30 секунд, 72°C – 1,20 минуты; финальная элонгация 20 минут при 72°C.
Смесь праймеров с финальной концентрацией согласно таблице 2, 75 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 20 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01% Твин 20, 3 мМ MgCl ₂ , дезоксинуклеотидтрифосфаты в концентрации 200 нМ каждого, 5 % ДМСО, 2 единицы смеси <i>MHS</i> и <i>Pfu</i> полимеразы в соотношении 19:1, 10 нг ДНК.	Длительная денатурация 95°C в течение 3 минут; 35 циклов 95°C – 30 секунд, 58°C – 30 секунд, 72°C – 1,20 минуты; финальная элонгация 20 минут при 72°C.
Смесь праймеров с финальной концентрацией согласно таблице 2, 75 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 20 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01% Твин 20, 2,5 мМ MgCl ₂ , дезоксинуклеотидтрифосфаты в концентрации 200 нМ каждого, 5 % ДМСО, 2 единицы смеси <i>Taq</i> и <i>Pfu</i> полимеразы в соотношении 19:1, 10 нг ДНК.	Длительная денатурация 95°C в течение 3 минут; 35 циклов 95°C – 30 секунд, 58°C – 30 секунд, 72°C – 1,20 минуты; финальная элонгация 20 минут при 72°C.
Смесь праймеров с финальной концентрацией согласно таблице 2, 75 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 20 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01% Твин 20, 1,5 мМ MgCl ₂ , дезоксинуклеотидтрифосфаты в концентрации 200 нМ каждого, 5 % ДМСО, 2 единицы <i>Platinum™ II Taq Hot-Start DNA Polymerase</i> . 10 нг ДНК.	Длительная денатурация 95°C в течение 3 минут; 35 циклов 95°C – 30 секунд, 58°C – 30 секунд, 72°C – 1,20 минуты; финальная элонгация 20 минут при 72°C.

Об эффективности условий ПЦР амплификации судили на основании детектирования пиков в форерограммах разделения и отсутствии дополнительных, не специфических продуктов амплификации. При визуальном учете результатов было установлено наложение сигнала от флуоресцентного красителя VIC (зеленый) на голубой и красный фильтр (6FAM) (рисунок 6)



а



б

а – наложение сигналов на соседние фильтры в реакционной смеси 1; б – ПЦР с Platinum™ II *Taq* Hot-Start DNA Polymerase, реакционной смеси 4

Рисунок 6 – Перекрестное наложение сигналов на соседние красители

Перекрестное наложение от праймеров меченных красителем VIC наблюдалось во всех смесях праймеров, что возможно связано с более высокой эффективностью амплификацией данных локусов или более

высокой эмиссионной активностью флуорофора. С целью устранения зашкала спектра красителя VIC была оптимизирована концентрация праймеров в реакционной смеси (таблица 2).

Оптимизированный состав концентраций праймеров приведен в таблице 3. В результате оптимизаций условий MLVA типирования был оптимизирован состав реакционной смеси под номером 3 с оптимальной концентрацией праймеров, что позволило получать четко интерпретируемые результаты во всех локусах (рисунок 7).



Рисунок 7 – ПЦР *Taq* и *Pfu* полимеразы в соотношении 19:1, реакционной смеси 3

Все пики в флорограммах четко интерпретируемы, отсутствуют не специфические продукты ПЦР амплификации и перенос эмиссии между фильтрами.

На основании полученных результатов был разработан протокол MLVA типирования, позволяющий получать значения анализируемых локусов. Протокол включал в себя оптимальный состав реакционной смеси и программу ПЦР амплификации.

Для генотипирования одного образца готовится пять реакционных смесей с соответствующей комбинацией праймеров (таблица 2). Реакционная смесь готовится в объеме 20 мкл и включает в себя: однократную смесь праймеров, 75 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Твин 20, 2,5 мМ MgCl₂, дезоксинуклеотидтрифосфаты в концентрации 200 нМ каждого, 5% ДМСО, 2 единицы смеси *Taq* и *Pfu* полимеразы в соотношении 19:1, 10 нг ДНК. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 3 минут; 35 циклов 95°C – 30 секунд, 58°C – 30 секунд, 72°C – 1,20 минуты; финальная элонгация 20 минут при 72°C.

Пошаговая детализация MLVA типирования была описана в разработанной нами методических рекомендациях (Приложение А). Методические рекомендации могут быть рекомендованы для специалистов медицинских и ветеринарных лабораторий.

3.5 Проведение MLVA типирования штаммов *Francisella tularensis* по гипервариабельным VNTR маркерам и получение MLVA профилей

В диссертационной работе проведено изучение генетического разнообразия варьирования tandemных повторов у 148 штаммов *Francisella tularensis*. С каждым образцом ДНК было поставлено 5 мультиплексных реакции.

Значение аллелей 11 VNTR локусов были получены для всех анализируемых штаммов *Francisella tularensis* (Приложение Б).

Выявленные аллельные варианты и значения дискриминирующего индекса Хантера-Гастона для каждого проанализированного локуса представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Индекс разнообразия Хантера-Гастона(HGDI)

Локусы	Индекс разнообразия	Число аллелей/генотипов
FT-M02	0	1
FT-M03	0.9067	16
FT-M04	0.165	3
FT-M05	0.04	2
FT-M06	0.6888	5
FT-M10	0	1
FT-M20-2A	0.0918	3
FT-M20-2B	0	1
FT-M22	0.1755	3
FT-M23	0	1
FT-M24	0.0657	2
MLVA11	0.9295	30

Значения индекса разнообразия Хантера-Гастона HGDI всех VNTR-локусов заметно отличались друг от друга (таблица 6). Локусы FT-M02, FT-M10, FT-M20-2B и FT-M23 в отношении исследуемых штаммов не обладали дискриминационной способностью (HGDI=0), оставшиеся семь маркеров были вариабельны. На основе MLVA построена дендограмма (рисунок 8).

Представленная дендограмма на рисунке 8 кластеризовала 148 штаммов в 3 клады: 1 клада объединила в себе 11 штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* генотипов GFt-1 – GFt-5, 2 клада объединила 134 штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* генотипов GFt-6 – GFt-29, 3 – клада объединила в себе 3 штамма *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 30 генотипа. Подвид *mediasiatica* отличается от *holarctica* в 3 высоконсервативных локусах FT-M05, FT – M20-A и FT-M24, при этом данные локусы полностью идентичны среди всех штаммов *holarctica*.

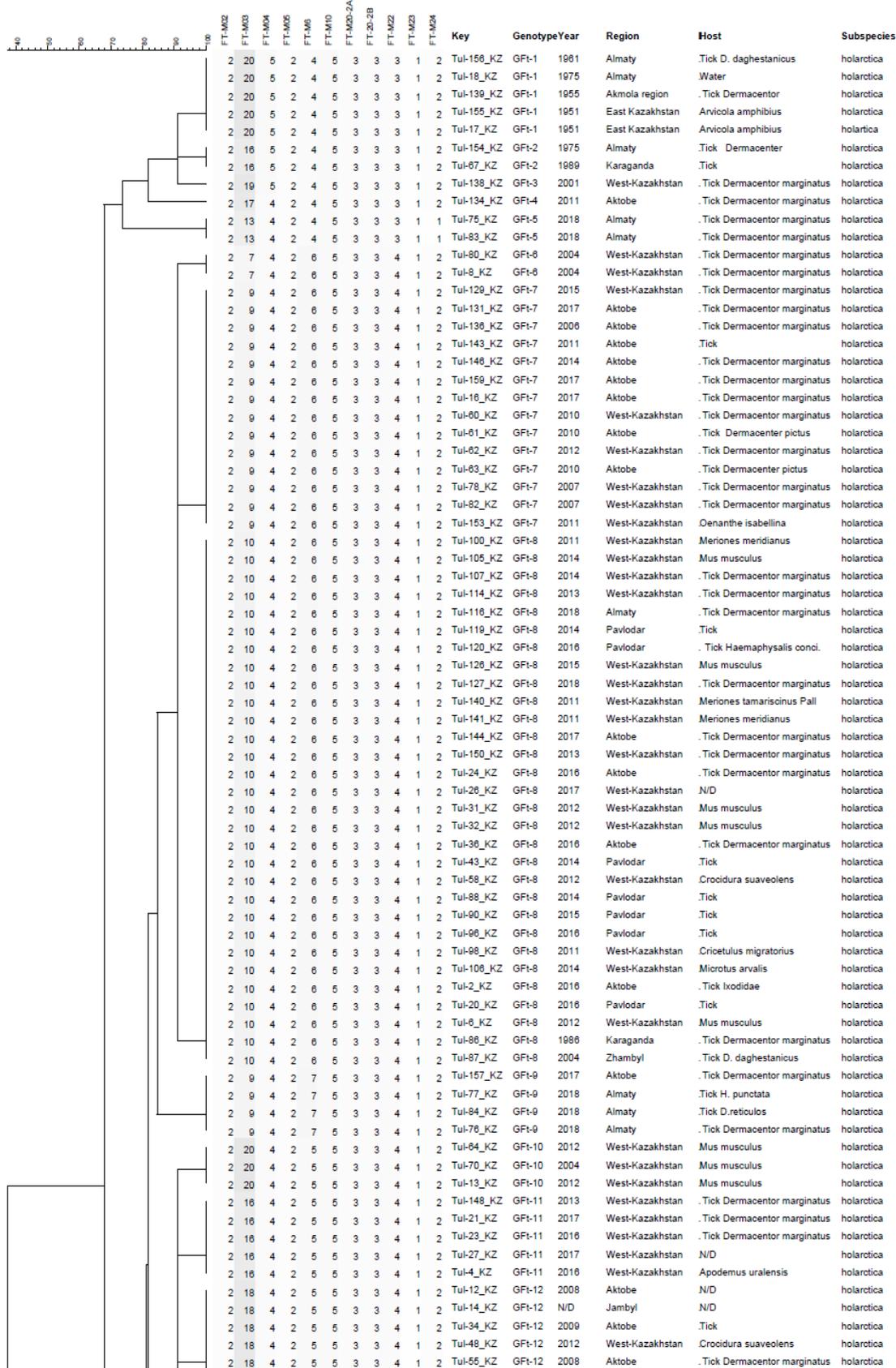


Рисунок 8 – Филогенетическое дерево на основе данных MLVA-11 *Francisella tularensis*, лист 1

2	18	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-59_KZ	GFI-12	2012	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-122_KZ	GFI-13	2014	Aktobe	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-28_KZ	GFI-13	2017	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-33_KZ	GFI-13	2009	Aktobe	.Tick	holarctica
2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-45_KZ	GFI-13	2016	Aktobe	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-47_KZ	GFI-13	2010	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-72_KZ	GFI-13	2016	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-117_KZ	GFI-14	2013	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-118_KZ	GFI-14	2014	Pavlodar	.Tick	holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-22_KZ	GFI-14	2017	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-25_KZ	GFI-14	2017	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-71_KZ	GFI-14	1983	Almaty	.Tick D. daghestanicus	holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-73_KZ	GFI-14	2016	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-74_KZ	GFI-14	2016	West-Kazakhstan	Microtus arvalis	holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-89_KZ	GFI-14	N/D	N/D		holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-95_KZ	GFI-14	2013	Pavlodar	.Tick Haemaphysalis concin.	holarctica
2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-19_KZ	GFI-14	2017	West-Kazakhstan	Apodemus uralensis	holarctica
2	14	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-10_KZ	GFI-15	2004	Almaty	N/D	holarctica
2	14	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-54_KZ	GFI-15	2002	Almaty	.Tick	holarctica
2	14	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-86_KZ	GFI-15	2004	Almaty	.Tick Dermacentor	holarctica
2	14	4	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-88_KZ	GFI-15	2002	Almaty	.Tick Dermacentor	holarctica
2	23	4	2	4	5	4	3	4	1	2	Tul-132_KZ	GFI-16	2017	Aktobe	Mustela nivalis	holarctica
2	23	4	2	4	5	4	3	4	1	2	Tul-15_KZ	GFI-16	2017	Aktobe	Mustela nivalis	holarctica
2	20	4	2	4	5	4	3	4	1	2	Tul-160_KZ	GFI-17	2017	Aktobe	Spermophilus pygmaeus	holarctica
2	16	4	2	4	5	4	3	4	1	2	Tul-161_KZ	GFI-18		Vaccine strain F. .		holarctica
2	16	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-92_KZ	GFI-19	1988	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	16	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-97_KZ	GFI-19	2013	Pavlodar	.Tick Haemaphysalis concinna	holarctica
2	23	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-42_KZ	GFI-20	2013	Aktobe	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	23	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-51_KZ	GFI-20	2013	Aktobe	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	23	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-52_KZ	GFI-20	2013	Aktobe district	Allactaga major	holarctica
2	12	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-37_KZ	GFI-21	2015	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	12	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-30_KZ	GFI-21	2015	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	19	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-147_KZ	GFI-22	2014	West-Kazakhstan	.Tick	holarctica
2	19	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-79_KZ	GFI-22	2018	Almaty	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	19	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-9_KZ	GFI-22	2004	Aktobe	N/D	holarctica
2	19	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-149_KZ	GFI-22	2013	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-121_KZ	GFI-23	2011	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-29_KZ	GFI-23	2015	Pavlodar	.Tick	holarctica
2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-38_KZ	GFI-23	2015	Pavlodar	.Tick	holarctica
2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-39_KZ	GFI-23	2014	Pavlodar	.Tick	holarctica
2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-44_KZ	GFI-23	2014	Pavlodar	.Tick	holarctica
2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-108_KZ	GFI-24	2014	Aktobe	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-113_KZ	GFI-24	2015	Aktobe	.Tick	holarctica
2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-124_KZ	GFI-24	2015	Aktobe	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-152_KZ	GFI-24	2011	Aktobe	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-41_KZ	GFI-24	2013	Aktobe	.Tick	holarctica
2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-5_KZ	GFI-24	2012	Aktobe	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-135_KZ	GFI-24	1953	Almaty	Water (Kargaly river)	holarctica
2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-102_KZ	GFI-25	2016	Pavlodar	.Tick	holarctica
2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-103_KZ	GFI-25	2016	Pavlodar	.Tick	holarctica
2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-104_KZ	GFI-25	2016	Pavlodar	.Tick Haemaphysalis concin.	holarctica
2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-109_KZ	GFI-25	2016	Pavlodar	.Tick Haemaphysalis concin.	holarctica
2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-110_KZ	GFI-25	2016	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-111_KZ	GFI-25	2016	Pavlodar	.Tick	holarctica
2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-35_KZ	GFI-25	2013	Pavlodar	.Tick Haemaphysalis concin.	holarctica
2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-40_KZ	GFI-25	2013	Pavlodar	.Tick Haemaphysalis concin.	holarctica
2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-112_KZ	GFI-25	2016	Pavlodar	.Tick Haemaphysalis concin.	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-101_KZ	GFI-26	2011	West-Kazakhstan	Meriones tamariscinus Pall	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-137_KZ	GFI-26	2008	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-81_KZ	GFI-26	2004	West-Kazakhstan	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-91_KZ	GFI-26	2004	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-128_KZ	GFI-26	2015	West-Kazakhstan	Meriones tamariscinus	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-133_KZ	GFI-26	2012	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-151_KZ	GFI-26	2011	Aktobe	Spermophilus pygmaeus	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-7_KZ	GFI-26	2004	West-Kazakhstan	.Tick Ixodidae	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-93_KZ	GFI-26	2004	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-99_KZ	GFI-26	2011	West-Kazakhstan	Spermophilus major	holarctica
2	20	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-115_KZ	GFI-27	2018	Aktobe	.Tick Dermacentor marginatus	holarctica
2	17	4	2	4	5	3	3	4	1	2	Tul-142_KZ	GFI-28	2011	West-Kazakhstan	Mus musculus	holarctica
2	9	3	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-11_KZ	GFI-29	2001	East Kazakhstan	.Tick	holarctica
2	9	3	2	5	5	3	3	4	1	2	Tul-89_KZ	GFI-29	2001	East Kazakhstan	.Tick	holarctica
2	20	3	4	3	5	6	3	13	1	1	Tul-58_KZ	GFI-30	1982	Jambyl	.Tick	mediasiat.
2	20	3	4	3	5	6	3	13	1	1	Tul-57_KZ	GFI-30	1982	Jambyl	.Tick	mediasiat.
2	20	3	4	3	5	6	3	13	1	1	Tul-65_KZ	GFI-30	2004	West-Kazakhstan	Meriones meridianus	mediasiat.

Рисунок 8 – лист 2

Штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* имеют идентичный генотип (GFt-30) по 11 VNTR локусам. Штаммы Tul-56_KZ и Tul-57_KZ выделены в Жамбылской области, а штамм Tul-65_KZ в Западно-Казахстанской области, хотя ранее выявление данного подвида в данной области не фиксировалось. Таким образом, между данными штаммами отсутствует эпизотологическая взаимосвязь, а идентичность локусов в панели MLVA11 предложенной Vogler, A.J с соавторами указывает на гомоплазию.

Штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* кластеризовались в 29 генотипов при этом 6 генотипов представлены единичными штаммами (GFt-3, GFt-4, GFt-17, GFt-18, GFt-27 и GFt-28). 7 генотипов представлены 2 штаммами (GFt-2, GFt-5, GFt-6, GFt-16, GFt-19, GFt-21 и GFt-29). Оставшиеся генотипы включали в себя 3 и более штаммов.

На рисунке 9 и 10 предстала кластеризация штаммов на основании регионов выделения, года выделения и присвоенного генотипа соответственно.

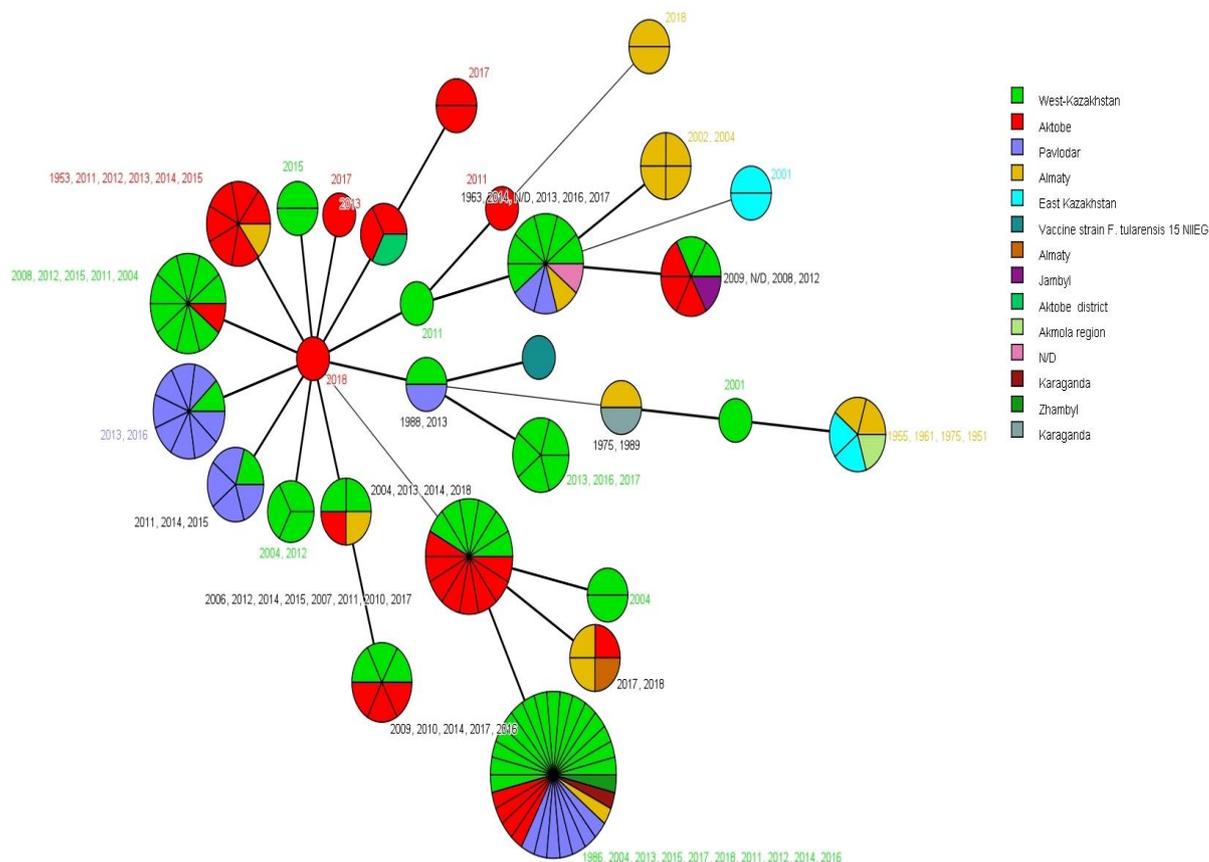


Рисунок 9 – MST кластеризация 148 штаммов *F. tularensis* с обозначением года выделения

Все штаммы используемые в наших исследованиях выделены из разнообразных объектов, таких как водоемы, переносчиков и окончательных хозяев в период с 1951 по 2018 годы.

