

Статистическая оценка согласованности результатов двух методов генотипирования штаммов *Francisella tularensis* двух подвидов

В.М.Сорокин, А.С.Водопьянов, М.В.Цимбалистова, Н.В.Аронова, Р.В.Писанов,
Ю.Г.Семенко, Р.С.Махмудов, Н.В.Павлович

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

Francisella tularensis – этиологический агент туляремии, инфекционного заболевания человека, грызунов и зайцеобразных. *F. tularensis* включает четыре подвида (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), которые различаются по своей патогенности и приуроченности к ландшафтно-географическим зонам. Несмотря на различия, штаммы *F. tularensis* проявляют очень ограниченное генетическое разнообразие, что затрудняло разработку полезных инструментов для изучения эпидемиологии патогена. Одним из первых инструментов дифференциации штаммов возбудителя туляремии стал метод VNTR. В дальнейшем развитие методов полногеномного секвенирования (WGS) способствовало созданию методов типирования бактерий с помощью анализа геномных SNP (single nucleotide polymorphism). В настоящее время для генотипирования микроорганизмов все чаще применяются иерархические методы дифференциации, основанные на MLVA и SNP-анализе. Целью исследования является статистический анализ корреляции результатов MLVA и SNP-типовирования для выявления генетического разнообразия штаммов двух подвидов – *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *mediasiatica*. Сравнительный анализ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) дендрограмм методом танглограмм позволил оценить согласованность кластеризации данных, полученных при разных способах генотипирования 31 штамма подвида *holarctica*. Коэффициент корреляции (BGI) составил 0,76, что означает сильную корреляцию разных методов кластеризации. Для 59 штаммов подвида *mediasiatica* BGI оказался равен 0,89 и приближен к показателю очень сильной корреляции. Корреляция согласованности кластеризации генотипов для обоих методов находится в пределах от сильной до очень сильной, что дает возможность их использования в иерархической схеме генотипирования штаммов *F. tularensis* двух изученных подвидов. Метод танглограмм впервые применен для сравнительной оценки результатов генотипирования выборки штаммов возбудителя туляремии двух подвидов (*holarctica* и *mediasiatica*) методами MLVA и SNP-типовирования.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, полногеномное секвенирование, SNP, VNTR, танглограмма, корреляция, филогенетический анализ

Для цитирования: Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Аронова Н.В., Писанов Р.В., Семенко Ю.Г., Махмудов Р.С., Павлович Н.В. Статистическая оценка согласованности результатов двух методов генотипирования штаммов *Francisella tularensis* двух подвидов. Бактериология. 2025; 10(4): 61–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-61-67

Statistical assessment of the consistency of the results of two methods of genotyping *Francisella tularensis* of two subspecies

В.М.Сорокин, А.С.Водопьянов, М.В.Цимбалистова, Н.В.Аронова, Р.В.Писанов,
Ю.Г.Семенко, Р.С.Махмудов, Н.В.Павлович

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

Francisella tularensis is an etiological agent of tularemia, an infectious disease of mammals, including humans, rodents and hare-like ones. The causative agent of the tularemia – *F. tularensis* is divided into four subspecies, which differ in their pathogenicity and dedication to landscape-geographical zones. Strains of *F. tularensis* show very limited genetic diversity, despite their different geographical origin and differences in virulence, which made it difficult to develop useful tools for studying the epidemiology of pathogen. One of the first tools for differentiating strains of the pathogen of the tularemia was the VNTR method.

Для корреспонденции:

Сорокин Владимир Михайлович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9113
ORCID: 0000-0002-1835-1496
Статья поступила 31.05.2025, принята к печати 25.12.2025

For correspondence:

Vladimir M. Sorokin, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the natural focal and zoonotic infections laboratory of Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksim Gor'ky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9113
ORCID: 0000-0002-1835-1496
The article was received 31.05.2025, accepted for publication 25.12.2025

The development of full-genomic sequencing methods (WGS) contributed to the development of methods of typifying bacteria by analyzing genomic SNP. Currently, hierarchical differentiation methods based on MLVA and SNP analysis are increasingly used for genotyping microorganisms.

