

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Бахтеева И.В.¹, Евсеева В.В.¹, Титарева Г.М.¹, Миронова Р.И.¹, Рождественский Е. Н.², Базарова Г. Х.², Мокриевич А. Н.¹, Тимофеев В. С.^{1*}

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ MELT-МАМА ПЦР ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОДВИДОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО И ЧУМНОГО МИКРОБОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ГОРНОГО АЛТАЯ

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ), 142279, Оболенск, Россия;

²Алтайская противочумная станция (ФКУЗ АПЧС), 649002, Горно-Алтайск, Республика Алтай, Россия

На территории горного Алтая существуют уникальные природные очаги чумы и туляремии. Их уникальность заключается в том, что возбудители этих инфекций - *Yersinia pestis* и *Francisella tularensis*, соответственно, представлены каждый двумя подвидами, которые отличаются по своему эпидемиологическому потенциалу. *Y. pestis* subsp. *pestis* способна вызвать чуму у людей, в то время как *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica* вызывает инфекцию только у грызунов. *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* более вирулентен для лабораторных животных, чем subsp. *holarctica*, но до сих пор не вызвал ни одного подтвержденного случая туляремии у людей. Соответственно, при выделении нового штамма *Y. pestis* и *F. tularensis* важной задачей является быстрое и точное определение его подвидовой принадлежности. Для этой цели разработаны наборы олигонуклеотидов, предназначенные для детекции диагностически важных SNP методом MELT-МАМА (mismatch amplification mutation assay), позволяющие проводить быструю дифференциацию *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* от subsp. *holarctica* и *Y. pestis* subsp. *pestis* от *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica*. Описан разработанный метод.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*; *Yersinia pestis*; ПЦР; вирулентность; дифференциальная диагностика.

Для цитирования: Бахтеева И.В., Евсеева В.В., Титарева Г.М., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С. Использование технологии MELT-МАМА ПЦР для дифференциации подвидов туляремиийного и чумного микробов, циркулирующих на территории горного Алтая. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (8): 496-505. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-8-496-505>.

Для корреспонденции: Бахтеева Ирина Викторовна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отдела особо опасных инфекций; e-mail: bahtejeva@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 10.03.2023

Принята к печати 10.04.2023

Опубликовано 01.08.2023

Bakhteeva I. V.¹, Evseeva V. V.¹, Titareva G. M.¹, Mironova R. I.¹, Rozhdestvensky E. N.², Bazarova G. H.², Mokrievich A. N.¹, Timofeev V. S.¹

THE USE OF MELT-MAMA PCR TECHNOLOGY TO DIFFERENTIATE THE SUBSPECIES OF TULAREMIA AND PLAGUE MICROBES CIRCULATING IN THE TERRITORY OF THE ALTAI MOUNTAINS.

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moscow Region, Russia;

²Altai anti-plague station, 649002, Gorno-Altaysk, Respublika Altai, Russia

On the territory of the Altai Mountains there are unique natural foci of plague and tularemia. Their uniqueness lies in the fact that the causative agents of these infections - *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*, respectively, are each represented by two subspecies, which differ in their epidemiological potential. *Y. pestis* subsp. *pestis* can cause plague in humans, while *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica* causes infection only in rodents. *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* is more virulent for laboratory animals than subsp. *holarctica*, but so far has not caused any confirmed cases of tularemia in humans. Accordingly, when isolating a new strain of *Y. pestis* and *F. tularensis*, it is an important task to quickly and accurately determine its subspecific significance. For this purpose, we have developed sets of oligonucleotides designed for the detection of diagnostically important SNPs by the MELT-MAMA method (mismatch amplification mutation assay), which allow for rapid differentiation of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* from subsp. *holarctica* and *Y. pestis* subsp. *pestis* from *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica*. Describe the method we have developed.

Key words: *Francisella tularensis*; *Yersinia pestis*; PCR; virulence; differential diagnosis.

For citation: Bakhteeva I.V., Evseeva V.V., Titareva G.M., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.H., Mokrievich A.N., Timofeev V.S. The use of MELT-MAMA PCR technology to differentiate the subspecies of tularemia and plague microbes circulating in the territory of the Altai Mountains. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (8): 496-505 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-8-496-505>.

For correspondence: *Bakhteeva I.V.*, Cand. Sci. Med., Senior Researcher of the Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology; e-mail: bahtejeva@mail.ru

Information about authors:

Bakhteeva I.V., <https://orcid.org/0000-0002-6897-3613>;
Evseeva V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0383-4698>;
Titareva G.M., <https://orcid.org/0000-0001-9478-5563>;
Mironova R.I., <https://orcid.org/0000-0001-8318-4156>;
Rozhdestvensky E.N., <https://orcid.org/0000-0002-6005-3783>;
Bazarova G.H., <https://orcid.org/0000-0002-4064-0155>;
Mokrievich A.N., <https://orcid.org/0000-0003-3675-8780>;
Timofeev V.S., <https://orcid.org/0000-0002-9501-1380>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Funding. *This work is supported by the Sectoral Scientific Program of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор).*

Received 10.03.2023

Accepted 10.04.2023

Published 01.08.2023

Введение. В горном Алтае расположен природный очаг чумы, являющийся российской частью трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы [1]. Долгое время эпидемический потенциал этого очага считался невысоким, поскольку на его территории выделялись только непатогенные для человека алтайский и, в редких случаях, улегейский биовары чумного микроба - *Yersinia. pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica* и *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *ulegeica* [2]. Внутривидовая таксономия *Y. pestis* остается дискуссионной, общепринятое мнение о таксономическом статусе внутривидовых групп отсутствует [3]. Мы придерживаемся таксономии, согласно которой вид *Y. pestis* подразделяется на два подвида: основной (эпидемически значимый, то есть способный вызвать чуму у человека) - subsp. *pestis* и неосновной (эпидемически незначимый) - subsp. *microtus*, в свою очередь подразделяющийся на несколько биоваров [3]. Начиная с 2012 года в Алтайском очаге чумы помимо bv. *altaica* обнаруживаются штаммы основного подвида чумного микроба. В настоящее время здесь наблюдается совместная циркуляция двух подвидов чумного микроба - опасного для человека *Y. pestis* subsp. *pestis* и неопасного *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica* [4]. В горном Алтае существует очаг туляремии. Возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, в регионе представлен также двумя подвидами. Помимо *F. tularensis* subsp. *holarctica*, широко распространённого по всему Северному полушарию [5], в регионе циркулирует генетически обособленная подгруппа среднеазиатского подвида, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* [6]. Отличие этих двух подвидов в вирулентности не столь очевидно, как для основного и неосновного подвидов чумного микроба. *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* в лабораторных опытах демонстрирует крайне высокую вирулентность и патогенность, а по способности преодолевать поствакцинальный иммунитет даже превосходит *F. tularensis* subsp. *holarctica* [7]. До сих пор в регионе не зафиксировано ни одного случая туляремии у людей, вызванной среднеазиатским подвидом, что может быть следствием не только недостаточной диагностики, но и сниженной вирулентности этого

подвида для человека.