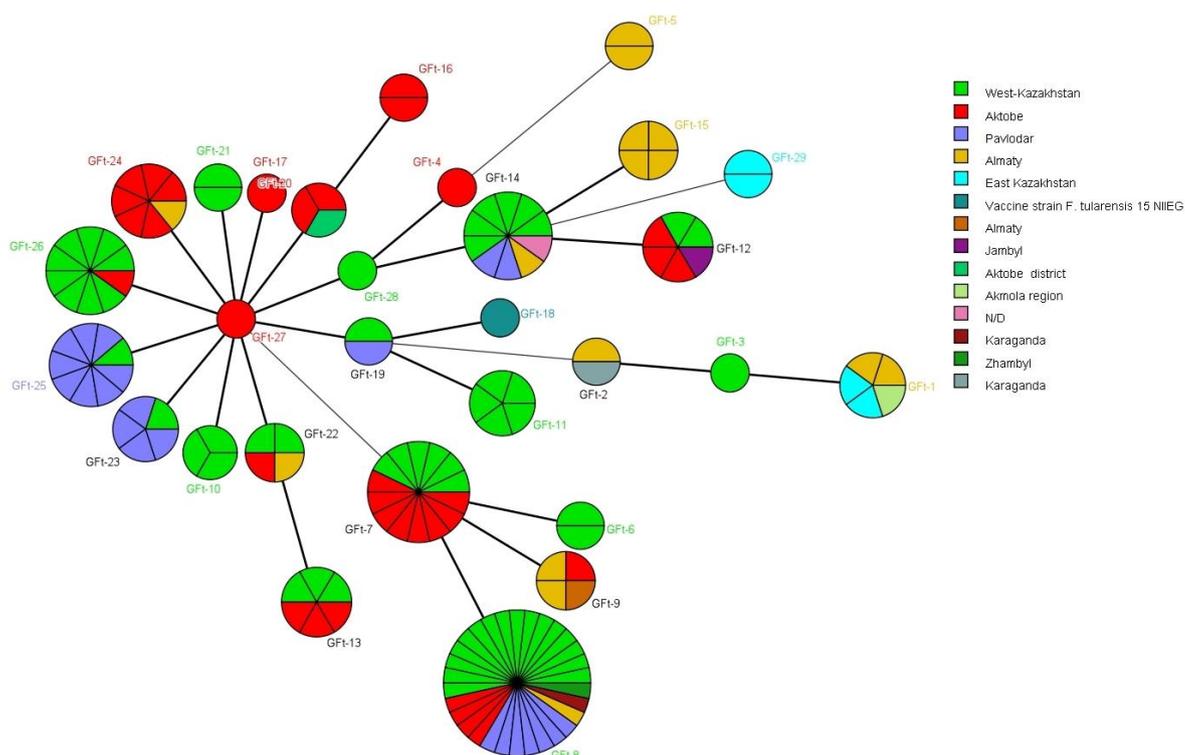


Рисунок 10 – MST кластеризация 148 штаммов *F. tularensis* с обозначением установленного генотипа

Степень родства между штаммами *Francisella tularensis* графически отображали в виде дендрограммы, построенной с использованием иерархического алгоритма связывания UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Averages) (рисунок 8). Использование данного метода показало, что штаммы каждого подвида формируют группу. Общее количество генотипов по результатам MLVA 11 представлена в таблице 6.

Основную часть исследованных штаммов составляют штаммы подвида *holartica*. Информативность и значимость использованных для построения филогенетического дерева 11 локусов различна. Количество повторов в 4 локусах – FT-M02, FT-M10, FT-M20-2B, FT-M23 – неизменно для всех проанализированных в нашей работе штаммов, и их использование не дает никакой информации о вариабельности штаммов внутри данных подвида. Количество повторов в гипервариабельном локусе FT-M03 колеблется у исследованных штаммов в пределах от 7 до 23, что позволяет дифференцировать штаммы, выделенные из одного географического района.

Отдельный кластер GFT-30 образуют штаммы Tul-56_KZ, Tul-57_KZ и Tul-65_KZ принадлежащие к подвиду *mediasiatica*. Вышеупомянутые штаммы являются генетически идентичными по 11 VNTR локусам. Штаммы Tul-56_KZ и Tul-57_KZ выделены в Жамбылской области, Мойынкумском районе от клещей в 1982 году, а штамм Tul-65_KZ в Жаргалинском районе Западно-Казахстанской области в 2004 году от полуденной песчанки, хотя ранее обнаружение данного подвида на данной территории не фиксировалось. Сравнение штаммов внутри подвида *mediasiatica* выявило одну группу

штаммов, идентичных по 11 локусам, поэтому вероятно, что они имеют общее происхождение.

Таблица 7 – Количество генотипов по результатам MLVA 11

Генотип	Количество штаммов	Область выделения
1	2	3
1	5	Алматинская область (2 образца) Акмолинская область (1 образец) Восточно-Казахстанская (2 образца)
2	2	Алматинская область (1 образец) Карагандинская область (1 образец)
3	1	Западно-Казахстанская область
4	1	Актюбинская область
5	2	Алматинская область (2 образца)
6	2	Западно-Казахстанская область (2 образца)
7	14	Западно-Казахстанская область (6 образца) Актюбинская область (8 образца)
8	30	Западно-Казахстанская область (16 образца) Павлодарская область (7 образца) Актюбинская область (4 образца) Алматинская область (1 образец) Карагандинская область (1 образец) Жамбылская область (1 образец)
9	4	Алматинская область (3 образца) Актюбинская область (1 образец)
10	3	Западно-Казахстанская область (3 образца)
11	5	Западно-Казахстанская область (5 образца)
12	6	Актюбинская область (3 образца) Западно-Казахстанская область (2 образца) Жамбылская область (1 образец)
13	6	Актюбинская область (3 образца) Западно-Казахстанская область (3 образца)
14	10	Западно-Казахстанская область (6 образцов) Павлодарская область (2 образца) Алматинская область (1 образец) Нет данных (1 образец)
15	4	Алматинская область (4 образца)
16	2	Актюбинская область (2 образца)
17	1	Актюбинская область
18	1	Вакцинный штамм <i>F.tularensis</i> 15 НИИЭГ.
19	2	Западно-Казахстанская область (1 образец) Павлодарская область (1 образец)
20	3	Актюбинская область (3 образца)
21	2	Западно-Казахстанская область (2 образца)
22	4	Западно-Казахстанская область (2 образца) Актюбинская область (1 образец) Алматинская область (1 образец)

Продолжение таблицы 7

1	2	3
23	5	Павлодарская область (4 образца) Западно-Казахстанская область (1 образец)
24	7	Актюбинская область (6 образцов) Алматинская область (1 образец)
25	9	Павлодарская область (8 образцов) Западно-Казахстанская область (1 образец)
26	10	Западно-Казахстанская область (9 образцов) Актюбинская область (1 образец)
27	1	Актюбинская область
28	1	Западно-Казахстанская область
29	2	Восточно-Казахстанская область (2 образцов)
30	3	Жамбылская область (2 образца) Западно-Казахстанская область (1 образец)

Как видно с таблицы 7 большое количество штаммов в количестве 30 штук относятся к генотипу GFt-8 из разных регионов Западно-Казахстанской (16 образцов), Павлодарской (7 образцов), Актюбинской (4 образца), Алматинской, Карагандинской и Жамбылской областей по 1 образцу. В Западно-Казахстанской области 5 образцов из данной группы выделены от домового мыши, 2 образца от полуденной песчанки, по одному образцу от гребенщиковой песчанки, беззубки малой, серого хомячка и обыкновенной полевки, 4 образца выделены от клещей *Dermacentor marginatus*. Остальная часть образцов генотипа 6 выделены от иксодовых клещей следующих видов, таких как *Dermacentor marginatus*, *D. daghestanicus* и *Haemaphysalis concinna*. Из общего числа образцов 7 штаммов *Francisella tularensis* данной группы, а именно Tul-98_KZ, Tul-106_KZ, Tul-2_KZ, Tul-20_KZ, Tul-6_KZ, Tul-86_KZ и Tul-87_KZ было проведено полногеномное секвенирование данных образцов.

Второй группой по численности образцов является генотип GFt-7, который представлен в количестве 14 штаммов выделенные из Западно-Казахстанской и Актюбинских областях. Основная часть культур туляремийного микроба выделена от иксодовых клещей вида *Dermacentor marginatus* и только один образец Tul-153_KZ от птицы семейства мухоловковых - каменки-плясуньи, случайно пойманной в норе грызунов в Западно-Казахстанской области. Для трех штаммов данной группы Tul-61_KZ, Tul-78_KZ и Tul-153_KZ проведено полногеномное секвенирование.

Генотипы GFt-14 и GFt-26 стоят на третьем месте по численности образцов, общее количество в каждой группе по 10 штаммов. Штаммы генотипа 12 выделены из разных регионов, таких как Западно-Казахстанской, Павлодарской и Алматинкой областях в основном от иксодовых клещей видов *Dermacentor marginatus* и *Haemaphysalis concinna*, только один образец Tul-19_KZ изолирован от лесной мыши, который в дальнейшем был взят для полногеномного секвенирования. Штаммы генотипа GFt-26 в количестве 10 образцов, 9 из которых были изолированы в Западно-Казахстанской области и

один штамм в Актюбинской области. Три штамма выделены от домашней мыши, 3 от иксодовых клещей вида *Dermacentor marginatus*, два штамма от гребенщиковой песчанки и по одному штамму от большого и малого сусликов. Шесть штаммов данного генотипа были взяты для исследования полногеномного секвенирования, а именно Tul-128_KZ, Tul-133_KZ, Tul-151_KZ, Tul-7_KZ, Tul-93_KZ и Tul-99_KZ.

На четвертом месте по численности образцов является группа штаммов генотипа GFt-25. Общее количество 9 штаммов выделены в Павлодарской (8 штаммов) и один штамм в Западно-Казахстанской областях, в основном от иксодовых клещей *Haemaphysalis concinna* и один штамм от домашней мыши соответственно. Только для одного штамма Tul-112_KZ из данной группы проведено полногеномное секвенирование.

Группа штаммов генотипа GFt-24 по численности выделенных штаммов стоит на пятом месте, общее количество которых составило 7 образцов. Шесть штаммов выделены в Актюбинской области от иксодовых клещей *Dermacentor marginatus* и только один штамм Алматинской области выделен из воды реки Каргалы, при этом данный штамм Tul-135_KZ взят для проведения полногеномного секвенирования.

На шестом месте по численности штаммов является группы штаммов генотипов GFt-12 и GFt-13, общее количество исследованных штаммов составило по 6 образцов в каждом генотипе. Генотип GFt-12 выделен в Актюбинской области - 3 штамма от иксодовых клещей, Западно-Казахстанской области – 2 штамма от малой беззубки и домашней мыши, 1 штамм из Жамбылской области. Генотип GFt-13 представлен также 6 штаммами выделенные в Актюбинской и Западно-Казахстанской областях по 3 штамма в каждом регионе. Штаммы в основном изолированы от иксодовых клещей вида *Dermacentor marginatus* и одного штамма от домашней мыши. Штаммы вышеуказанных генотипов не были взяты для проведения полногеномного секвенирования.

Штаммы генотипов GFt-1, GFt-11 и GFt-23 представлены пятью образцами в каждой группе, которые занимают седьмое место среди генотипов исследованных штаммов *Francisella tularensis*. Штаммы генотипа GFt-1 выделены в Алматинской области, 2 штамма от клещей вида *D. daghestanicus* и от воды горного ручья окраины населенного пункта с. Лепсинск. Два штамма данной группы выделены в 1951 году в Восточно-Казахстанской области от водяной полевки (крысы). Четыре штамма GFt-1 - Tul-18_KZ, Tul-139_KZ, Tul-155_KZ и Tul-17_KZ использованы для полногеномного секвенирования. Штаммы генотипа GFt-11 представлены образцами исключительно выделенные в Западно-Казахстанской области выделенные от клещей *Dermacentor marginatus* и одного от лесной мыши. Депонированные штаммы генотипа GFt-23 выделены в Павлодарской области от иксодовых клещей в количестве 4 штук, в Западно-Казахстанской области - 1 штамм выделенный от домашней мыши. Штаммы генотипов GFt-11 и GFt-23 не были взяты для полногеномного секвенирования.

По четыре штамма в генотипах GFt-9, GFt-15, GFt-22 обнаружены в Алматинской, Западно-Казахстанской и Актюбинских областях. Штаммы генотипа GFt-9 обнаружены в Алматинской области - 3 выделенные в 2018 году от иксодовых клещей *H. punctata*, *D. reticulos* и *D. marginatus*, а также один штамм в Актюбинской области выделенный от *D. marginatus*. Из вышеуказанного генотипа только один штамм Tul-76_KZ от Алматинской области взят для исследования полногеномного секвенирования. Генотип GFt-15 представлен штаммами исключительно выделенные в Алматинской области от иксодовых клещей. Два штамма данного генотипа Tul-66_KZ и Tul-68_KZ использованы для полногеномного секвенирования. Четыре штамма генотипа GFt-22 выделены в разных областях таких как, 2- Западно-Казахстанская, и по одному штамму в Алматинской и Актюбинских областях от иксодовых клещей *Dermacentor marginatus*. Штамм Tul-149_KZ выделенный в 2013 году в Западно-Казахстанской области взят для полногеномного секвенирования.

Генотипы GFt-10, GFt-20 и GFt-30 представлены 3 штаммами в каждой группе. Генотип GFt-10 выделен в Западно-Казахстанской области от домашней мыши, при этом один штамм Tul-13_KZ изолированный в 2012 году использован для полногеномного секвенирования. Генотип GFt-20 представлен штаммами выделенные в Актюбинской области в 2013 году от иксодовых клещей *D. marginatus* и большого тушканчика (*Allactaga major*), штамм Tul-52_KZ использован в полногеномном секвенировании. Штаммы генотипа GFt-30 выделены 2 образца в Жамбылской (от клещей) и один в Западно-Казахстанской областях (от полуденной песчанки).

Штаммы генотипов GFt-2, GFt-5, GFt-6, GFt-16, GFt-19, GFt-21, GFt-29 представлены двумя штаммами в каждой группе. Штаммы генотипов GFt-2, GFt-5, GFt-6 выделены от иксодовых клещей *Dermacentor marginatus*, штаммы GFt-2 взяты для полногеномного секвенирования. Штаммы Tul-132_KZ и Tul-15_KZ генотипа GFt-16 были выделены в Актюбинской области в 2017 году от хищного млекопитающего семейства куньих – ласки. Генотип GFt-19 – представлен штаммами выделенные от 2 видов иксодовых клещей *Dermacentor marginatus* и *Haemaphysalis concinna* в Западно-Казахстанской и Павлодарской областях. Штаммы вышеперечисленных генотипов взяты для полногеномного секвенирования. Штаммы Tul-37_KZ и Tul-30_KZ генотипа GFt-21 выделены в Западно-Казахстанской области от домашней мыши в 2015 году, последний из которых взят для полногеномного секвенирования. Штаммы генотипа GFt-29 выделены в Восточно-Казахстанской области от клещей в 2001 году, из которых штамм Tul-11_KZ взят для проведения полногеномного секвенирования.

Шесть генотипов GFt-3, GFt-4, GFt-17, GFt-18, GFt-27 и GFt-28 представлены единичными штаммами Tul-160_KZ, объектом выделения являлся малый суслик, Tul-115_KZ и Tul-134_KZ - клещ *D. marginatus*. Вышеперечисленные штаммы изолированы в Актюбинской области. Штаммы Tul-138_KZ и Tul-142_KZ источниками выделения являются клещ

D. marginatus и домовая мышь в Западно-Казахстанской области, при этом штамм Tul-161_KZ представлен вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

На основании 11 VNTR локусов анализируемые штаммы кластеризовались в 30 генотипов. Для визуального представления распределения генотипов на территории нашей страны, построена карта (рисунок 11).

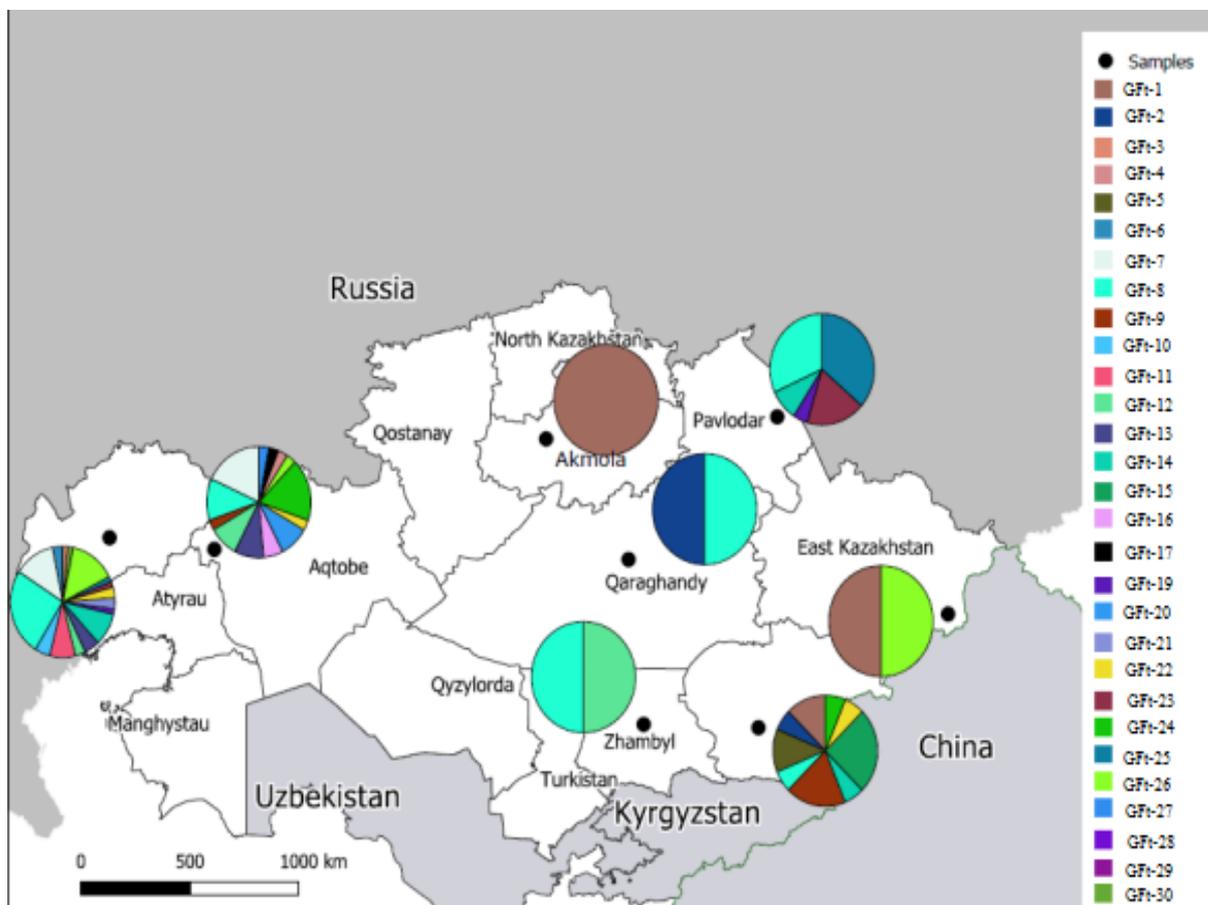


Рисунок 11 – Карта распределение генотипов на территории Казахстана

Крупные генотипы, объединившие в себя 5 и более штаммов, объединили в себя образцы, выделенные на разных географических территориях, что указывает на смешивание генотипов за счет исторического беспрепятственного передвижения животных и клещей по территории нашей страны.