The aim of the study is to analyze the correlation of the results of MLVA and SNP analysis methods to identify the genetic variety of strains of the two subspecies *F. tularensis*. A comparative analysis of the UPGMA dendograms by tanglegrams made it possible to evaluate the consistency of data clustering obtained with different genotyping methods of 31 subspecies of the subspecies of *holarctica*.

The correlation coefficient (BGI) is 0.76, which means a strong correlation of different clustering methods. For 59 strains, the subspecies of *mediasiatica* BGI was 0.89, and close to the indicator of a very strong correlation. Consultation of the classification of genotypes for both methods is in the range from strong to very strong, what makes it possible to use *F. tularensis* of two studied subspecies in the combined scheme of genotyping. The tanglegram method was used for the first time to compare the results of genotyping a sample of tularemia pathogen strains of two subspecies (*holarctica* and *mediasiatica*) using MLVA and SNP typing methods.

Key words: *Francisella tularensis*, whole genome sequencing, SNP, VNTR, tanglegram, correlation, phylogenetic analysis

For citation: Sorokin V.M., Vodopyanov A.S., Tsimbalistova M.V., Aronova N.V., Pisanov R.V., Semenko Yu.G., Mahmudov R.S., Pavlovich N.V. Statistical assessment of the consistency of the results of two methods of genotyping *Francisella tularensis* of two subspecies. Bacteriology. 2025; 10(4): 61–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-61-67

F *Francisella tularensis* – этиологический агент туляремии, инфекционного заболевания человека, грызунов и зайцеобразных. Возбудитель туляремии делится на четыре подвида: *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, которые различаются по своей патогенности и приуроченности к ландшафтно-географическим зонам [1]. Исторически такое разделение было обусловлено различными ареалами циркуляции штаммов, их отличиями в биохимической активности и патогенностью для разных хозяев [2, 3]. Штаммы туляремийного микробы проявляют весьма ограниченное генетическое разнообразие, что затрудняло разработку инструментов для изучения их эпидемиологических особенностей. В 2001 г. при анализе нуклеотидной последовательности ДНК штамма *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 впервые были обнаружены короткие tandemные повторы SSTR9 и SSTR16, представленные шестью и девятью повторяющимися нуклеотидами [4]. Число повторов различалось у разных штаммов одного подвида, что позволило создать систему типирования с индексом разнообразия, равным 0,97. В это же время Farlow et al. был предложен набор из шести VNTR-локусов (V1-V6) с индексом разнообразия от 0,36 до 0,93 [5]. Анализ 56 штаммов, выделенных в четырех штатах США, и вакцинного штамма *F. tularensis* LVS привел к разделению их на две генетически различные группы: биовар А (подвид *tularensis*) и биовар В (подвид *holarctica*). Авторами предложен термин MLVA (multilocus VNTR analysis) и показана применимость метода для быстрой характеристики и идентификации культур из разных эндемичных очагов. В 2004 г. была разработана схема генотипирования *F. tularensis*, ставшая со временем классической, основанная на анализе 25 VNTR-локусов [6]. Проведен анализ репрезентативной коллекции 192 штаммов туляремийного микробы, включающей представителей всех четырех подвидов. Кластерный анализ позволил выявить 120 индивидуальных VNTR-генотипов и точно дифференцировать все подвиды. Обнаружено разделение штаммов подвида *tularensis* на два кластера (A.I и A.II). В целом это исследование внесло значительный вклад в изучение экологии и эпидемиологии возбудителя туляремии. Практически все последующие работы по VNTR-генотипированию штаммов *F. tularensis* так или иначе были основаны на клас-

тической схеме Johansson или ее модификациях [7–9]. В модификации Vogler et al. использованы 10 наиболее вариабельных VNTR-маркеров, что обусловлено сложностью «классической» схемы для рутинной лабораторной диагностики и необходимостью постановки 25 отдельных полиморфных цепных реакций (ПЦР) для каждого образца [7]. Модифицированный метод предполагает мультиплексный формат и проведение всего пяти ПЦР для каждого образца. Разрешающая способность метода практически не меняется, за исключением недостаточной дифференциации отдельных штаммов. В таком случае при необходимости можно применить генотипирование, основанное на канонических SNP. Развитие методов полногеномного секвенирования (WGS) способствовало разработке типирования бактерий с помощью анализа геномных SNP. В настоящее время для генотипирования микроорганизмов все чаще применяются комбинированные методы дифференциации с использованием MLVA и SNP-анализа. Для сравнительного анализа результатов кластеризации посредством разных методов генотипирования применяется метод танглеграмм – графическое представление, используемое для сравнения двух филогенетических деревьев или иерархических кластерных классов [10, 11].