Активное присутствие в регионе двух возбудителей особо опасных инфекций представляет определённый интерес для исследователей, занимающихся вопросами эволюции, экологии, филогении, филогеографии соответствующих возбудителей. Но при этом такая ситуация значительно осложняет работу организаций, осуществляющих санитарный и ветеринарный надзор, так как для оценки эпидемической ситуации помимо постоянного мониторинга наличия возбудителями чумы и туляремии в регионе, требуется определение подвидовой принадлежности каждого выделенного штамма и полученного положительного ПЦР результата ($Ct > 20,0$).

Для решения этой проблемы традиционно используются культуральные и биохимические методы, такие как определение способности к ферментации рамнозы [3] для чумного микроба и способности к расщеплению нитроцефина для возбудителя туляремии [8]. Но эти методы требуют работы с живыми культурами. Классическая бактериология занимает довольно много времени и налагает определенные требования к аккредитации соответствующих лабораторий и персонала. Высокую значимость имеют молекулярно-биологические методы индикации патогенов и дифференциации их внутривидовых групп, например, ПЦР. Одной из генетических мишеней, которые могут быть детектированы в ПЦР являются однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), представляющие собой точечные мутации, широко распространены в геномах всех видов. За последние 20 лет разработаны многочисленные технологии обнаружения SNP [9-11]. Многие из этих технологий основаны на ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Приборы для ПЦР-РВ присутствуют во многих клинических и исследовательских лабораториях благодаря их эффективности, автоматизации, простоте экспериментов и способности работать с высокой пропускной способностью. Одной из наиболее распространённых технологий детекции SNP в реальном времени являются Dual Allele-Specific (AS) ПЦР. Определение аллельного состояния SNP с помощью анализа AS-

Штаммы, использованные в исследованиях

| | Подвид | Штамм | Источник |
|----|------------------------------------|------------|---|
| 1 | <i>holarctica</i> | 503 | ГКПМ-Оболенск |
| 2 | <i>holarctica</i> | 1045 | ГКПМ-Оболенск |
| 3 | <i>holarctica</i> | Ха-179 | ГКПМ-Оболенск |
| 4 | <i>holarctica</i> | А-323 | ГКПМ-Оболенск |
| 5 | <i>holarctica</i> | Во-455/398 | ГКПМ-Оболенск |
| 6 | <i>holarctica</i> | Во-429/209 | ГКПМ-Оболенск |
| 7 | <i>holarctica</i> | Я-5 | ГКПМ-Оболенск |
| 8 | <i>holarctica</i> | Я-6 | ГКПМ-Оболенск |
| 9 | <i>holarctica</i> | Хм-4 | ГКПМ-Оболенск |
| 10 | <i>holarctica</i> | А-79 | ГКПМ-Оболенск |
| 11 | <i>mediasiatica</i> | К334 | ГКПМ-Оболенск |
| 12 | <i>mediasiatica</i> | 554 | ГКПМ-Оболенск |
| 13 | <i>mediasiatica</i> | 678 | ГКПМ-Оболенск |
| 14 | <i>mediasiatica</i> | 120 | ГКПМ-Оболенск |
| 15 | <i>mediasiatica</i> | А-84 | ГКПМ-Оболенск |
| 16 | <i>mediasiatica</i> | А-116 | ГКПМ-Оболенск |
| 17 | <i>mediasiatica</i> | А-133 | ГКПМ-Оболенск |
| 18 | <i>mediasiatica</i> | А-99 | ГКПМ-Оболенск |
| 19 | <i>mediasiatica</i> | А-373 | ГКПМ-Оболенск |
| 20 | <i>mediasiatica</i> | А-142 | ГКПМ-Оболенск |
| 21 | <i>mediasiatica</i> | А-187 | ГКПМ-Оболенск |
| 22 | <i>mediasiatica</i> | А-178 | ГКПМ-Оболенск |
| 23 | <i>tularensis</i> | SCHU | ГКПМ-Оболенск |
| 24 | <i>tularensis</i> | 8859 | ГКПМ-Оболенск |
| 25 | <i>mediasiatica</i> | 125 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 26 | <i>mediasiatica</i> | 128 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 27 | <i>mediasiatica</i> | 129 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 28 | <i>mediasiatica</i> | 166 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 29 | <i>mediasiatica</i> | 137 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 30 | <i>mediasiatica</i> | 23 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 31 | <i>mediasiatica</i> | 91 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 32 | <i>mediasiatica</i> | 95 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 33 | <i>mediasiatica</i> | 87 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 34 | <i>mediasiatica</i> | 90 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 35 | <i>mediasiatica</i> | 96 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Чойский район |
| 36 | <i>mediasiatica</i> | 9 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Шебалинский район |
| 37 | <i>mediasiatica</i> | 281 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Майминский район |
| 38 | <i>pestis</i> | 1219 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Кош-Агачский район |
| 39 | <i>pestis</i> | 1211 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Кош-Агачский район |
| 40 | <i>pestis</i> | 1208 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Кош-Агачский район |
| 41 | <i>pestis</i> | 1020 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Кош-Агачский район |
| 42 | <i>pestis</i> | 62 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Кош-Агачский район |
| 43 | <i>microtus</i> <i>bv. altaica</i> | 1273 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Кош-Агачский район |
| 44 | <i>microtus</i> <i>bv. altaica</i> | 1270 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Кош-Агачский район |
| 45 | <i>microtus</i> <i>bv. altaica</i> | 1258 | Горно-Алтайская ПЧС, Республика Алтай, Кош-Агачский район |
| 46 | <i>microtus</i> <i>bv. altaica</i> | И-3446 | ГКПМ-Оболенск |
| 47 | <i>microtus</i> <i>bv. altaica</i> | И-2277 | ГКПМ-Оболенск |
| 48 | <i>microtus</i> <i>bv. altaica</i> | И-2976 | ГКПМ-Оболенск |
| 49 | <i>microtus</i> <i>bv. altaica</i> | И-3113 | ГКПМ-Оболенск |