В итоге MLVA типирования по 11 локусам позволило отобрать 40 штаммов *Francisella tularensis* для проведения полногеномного секвенирования.

3.6 Полногеномное секвенирование штаммов *Francisella tularensis*

Для полногеномного секвенирования использованы 40 штаммов приведены в таблице 8: 39 штамма подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* и 1 штамм подвида *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

Таблица 8 – Образцы ДНК *F. tularensis* используемые для полногеномного секвенирования

Шифр штамма	Регион	Природный очаг	Дата изоляции	Источник выделения
1	2	3	4	5
Tul-106_KZ	ЗКО, Казталовский район, Жа нажольский с.о.	Пойменно-болотный	12.12.2014г.	Обыкновенная полёвка (лат. <i>Microtus arvalis</i>) (найден труп)
Tul-11_KZ	ВКО, Зайсанский район	Предгорно-ручевой	01.06.2001г.	Клещ
Tul-112_KZ	Павлодарская область, Щербактинский район, 10 км от с. Жылы-Булак	Пойменно-болотный	15.06.2016г.	Клещ - <i>Haemaphysalis concinna</i>
Tul-128_KZ	ЗКО, Жангалинский район, Жангалинский а/о	Пойменно-болотный	18.02.2015г.	Тамарисковая песчанка (<i>Meriones tamariscinus</i>)
Tul-13_KZ	ЗКО, Казталовский район	Пойменно-болотный	30.01.2012г.	Домовая мышь (лат. <i>Mus musculus</i>)
Tul-132_KZ	Актюбинская область, Хобдинский район, зим. Акбалшык	Пойменно-болотный	29.05.2017г.	Ласка (лат. <i>Mustela nivalis</i>)
Tul-133_KZ	ЗКО, Жангалинский район, Пятимарский а/о.	Пойменно-болотный	21.12.2012г.	Домовая мышь (лат. <i>Mus musculus</i>)
Tul-135_KZ	Алматинская область, Саркандский район	Предгорно-ручевой	15.07.1953г.	Вода (р. Каргалы)
Tul-139_KZ	Акмолинская обл, г. Атбасар, р.Ишим	Пойменно-болотный	1955г.	Клещ - <i>Dermacentor</i>
Tul-149_KZ	ЗКО, Таскалинский р-н, Амангельдинский с.о.	Пойменно-болотный	23.05.2013г.	Клещ - <i>Dermacentor marginatus</i>
Tul-15_KZ	Актюбинская область, Хобдинский район, зим. Акбалшык	Пойменно-болотный	15.05.2017г.	Ласка (лат. <i>Mustela nivalis</i>)
Tul-151_KZ	Актюбинская обл. Уилский р-н, Саралжынск с/о	Пойменно-болотный	10.05.2011г.	Малый суслик (лат. <i>Spermophilus pygmaeus</i>)
Tul-153_KZ	ЗКО, Каратобинский р-н, Сулыкольский с/о.	Пойменно-болотный	24.05.2011г.	Каменка-плясунья (лат. <i>Oenanthe isabellina</i>)
Tul-154_KZ	Алматинская область, Алакольский район, левобережье р.Дубрай	Пойменно-болотный	27.08.1975г.	Клещ - <i>Dermacentor</i>

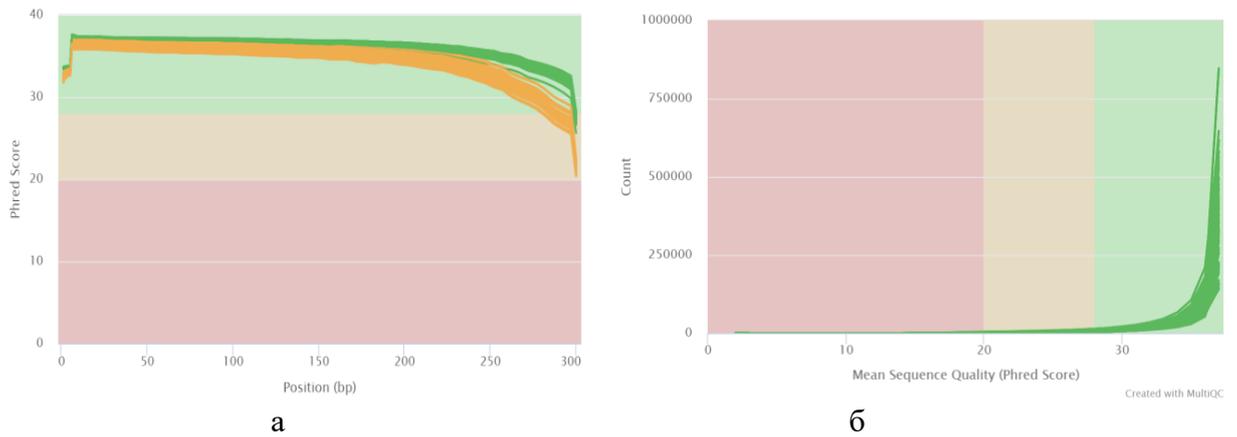
Продолжение таблицы 8

1	2	3	4	5
Tul-155_KZ	ВКО, ст.Защита	Пойменно-болотный	1951г.	Водяная полёвка (лат. <i>Arvicola amphibius</i>)
Tul-161_KZ	Вакцинный штамм 15 НИИЭГ			
Tul-17_KZ	ВКО, ст.Защита	Пойменно-болотный	1951г.	Водяная полёвка (лат. <i>Arvicola amphibius</i>)
Tul-18_KZ	Алматинская область, Андреевский район, с. Лепсинск,	Предгорно-ручевой	27.08.1975г.	Вода (горный ручей на окраине с. Лепсинск_
Tul-19_KZ	ЗКО, Акжайкский р-н, Алмалинский а/о.	Пойменно-болотный	25.01.2017г.	Лесная мышь (лат. <i>Apodemus uralensis</i>)
Tul-2_KZ	Актюбинская область, Уилский р-н, Уилский а/о	Пойменно-болотный	22.05.2016г.	Пастбищные клещи
Tul-20_KZ	Павлодарская обл. Лебяжинский р-н, с. Костомар	Пойменно-болотный	07.09.2016г.	Клещ
Tul-30_KZ	ЗКО, Казталовский р-н, Караузенский а/о ст. Жалпакдала	Пойменно-болотный	03.12.2015г.	Домовая мышь (лат. <i>Mus musculus</i>)
Tul-52_KZ	Актюбинская обл. Иргизский р-н н.п. Коминтерн	Пойменно-болотный	22.04.2013г.	Большой тушканчик (лат. <i>Allactaga major</i>)
Tul-6_KZ	ЗКО, Сырымский р-н.	Пойменно-болотный	18.10.2012г.	Домовая мышь
Tul-61_KZ	Актюбинская обл., Уилский р-н	Пойменно-болотный	27.03.2010г.	Клещ - <i>D. pictus</i>
Tul-66_KZ	Алматинская область, Алакольский р-н, Ушарал	Пойменно-болотный	29.05.2004г.	Клещ - <i>Dermacentor</i>
Tul-67_KZ	Карагандинская область	Пойменно-болотный	1989г.	Клещ
Tul-68_KZ	Алматинская обл., Алакольский р-н, г. Ушарал	Пойменно-болотный	28.04.2002г.	Клещ - <i>Dermacentor</i>
Tul-7_KZ	ЗКО, Казталовский р-н, Караузенский а/о.	Пойменно-болотный	29.09.2004г.	Пастбищные клещи
Tul-71_KZ	Алматинская обл. Балхашский р-н, с. Кокжиде	Тугайный	17.05.1963г.	Клещ - <i>D. daghestanicus</i>
Tul-76_KZ	Алматинская область, Саркандский район	Предгорно-ручевой	10.05.2018г.	Клещ - <i>D. marginatus</i>

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4	5
Tul-78_KZ	ЗКО, Каратобинский р-н, Каракольский с/о.	Пойменно-болотный	19.04.2007г.	Пастбищные клещи
Tul-86_KZ	Карагандинская обл., г.Караганда, предгорье Дос и Мыржак, р. Узун-Булак	Пойменно-болотный	1986г.	Клещ- <i>D. marginatus</i>
Tul-87_KZ	Жамбылская область, Мойынкумский р-н, пос. Уланбель	Тугайный	2004г.	Клещ - <i>D. daghestanicus</i>
Tul-92_KZ	ЗКО, Чингир-кий р-н.	Пойменно-болотный	09.07.1988г.	Клещ - <i>D. marginatus</i>
Tul-93_KZ	ЗКО, Казталовский р-н, Аккулбский а/о.	Пойменно-болотный	23.01.2004г.	Домовая мышь (лат. <i>Mus musculus</i>)
Tul-97_KZ	Павлодарская область, Щербактинский р-н, 5 км от с. Жылы-Булак	Пойменно-болотный	30.05.2013г.	Клещ - <i>Haemaphysalis concinna</i>
Tul-98_KZ	ЗКО, Бокейординский р-н, Уялинский а/о.	Пойменно-болотный	19.12.2011г.	Серый хомячок (лат. <i>Cricetulus migratorius</i>)
Tul-99_KZ	ЗКО, Каратобинский р-н, Аккозинский с/о.	Пойменно-болотный	24.05.2011г.	Большой суслик (лат. <i>Spermophilus major</i>)
Tul-240_KZ	Жамбылская обл. Мойынкумский р-н, пос. Кумосек	Тугайный	10.04.1982г.	Клещ

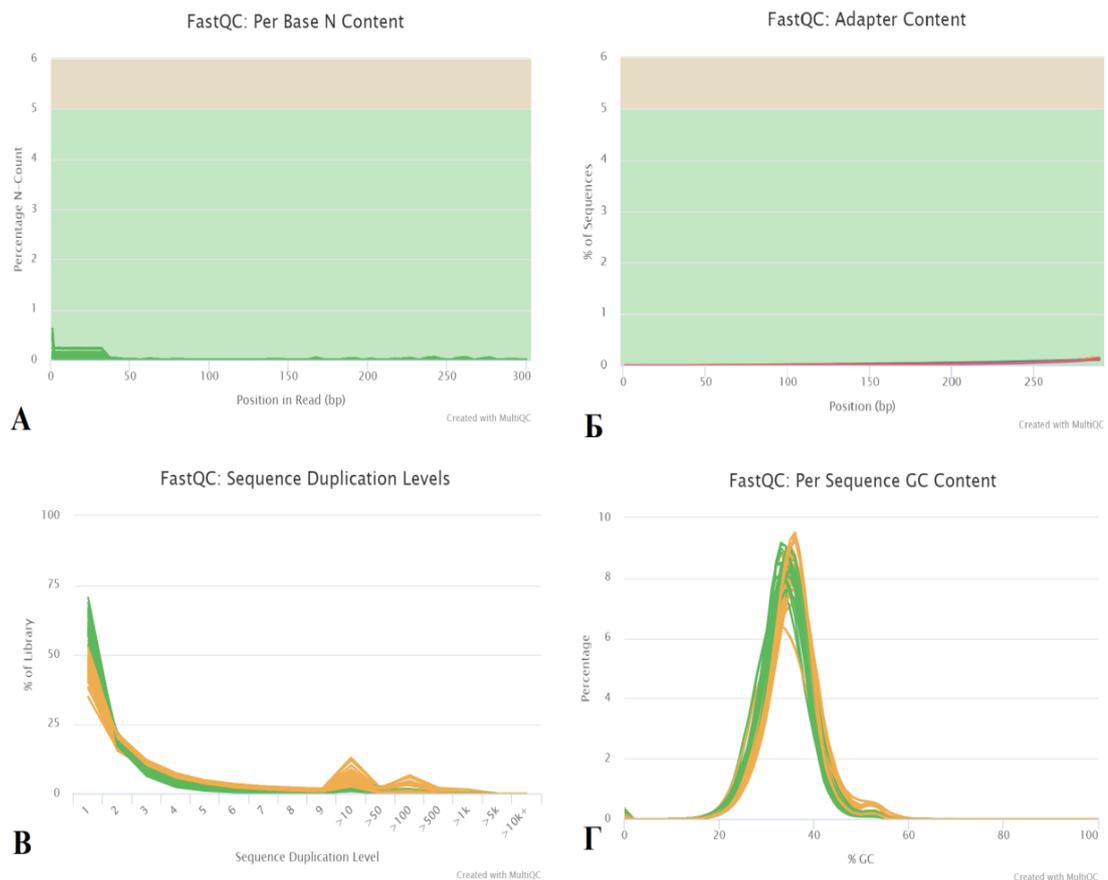
В рамках научно-исследовательской работы было проведено полногеномное секвенирование 40 штаммов *F. tularensis*, количество прочтений которых варьировало от 347926 до 1219022 чтений на образец. На рисунке 12 представлены результаты оценки понуклеотидного качества сырых данных прочтений.



а – график качества прочтений на протяжении 300 циклов секвенирования; б – график количества прочтений и их значения по шкале Phred

Рисунок 12 – График качества сырых прочтений 39 штаммов *F. tularensis*

Согласно результатам оценки сырых данных прочтений, точность секвенирования равна не менее 99,9% (рисунок 12а).



А – содержание «N» (неопределенных) нуклеотидов; Б – содержание последовательностей адаптеров; В – уровень дубликации последовательностей; Г – содержание GC оснований в прочтениях

Рисунок 13 – Графики анализа качества сырых прочтений 40 штаммов *F. tularensis*

Остальные разделы анализа сырых данных, представленные на рисунке 13, также указывают на высокое качество прочтений: низкое содержание N (неопределенных) нуклеотидов (A); низкое содержание последовательностей адаптеров (B); малое соотношение уровня дубликации прочтений по отношению к уникальным прочтениям генома (B); содержание GC оснований (GC%) в прочтениях соответствуют нормальному распределению и в среднем составляет 32,3% (Г).

В целом, полученные данные удовлетворяют необходимым критериям для проведения комплексного сравнительного геномного анализа штаммов *F. tularensis*, циркулирующих в Казахстане.

3.6.1 Анализ результатов полногеномного секвенирования 40 штаммов *Francisella tularensis*

Из-за эндемичности туляремии в Казахстане за последние семьдесят лет были проведены обширные полевые работы. Эта работа позволила нанести на карту ряд природных очагов по всей стране и сформировать коллекцию штаммов. Однако в настоящее время имеется мало информации о генетическом разнообразии циркулирующих штаммов. Данная диссертационная работа является вкладом в восполнение этого пробела. Из 40 штаммов 1 штамм был идентифицирован как *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*., а 39 штаммов идентифицированы как *F. tularensis* subsp. *holartica*. Мы использовали полногеномное секвенирование и генотипирование MLVA *in vitro* для исследуемых 39 штаммов *F. tularensis* subsp. *holartica*, выделенных в Казахстане. Мы сравнили данные MLVA *in vitro* и *in silico*, полученные из данных WGS, а также кластеризацию, достигнутую с помощью MLVA и анализа однонуклеотидных полиморфизмов всего генома (wgSNP). MLVA-7 панель, состоящая из семи локусов VNTR хорошо адаптирована к использованию для изучения генетического разнообразия, наблюдаемому в Казахстане. Вышеупомянутая панель создана с целью обеспечения скринингового генотипирования, пригодного для использования в больших масштабах. Это первая работа, которая получила данные WGS для штаммов подвида *holarctica* циркулирующие на территории Казахстана (Приложение В).

3.6.1.2 Анализ результатов полногеномного секвенирования штамма *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*

Francisella tularensis subsp. *mediasiatica* – наименее изученный подвида *F. tularensis* среди четырех существующих подвида. В рамках выполнения диссертационной работы мы провели полногеномное секвенирование и анализ данных штамма *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 240. Штамм был выделен из суспензии клеща отловленного в Жамбылской области в 1982 году.

Сборка генома с использованием Skesa версии 2.3.0 позволило сформировать 75 контигов общей протяженностью 1791721 пар нуклеотидов, среднее покрытие составляло 71x, значение N50-35408 и GC состав 32,33%. Аннотации генома выполнялись с помощью веб-сервиса RAST и схемой

аннотации RASTtk с параметрами по умолчанию [185]. В результате было обнаружено 1968 генов, кодирующих белки, из которых 493 являются гипотетическими, а также 38 открытых рамок считывания, кодирующих РНК. На основании однонуклеотидных полиморфизмов всего генома было построено дерево методом максимальной экономии (рисунок 14).

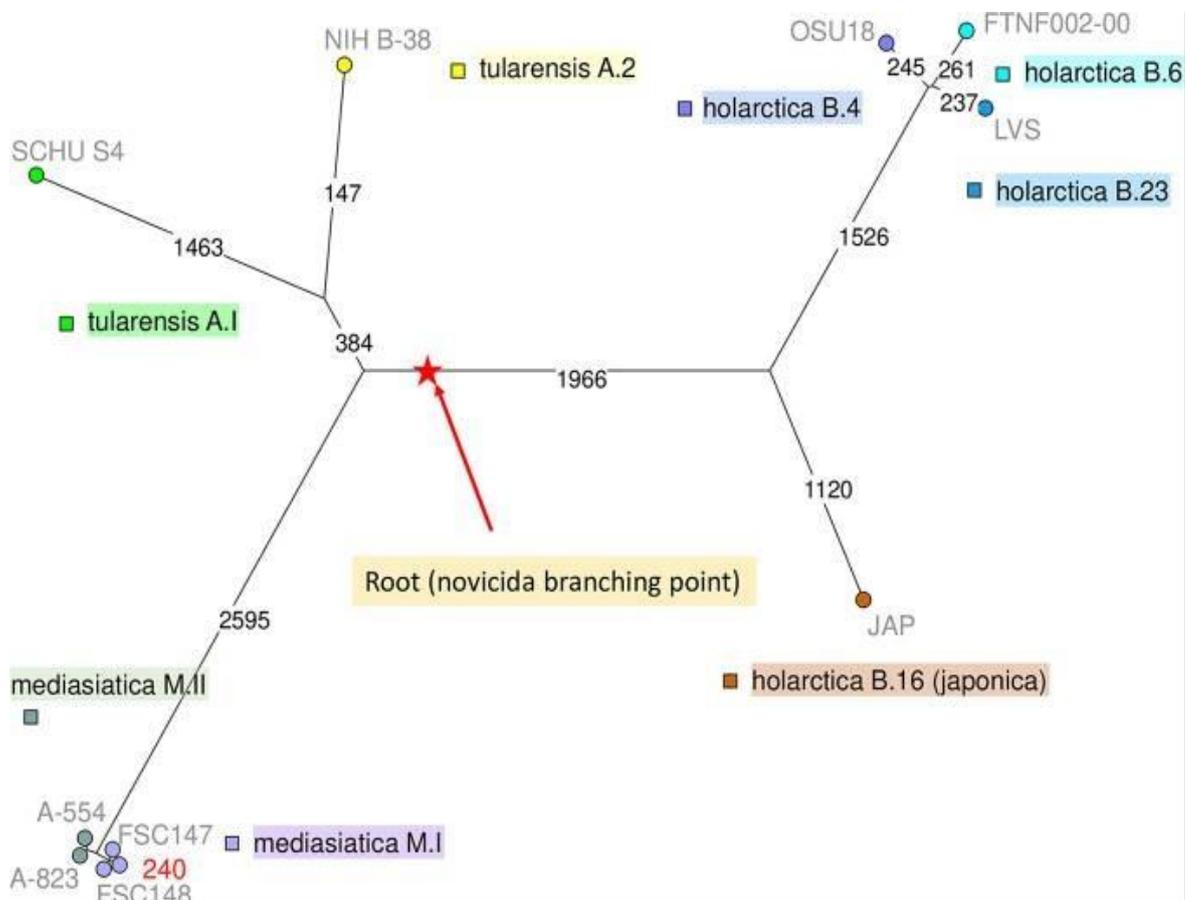


Рисунок 14 – Дерево построенное методом максимального правдоподобия на однонуклеотидных полиморфизмах всего генома штаммов *F. tularensis subsp. mediasiatica*

Полногеномные данные отобранных штаммов и штамма *F. tularensis subsp. mediasiatica* 240 (обозначен красным) были картированы на эталонном геноме SCHU S4 (номер сборки GCA_000008985). В результате было сгенерировано 10953 однонуклеотидных полиморфизмов, размер дерева 11027 (гомоплазия 0,67%). Анализируемый штамм *F. tularensis subsp. mediasiatica* 240 кластеризовался со штаммами подтипов M.I. Между ветвями M.I и M.II от точки ветвления 70 и 44 однонуклеотидных полиморфизма, красная звезда показывает точку ветвления в сторону подвида *novicida*. Важно подчеркнуть, что к подтипам M.I также отнесены штаммы FSC147 и FSC148 выделенные в Казахстане [186], в то время как подтипы M.II на данный момент представлены исключительно штаммами выделенными в Сибири [187].

подсетей. Эти подлинии показывают сильную географическую связь, за исключением подлиний В.12, В.23 и особенно В.42. В соответствии с современными знаниями о его географическом распространении, В.6 не обнаружен в Казахстане в настоящей коллекции [178, р. e0009419-7].

Шесть штаммов, выделенных в 1951-1989 гг. в Восточно-Казахстанской, Акмолинской, Алматинской и Карагандинской областях, определяют новую базальную линию внутри клады *holarctica* В.4. Остальная часть группы В.4 разделена на две подгруппы, одна из которых демонстрирует сильную географическую связь с Северной Америки, а другой с Россией и Западной Европой (Норвегия и Германия). Расширения ветвей от самого последнего общего предка (MRCA) В.4 до кончиков похожи и варьируются от минимум 46 SNP до 56 SNP (рисунок 16).

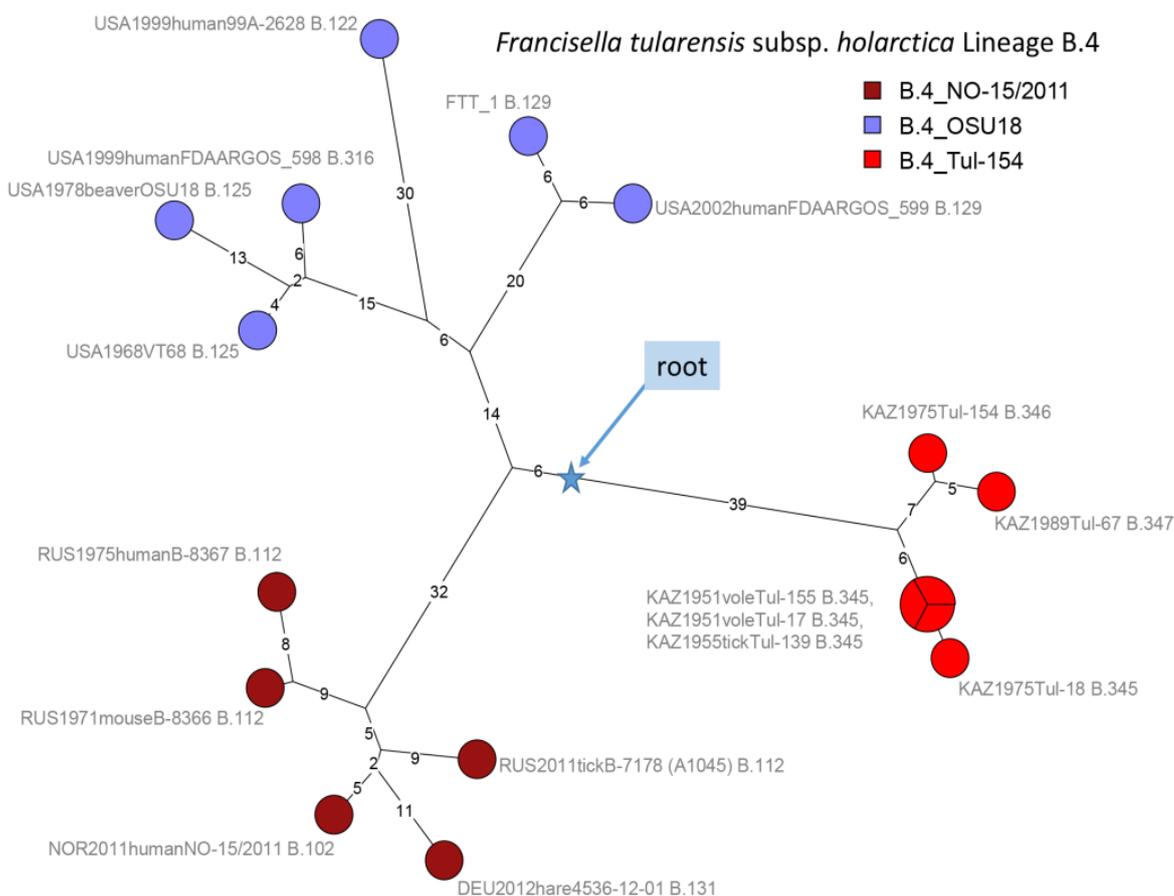


Рисунок 16 – Новая базальная линия внутри клады *holarctica* В.4

Все остальные штаммы относятся к кладе *holarctica* В.12. Шестнадцать принадлежат субкладе В.12_В.23 и семнадцать - субкладе В.12_В.42 [6, с. 29]. На рисунке 17 показано, что идентичные полногеномные генотипы SNP наблюдаются у штаммов, собранных в отдаленных местах в разное время. Штамм Tul-92_KZ, собранный в Западном Казахстане в 1988 году, идентичен штамму Tul-97_KZ, собранному в Павлодаре в 2013 году, то есть двадцать пять лет спустя на расстоянии более тысячи километров. Единственный SNP разделяет Tul-13_KZ, собранный в 2012 году в Западном Казахстане из Tul-71_KZ, собранный

49 годами ранее в Алматинской области, или Tul-52_KZ, выделенный в 2013 году в Актобе из Tul-135_KZ, изолированного шестьдесятю годами ранее в Алматинской области. В обоих случаях самый последний штамм показал предкового генотипа, а единственный SNP в производном генотипе является переходом из G в A, что согласуется с ранее наблюдаемой предвзятостью мутации AT [188].

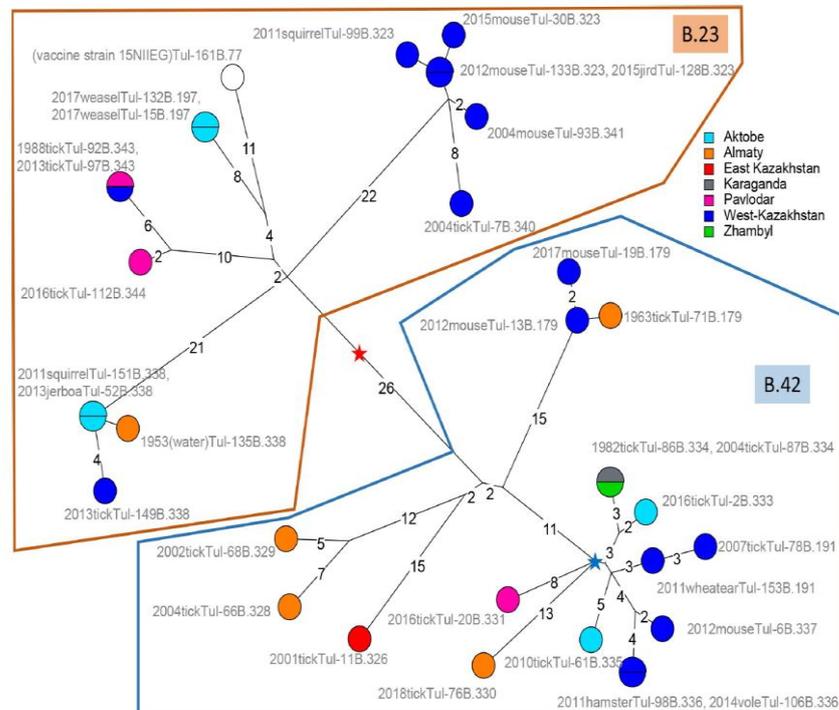


Рисунок 17 – Фокусирование на 33 казахстанских штаммах, принадлежащих к подлиниям B.23 и B.42

Двести пятьдесят четыре SNP были вызваны путем сопоставления по ссылке SCHU_S4 (сборочный номер GCA_000008985). Максимальный размер дерева бережливости - 254 (без гомоплазии). Красная звезда указывает положение MRCA. Синяя звездочка указывает корень политомии B.66, показанной в более широком контексте на рисунке 17. Штаммы помечены годом изоляции, хозяином, Id штамма и назначением CanSNP. Цветовой код отражает географическое происхождение в пределах Казахстана (на региональном уровне). Указана длина отвления больше единицы. Масштаб ветки линейный.

Это указывает на то, что идентичный профиль wgSNP может сохраняться в течение двадцати пяти лет, и усиливает предыдущее наблюдение идентичных генотипов wgSNP в штаммах, собранных в Швеции с разницей в 15 лет [168, p. 1547] и во Франции, Швейцарии и Германии с разницей в 31 год [178, p. e0009419-8]. Некоторые генотипы демонстрируют сильную географическую однородность, в частности, группа из шести штаммов B.23, выделенных в Западном Казахстане в 2004-2015 гг. Они составляют политомию с тремя ветвями, длина которой может достигать восьми SNP. Самый близкий штамм

(от семи до 14 SNP) среди общедоступных данных WGS - это штамм NO-18/2011, выделенный в Норвегии в 2011 году. Напротив, одиннадцать штаммов, происходящих из шести регионов Казахстана, составляют политомию с тремя ветвями, исходящими от синей звезды в подлинцию B.42 (рисунок 18).

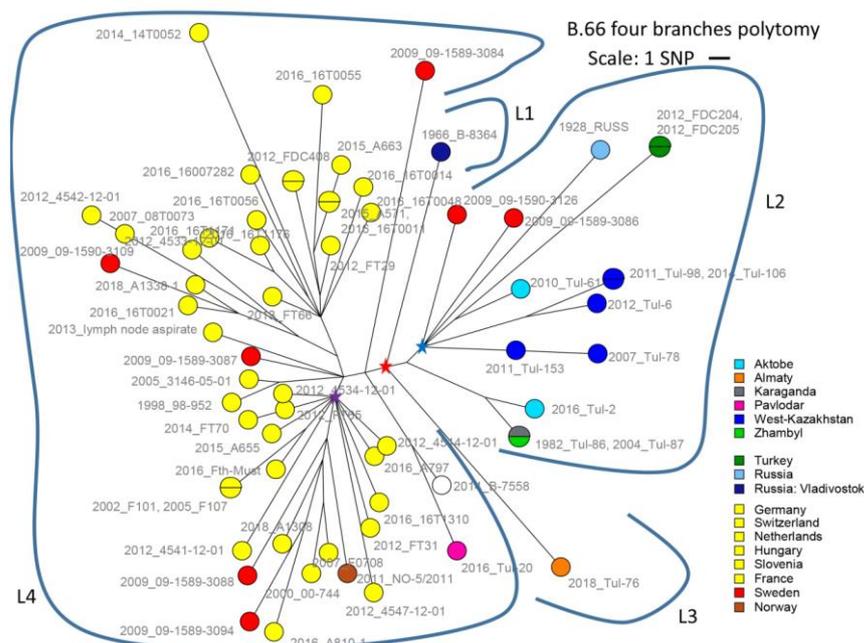


Рисунок 18 – Филогенетический анализ данных wgSNP 64 штаммов, принадлежащих к четырем ветвям B.12/V.42/V.66 политомии

Данные рисунка 18 включают все общедоступные данные WGS, присвоенные этой политомии. С точки зрения номенклатуры canSNP политомия принадлежит B.12 V.42 и включает все ветви, подчиненные B.66. 64 штамма, отнесенных к политомии B.66, были собраны в период с 1928 по 2018 год и определяют четыре ветви, произвольно обозначенные здесь от L1 до L4. От MRCА политомии, обозначенной красной звездочкой и до кончиков, расстояния находятся в диапазоне 5-19 SNP. Ветвь L1 в политомии B.66 представлена одним штаммом B-8364, выделенным на Дальнем Востоке Сибири в 1966 году.

Аналогичным образом ветвь L3 представлена штаммом Tul-76 из Казахстана. L4 с 48 штаммами на сегодняшний день является наиболее представленным в доступных данных WGS. Помимо штамма Tul-20 из Казахстана и штамма B-7558, предположительно из России, он включает штаммы из Западной Европы, в частности из Германии (29 штаммов), в том числе из Скандинавии. В Европе Швеция, по-видимому, имеет особый статус, поскольку штаммы из Швеции присутствуют также в L2 и вносят вклад в одну базальную ветвь в L4. Это наблюдение согласуется с предыдущими сообщениями об относительно высоком генетическом разнообразии в Скандинавии, которые могут предполагать, что Скандинавия является основным источником туляремии в Западной Европе [37, p. 635] или что

Скандинавия предоставляет больше экологических возможностей для долгосрочного сохранения *F. tularensis*. Что касается политомии В.66, Центральная Азия кажется лучшим кандидатом на роль источника, поскольку представлены все четыре ветви.

Триста двадцать пять SNP были идентифицированы путем картирования последовательности генома FSC200 (сборочный номер GCA_000168775). Дерево максимальной экономии имеет размер 325 SNP (без гомоплазии). Длина ветви пропорциональна количеству SNP и колеблется от одного SNP до 14. Красная звездочка указывает положение MRCA политомии. Четыре ветви, произвольно обозначенные от L1 до L4, исходят от красной звезды. Расстояния от красной звезды до кончиков варьируются от пяти (штамм L4 4534-12-01, выделенный в 2012 году в Германии) до 19 (штамм L4 14T0052, выделенный в 2014 году в Германии) SNP. Кружки помечены годом изоляции и Id штамма и окрашены в соответствии с указанным географическим происхождением.

Обе линии L2 и L4 содержат вторичные политомии. Вторичная политомия в L2 содержит шесть ветвей, длина которых от корня (синяя звездочка) до кончиков варьируется от пяти до 14 SNP. Эта политомия отличается географическим разнообразием. Две ветви представлены штаммами, выделенными в Швеции, а две ветви - штаммами из Западного Казахстана. Один из них был выделен от перелетной птицы (*Oenanthe isabellina*) [189]. Основная политомия в L4 (пурпурная звезда) содержит одиннадцать расходящихся ветвей и показана с более конкретным цветовым кодом страны на рисунке 19.

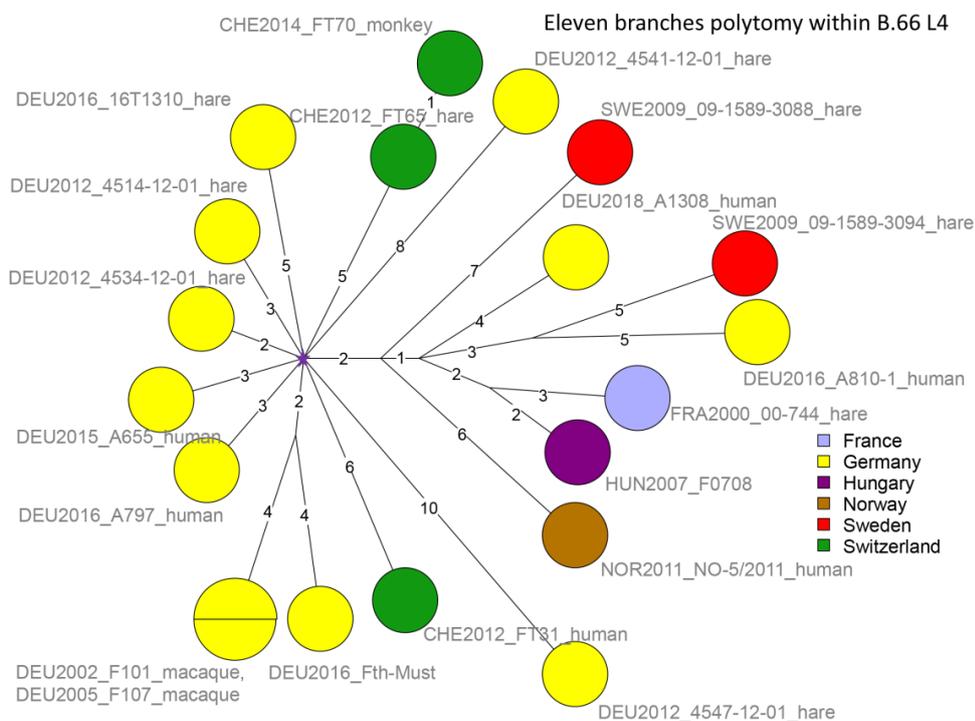


Рисунок 19 – Фокусировка на политомии одиннадцати ветвей в В.12/В.42/В.66/L4

Политомия включает 20 штаммов, выделенных в Европе, преимущественно в Германии, в 2000-2018 гг. Девяносто шесть SNP были идентифицированы путем картирования последовательности генома FSC200 (сборочный номер GCA_000168775). Дерево максимальной экономии имеет размер 96 SNP (без гомоплазии). Длина ответвления от MRCA, обозначенного фиолетовой звездой, до кончиков, варьируется от двух до одиннадцати SNP. Кружки помечены трехбуквенным кодом страны, годом изоляции, идентификатором штамма и хозяином. Они окрашены в соответствии с географическим происхождением.

Восемь ветвей представлены штаммами из Германии и две - штаммами из Швейцарии. Последняя ветвь самая разнообразная и наблюдается в Скандинавии, Франции, Венгрии и Германии. Наиболее интересная интерпретация имеющихся данных состоит в том, что Скандинавия (возможно, Швеция) была заражена по одному разу каждой из двух линий, L2 и L4, возможно, через перелетных птиц, и что вторичное заражение произошло из Скандинавии в Западную Европу, в основном в Германию. Чтобы оценить эту предварительную гипотезу, необходимо знать гораздо больше о причастности к перелетным птицам [190].