ПЦР достигается с помощью двух прямых праймеров AS, которые действуют совместно с одним обратным праймером. Дизайн праймера AS предполагает несоответствие на 3'-конце с матрицей ДНК, состоящей из некомплементарного состояния SNP (неаллельная матрица). В то же время некомплементарное несоответствие оснований не наблюдается с аллельной матрицей. Несовпадение 3'-конца снижает эффективность полимеразы Taq на 15-50% за цикл [12], что ведёт к снижению эффективности ПЦР по сравнению с аллельным комплексом праймер-матрица [13, 14]. Конкуренция между праймерами дополнительно усиливается за счёт введения дополнительного дестабилизирующего несоответствия нуклеотида в (-2) или (-3) положение на 3'-конце форвардных AS-праймеров [15, 16]. Мечение одного из форвардных AS-праймеров GC-последовательностью, которая увеличивает размер полученного ПЦР-продукта и, соответственно, температуру его плавления на несколько градусов, позволяет дифференцировать продукты AS-ПЦР посредством анализа кривой плавления [16-19]. Этот анализ назван mismatch amplification mutation assay or MELT-МАМА [17, 20]. В исследовании представлены примеры использования данной методики с модификациями для дифференциации *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* от subsp. *holarctica* и *Y. pestis* subsp. *pestis* от *Y. pestis* subsp. *microtus*.

Материал и методы. Использовали 37 клинических штаммов *F. tularensis* разных подвидов и 12 штаммов *Y. pestis* подвидов *pestis* и *microtus* bv. *altaica* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ - Оболенск» ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии и из Алтайской противочумной станции (г. Горно-Алтайск) (табл. 1). Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37 °С на плотной питательной среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск). Штаммы *Y. pestis* культивировали на питательной среде для культивирования чумного микроба (ЧПС) (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск).

Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и анализ анализ *in silico* проведён с использованием баз данных, доступных на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Множественное выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, трансляция *in silico*, анализ расположения на хромосоме исследуемых генов, и их гомологов, их фрагментов, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов, расчёт их температур плавления, проводились с помощью программного пакета Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation).

Выделение нуклеиновых кислот из бактерий проведено с помощью набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) согласно инструкциям производителя.

Олигонуклеотидные праймеры разработаны нами, синтезированы биотехнологической компанией «Синтол» (г. Москва, Россия).

Детекцию SNP осуществляли с помощью аллель-специфической ПЦР (AS-ПЦР) по схеме [21]. Учёт результатов AS-ПЦР-РВ проводили по анализу кри-

вых плавления в амплификаторе с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) с использованием «2,5 кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, Москва) при конечной концентрации $MgCl_2$ равной 2мМ. Праймеры добавляли из расчёта 10 пк Моль каждого на 25 мкл рабочей смеси. Анализ кривых амплификации и плавления проводили с использованием оптического ПЦР-модуля по каналу FAM/SYBR.

Программа амплификации:

- 1) 50,0 °С-2:00 мин;
- 2) 95,0 °С-10:00 мин;
- 3) 95,0 °С- 0:20 с;
- 4) 60,0 °С - 0:30 с либо 62,0 °С - 0:30 с;
- 5) 72,0 °С - 0:30 с + измерение флуоресценции;
- 6) повторить этапы 3-5 30 раз;
- 7) 95,0 °С - 0:15 с;
- 8) построение кривой плавления от 60,0 °С до 95,0 °С, шаг 0,5 °С, интервал 0:05 с + измерение флуоресценции.

Результаты. Выбор ПЦР-мишеней. Для дифференциации *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* в качестве основной мишени использована ранее описанная однонуклеотидная замена 289G→А в гене β-лактамазы FTU-1 (BlaB), номер доступа к последовательности гена в GenBank KCX65_03135 для референсного штамма SCHU S4, номер доступа к геному в GenBank CP073128.1[22]. Эта замена подвидоспецифична для *F. tularensis* среднеазиатского подвида и приводит к аминокислотной замене глицина на аргинин в 97 положении транслируемого белка. Кроме этой SNP, в качестве дополнительной ПЦР-мишени использована ещё одна SNP в последовательности данного гена - 518T→С, характерная для двух подвидов - subsp. *mediasiatica* и subsp. *tularensis* (наиболее эпидемически опасный подвид туляремийного микроба, до сих пор не обнаруженный в России и в соседних государствах).

В качестве мишени для дифференциации основного и неосновного подвидов *Y. pestis* выбрана SNP671A→G в гене *rhaS*, кодирующем регулятор рамнозного оперона (номер доступа к последовательности гена в GenBank YPO0332 для референсного штамма *Y. pestis* CO92, номер доступа к геному в GenBank AL590842.1). Наличие остатка гуанина в этом положении характерно для штаммов неосновного подвида чумного микроба и для *Y. pseudotuberculosis*, а наличие остатка аденина - для основного подвида [23, 24].

Дизайн праймеров. Принцип описываемого метода предполагает использование в одной реакции амплификации трёх праймеров - двух конкурирующих аллель-специфичных и одного общего праймера. За счёт конкуренции за связывание с ДНК-матрицей в состав синтезируемого ампликона включается преимущественно один из аллель-специфических праймеров, комплементарный своим 3'-нуклеотидом определяемой SNP.