3.7 MLVA генотипирование *in vitro*

В настоящее время полногеномное секвенирование (WGS) является самым дискриминационным методом генотипирования, который позволяет выявлять наибольшее количество генетических особенностей в изучаемых штаммах. Тем не менее, для рутинного использования данного метода основными сдерживающими факторами остаются высокая стоимость и сложность биоинформатического анализа. До настоящего времени нет единого алгоритма аннотирования бактериальных геномов, позволяющий охватить весь массив получаемой информации. Так, например, анализ однонуклеотидных полиморфизмов использует последовательности присутствующие во всех анализируемых геномах и автоматически исключает инсерции, делеции связанные с дрейфом генов или внедрением профагов. В большинстве случаев он также упускает тандемные повторы, которые являются высоко дискриминационными маркерами, особенно у видов с высококонсервативным геномом. К сожалению, уровень финансирования молекулярно-генетических исследований бактериальных возбудителей не достаточен, чтобы проводить полногеномное секвенирование всех выделяемых изолятов. В связи с чем, требуется разработка высоко дискриминационного скринингового метода, позволяющего отбирать штаммы, отличающиеся между собой. Наибольшей дискриминацией в отношении *F. tularensis* обладает мультилокусный анализ множественных тандемных повторов MLVA. Самая дискриминационная MLVA панель включает в себя 25 VNTR локусов, однако большинство локусов в различных выборках обладают нулевой дискриминацией, в связи с чем, многие авторы формируют свою панель локусов. Чтобы разработать скрининговый метод генотипирования, мы

оценили дискриминационную возможность MLVA в настоящей коллекции. Пять из 25 локусов VNTR, составляющих полную схему MLVA типирования полиморфны, Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6, Ft-M20 и Ft-M22. Наибольшая дискриминация наблюдалась в локусе FT-M3 в соответствии с предыдущими данными. Двенадцать аллелей и HGDI 0,90 наблюдались среди 39 штаммов. Локус Ft-M6 является вторым по вариабельности с четырьмя аллелями. В локусах Ft-M4, Ft-M20 и Ft-M22, наблюдались три, два и два аллеля соответственно. Пять полиморфных локусов среди 25 классических VNTR определили 18 генотипов в настоящей коллекции (MLVA5 Nur-Султан, таблица 9).

Таблица 9 – Дискриминация VNTR локусов для штаммов, циркулирующих в Казахстане

Название локуса	Число аллелей/генотипов	HGDI (95% доверительный интервал)
Ft-M3	12	0.9042 (0.8730,0.9354)
Ft-M4	3	0.3104 (0.1416,0.4792)
Ft-M6	4	0.6073 (0.4904,0.7242)
Ft-M20A	2	0.1457 (0.0013,0.2902)
Ft-M22	2	0.2672 (0.1072,0.4272)
<i>MLVA5 Nur-Sultan</i>	18	0.9325 (0.8950,0.9700)
<i>insilico-FT-4</i>	2	0.0513 (0.0000,0.1473)
<i>insilico-FT-8</i>	2	0.2672 (0.1072,0.4272)
<i>MLVA7 Nur-Sultan</i>	19	0.9406 (0.9074,0.9738)

Два дополнительных полиморфных локуса VNTR в настоящей коллекции были идентифицированы с помощью анализа *in silico*, *in silico-FT-4_6bp_97bp_2u* и *in silico-FT-8_4bp_152bp_3u* (таблица 3). Согласно анализу *in silico*, они полиморфны в данной коллекции и позволяют разрешить один дополнительный генотип. Согласно нашим исследованиям для генотипирования *F. tularensis* subsp. *holartica*, циркулирующих в Казахстане, целесообразно использовать упрощенную схему генотипирования, которая включает пять из 25 классических VNTR локусов, Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6, Ft-M20A, Ft-M22 и два дополнительных выбранных локуса *in silico-FT-4* и *in silico-FT-8*. Все семь локусов можно амплифицировать в одной реакции ПЦР с разными флуоресцентными красителями и проанализировать на генетическом анализаторе за один прогон.

3.8 *In silico* MLVA для *F. tularensis* subsp. *holartica* из Казахстана

Чтобы удовлетворить будущие потребности с точки зрения совместимости между *in silico* и *in vitro* генотипированием MLVA, мы оценили два различных подхода. В первом более традиционном подходе, чтения секвенирования собирались перед анализом. Сравнивались два популярных

сборщика: SPAdes и SKESA. Во втором подходе, необработанные считывания секвенирования соответствующие локусам VNTR, были извлечены и непосредственно проанализированы для получения генотипов *in silico* MLVA. Подход использует преимущество произведенных считываний 300 пар оснований, которые должны быть достаточно длинными, чтобы заключить в подмножество считываний весь тандемный повтор и несколько фланкирующих нуклеотидов с обеих сторон, даже для самых больших аллелей Ft-M3.

Результаты, полученные с помощью анализа прямого считывания, были полностью идентичны данным *in vitro*. Напротив, в сборках наблюдались несоответствия. SKESA не удалось собрать аллель Ft-M6 в двух штаммах. Ft-M3 не был собран в одиннадцати и пяти штаммах с SPAdes и SKESA соответственно (рисунок 20).

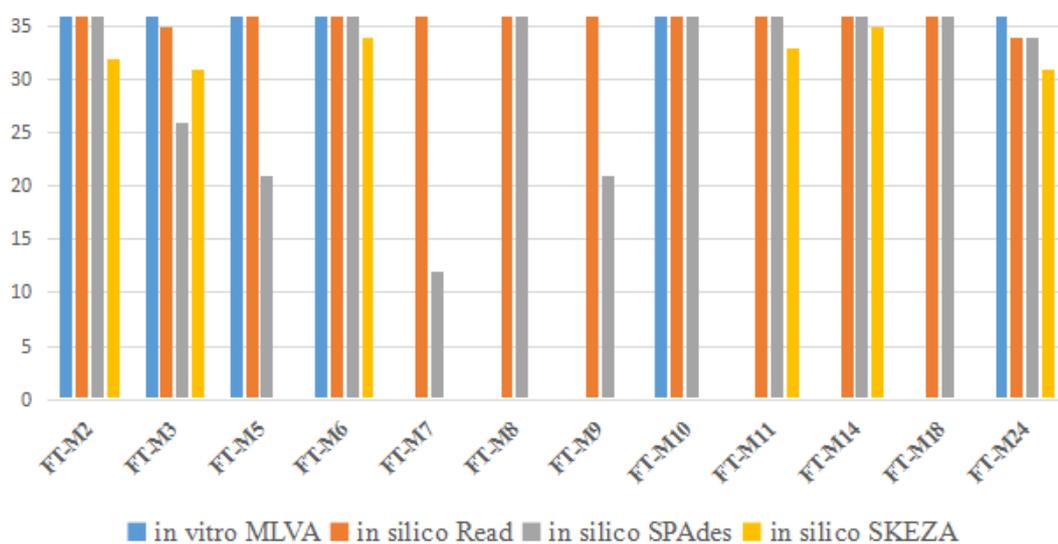


Рисунок 20 – Количество штаммов с установленными аллелями

Кроме того, сборки Ft-M3 SPAdes показали неправильный размер в пяти аллелях. Сборки SKESA предсказали неверный размер *in silico*-Ft-4 во всех штаммах, кроме одного (таблица 10).

Таблица 10 – Количество сырых прочтений, содержащих локус Ft-M3 и фланкирующие праймеры (как указано в таблице 2), обнаруженных в наборе данных 39 последовательных чтений с учетом числа копий повторов и размера набора данных

Образец	Общее количество прочтений	Количество полученных чтений Ft-M3 с использованием <i>in-silico</i> MLVA	Количество повторяющихся единиц в локусе Ft-M3
1	2	3	4
Tul-106_KZ	1085942	39	10
Tul-11_KZ	1780478	84	9
Tul-112_KZ	1581346	17	15
Tul-128_KZ	1465008	3	21

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4
Tul-13_KZ	1147434	17	20
Tul-132_KZ	1337374	3	23
Tul-133_KZ	1300094	3	21
Tul-135_KZ	1376012	4	22
Tul-139_KZ	1134750	4	20
Tul-149_KZ	743210	2	19
Tul-15_KZ	1617068	13	23
Tul-151_KZ	1197914	11	21
Tul-153_KZ	729902	55	9
Tul-154_KZ	2842220	26	16
Tul-155_KZ	1508014	7	20
Tul-161_KZ	1787860	61	16
Tul-17_KZ	1760768	25	20
Tul-18_KZ	1645066	2	20
Tul-19_KZ	957990	29	17
Tul-2_KZ	1828480	64	10
Tul-20_KZ	873296	61	10
Tul-30_KZ	729482	38	12
Tul-52_KZ	1390580	14	23
Tul-6_KZ	2051798	90	10
Tul-61_KZ	1347332	36	9
Tul-66_KZ	695852	13	14
Tul-67_KZ	1316218	10	13
Tul-68_KZ	821430	4	14
Tul-7_KZ	1582146	5	21
Tul-71_KZ	1375426	15	17
Tul-76_KZ	932356	9	9
Tul-78_KZ	984536	20	9
Tul-86_KZ	1089742	75	10
Tul-87_KZ	922916	73	10
Tul-92_KZ	1473396	6	16
Tul-93_KZ	1769000	7	21
Tul-97_KZ	2438044	14	16
Tul-98_KZ	1310072	55	10

В целом, прямой анализ 300 бр чтений показал себя значительно лучше, чем анализ сборок. Как и ожидалось, количество восстановленных чтений пропорционально зависит от размера аллеля VNTR, как показано для Ft-M3.

3.9 Кластеризация *F. tularensis subsp. holarctica* с использованием MLVA и соответствие с canSNP

На основе семи переменных локусов 39 штаммов были сгруппированы в 19 генотипов (рисунок 21).

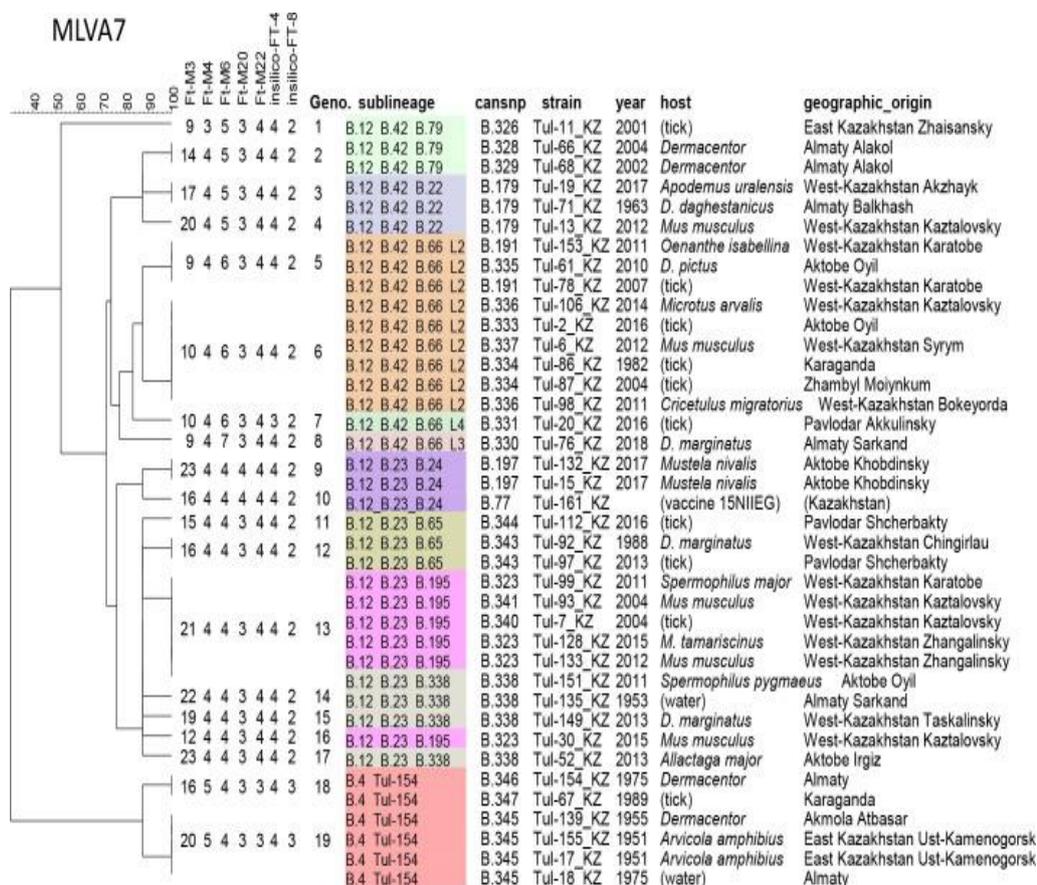


Рисунок 21 – MLVA-кластеризация 39 казахстанских штаммов

Данные MLVA для семи полиморфных локусов были кластеризованы с использованием метода UPGMA. Основные подлинии canSNP выделены цветом.

Десять генотипов уникальны, пять генотипов являются общими для двух штаммов. Четыре наиболее частых генотипа разделяют 3, 4, 6 и 6 штаммов соответственно. Одиннадцать штаммов, принадлежащих к политомии В.66 правильно сгруппированы. В более общем плане группы В.4, В.12_В.23 и В.12_В.42 сгруппированы глобально, как и ожидалось из анализа wgSNP. Видны некоторые филогенетические несоответствия терминальных ветвей, где MLVA не конгруэнтна филогенезу wgSNP, из-за гомоплазии, свойственной полиморфизму тандемных повторов. Большинство этих концевых ветвей MLVA определяется только сильно изменчивым локусом Ft-M3.

Мы представляем результаты генотипирования тридцати девяти *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, выделенных в Казахстане, включая вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, с использованием MLVA, canSNP и wgSNP.

Впервые получены полногеномные данные штаммов *Francisella tularensis*, циркулирующих в Казахстане. При помощи электронной системы QGIS разработана карта по визуализации распределения генотипов штаммов *Francisella tularensis* по территории Республики Казахстан на основании

полногеномных данных для усовершенствования контроля за особо опасной инфекцией, как туляремия (рисунок 22).

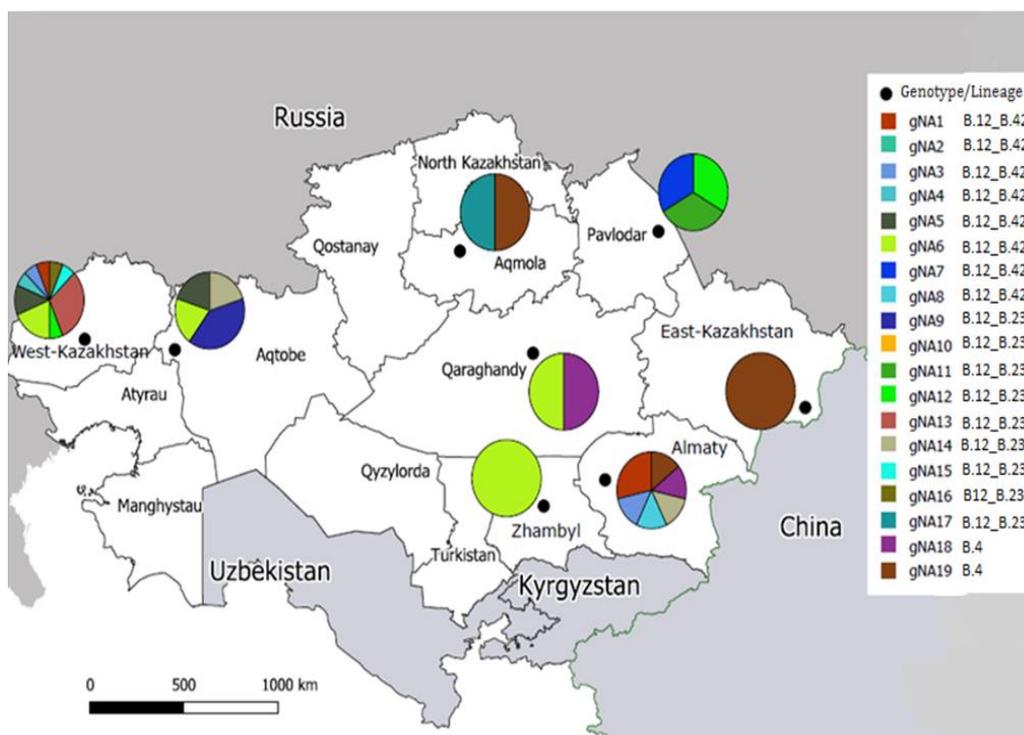


Рисунок 22 – Карта распределения генотипов на территории Казахстана

Один из самых больших генотипов gNa6, объединивший в себя 6 штаммов, которые выделены на разных географических территориях, таких как Западно-Казахстанская, Актюбинская, Жамбылская и Карагандинская областях. Это указывает на то, что происходит смешивание генотипов за счет исторического беспрепятственного передвижения животных и клещей.

Крупный генотип gNa13, объединивший в себя 5 штаммов, выделенных исключительно в Западно-Казахстанской области.

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований создана коллекция образцов ДНК 148 штаммов *Francisella tularensis*, при этом наибольшее количество штаммов получены из Западно-Казахстанской области. Для исключения контаминации и видовой идентификации образцов ДНК проведен анализ нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена. Идентифицированы 2 подвида: *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

Нами представлены результаты полногеномного секвенирования тридцати девяти штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica*, выделенные в Казахстане, включая вакцинный штамм 15 НИИЭГ, с использованием MLVA, canSNP и wgSNP. Генотипирование MLVA проводили по классической схеме генотипирования, включающей 11 локусов [134], что согласуется с предыдущими сообщениями пять из подмножества десяти локусов, выбранных Vogler et al. были вариабельными среди проанализированных штаммов [154, p. 2477, p. 2481; 191]. Для генотипирования изолятов, циркулирующих в Центральноазиатском регионе, мы предлагаем новую панель MLVA-7, объединяющую эти пять классических локусов VNTR и два дополнительных VNTR, идентифицированных *in silico* анализом общедоступных данных WGS. Предложенный *in silico* сценарий генотипирования MLVA, основанный на прямом анализе необработанных считываний длиной 300 п.н. удалось правильно идентифицировать все аллели в 39 штаммах. Следовательно, MLVA7 представляет собой один анализ ПЦР, совместимый с анализом *in silico* WGS, который должен облегчить выбор штаммов для секвенирования и контроля качества идентичности штаммов.

На основе анализа wgSNP у *F. tularensis* subsp. *holarctica* выделены четыре генетические группы: В.4, В.6, В.12 и В.16 [192, 193]. В нашем исследовании шесть штаммов, выделенных в 1951-1989 гг. Восточном и Центральном Казахстане, были отнесены к генетической кладе В.4. Принадлежность штаммов к генетической группе В.4 были ранее обнаружены в Северной Америке, Китае и Северо-Восточной Европе [194]. Клада В.4 является относительно распространенным в Азии, а секвенированные изоляты из Казахстана позволяют определить более базальную точку ветвления. Субклада В.16 присутствует также в Японии, Турции, Тибете и Австралии, увеличивают вероятность того, что *F. tularensis* subsp. *holarctica* имеет азиатское происхождение [38, p. 866]. Остальные 33 штамма из Казахстана отнесены к генетической группе В.12, которая широко распространена в Центральной и Восточной Европе [195].

Туляремия была и остается предметом важного мониторинга в Казахстане из-за ее зоонозного потенциала. Ряд природных очагов охарактеризованы как в Казахстане, так и за его пределами, однако глобальная экология и филогеография этого важного патогена остаются малоизученными [196]. Например, строгая клональность эволюции инфекционного агента предсказывает, что он возник в одном месте в пространстве и времени, а

географическое происхождение бактерии *F. tularensis* неизвестно. Одна из причин такой ситуации заключается в том, что, несмотря на значительный прогресс, достигнутый за последние пятнадцать лет благодаря появлению мощных инструментов генотипирования и важные усилия с точки зрения производства WGS, данные по многим странам отсутствуют. Другая причина заключается в том, что филогеография *F. tularensis* характеризуется обнаружением почти идентичных штаммов в очень отдаленных местах и/или в очень разные периоды времени [194, p. 330]. Третья причина – это слабое знание филогенетических близких видов бактерии *F. tularensis*, включая *F. novicida*, информация о них послужила самым веским аргументом в пользу африканского происхождения как *Mycobacterium tuberculosis* и *B. anthracis* [197, 198].

Полученные результаты в ходе выполнения диссертационной работы подтверждают важные особенности филогеографии *F. tularensis*, в частности, растущее количество свидетельств в пользу способности бактерий к долгосрочному сохранению в сочетании со способностью к распространению на большие расстояния. Это позволяет предположить, что *F. tularensis* обладает способностью к «увекочиванию», то есть к долгосрочному поддержанию без генетических изменений, в состоянии, предполагающем низкий уровень репликации [196, p. 360]. Жизнеспособное, но не культивируемое состояние было предложено для объяснения длительного сохранения [199, 200]. Однако имеющиеся доказательства все еще хрупкие и ограниченные. Также такое поведение не согласуется с относительно однородной длиной ветвей от корня до кончиков, наблюдаемой у *F. tularensis* [7, p. e0183714-3].

Данные из многих географических регионов отсутствуют, и, кроме того, большинство исследований до сих пор представляли собой ретроспективный анализ исторических коллекций. Исследования потребовали повторного культивирования штаммов до подготовки новых экстрактов ДНК. Формально исключить перекрестное загрязнение нельзя, и для подтверждения настоящих наблюдений потребуются дополнительные исследования. В частности, настоятельно рекомендуется подготовить серию ДНК для последующего секвенирования во время самого первого выделения и роста патогена. Эта партия ДНК может быть подтверждена генотипированием MLVA7 *in vitro*, а полученные данные могут быть заархивированы в онлайн-базе данных MLVA *F. tularensis*. Этот исходный генотип может служить в качестве контроля идентификации ДНК для возможных данных WGS, которые могут быть генотипированы *in silico*, по крайней мере, если считывания секвенирования длиннее 300 п.н.

Интересно, что благодаря обширному полевому отбору проб в природных очагах, который регулярно проводится в Казахстане, один штамм был выделен от птицы каменки - плясуньи *Isabellina*, случайно пойманной в норе грызунов в Западном Казахстане [189, p. 78]. Хотя имеются данные, что птицы являются потенциальными распространителями *F. tularensis* [201], мы нашли очень мало прямых доказательств в литературе с участием птиц, мигрирующих [190,

р. 857] или падальщиков [202]. Каменька-плясунья является перелетной насекомоядной птицей. Весной откладывает яйца в норах грызунов. В период с марта по август птицы посещают ряд нор. После этого начинаются зимние миграции, и грызуны возвращаются в норы, чтобы впасть в спячку. Некоторые блохи являются общими между данной птицей и грызунами [203]. География распространения каменьки-песуньи простирается от Северо-Восточной Греции до Северо-Восточного Китая. Зимует данная птица в Африке, на Аравийском полуострове и в Индии, где совместно зимует с северной обыкновенной каменкой, которая имеет еще более широкий географический ареал, включая Скандинавию, Аляску, северо-восток Канады. Ранее предполагалась потенциальная роль каменьки-песуньи в распространении чумы [204].

Такой вывод поможет объяснить некоторые аспекты филогеографии бактерий, включая распространение на большие расстояния и долгосрочное сохранение (в почвенной экосистеме, норах). Это означало бы, что птицы - здоровые носители. Птицы будут инфицированы в местах своего размножения и заразят других перелетных птиц, таких как северная каменка, в местах нагула. Участие перелетных птиц также может быть рабочей гипотезой о датировке появления клона *F. tularensis*. Это должно было последовать за концом последнего пика оледенения около 20000 лет назад. Считается, что каменка-песунья прибыла в нижнее Поволжье примерно 10 000 лет назад [203, с. 215].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, достигнуты благодаря новейшим методам, разработанным в области молекулярно-генетических исследований, что соответствует мировой практике исследований такого рода.

На основании проведенного исследования сделаны следующие **выводы**:

1. Создана коллекция образцов ДНК 148 штаммов *Francisella tularensis* из 8 областей Казахстана, пригодных для генотипирования методом MLVA, ПЦР и полногеномного секвенирования. При этом наибольшее количество штаммов получены из Западно-Казахстанской области, что составляет 41,89% от общего количества штаммов. Во всех образцах установлена высокая степень очистки ДНК, на что указывает соотношение длин волн 260/280 в среднем диапазоне 1,8 при концентрации ДНК от 2 до 78 нг/мкл. Для исключения контаминации и видовой идентификации образцов ДНК проведен анализ нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена. В результате нуклеотидные последовательности исследованных образцов отнесены к виду *F. tularensis*, поскольку имели максимальную идентичность (99-100%). Внутривидовая идентификация изученных штаммов *F. tularensis* методом ПЦР на основе праймеров к гену RD1, позволила идентифицировать 2 подвида: *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

2. Разработан протокол генотипирования *F. tularensis* методом мультилокусного анализа 11 VNTR повторов, который включает в себя состав реакционной смеси для каждой из пяти смеси праймеров, режим амплификации и фрагментный анализ. На основании разработанного протокола MLVA типирования выпущены методические рекомендации, которые могут быть использованы специалистами медицинских и ветеринарных лабораторий.

3. MLVA типирование 148 штаммов *Francisella tularensis* по 11 гипервариабельным VNTR маркерам позволило определить суммарный индекс разнообразия Хантера-Гастона (HGDI) MLVA-11, который составил 0,9295. Разработана упрощенная схема генотипирования, которая включает основные локусы: Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6, Ft-M20A, Ft-M22 и два дополнительных - *in silico*-FT-4 и *in silico*-FT-8. Все семь локусов можно амплифицировать одновременно в ПЦР реакции. Предложенная схема генотипирования обладает более высокой дискриминационной способностью и позволяет определить 19 генотипов у 39 штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica*, в то время как классическая схема (по 25 VNTR маркерам) способна определить 18 генотипов.

4. Определено генетическое разнообразие выделенных на территории РК 148 штаммов *F. tularensis* на основании MLVA-11. Кластеризация штаммов с построением дендрограммы и минимальных остовных деревьев, позволило установить 30 генотипов, из которых 6 генотипов представлены единичными штаммами. Генотипы, объединившие в себя 5 и более штаммов, выделены на разных географических территориях, что указывает на смешивание генотипов

за счет беспрепятственного передвижения животных и клещей по территории Казахстана в длительном временном отрезке.

5. Впервые в Казахстане проведено полногеномное секвенирование 40 штаммов *F. tularensis*: 39 штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* и 1 штамм подвида *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Штамм *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 240 оказался идентичен со штаммами подтипов МІ. Анализ 39 штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* позволил подтвердить две линии, а именно В.4 и В.12. Полученные результаты и их сравнение с базой данных (Генбанк) подтверждает более широкое распространение генотипа В.4 в Азии, что подтверждается наличием базальной точки ветвления в этом субкладе. На основании полученных данных подтверждена гипотеза азиатского происхождения *F. tularensis*, а обнаружение идентичных генотипов у штаммов, разделенных большими временными и географическими расстояниями, подтверждает способность бактерий к длительному сохранению и быстрому распространению на большие территории. Изоляция *F. tularensis* subsp. *holarctica* от птиц вида *Isabellina*, позволяет предположить большую роль птиц в распространении данного возбудителя.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Dennis D.T., Inglesby T.V., Henderson D.A. et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management // *Jama*. – 2001. – Vol. 285. – P. 2763-2773.
- 2 Kubelkova K., Macela A. Putting the Jigsaw Together - A Brief Insight Into the Tularemia // *Open Life Sci.* – 2015. – Vol. 10. – P. 195-216.
- 3 Мека-Меченко Т., Аикимбайев А., Кунитца Т. et al. Clinical and epidemiological characteristic of tularemia in Kazakhstan // *Przegl. Epidemiol.* – 2003. – Vol. 57. – P. 587-591.
- 4 Куница Т.Н., Избанова У.А., Мека-Меченко Т.В. и др. Современные клинико-эпидемические особенности проявления туляремии в Казахстане на урбанизированных территориях // *Жизнь без опасностей*. – 2013. – Т. 8, №2. – С. 41-46.
- 5 Куница Т.Н., Мека-Меченко Т.В., Лухнова Л.Ю. и др. Заболеваемость туляремией в Казахстане // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2001. – №1(81). – С. 52-55.
- 6 Избанова У.А., Куница Т.Н., Мека-Меченко Т.В. и др. Эпизоотическая и эпидемическая обстановка по туляремии в Казахстане в 2011-2012 гг. // *Дезинфекция, антисептика*. – 2013. – Т. 4, №2. – С. 28-34.
- 7 Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G. et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* // *JPO*. – 2017. – Vol. 12. – P. e0183714.
- 8 Olsufjev N., Meshcheryakova I. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912 // *Microbiology*. – 1983. – Vol. 33. – P. 872-874.
- 9 Derzelle S., Thierry S. Genetic diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: genotyping methods in forensic and epidemiologic investigations // *Biosecur Bioterror*. – 2013. – Vol. 11. – P. 166-176.
- 10 Guigon G., Cheval J., Cahuzac R. et al. MLVA-NET—a standardized web database for bacterial genotyping and surveillance // *Euro Surveill*. – 2008. – Vol. 13, №19. – P. 18863.
- 11 Vergnaud G., Girault G., Thierry S. et al. Comparison of French and Worldwide *Bacillus anthracis* Strains Favors a Recent, Post-Columbian Origin of the Predominant North-American Clade // *PloS One*. – 2016. – Vol. 11, №2. – P. e0146216-1-e0146216.
- 12 McLendon M.K., Apicella M.A., Allen L.H. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare // *Annu Rev Microbiol*. – 2006. – Vol. 60. – P. 167-185.
- 13 Penn R.L. *Francisella tularensis* (Tularemia) // In book: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. – Amsterdam: Elsevier, 2010. – P. 2927-2937.
- 14 Friend M. Tularemia. – Reston: Geological Survey, 2006. – 68 p.
- 15 Pollitzer R. History and Incidence of Tularemia in the Soviet Union. – NY.: Fordham University. – 1967. – 366 p.

- 16 Голов Д.А., Князевский А.Н., Бердников В.А. и др. Чумоподобные заболевания (туляремия?) на р. Урал в Оренбургской губернии весной 1928 г. // Вестник микробиол., эпидемиол. и паразитол. – 1928. – №7. – С. 301-326.
- 17 Айкимбаев М.А. Туляремия в Казахстане. – Алма-Ата, 1982. – 184 с.
- 18 Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G. Taxonomic Outline of the Procaryotes Release 5.0. Bergey's Manual of and Systematic Bacteriology // Springer. – 2004.
- 19 Oyston P.C. Francisella tularensis: unravelling the secrets of an intracellular pathogen // J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 57. – P. 921-930.
- 20 Francisella is a genus of g-proteobacteria in the family Francisellaceae // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/262/>. 10.05.2020.
- 21 Whipp M.J., Davis J.M., Lum G. et al. Characterization of a novocida-like subspecies of Francisella tularensis isolated in Australia // J. Med. Microbiol. – 2003. – Vol. 53. – P. 839-842.
- 22 Bioterrorism agent/Diseases Atlanta 2014 // <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>. 10.02.2020.
- 23 Saslaw S., Eigelsbach H.T., Prior J.A., Wilson H.E., Carhart S. Tularemia vaccine study. II Respiratory challenge // Arch. Intern. Med. – 1961. – Vol. 107. – P. 702-714.
- 24 McGovern T.W., Christopher G.W., Eitzen E.M. Cutaneous manifestations of biological warfare and related threat agents // Arch. Dermatol. – 1999. – Vol. 135. – P. 311-322.
- 25 Eden J.S., Rose K.J., Shi M. et al. Francisella tularensis ssp. holarctica in ringtail possums, Australia // Emerg. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 23. – P. 1198-1201.
- 26 Олсуфьев Н.Г., Мещерякова И. С. Природные очаги туляремии и их антропогенная трансформация // Тез. докл. 12-й всесоюз. конф. по природной очаговости болезней. – М., 1989. – С. 119-121.
- 27 Sinclair R., Boone S.A., Greenberg D. et al. Persistence of category A select agents in the environment // Appl. Environ. Microb. – 2005. – Vol. 74. – P. 555-563.
- 28 Reif K.E., Palmer G.H., Crowder D.W. et al. Restriction of *Francisella novicida* genetic diversity during infection of the vector midgut // *PLOS Pathog.* – 2014. – Vol. 10. – P. e1004499-1-e1004499-11.
- 29 Куница Т.Н. Современные особенности туляремии в Казахстане. – Саарбрюккен. 2014. – 85 с.
- 30 Куница Т.Н., Айкимбаев А.М. Темиралиева Г.А. и др. К вопросу о таксономии рода *Francisella* // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. – 2001. – №4. – С. 195-199.
- 31 Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G. et al. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964–2004 // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12. – P. 1113-1118.
- 32 Farlow J., Wagner D.M., Dukerich M. et al. *Francisella tularensis* in the United States // Emerg. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 11. – P. 1835-1841.
- 33 Kugeler K.J., Mead P.S., Janusz A.M. et al. Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States // Clin. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 48. – P. 863-870.

- 34 Antonation K.S., Bekal S., Cote G. et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Francisella tularensis* from Quebec, Canada // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2015. – Vol. 60. – P. 328-333.
- 35 Larson M.A., Fey P.D., Hinrichs S.H. et al. *Francisella tularensis* bacteria associated with feline tularemia in the United States // *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 20. – P. 2068-2071.
- 36 Svensson K., Granberg M., Karlsson L. et al. A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4. – P. e8360-4-e8360-14.
- 37 Karlsson E., Svensson K., Lindgren P. et al. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of Eurosiberian tularaemia // *Environ. Microbiol.* – 2013. – Vol. 15. – P. 634-645.
- 38 Lu Y., Yu Y., Feng L. et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* from Tibet, China: evidence for an asian origin and radiation of holarctica-type tularemia // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2016. – Vol. 7. – P. 865-868.
- 39 Rijks J.M., Kik M., Koene M.G. et al. Tularaemia in a brown hare (*Lepus europaeus*) in 2013: first case in the Netherlands in 60 years // *Euro Surveill.* – 2013. – Vol. 18, №49. – P. 20655.
- 40 Nordstoga A., Handeland K., Johansen T.B. et al. Tularaemia in Norwegian dogs // *Vet. Microbiol.* – 2014. – Vol. 173. – P. 318-322.
- 41 Hestvik G., Uhlhorn H., Sodersten F. et al. Tularaemia in European Brown Hares (*Lepus europaeus*) and Mountain Hares (*Lepus timidus*) characterized by Histopathology and Immunohistochemistry: organ lesions and suggestions of routes of infection and shedding // *J. Comp. Pathol.* – 2017. – Vol. 157. – P. 103-114.
- 42 Morner T., Sandstrom G., Mattsson R. et al. Infections with *Francisella tularensis* biovar palaeartica in hares (*Lepus timidus*, *Lepus europaeus*) from Sweden // *J. Wildl. Dis.* – 1988. – Vol. 24. – P. 422-433.
- 43 Gyuranecz M., Szeredi L., Makrai L. et al. Tularemia of European brown hare (*Lepus Europaeus*): a pathological, histopathological and immunohistochemical study // *Vet. Pathol.* – 2010. – Vol. 47. – P. 958-963.
- 44 Origgi F.C., Pilo P. *Francisella tularensis* clades B.FTN002-00 and B.13 are associated with distinct pathology in the European Brown hare (*Lepus europaeus*) // *Vet. Pathol.* – 2016. – Vol. 53. – P. 1220-1232.
- 45 Sissonen S., Rossow H., Karlsson E. et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies holarctica in Finland, 1993-2011 // *Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 47. – P. 701-706.
- 46 Kilic S., Celebi B., Acar B. et al. In vitro susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* from Turkey // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 45. – P. 337-341.
- 47 Wang Y., Peng Y., Hai R. et al. Diversity of *Francisella tularensis* subsp. holarctica lineages, China // *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 20. – P. 1191-1194.
- 48 Zhang F., Liu W., Wu X.M. et al. Detection of *Francisella tularensis* in ticks and identification of their genotypes using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis // *BMC Microbiol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 152-1-152-5.

- 49 Larsson P., Oyston P.C., Chain P. et al. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia // Nat. Genet. – 2005. – Vol. 37. – P. 153-159.
- 50 Pomerantsev A.P., Obuchi M., Ohara Y. Nucleotide sequence, structural organization, and functional characterization of the small recombinant plasmid pOM1 that is specific for *Francisella tularensis* // Plasmid. – 2001. – Vol. 46. – P. 86-94.
- 51 Thomas R., Johansson A., Neeson B. et al. Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 50-57.
- 52 Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C. et al. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – P. 30-36.
- 53 Lai X.H., Golovliov I., Sjostedt A. Expression of IglC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis* // Microb. Pathog. – 2004. – Vol. 37. – P. 225-230.
- 54 Nano F.E., Schmerk C. The *Francisella* Pathogenicity Island // Animals of the New York academy of sciences. – 2007. – Vol. 1105. – P. 122-137.
- 55 Baron G.S., Nano F.E. MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida* // Mol. Microbiol. – 1998. – Vol. 29. – P. 247-259.
- 56 Lauriano C.M., Barker J.R., Yoon S.S. et al. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 4246-4249.
- 57 Dryselius R., Hjertqvist M., Mäkitalo S. et al. Large outbreak of tularaemia, central Sweden, July to September 2019 // Eurosurveillance. – 2019. – Vol. 24. – P. 1-5.
- 58 Borlu A., Benli A.R., Doganay M. Epidemiological features of tularaemia in Central Anatolia, Turkey // Tropical Doctor – 2019. – Vol.49. – P. 264-268.
- 59 Herriman R. Tularemia in the US: Increase in cases, different states hardest hit // <http://www.theglobaldispatch.com/tularemia-in-the-us-increase>. 10.04.2020.
- 60 Faber M., Heuner K., Jacob D. et al. Tularemia in Germany-A Re-emerging Zoonosis // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2018. – Vol. 8. – P. 40-1-40-10.
- 61 Куница Т.Н., Избанова У.А., Ерубает Т.К. и др. Природная очаговость туляремии в Казахстане: монография. – Алматы: КНЦКЗИ, 2019. – 97 с.
- 62 Барановский Л.М., Грицай З.Н., Бунимович А.Г. и др. К эпидемиологии туляремии в Семипалатинской области // Журнал микробиол. эпидемиол. и иммунологии. – 1948.– №1.– С. 32-33.
- 63 Ерубает Т.К. Особенности эпидемиологии зоонозных инфекций в Восточно-Казахстанской области: автореф. ... док. мед. наук: 14.02.02. – Бишкек, 2012. – 39 с.