Для дифференциации подвидов туляремийного микроба разработана система из трёх праймеров. Два прямых аллель-специфичных праймера отли-

чаются между собой 3'-концевым нуклеотидом, соответствующим аллелю, характерному для *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* или подвидам *holarctica* и *tularensis* (табл. 2, рис. 1). Один из них помечен GC-последовательностью, которая увеличивает размер ампликона и его температуру плавления, что в свою очередь позволяет определить какой из праймеров включён в состав вновь синтезированного ампликона электрофоретически или методом анализа кривых плавления, соответственно. Для того, чтобы в реак-

цию включался преимущественно один праймер, комплементарный 3'-концевым нуклеотидам анализируемой ДНК-матрице в (-3) положении с 3' конца обоих форвардных праймеров введено некомплементарное матрице основание (принцип повышения специфичности конкурентной аллель-специфичной ПЦР при введении некомплементарных оснований [21]). В отличие от предложенных праймеров [22], добавлен некомплементарный нуклеотид в (-4) положении обоих форвардных праймеров.

| | | | | | | | |
|--|-----|-------------------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | | 256 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| B. tularensis holarctica FDAARGOS 595 | 256 | ATTCCAATAAAATCAAGATGATATTGGTAAACTC | GGATATGCTCCTATTA | | | | |
| BlaB_tularensis_holarctica_LVS | 256 | ATTCCAATAAAATCAAGATGATATTGGTAAACTC | GGATATGCTCCTATTA | | | | |
| BlaB_tularensis_mediatica_147 | 256 | ATTCCAATAAAATCAAGATGATATTGGTAAACTCA | GGATATGCTCCTATTA | | | | |
| BlaB_sub.tularensis_NIH-B38 | 256 | ATTCCAATAAAATCAAGATGATATTGGTAAACTC | GGATATGCTCCTATTA | | | | |
| | | 256 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| B. tularensis holarctica FDAARGOS 595 | 256 | CATAGTAATATAAATAAAA | CAACTCCAAAGGCTATTACTAAAGATATTT | | | | |
| BlaB_tularensis_holarctica_LVS | 256 | CATAGTAATATAAATAAAA | CAACTCCAAAGGCTATTACTAAAGATATTT | | | | |
| BlaB_tularensis_mediatica_147 | 256 | CATAGTAATATAAATAAAA | CAACTCCAAAGGCTATTACTAAAGATATTT | | | | |
| BlaB_sub.tularensis_NIH-B38 | 256 | CATAGTAATATAAATAAAA | CAACTCCAAAGGCTATTACTAAAGATATTT | | | | |

Рис. 1. Выравнивание гена *blaB* в хромосоме *F. tularensis* разных подвигов. Выполнено с помощью программы Vector NTI. Чёрным цветом выделены области праймеров.

Таблица 2

Последовательность нуклеотидов в разработанных и используемых для проведения исследования праймерах

| Название | Последовательность 5'→3' |
|--|---|
| Праймеры, используемые для дифференциации подвигов туляремии | |
| A-Bla 2SNPTulF1 | AATAAATCAAGATGATATTGGTAAAgcCG |
| D-Bla 2SNPMedF1 | CGGGGCGGGGCGGGGCGGGCAATAAAT CAAGATGATATTGGTAAAggCA |
| R-Bla 2SNPRev | ATCTTTAGTAATAGCCTTTGGAGgTG |
| Праймеры, используемые для дифференциации подвигов чумы | |
| rhaS-Alt-RD | CGGGGCGGGGCGGGGCGGGCCAGTTGAT GACGGGCTTGCAgTgcGC |
| rhaS-Pest-RA | CAGTTGATGACGGGCTTGCAgTtcGT |
| rhaS-Alt-F | TTATGCAGCTATTGGTGAACACTGTGGCA |

Примечание. Жирным шрифтом обозначены GC-последовательности, нижним подчеркиванием - аллель-специфические нуклеотиды, строчными буквами - некомплементарные основания.

Общий для обоих форвардных праймеров реверсный праймер сделан аллель-специфичным. Его 3'-концевой нуклеотид (G) комплементарен ДНК матрице подвигов *mediatica* и *tularensis* (C). В (-3) положение ввели некомплементарное матрице основание (см. табл. 2, рис. 1).

Для дифференциации подвигов чумного микроба использованы три праймера - два конкурирующих аллель-специфических реверсных и один общий форвардный (см. табл. 2). Аллель-специфические праймеры отличаются 3'-концевым нуклеотидом, комплементарным одной из двух аллелей. Один из аллель-специфичных праймеров, rhaS-Alt-RD, 3' - концевой нуклеотид которого комплементарен

ДНК матрице неосновного подвида помечен GC-последовательностью. В (-3) положении с 3'-конца этого праймера введено некомплементарное основание. В последовательность второго аллель-специфического праймера rhaS-Pest-RA, 3' - концевой нуклеотид которого комплементарен ДНК матрице основного подвида чумного микроба, введены два некомплементарных основания в (-3) и (-4) положениях с 3' конца. В последовательности общего форвардного праймера отсутствуют аллель-специфические нуклеотиды и некомплементарные основания.

Использование разработанных праймеров для определения подвиговой принадлежности тулярийного и чумного микробов. Разработанные системы

праймеров протестированы на панели штаммов, указанных в табл. 1. Испытания проводились на базе ФБУН ГНЦ ПМБ и Алтайской противочумной станции.

Система праймеров, разработанная для дифференциации подвидов туляреимийного микроба может быть использована в двух температурных режимах амплификации, отличающихся температурой отжига праймеров – 60 °С происходит накопление ПЦР продукта вне зависимости от того ДНК штамма какого подвида использовано в качестве матрицы, форма кривой амплификации при этом приближена к клас-

сической сигмовидной (рис. 2, а).

Накопление ПЦР-продукта образующегося с матрицы ДНК *F. tularensis* subsp. *holarctica* происходит с некоторой задержкой (до 10 циклов). Анализ кривых плавления ПЦР-продуктов показывает, что пик кривой плавления у подвидов *tularensis* и *holarctica* составляет 80 °С, иногда 79,5 °С, а у подвида *mediasiatica* – 82 °С, иногда 81,5 °С (рис. 2, б). Следовательно, анализ кривых плавления позволяет однозначно дифференцировать *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* от других подвидов.