- 64 Безверхний А.В. Комплексная эпидемиологическая разведка зоонозных инфекций в Джунгарском Алатау: автореф. ... канд. мед. наук: 14.00.30. – Алматы, 1995. – 22 с.
- 65 Айкимбаев М.А. Туляремия в Казахстане: дис. ... канд. мед. наук. – Алма-Ата, 1967. – 400 с.
- 66 Амиржанов М.А., Мазуров В.И., Филиппова Т.М. и др. О природной очаговости туляремии в Гурьевской области // Здравоохранение Казахстана. – 1979. – №12. – С. 16-17.
- 67 Куанбаев Д.Н., Айкимбаев М.А., Чимиров О.Б. и др. Новый природный очаг туляремии в Актюбинской области в зоне проектируемого канала Обь – Амударья // Матер. 12-й межреспубл. науч.-практ. конф. противочумных учрежд. Средней Азии и Казахстана по профилактике чумы. – Алма-Ата, 1985. – С. 261-262.
- 68 Филиппова Т.М., Абилова С.Т., Амиржанов М.А. Ландшафтно-географическая районирование в Гурьевской области по туляремии // Здравоохранение Казахстана. – 1981. – №4. – С. 21-22.
- 69 Слудский А.А., Варшавский С.Н., Исмаилов М.И. и др. Млекопитающие Казахстана: в 4 т. – Алма-Ата, 1969. – Т. 1. – 455 с.
- 70 Mörner T. The ecology of tularaemia // Rev. Off. Int. Epizoot. – 1992. – Vol. 11. – P. 1123-1130.
- 71 Hopla C. E. The ecology of tularemia // Adv. Vet. Sci. Comp. Med. – 1974. – Vol. 18. – P. 25-53.
- 72 Origgi F.C., Frey J., Pilo P. Characterisation of a new group of *Francisella tularensis* subsp. *Holarctica* in Switzerland with altered antimicrobial susceptibilities, 1996 to 2013 // Euro Surveill. – 2014. – Vol. 19. – P. 208-258.
- 73 Rodriguez-Pastor R., Escudero R., Vidal D. et al. Density-dependent prevalence of *Francisella tularensis* in fluctuating vole populations, Northwestern Spain // Emerg. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 23. – P. 1377-1379.
- 74 Park C.H., Nakanishi A., Hatai H. et al. Pathological and microbiological studies of Japanese Hare (*Lepus brachyurus angustidens*) naturally infected with *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* // J. Vet. Med. Sci. – 2009. – Vol. 71. – P. 1629-1635.
- 75 Telford S.R., Goethert H.K. Toward an understanding of the perpetuation of the agent of tularemia // Front. Microbiol. – 2010. – Vol. 1. – P. 150-1-150-7.
- 76 WHO Guidelines of Tularemia / World Health Organization. – Geneva, 2007. – 125 p.
- 77 Origgi F.C., König B., Lindholm A.K. et al. Tularemia among free-ranging mice without infection of exposed humans, Switzerland, 2012 // Emerg. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 21. – P. 133-135.
- 78 Sjöstedt A. B. *Francisella* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: handbook. – NY., 2015. – P. 1-18.
- 79 Vidal D., Alzaga V., Luque-Larena J.J. et al. Possible interaction between a rodenticide treatment and a pathogen in common vole (*Microtus arvalis*) during a population peak // Sci. Total Environ. – 2009. – Vol. 408. – P. 267-271.

80 Parker H., Nummi P., Hartmann G. et al. Invasive North American beaver *Castor canadensis* in Eurasia: a review of potential consequences and a strategy for eradication // *Wildlife Biol.* – 2012. – Vol. 18. – P. 354-365.

81 Schulze C., Heuner K., Myrtennas K. et al. High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence // *Epidemiol. Infect.* – 2016. – Vol. 144. – P. 3025-3036.

82 Morner T., Sandstrom G., Mattsson R. Comparison of serum and lung extracts for surveys of wild animals for antibodies to *Francisella tularensis* biovar *palaeartica* // *J. Wildl. Dis.* – 1988. – Vol. 24. – P. 10-14.

83 Elashvili E., Kracalik I., Burjanadze I. et al. Environmental monitoring and surveillance of rodents and vectors for *Francisella tularensis* following outbreaks of human tularemia in Georgia // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2015. – Vol. 15. – P. 633-636.

84 Ketz-Riley C.J., Kennedy G.A., Carpenter J.W. et al. Tularemia type A in captive Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) // *J. ZooWildl. Med.* – 2009. – Vol. 40. – P. 257-262.

85 Mörner T. Tularemia // In book: *Infectious Diseases of Wild Birds.* – Oxford, 2008. – P. 352-359.

86 Padeshki P.I., Ivanov I.N., Popov B. et al. The role of birds in dissemination of *Francisella tularensis*: first direct molecular evidence for bird-to-human transmission // *Epidemiology & Infection.* – 2010. – Vol. 138, №3. – P. 376-379.

87 DeBey B.M., Andrews G.A. et al. Immunohistochemical demonstration of *Francisella tularensis* in lesions of cats with tularemia // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2002. – Vol. 14. – P. 162-164.

88 Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G. et al. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964-2004 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1113-1118.

89 Meinkoth K.R., Morton R.J., Meinkoth J.H. Naturally occurring tularemia in a dog // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* – 2004. – Vol. 225. – P. 545-547.

90 Nordstoga A., Handeland K., Johansen T.B. et al. Tularaemia in Norwegian dogs // *Vet. Microbiol.* – 2014. – Vol. 173. – P. 318-322.

91 O'Toole D., Williams E.S., Woods L.W. et al. Tularemia in range sheep: an overlooked syndrome? // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2008. – Vol. 20. – P. 508-513.

92 Petersen J.M., Mead P.S., Schriefer M.E. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen // *Vet. Res.* – 2009. – Vol. 40. – P. 07-1-07-9.

93 Tarnvik A., Priebe H.S., Grunow R. Tularaemia in Europe: an epidemiological overview // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 36. – P. 350-359.

94 Balashov Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea): vectors of disease in man and animals // *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* – 1972. – Vol. 8. – P. 161-376.

95 Голов Д.А., Федоров В.Н. О роли клещей *Dermacentor silvarum* в эпидемиологии туляремии // *Мед. журн. Казахстана.* – 1934. – №3. – С. 37-48.

96 Reese S.M., Dietrich G., Dolan M.C. et al. Transmission dynamics of *Francisella tularensis* subspecies and clades by nymphal *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2010. – Vol. 83. – P. 645-652.

97 Hubalek Z., Rudolf I. Francisella tularensis prevalence and load in Dermacentor reticulatus ticks in an endemic area in Central Europe // Med. Vet. Entomol. – 2017. – Vol. 31. – P. 234-239.

98 Goethert H.K., Shani I., Telford S.R. Genotypic diversity of Francisella tularensis infecting Dermacentor variabilis ticks on Martha's Vineyard, Massachusetts // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 4968-4973.

99 Петров В.Г. Туларемия // Зоология журнал – 1963. – №7. – С. 1031-1040.

100 Hopla C.E. The multiplication of tularemia organisms in the lone star tick // Am. J. Epidemiol. – 1955. – Vol. 61. – P. 371-380.

101 Armstrong B.A., Kneubehl A.R., Mitchell R.D. et al. Differential Expression of Putative Ornithodoros turicata Defensins Mediated by Tick Feeding // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2020. – Vol. 10. – P. 152-1-152-11.

102 Zellner B., Huntley J.F. Ticks and Tularemia: Do We Know What We Don't Know? // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2019. – Vol. 9. – P. 146-1-146-8.

103 Pavlovsky E. Natural Nidality of Transmissible Diseases: With Special Reference to the Landscape Epidemiology of Zoonothroponoses. – Urbana, IL: Univ. Ill. Press, 1966. – 261 p.

104 Genchi M., Prati P., Vicari N. et al. Francisella tularensis: no evidence for transovarial transmission in the tularemia tick vectors Dermacentor reticulatus and Ixodes ricinus // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10, №8. – P. e013359-1-e013359-14.

105 Prince F.M., McMahan M.C. Tularemia: attempted transmission by each of two species of fleas: Xenopsylla cheopis (Roths.) and Diamanus montanus (Baker) // Public Health Rep. – 1946. – Vol. 61. – P. 79-85.

106 Parker D.D. Attempted transmission of Pasteurella tularensis by three species of fleas // J. Econ. Entomol. – 1958. – Vol. 50. – P. 724-726.

107 Hood A.M., Molyneux D.H. Survival of Pasteurella tularensis in flea larvae // J. Med. Entomol. – 1970. – Vol. 7. – P. 609-611.

108 Francis E., Lake G.C. Transmission of tularaemia by the mouse louse, Polyplax serratus (Burm.) // Public. Health. Rep. – 1922. – Vol. 37. – P. 96-101.

109 Price R.D. A microscopic study of Pasteurella tularensis in the human body louse // Parasitology – 1957. – Vol. 47. – P. 435-446.

110 Francis E., Lake G.C. Transmission of tularaemia by the bedbug, Cimex lectularius // Public Health Rep. – 1922. – Vol. 37. – P. 83-115.

111 Peta V., Tantely L.M., Potts R. et al. A Francisella tularensis-Like Bacterium in Tropical Bed Bugs from Madagascar // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2022. – Vol. 22, №1. – P. 58-61.

112 Romanova V.P., Bojenko V.P., Yakolev M.G. Studies of the natural nidus of the water meadow type of tularemia // In book: Natural Nidi of Human Diseases and Regional Epidemiology. – M., 1955. – P. 83-89.

113 Francis E., Mayne B. Experimental transmission of tularemia by flies of the species Chrysops discalis // Public Health Rep. – 1921. – Vol. 36. – P. 1731-1792.

- 114 Jellison W.L. Tularemia geographical distribution of “deerfly fever” and the biting fly, *Chrysops discalis* // Public Health Rep. – 1950. – Vol. 65. – P. 1315-1350.
- 115 Chernin E. Sir Patrick Manson’s studies on the transmission and biology of filariasis // Infect. Dis. – 1983. – Vol. 5. – P. 148-166.
- 116 Eliasson H., Bäck E. Tularaemia in an emergent area in Sweden: an analysis of 234 cases in five years // Scand. J. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 39. – P. 880-889.
- 117 Lundström J.O., Andersson A.C., Bäckman S. et al. Transstadial transmission of *Francisella tularensis holarctica* in mosquitoes, Sweden // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 17. – P. 794-799.
- 118 Thelaus J., Andersson A., Broman T. et al. *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* occurs in Swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding // Microb. Ecol. – 2014. – Vol. 67. – P. 96-107.
- 119 Bäckman S., Näslund J., Forsman M. et al. Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 77-93.
- 120 Mahajan U.V., Gravgaard J., Turnbull M. et al. Larval exposure to *Francisella tularensis* LVS affects fitness of the mosquito *Culex quinquefasciatus* // FEMS Microbiol. Ecol. – 2011. – Vol. 78. – P. 520-530.
- 121 Londono-Renteria B., Cardenas J.C., Cardenas L.D. et al. Use of anti-*Aedes aegypti* salivary extract antibody concentration to correlate risk of vector exposure and dengue transmission risk in Colombia // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8. – P. e81211-1-e81211-7.
- 122 Hubálek Z., Halouzka J. Mosquitoes (Diptera: Culicidae), in contrast to ticks (Acari: Ixodidae), do not carry *Francisella tularensis* in a natural focus of tularemia in the Czech Republic // J. Med. Entomol. – 1997. – Vol. 34. – P. 660-663.
- 123 Mironchuk Y.V., Mazepa A.V. Viability and virulence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in water ecosystems (experimental study) // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. – 2002. – Vol. 2. – P. 9-13.
- 124 Anda P., Segura del Pozo J., Díaz García J.M. et al. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing // Emerg. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 7. – P. 575-582.
- 125 Duff J.P., Gavier-Wieden D., Meredith A. Tularemia // In book: Infectious diseases of Wild Mammals and Birds in Europe. – NY.: Wiley-Blackwell, 2012. – P. 303-309.
- 126 Hestvik G., Warns-Petit E., Smith L.A. et al. The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review // Epidemiol. Infect. – 2015. – Vol. 143, №10. – P. 2137-2160.
- 127 Origgi F.C., Wu N., Pilo P. *Francisella tularensis* infection in a stone marten (*Martes foina*) without classic pathological lesions consistent with tularemia // J. Vet. Diagn. Invest. – 2013. – Vol. 25, №4. – P. 519-521.

128 Schulze C., Heuner K., Myrtennas K. et al. High and novel genetic diversity of *Francisella tularensis* in Germany and indication of environmental persistence // *Epidemiol. Infect.* – 2016. – Vol. 144, №14. – P. 3025-3036.

129 Cross J.T., Penn R.L. *Francisella tularensis* (tularemia) // In book: *Mandell's principles and practice of infectious diseases.* – Philadelphia: Churchill Livingstone Inc, 2000. – P. 2393-2402.

130 Nutter J.E. Antigens of *Pasteurella tularensis*: preparative procedures // *Appl. Microbiol.* – 1971. – Vol. 22. – P. 44-48.

131 Savin C., Criscuolo A. et al. Genus-wide *Yersinia* core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization // *Microbial genomics.* – 2019. – Vol. 5, №10. – P. e000301-1-e000301-14.

132 Fey P.D., Dempsey M.M., Olson M.E. et al. Molecular analysis of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *holarctica* // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2007. – Vol. 128. – P. 926-935.

133 Svensson K., Larsson P., Johansson D. et al. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis* // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 3903-3908.

134 Каиржанова А.Д., Избанова У.А., Шевцов А.Б. Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis* циркулирующие на территории Казахстана // Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы и тенденции развития современной аграрной науки и ветеринарии». – Костанай, 2021. – С. 252-255.

135 Petrosino J.F., Xiang Q., Karpathy S.E. et al. Chromosome rearrangement and diversification of *Francisella tularensis* revealed by the type B (OSU18) genome sequence // *Journal of Bacteriology.* – 2006. – Vol. 188. – P. 6977-6985.

136 Pohanka M., Hubalek M., Neubauerova V. et al. Current and emerging assays for *Francisella tularensis* detection: a review // *Veterinari Medicina.* – 2008. – Vol. 53. – P. 585-594.

137 Splettstoesser W.D., Tomaso H., Al Dahouk S. et al. Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. // *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health.* – 2005. – Vol. 52. – P. 249-261.

138 Broekhuijsen M., Larsson N., Johansson A. et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp *tularensis* // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2003. – Vol. 41. – P. 2924-2931.

139 Kugeler K.J., Pappert R., Zhou Y. et al. Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B // *Emerging Infectious Diseases.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1799-1801.

140 Molins-Schneekloth C.R., Belisle J.T., Petersen J.M. Genomic markers for differentiation of *Francisella tularensis* subsp *tularensis* A.I and A.II strains // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2008. – Vol. 74. – P. 336-341.

141 Gunnell M.K., Adams B.J., Robison R.A. The Genetic Diversity and Evolution of *Francisella tularensis* with Comments on Detection by PCR // *Curr Issues Mol Biol.* – 2016. – Vol. 18. – P. 79-91.

142 Forsman M., Sandstrom G., Sjostedt A. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR // *International Journal of Systematic Bacteriology.* – 1994. – Vol. 44. – P. 38-46.

143 Champion M.D., Zeng Q.D., Nix E.B. et al. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies // *Plos Pathogens.* – 2009. – Vol. 5, №5. – P. e1000459.

144 Gunnell M.K., Lovelace C.D., Satterfield B.A. et al. A multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of *Francisella tularensis* subspecies // *Journal of Medical Microbiology.* – 2012. – Vol. 61. – P. 1525-1530.

145 Garcia Del Blanco N., Dobson M.E., Vela A.I. 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. – Vol. 40. – P. 2964-2972.

146 Thomas R., Johansson A., Neeson B. et al. Discrimination of Human Pathogenic Subspecies of *Francisella tularensis* by Using Restriction Fragment Length Polymorphism// *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41. – P. 50-57.

147 Trindade P.A., McCulloch J.A., Oliveira G.A., Mamizuka E.M. Molecular techniques for MRSA typing: Current issues and perspectives // *Braz. J. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 7. – P. 32-43.

148 Samrakandi M.M., Zhang C., Zhang M. et al. Genome diversity among regional populations of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* isolated from the US // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – Vol. 237. – P. 9-17.

149 Dempsey M.P., Nietfeldt J., Ravel J. et al. 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. – Vol. 188. – P. 5904-5914.

150 Salomonsson E., Kuoppa K., Forslund A.L. et al. Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis* // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 77. – P. 3424-3431.

151 Byström M., Bocher S., Magnusson A. et al. Tularemia in Denmark: Identification of a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* Strain by Real-Time PCR and High-Resolution Typing by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 5355-5358.

152 Dempsey M.P., Dobson M., Zhang C. et al. Genomic Deletion Marking an Emerging Subclone of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in France and the Iberian Peninsula // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 73. – P. 7465-7470.

153 Molins C.R., Carlson J.K., Coombs J. et al. Identification of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* A1 and A2 infections by real-time polymerase chain reaction // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 64. – P. 6-12.

- 154 Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B. et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191. – P. 2474-2484.
- 155 Johansson A., Petersen J.M. Genotyping of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia // *J.AOAC Int.* – 2010. – Vol. 93. – P. 1930-1943.
- 156 Каиржанова А.Д., Куйбагаров М.А., Шевцов А.Б. Методы изучения генетического разнообразия штаммов *Francisella tularensis* // *Ғалым және білім.* – 2020. – № 3. – С. 189-197.
- 157 Müller W., Hotzel H., Otto P. et al. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity // *BMC Microbiol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 611-619.
- 158 Karlsson E., Svensson K., Lindgren P. et al. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of Eurosiberian tularemia // *Environ. Microbiol.* – 2013. – Vol. 15. – P. 634-645.
- 159 Afset J.E., Larssen K.W., Bergh K. et al. Phylogeographical pattern of *Francisella tularensis* in a nationwide outbreak of tularemia in Norway, 2011 // *Euro Surveill.* – 2015. – Vol. 20. – P. 9-14.
- 160 Wittwer M., Altpeter E., Pilo P. et al. Population genomics of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* and its implication on the eco-epidemiology of tularemia in Switzerland // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 1-16.
- 161 Ulu-Kilic A., Gulen G., Sezen F. et al. Tularemia in Central Anatolia // *Infection.* – 2013. – Vol. 41. – P. 391-399.
- 162 Johansson A., Forsman M., Sjöstedt A. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis* // *APMIS.* – 2004. – Vol. 112. – P. 898-907.
- 163 Engelthaler D.M., Chiller T., Schupp J.A. et al. Next-generation sequencing of *Coccidioides immitis* isolated during cluster investigation // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 17. – P. 227-232.
- 164 Gillece J.D. et al. Whole genome sequence analysis of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest reveals unexpected diversity // *PLoS One.* – 2011 – Vol. 6. – P. e28550-1-e28550-7.
- 165 O'Farrell B. Transforming microbial genotyping: a robotic pipeline for genotyping bacterial strains // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. e48022-1-e48022-16.
- 166 Karlsson J., Prior R.G., Williams K. et al. Sequencing of the *Francisella tularensis* strain Schu 4 genome reveals the shikimate and purine metabolic pathways, targets for the construction of a rationally attenuated auxotrophic vaccine // *Microb. Comp. Genomics.* – 2000. – Vol. 5, №1. – P. 25-39.
- 167 Shevtsova E., Vergnaud G., Shevtsov A. et al. Genetic diversity of *Brucella melitensis* in Kazakhstan in relation to World-wide diversity // *Front Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1897-1-1897-11.
- 168 Johansson A., Lärkeryd A., Widerström M. et al. An outbreak of respiratory tularemia caused by diverse clones of *Francisella tularensis* // *Clin Infect Dis.* – 2014. – Vol. 59, №11. – P. 1546-1553.