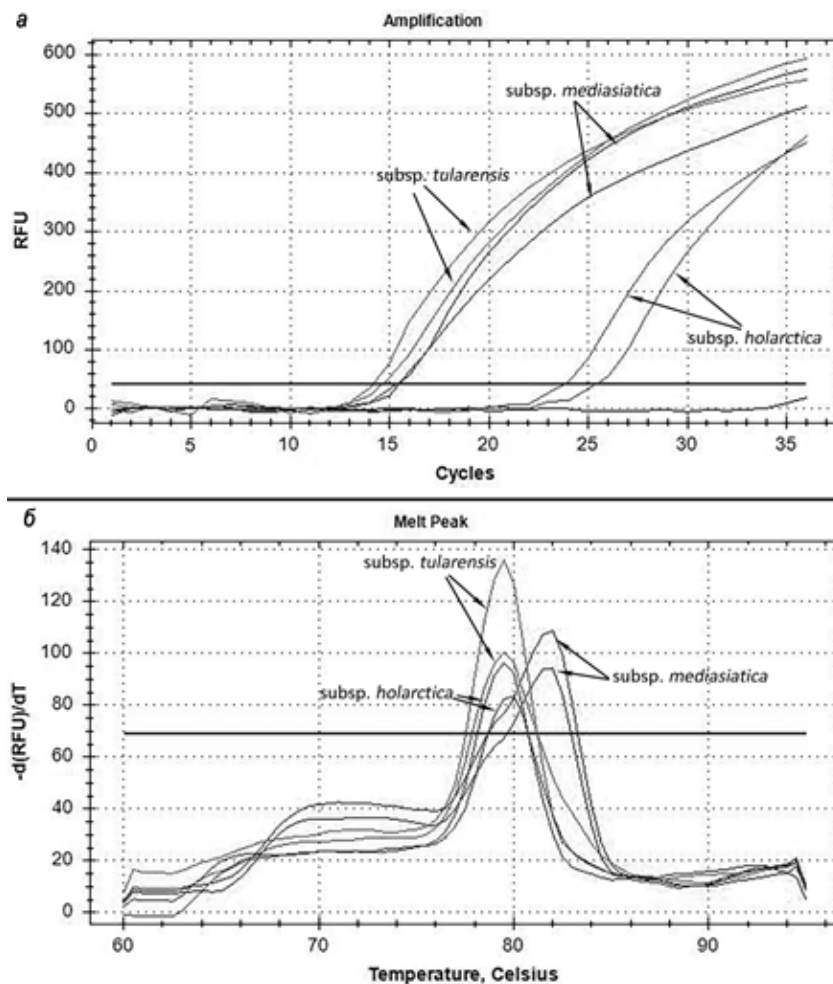


Рис. 2. Кривые амплификации (а) и кривые плавления (б) ПЦР-продуктов при использовании в качестве матрицы ДНК штаммов *F. tularensis* разных подвидов при температуре отжига 60 °С. Кривые рассчитаны и визуализированы программой Bio-Rad CFX manager.

При повышении температуры отжига праймеров снижается эффективность образования двуцепочечных димеров праймер-матрицы, что снижает эффективность ПЦР. При этом возрастает дестабилизирующее влияние некомплементарных оснований в 3' концевой области праймера. В нашем случае при повышении температуры отжига до 62 °С эффективность ПЦР снижается значительно, при этом форма кривых амплификации для подвидов *tularensis* и *mediasiatica* приближается к линейной, для подвида *holarctica* ПЦР настолько неэффективна, что накопле-

ния продукта реакции за 30-35 циклов амплификации практически не происходит (рис. 3, а). Пики кривых плавления остаются прежними – 80 °С и 82 °С у подвидов *tularensis* и *mediasiatica*, соответственно. Для подвида *holarctica* ввиду крайне слабо выраженного накопления продукта амплификации пик кривой плавления выражен слишком слабо, и данная кривая может не учитываться при анализе (рис. 3, б). Этот вариант ПЦР позволяет дифференцировать все три патогенных подвида туляреимийного микроба.

Система праймеров, разработанная для дифферен-

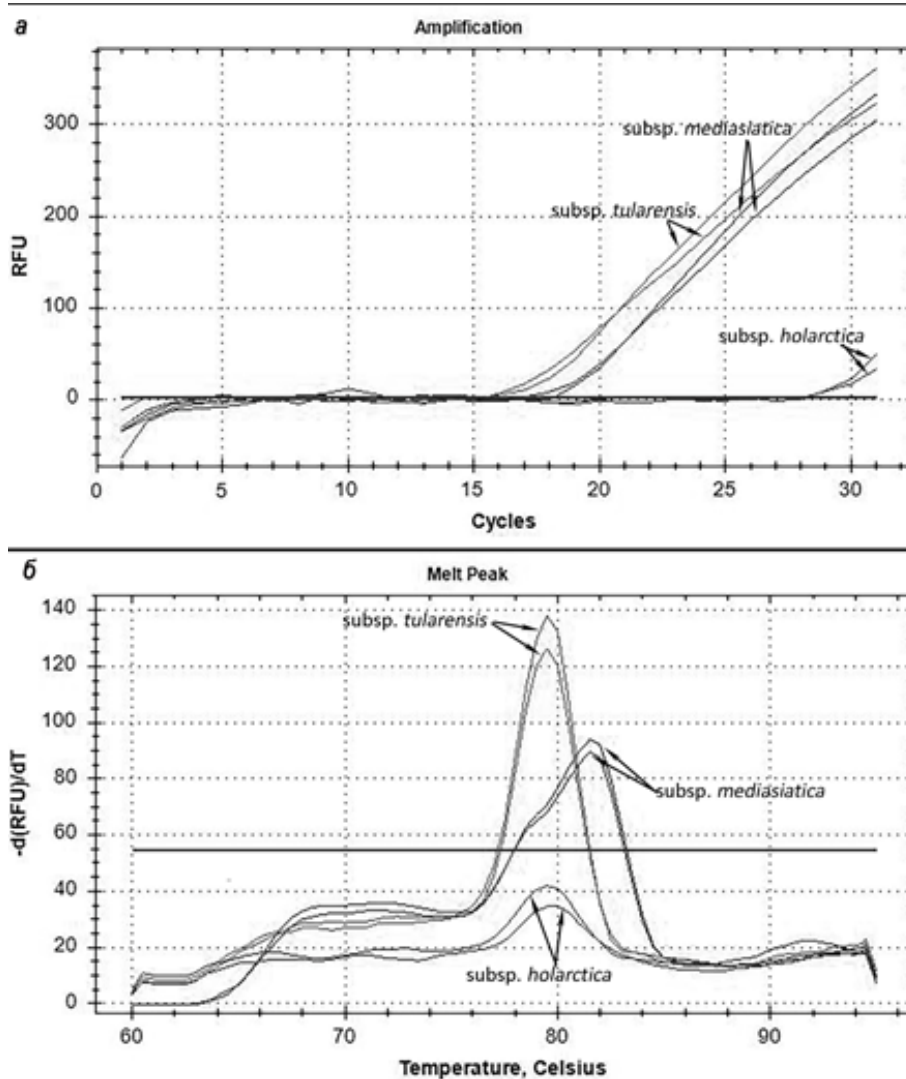


Рис. 3. Кривые амплификации (а) и кривые плавления (б) ПЦР-продуктов при использовании в качестве матрицы ДНК штаммов *F. tularensis* разных подвидов при температуре отжига 62 °С.

циации основного и неосновного подвидов чумного микроба работает при температуре отжига праймеров 60 °С. При этом не видно разницы в кривых амплификации для дифференцируемых подвидов, и определение подвидовой принадлежности осуществляется только на стадии анализа кривых плавления - пик кривой плавления у подвида *pestis* составляет 87 °С, а у подвида *microtus* (bv. *altaic*) - 88,5 °С (рис. 4, а, б).

Обсуждение. Применён метод MELT-МАМА ПЦР для решения задачи быстрой дифференциации подвидов туляреминого и чумного микробов, циркулирующих на территории горного Алтая. Предложенные олигонуклеотиды могут быть использованы не только для подвидовой диагностики уже выделенных штаммов, но и для индикации соответствующих возбудителей в полевом или клиническом материале.

Использованный подход не является единственным решением этой задачи. На данный момент существуют коммерчески доступные ПЦР-тест-системы и иммунохроматографические тесты для индикации

чумного и туляреминого микробов. Но при этом проблема точной и быстрой идентификации внутривидовых групп этих микроорганизмов разработана недостаточно. Если исключить из обсуждения традиционные биохимические тесты (определение способности к расщеплению рамнозы для чумного микроба и к расщеплению нитроцефина для туляреминого), которые требуют значительного времени и работы с чистыми культурами возбудителей, то мы можем констатировать, что для решения этой задачи применяются в основном методы на основе ПЦР. Большая часть этих методов предполагает электрофоретический учёт результатов одной или нескольких ПЦР-реакций для каждого тестируемого штамма [25-28], что увеличивает время- и трудозатратность анализа. Существуют лишь отдельные работы, посвящённые экспресс-дифференциации подвидов чумного микроба с помощью ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов реакции [29]. Для туляреминого микроба отсутствуют экспресс-методы

дифференциации подвида *mediasiatica* от других подвидов. Большие трудности возникают при попытке дифференцировать этот подвид от подвида *tularensis*, поскольку большая часть предлагаемых тестов плохо воспроизводится на представительной выборке штаммов. С одной стороны, эта задача не столь актуальна, так как ареалы распространения этих подвидов (Северная Америка, Средняя Азия, южная Сибирь, соответственно) не пересекаются. С другой стороны, в

условиях современной глобализации и транспортной логистики нельзя исключить ни случайного, ни преднамеренного заноса патогенов в неэндемичные для них регионы, что актуализирует задачу дифференциации различных внутривидовых групп и превентивной разработки соответствующих методов диагностики. Разработанная схема ПЦР позволяет надёжно дифференцировать среднеазиатский подвид от других подвидов, в том числе и подвида *tularensis*.

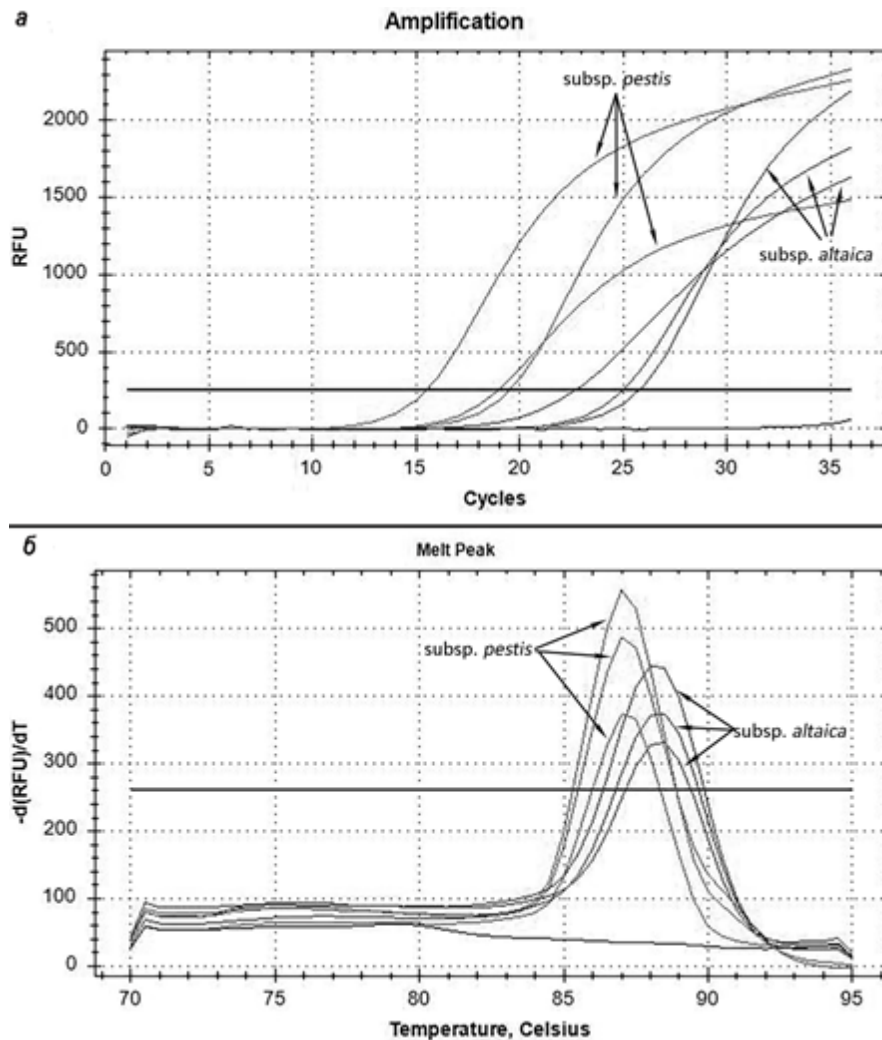


Рис. 4. Кривые амплификации (а) и кривые плавления (б) ПЦР-продуктов при использовании в качестве матрицы ДНК штаммов *Y. pestis* подвидов *pestis* и *altaica*.