169 Larson M.A., Nalbantoglu U., Sayood K. et al. *Francisella tularensis* Subtype A.II Genomic Plasticity in Comparison with Subtype A.I. // PLoS One. – 2014. – Vol. 10, №4. – P. e0124906-1- e0124906-21.

170 Antwerpen M.H., Prior K. et al. Rapid high resolution genotyping of *Francisella tularensis* by whole genome sequence comparison of annotated genes (“MLST+”) // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, №4. – P. e0123298-1-e0123298-12.

171 Финенко Ф.Д., Калмыкова А.Ф., Шестакова Л.И. и др. О заболеваниях туляремией в Казалинском районе Кызыл-Ординской области // Матер. 4-й науч. конф. по природной очаговости и профилактике чумы. – Алма-Ата. – 1965. – С. 272.

172 Каиржанова А.Д., Абдрахманов С.К., Шевцов А.Б. Генетическая идентификация *Francisella tularensis* // Современная аграрная наука: цифровая трансформация (Сейфуллинские чтения – 17): матер. междунар. науч.-теорет. конф. посв. 30-летию независимости Республики Казахстан. – Астана, 2021. – С. 144-146.

173 Werle E., Schneider C., Renner M. et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // Nucleic Acids Res. – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4355.

174 Clayton R.A., Sutton G., Hinkle P.S. et al. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1995. – Vol. 45. – P. 595-599.

175 Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // J. Comput. Biol. – 2012. – Vol. 19, №5. – P. 455-477.

176 Souvorov A. et al. SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies // Genome biology. – 2018. – Vol. 19, №1. – P. 153-1-153-13.

177 Laërkeryd A., Myrtennas K., Karlsson E. et al. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30, №12. – P. 1762-1764.

178 Shevtsov V., Kairzhanova A., Shevtsov A. et al. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan // PLoS. Negl. Trop. Dis. – 2021. – Vol. 15, №5. – P. e0009419-1-e0009419-11.

179 Vogler A.J., Birdsell D., Wagner D.M. et al. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis* // Lett. Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 48, №1. – P. 140-144.

180 Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data // <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. 10.06.2020.

181 Ewels P., Magnusson M. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report // Bioinformatics. – 2016. – Vol. 32, №19. – P. 3047-3048.

182 Fitch W.M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology // Systematic Zoology. – 1971. – Vol. 20, №4. – P. 406-416.

- 183 Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences // Nucleic acids research. – 1999. – Vol. 27, №2. – P. 573-580.
- 184 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. – Vol. 26. – P. 2465-2466.
- 185 Kuibagarov M., Kairzhanova A. et al. Draft genome sequence of the strain *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* 240, isolated in Kazakhstan // Microbiol. Resour. Announc. – 2020. – Vol. 9. – P. e00766-1-e00766-20.
- 186 Larsson P., Elfsmark D., Svensson K. et al. Molecular evolutionary consequences of niche restriction in *Francisella tularensis*, a facultative intracellular pathogen // PLoS Pathog. – 2005. – Vol. 5, №6. – P. e1000472-1-e1000472-15.
- 187 Mokrievich A.N. et al. Draft Genome Sequences of Three *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* Strains Isolated in the Altai Territory, Russian Federation // Microbiology resource announcements. – 2020. – Vol. 9, №7. – P. e01202-19-e01202-19-2.
- 188 Dwibedi C., Birdsall D., Larkeryd A. et al. Long-range dispersal moved *Francisella tularensis* into Western Europe from the East // Microb. Genom. – 2016. – Vol. 2, №12. – P. e000100-1-e000100-13.
- 189 Kdysikh B.G., Sundukov R.I., Kuspanov A.K. et al. About the isolation of the tularemia agent from the Isabelline wheatear (*Oenanthe isabellina*) in West Kazakhstan region // Quarantinable and zoonotic infections in Kazakhstan. – 2013. – Vol. 28, №2. – P. 71-82.
- 190 de Carvalho I.L., Zer-Zer L., Alves A.S. et al. *Borrelia garinii* and *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* detected in migratory shorebirds in Portugal // Eur. J. Wildl. Res. – 2012. – Vol. 58. – P. 857-861.
- 191 Ariza-Miguel J. et al. Molecular investigation of tularemia outbreaks, Spain, 1997-2008 // Emerg. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 20, №5. – P. 754-761.
- 192 Appelt S., KoEppen K., Radonić A. et al. Genetic diversity and spatial segregation of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Germany // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2019. – Vol. 9. – P. 376-1-376-10.
- 193 Gyuranecz M., Birdsall D.N., Splettstoesser W. et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* // Europe. Emerg. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 18, №2. – P. 290-293.
- 194 MyrtennaEš K., Marinov K., Johansson A. et al. Introduction and persistence of tularemia in Bulgaria // Infect. Ecol. Epidemiol. – 2016. – Vol. 6. – P. 328-338.
- 195 Koene M., Rijks J., Maas M. 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. – Vol. 9. – P. 1-11.
- 196 Telford S.R., Goethert H.K. Ecology of *Francisella tularensis* // Annu. Rev. Entomol. – 2020. – Vol. 65. – P. 351-372.

197 Blouin Y., Hauck Y., Soler C. et al. Significance of the identification in the Horn of Africa of an exceptionally deep branching *Mycobacterium tuberculosis* clade // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, №12. – P. e52841-1-e52841-16.

198 Vergnaud G. *Bacillus anthracis* evolutionary history: taking advantage of the topology of the phylogenetic tree and of human history to propose dating points // Erciyes. Med. J. – 2020. – Vol. 42, №4. – P. 362-369.

199 Hennebique A., Boisset S., Maurin M. Tularemia as a waterborne disease: a review // Emerg. Microbes. Infect. – 2019. – Vol. 8, №1. – P. 1027-1042.

200 Forsman M., Henningson E.W., Larsson E. et al. *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state // FEMS Microbiol. Ecol. – 2000. – Vol. 31, №3. – P. 217-224.

201 Splettstoesser W.D., MaËtz-Rensing K., Seibold E. et al. Re-emergence of *Francisella tularensis* in Germany: fatal tularaemia in a colony of semi-free-living marmosets (*Callithrix jacchus*) // Epidemiol. Infect. – 2007. – Vol. 135, №8. – P. 1256-1265.

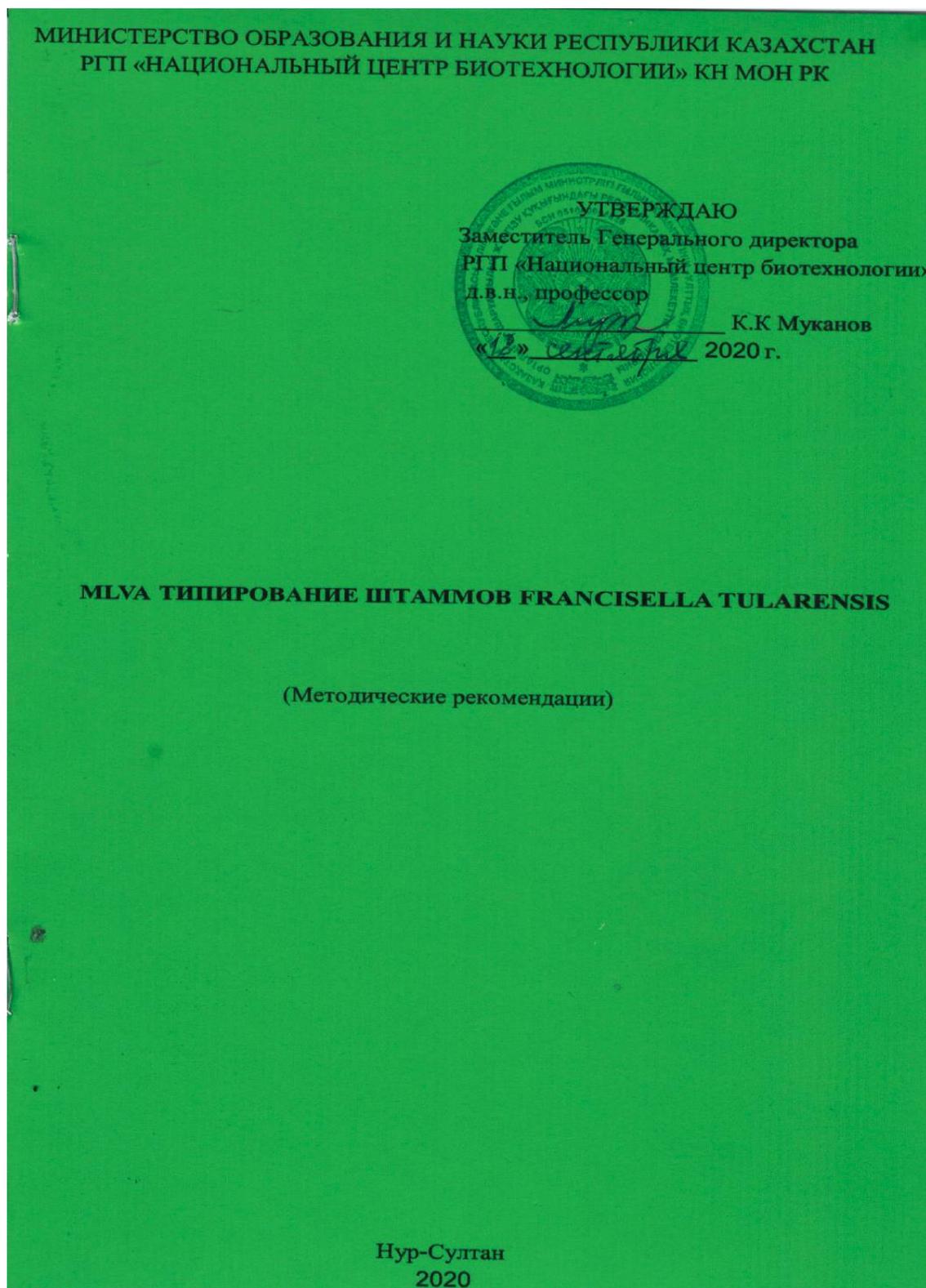
202 Padeshki P.I., Ivanov I.N., Popov B. et al. The role of birds in dissemination of *Francisella tularensis*: first direct molecular evidence for bird-to-human transmission // Epidemiol. Infect. – 2010. – Vol. 138, №3. – P. 376-379.

203 Попов Н.В., Слудский А.А., Завьялов Е.В. и др. Оценка возможной роли каменки-плясуньи (*Oenanthe isabellina*) и других птиц в механизме энзоотии чумы // Поволж. экол. журнал. – 2007. – №3. – С. 215-226.

204 Balakhonov S.V., Korzun V.M., Verzhutsky D.B. et al. The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of the Altai mountain natural plague focus. communication 2. probable ways and mechanisms of plague agent main subspecies importation into the territory of the focus // Problems of Particularly Dangerous Infections. – 2013. – Vol. 2. – P. 5-10.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Методические рекомендации по генотипированию возбудителя туляремии



УДК 602.4
ББК 30.16
М 14

Утверждено и разрешено к печати решением Ученого совета РГП «Национальный центр биотехнологии»

Протокол № 3 от « 18 » сентября 2020 г.

Рецензенты:

Абдрахманов С.К. доктор ветеринарных наук, профессор, декан факультета Ветеринарии и технологии животноводства НАО «Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина».

Тарлыков П.В. PhD, заведующий лабораторией протеомики и масс-спектрометрии РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК.

MLVA ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *FRANCISELLA TULARENSIS*: Метод.
рекоменд. Сост.: А.Д. Каиржанова, В.Б. Луцай, А.О. Амиргазин, М.А. Куйбагаров, А.Б. Шевцов, – Нур-Султан, 2020. - 15 с

ISBN 978-601-332-968-0

Методические рекомендации составлены в лаборатории прикладной генетики РГП на ПВХ «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК в рамках грантового финансирования «Сравнительный анализ молекулярно-генетических особенностей геномов у возбудителей сибирской язвы и туляремии в Казахстане», № AP05131460 на 2018-2020 гг. Методические рекомендации могут быть рекомендованы для специалистов медицинских и ветеринарных лабораторий.

УДК
ББК

© А.Д. Каиржанова, В.Б. Луцай, А.О. Амиргазин, М.А. Куйбагаров, А.Б. Шевцов
– Нур-Султан, 2020

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 –Результаты MLVA типирования 148 штаммов *Francisella tularensis* по 11 VNTR локусам

Номер штамма	FT-M02	FT-M03	FT-M04	FT-M05	FT-M6	FT-M10	FT-M20-2A	FT-20-2B	FT-M22	FT-M23	FT-M24
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tul-100_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-101_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-102_KZ	2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-103_KZ	2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-104_KZ	2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-105_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-107_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-108_KZ	2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-109_KZ	2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-10_KZ	2	14	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-110_KZ	2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-111_KZ	2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-113_KZ	2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-114_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-115_KZ	2	20	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-116_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-117_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-118_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-119_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-11_KZ	2	9	3	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-120_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-121_KZ	2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tul-122_KZ	2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-124_KZ	2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-126_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-127_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-129_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-12_KZ	2	18	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-131_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-132_KZ	2	23	4	2	4	5	4	3	4	1	2
Tul-134_KZ	2	17	4	2	4	5	3	3	3	1	2
Tul-136_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-137_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-138_KZ	2	19	5	2	4	5	3	3	3	1	2
Tul-140_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-141_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-142_KZ	2	17	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-143_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-144_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-146_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-147_KZ	2	19	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-148_KZ	2	16	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-14_KZ	2	18	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-150_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-152_KZ	2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-154_KZ	2	16	5	2	4	5	3	3	3	1	2
Tul-156_KZ	2	20	5	2	4	5	3	3	3	1	2
Tul-157_KZ	2	9	4	2	7	5	3	3	4	1	2

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tul-159_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-160_KZ	2	20	4	2	4	5	4	3	4	1	2
Tul-161_KZ	2	16	4	2	4	5	4	3	4	1	2
Tul-16_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-18_KZ	2	20	5	2	4	5	3	3	3	1	2
Tul-21_KZ	2	16	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-22_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-23_KZ	2	16	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-24_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-25_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-26_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-27_KZ	2	16	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-28_KZ	2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-29_KZ	2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-31_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-32_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-33_KZ	2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-34_KZ	2	18	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-35_KZ	2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-36_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-37_KZ	2	12	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-38_KZ	2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-39_KZ	2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-40_KZ	2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-41_KZ	2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-42_KZ	2	23	4	2	4	5	3	3	4	1	2

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tul-43_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-44_KZ	2	11	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-45_KZ	2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-47_KZ	2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-48_KZ	2	18	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-4_KZ	2	16	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-51_KZ	2	23	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-54_KZ	2	14	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-55_KZ	2	18	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-56_KZ	2	20	3	4	3	5	6	3	13	1	1
Tul-57_KZ	2	20	3	4	3	5	6	3	13	1	1
Tul-58_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-59_KZ	2	18	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-5_KZ	2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-60_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-61_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-62_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-63_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-64_KZ	2	20	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-65_KZ	2	20	3	4	3	5	6	3	13	1	1
Tul-67_KZ	2	16	5	2	4	5	3	3	3	1	2
Tul-69_KZ	2	9	3	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-70_KZ	2	20	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-71_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-72_KZ	2	19	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-73_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tul-74_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-75_KZ	2	13	4	2	4	5	3	3	3	1	1
Tul-77_KZ	2	9	4	2	7	5	3	3	4	1	2
Tul-78_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-79_KZ	2	19	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-80_KZ	2	7	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-81_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-82_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-83_KZ	2	13	4	2	4	5	3	3	3	1	1
Tul-84_KZ	2	9	4	2	7	5	3	3	4	1	2
Tul-88_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-89_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-8_KZ	2	7	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-90_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-91_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-95_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-96_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-98_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-9_KZ	2	19	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-106_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-112_KZ	2	15	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-128_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-13_KZ	2	20	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-133_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-135_KZ	2	22	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-139_KZ	2	20	5	2	4	5	3	3	3	1	2

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tul-149_KZ	2	19	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-15_KZ	2	23	4	2	4	5	4	3	4	1	2
Tul-151_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-153_KZ	2	9	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-155_KZ	2	20	5	2	4	5	3	3	3	1	2
Tul-17_KZ	2	20	5	2	4	5	3	3	3	1	2
Tul-19_KZ	2	17	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-2_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-20_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-30_KZ	2	12	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-52_KZ	2	23	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-6_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-66_KZ	2	14	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-68_KZ	2	14	4	2	5	5	3	3	4	1	2
Tul-7_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-76_KZ	2	9	4	2	7	5	3	3	4	1	2
Tul-86_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-87_KZ	2	10	4	2	6	5	3	3	4	1	2
Tul-92_KZ	2	16	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-93_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-97_KZ	2	16	4	2	4	5	3	3	4	1	2
Tul-99_KZ	2	21	4	2	4	5	3	3	4	1	2

ПРИЛОЖЕНИЕ В

National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information
asylulan0894@gmail...

BioProject BioProject Search

Display Settings: ▾
Send to: ▾

Comparative analysis of molecular genetic features of genomes in causative agents of anthrax and tularemia in Kazakhstan Accession: PRJNA639508 ID: 639508

Bacillus anthracis and Francisella tularensis bacteria are causative agents of highly dangerous infectious diseases. Knowledge of the genotypes of circulating strains is important for epidemiological monitoring at the local and global levels. Full-genomic sequencing and subsequent analysis of single nucleotide polymorphisms is the method of genotyping with the highest resolutions of a powerful phylogenetic ability.

To study the genotypes and genomic features of the causative agents of anthrax and tularemia circulating in Kazakhstan with using of highly discriminatory methods and full genomic sequencing. Less...

Related information

- Assembly
- BioSample
- Genome
- Nucleotide
- SRA
- WGS master

Recent activity

Accession	PRJNA639508
Data Type	Genome sequencing and assembly
Scope	Multispecies
Submission	Registration date: 15-Jun-2020 National Center for Biotechnology
Relevance	Epidemiology

Project Data:

Resource Name	Number of Links
SEQUENCE DATA	
Nucleotide (WGS master)	44
SRA Experiments	120
OTHER DATASETS	
BioSample	159
Assembly	44

▾ Assembly details: Download

Assembly level	Number of Assemblies
Contig [↕]	44
Total	44
Assembly	Level
WGS	BioSample
Strain	Taxonomy
GCA_017312195.1	JAFCRE000000000 SAMN17786977 Tul-20_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017312225.1	JAFCRK000000000 SAMN17786971 Tul-97_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089005.1	JAFCSH000000000 SAMN17786946 Tul-181_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089995.1	JAFCSG000000000 SAMN17786947 Tul-17_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089025.1	JAFNSE000000000 SAMN17786949 Tul-139_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089995.1	JAFCSO00000000 SAMN17786950 Tul-88_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089995.1	JAFCSF000000000 SAMN17786948 Tul-155_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089805.1	JAFCSO00000000 SAMN17786951 Tul-87_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089785.1	JAFCSA000000000 SAMN17786954 Tul-92_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089755.1	JAFCSB000000000 SAMN17786952 Tul-135_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089745.1	JAFCRZ000000000 SAMN17786956 Tul-88_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica
GCA_017089705.1	JAFCRY000000000 SAMN17786957 Tul-93_KZ Francisella tularensis subsp. holarctica

▾ SRA Data Details

Parameter	Value
Data volume, Gbases	51

Рисунок В.1 – Полногеномные данные штаммов *Francisella tularensis*, внесенные в международную базу данных