Примененный метод MELT-МАМА ПЦР с технической точки зрения заключается в детекции в каждой ПЦР-РВ одной SNP-мишени в присутствии интеркалирующего красителя по анализу кривой плавления полученного ампликона. Эти особенности метода обуславливают специфическую комбинацию его недостатков и преимуществ. Недостатками метода являются: 1) отсутствие технической возможности детекции одновременно нескольких ПЦР-мишеней в одной реакционной смеси; 2) достаточно высокая чувствительность к составу реакционной смеси, что

в ряде случаев может приводить к необходимости изменения температурного режима амплификации при изменении состава смеси, например, при переходе на ПЦР-реагенты другого изготовителя; 3) необходимость использования ПЦР-амплификатора, обладающего функцией анализа кривых плавления; 4) большая, чем при ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией сложность расчёта праймеров, особенно количества и позиции некомплементарных оснований, и оптимальной температуры отжига праймеров, что может требовать эмпирического выбора

олигонуклеотидов из нескольких сконструированных вариантов и более трудоёмкой оптимизации температурного режима реакции. К преимуществам метода можно отнести: 1) высокую скорость анализа, позволяющую в отличие от молекулярно-генетических методов с электрофоретическим учётом результатов проводить анализ в течение нескольких часов; 2) отсутствие использования флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов, что удешевляет анализ и увеличивает срок хранения рабочих растворов олигонуклеотидов по сравнению с ПЦР-РВ с гибридно-флуоресцентной детекцией, используемой в большинстве коммерчески доступных ПЦР-тест систем; 3) возможность детекции однонуклеотидных ПЦР мишеней. Последний пункт на наш взгляд перевешивает все недостатки метода.

Используемый в работе метод детекции однонуклеотидных ДНК маркёров может быть применим для решения гораздо более широкого круга задач, от определения таксономического положения исследуемого штамма с различной степенью разрешения, до определения неких функциональных мутаций в том или ином гене, так как метод MELT-МАМА ПЦР может быть успешно адаптирован для детекции практически любых SNP без проведения секвенирования.

Заключение. MELT-МАМА ПЦР применён в качестве экспресс-метода дифференциации *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* от других подвидов туляремийного микроба и *Y. pestis* subsp. *pestis* от *Y. pestis* subsp. *microtus*, используя в качестве мишеней подвидоспецифические SNP. В случае с туляремийной инфекцией, данная модификация метода MELT-МАМА является по существу единственной, которая надёжно и быстро дифференцирует все подвиды. Для чумного микроба подвидовая диагностика более разработана и существуют аналоги, но использование этого не очень распространённого метода может оказаться полезным и для подвидовой диагностики *Y. pestis*. Данный метод может быть интересен широкому кругу исследователей для детекции диагностически, филогенетически или филогеографически важных SNP без проведения полногеномного секвенирования.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5 - 7, 9 - 21 с.м.)
REFERENCES

1. Корзун В.М., Балахонов С.В., Денисов А.В., Ярыгина М.Б., Рождественский Е.Н., Абибулаев Д.Э. и др. Монгольская часть трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы в 2017 г. Сообщение 1. Эпизоотическая ситуация. Проблемы особо опасных инфекций. 2018; 1: 79-84. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-79-84.
2. Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Гладких А.С., Миронова Л.В., Феранчук С.И., Бочалгин Н.О. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2019; 3: 34-42. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42.
3. Кисличкина А.А., Платонов М.Е., Вагайская А.С., Богун А.Г., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Рациональная таксономия *Yersinia pestis*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019; 37(2):76-82. DOI: 10.17116/molgen20193702176.
4. Корзун В.М., Балахонов С.В., Косилко С.А., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В. и др. Особенности эпизоотиче-

- ской и эпидемической активности Горно-Алтайского природного очага чумы в 2012-2016 годах. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2017; 16(1): 36-8. DOI: 36-8.10.31631/2073-3046-2017-16-1-36-38.
8. Родионова И.В. Дифференциация географических рас *Francisella tularensis* на основании активности цитруллинуреидазы. Лабораторное дело. 1970; 1: 42-3.
 22. Бахтеева И.В., Кравченко Т.Б., Рябко А.К., Титарева Г.М., Лев И.О., Мокриевич А.Н. и др. Особенности β-лактамазной активности среднеазиатского подвида туляремийного микроба. Инфекция и иммунитет. 2018; 8(1): 33-42. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-33-42.
 23. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Дёмина Ю.В., Пакскина Н.Д., Шарова И.Н. и др. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 2. Особенности лабораторной диагностики и молекулярно-генетическая характеристика выделенных штаммов. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 4: 43-51. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-43-51.
 24. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Одинокоев Г.Н. и др. Сравнение полной нуклеотидной последовательности гена *glaS* у штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов. Проблемы особо опасных инфекций. 2008; 3(97): 38-42. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-3(97)-38-42.
 25. Кисличкина А. А., Кадникова Л.А., Платонов М.Е., Майская Н.В., Коломбет Л.В., Соломенцев В.И. и др. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного, неосновного подвидов и других представителей *Yersinia pseudotuberculosis* complex. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017; 35(2): 43-8. DOI: 10.3103/S0891416817020070.
 26. Гаева А.В., Булгакова Е.Г., Суханосов И.Ю., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Идентификация и внутривидовое типирование штаммов чумного микроба с определением их потенциальной вирулентности методом ПЦР. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; 2(108): 36-41. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-2(108)-36-41.
 27. Сорокин В. М., Водопьянов А. С., Цимбалистова М. В., Павлович Н. В. Дифференциация подвидов *Francisella tularensis* методом INDEL-типирования. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022; 99: 193-202. DOI: 10.36233/0372-9311-189.
 28. Вахрамеева Г.М., Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Миронова Р.И., Дятлов И.А. ПЦР дифференциация подвидов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; 1(107): 46-8. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-46-48.
 29. Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ситгметов Д.А., Осина Н.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование набора реагентов «ГенПестподвид/алтай-РГФ». Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 4: 90-5. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95.

REFERENCES

1. Korzun V.M., Balakhonov S.V., Denisov A.V., Yarygina M.B., Rozhdestvensky E.N., Abibulaev D.E. et al. The Mongolian part of the transborder Sailugem natural plague outbreak in 2017. Message 1. Epizootic situation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2018; 1: 79-84. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-79-84. (in Russian)
2. Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Gladkikh A.S., Mironova L.V., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O. et al. Molecular genetic characteristics of *Yersinia pestis* strains, isolated in the Mongolian territory of the transborder Sailugemsky native plague center. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2019; 3: 34-42. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42. (in Russian)
3. Kislichkina A.A., Platonov M.E., Vagayskaya A.S., Bogun A.G., Dentsovskaya S.V., Anisimov A.P. Rational taxonomy of *Yersinia pestis*. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2019; 37(2): 76-82. DOI: 10.17116/molgen20193702176. (in Russian)

4. Korzun V.M., Balakhonov S.V., Kosilko S.A., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., et al. Features of epizootic and epidemic activity of the Gorno-Altai natural plague outbreak in 2012-2016. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2017; 16(1): 36-8. DOI: 36-8.10.31631/2073-3046-2017-16-1-36-38. (in Russian)
5. Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2007; 1105: 30-66. DOI:10.1196/annals.1409.011.
6. Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christiany D., Mokrievich A. et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. *PLoS One*. 2017; 12(9): 0183714. DOI:10.1371/journal.pone.0183714.
7. Timofeev V., Titareva G., Bakhteeva I., Kombarova T., Kravchenko T., Mokrievich A. et al. The Comparative virulence of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* for vaccinated laboratory animals. *Microorganisms*. 2020; 8(9): 1403. DOI:10.3390/microorganisms8091403.
8. Rodionova I.V. Differentiation of geographic races of *Francisella tularensis* on the basis of citrulline ureidase activity. *Laboratornoe delo*. 1970; 1: 42-3. (in Russian)
9. Kim S., Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2007; 9: 289-20. DOI:10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037.
10. Shi M.M. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin. Chem.* 2001; 47: 164-72.
11. Ding C., Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping. *Methods in molecular biology*. 2009; 578: 245-54. DOI: 10.1007/978-1-60327-411-1_16.
12. Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N., Spasic D., Goda L. et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*. 1990; 18: 999-1005. DOI: 10.1093/nar/18.4.999.
13. Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Research*. 1992; 20: 4567-73. DOI: 10.1093/nar/20.17.4567.
14. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*. 1989; 17: 2503-16. DOI: 10.1093/nar/17.7.2503.
15. Cha R.S., Zarbl H., Keohavong P., Thilly W.G. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *PCR Methods Appl.* 1992; 2: 14-20. DOI: 10.1101/gr.2.1.14.
16. Papp A.C., Pinsonneault J.K., Cooke G., Sadee W. Single nucleotide polymorphism genotyping using allele-specific PCR and fluorescence melting curves. *Biotechniques*. 2003; 34: 1068-72. DOI: 10.2144/03345dd03.
17. Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M. et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *Journal of Bacteriology*. 2009; 191: 2474-84. DOI: 10.1128/JB.01786-08.
18. Dall'Ozzo S., Andres C., Bardos P., Watier H., Thibault G. Rapid single-step FCGR3A genotyping based on SYBR Green I fluorescence in real-time multiplex allele-specific PCR. *Journal Immunol. Methods*. 2003; 277: 185-92. DOI:10.1016/s0022-1759(03)00123-6.
19. Waterfall C.M., Cobb B.D. SNP genotyping using single-tube fluorescent bidirectional PCR. *Biotechniques*. 2002; 33(1):80, 82-4, 86 passim. DOI: 10.2144/02331st05.
20. Fonseca-Coronado S., Vaughan G., Cruz-Rivera M.Y., Carpio-Pedroza J.C., Ruiz-Tovar K. et al. Interleukin-28B genotyping by melt-mismatch amplification mutation assay PCR analysis using single nucleotide polymorphisms rs12979860 and rs8099917, a useful tool for prediction of therapy response in hepatitis C patients. *Journal Clin. Microbiol.* 2011; 49: 2706-10. DOI: 10.1128/JCM.00877-11.
21. Birdsell D.N., Pearson T., Price E.P., Hornstra H.M., Nera R.D. et al. MELT analysis of mismatch amplification mutation assays MELT-MAMA: a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS One*. 2012; 7(3): 32866. DOI: 10.1371/journal.pone.0032866.
22. Bakhteeva I.V., Kravchenko T.B., Ryabko A.K., et al. Features of beta-lactamase activity in *Francisella tularensis* subsp. *Mediasiatica*. *Infektsiya i immunitet*. 2018; 8(1): 33-42. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-33-42. (in Russian)
23. Kuttyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Paksina N.D., Sharova I.N. et al. Infection of an Individual with Plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2014. Communication 2. Peculiarities of Laboratory Diagnostics and Molecular-Genetic Characterization of the Isolated Strains. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2014; (4): 43-51. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-43-51. (in Russian)
24. Koukleva L.M., Yeroshenko G.A., Kouklev V.E., Krasnov Y.M., Guseva N.P., Odinokov G.N. et al. Comparison of complete nucleotide sequence of rhaS gene in the strains of plague etiological agent of main and minor subspecies. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2008; 3(97): 38-42. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-3(97)-38-42. (in Russian)
25. Kislichkina A.A., Kadnikova L.A., Platonov M.E., Maiskaya N.V., Kolombet L.V., Solomentsev V.I. et al. Differentiation of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* subsp. *pestis* and subsp. *microti* strains and other representatives of *Yersinia pseudotuberculosis* complex. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 32(2): 67-74. DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-2-43-48. (in Russian)
26. Gaeva A.V., Boolgakova E.G., Sukhonorov I.Yu., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kuttyrev V.V. Identification and intraspecific typing of plague microbe strains with their potential virulence determination using PCR. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2011; 2(108): 36-41. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-2(108)-36-41. (in Russian)
27. Sorokin V.M., Vodopyanov A.S., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Differentiation of the *Francisella tularensis* subspecies by the INDEL typing method. *Zhurnal mikrobiologii, e'pidemiologii i immunobiologii*. 2022; 99(2): 193-202. DOI: 10.36233/0372-9311-189. (in Russian)
28. Vakhrameeva G.M., Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Mironova R.I., Dyatlov I.A. PCR Differentiation of *Francisella tularensis* subspecies using one primer. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2011; 1(107): 46-8. DOI: 0.21055/0370-1069-2011-1(107)-46-48. (in Russian)
29. Nikiforov K.A., Koukleva L.M., Sitmbetov D.A., Osina N.A., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. Construction of the reagent panel "GenPest-subspecies/Altai-RGF". *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (4): 90-5. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95. (in Russian)