Целью исследования является анализ корреляции результатов MLVA и SNP-анализа для выявления генетического разнообразия штаммов двух подвидов *F. tularensis* – *holarctica* и *mediasiatica*.

Материалы и методы

Полногеномное секвенирование 56 штаммов *F. tularensis* осуществляли на платформе MiSeq Illumina. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с применением программы Spades [12]. Для сравнительного анализа использовали данные, полученные из базы данных NCBI. Кластерный анализ выполняли методом UPGMA, для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5.wgSNP-анализ полногеномных данных проводили по методике, описанной ранее [13, 14]. Для филогенетического анализа штаммов подвида *holarctica* выбраны 2000 SNP, подвида *mediasiatica* – 5000 SNP. MLVA проводили по пяти VNTR-локусам, как описано ранее [9]. Статистическую обра-

ботку результатов и построение танглограмм (Tanglegram plot) осуществляли с использованием пакета Base R v4.1.2 [15]. Для танглограмм статистически измерялась связь между ветвями в двух противоположных дендрограммах с помощью расчета гамма-индекса Бейкера (BGI) [16].

Результаты исследования и их обсуждение

В настоящее время при проведении внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей инфекционных заболеваний перспективным является использование двух и более типов молекулярных маркеров. Для филогенетического анализа популяций различных микроорганизмов успешно применяются как SNP-, так и VNTR-методы. Так, например, для популяций *Bacillus anthracis* применяется комбинация SNP- и VNTR-маркеров, включающая набор из 14 диагностически значимых SNP (canSNP) на первом этапе [17, 18]. Важным направлением для генотипирования штаммов *Burkholderia pseudomallei* является использование комбинации VNTR-локусов, обеспечивающей высокую дискриминирующую способность мультилокусного анализа числа вариабельных tandemных повторов (MLVA), в сочетании с медленно эволюционирующими единичными нуклеотидными полиморфизмами (SNP) [19]. При анализе вспышки заболевания, вызванного бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, проведенном с применением методов VNTR-типовирования и полногеномного секвенирования, авторы пришли к выводу о целесообразности применения на первом этапе простого и быстрого метода MLVA с последующим секвенированием изолятов с одинаковым MLVA-профилем [20].

В то же время данные по сравнительному изучению результатов совместного VNTR- и SNP-типовирования штаммов *F. tularensis* весьма немногочисленны. В работе Myrtennäs et al. показано, что кластеризация по VNTR-генотипам согласуется с таковой по 117 информативным SNP-генотипам, при этом метод SNP обладает большей разрешающей способностью – 45 изученных штаммов представлены 23 SNP-генотипами и лишь шестью VNTR-генотипами [21]. Только лишь в одном случае один SNP-генотип делится на два VNTR-генотипа. Шевцовым с соавт. представлены результаты генотипирования 39 штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica*, выделенных в Казахстане, с использованием MLVA, canSNP и wgSNP [22]. Генотипирование MLVA проводили по классической схеме, включающей 25 локусов, из них только пять локусов оказались вариабельными для данной популяции. В набор были включены еще два VNTR-локуса, обнаруженные авторами *in silico*. Изученные штаммы представлены 19 MLVA-генотипами, причем кластеризация по MLVA-генотипам коррелирует с таковой для canSNP и wgSNP-типовирования и разрешающая способность методов примерно одинакова. Анализ ридов длиной 300 п.н. позволил корректно идентифицировать все VNTR-аллели у 39 изученных штаммов [22]. Авторы делают вывод о том, что ПЦР-анализ с использованием набора MLVA7 совместим с анализом WGS *in silico* и должен облегчить выбор штаммов для секвенирования и контроля качества идентичности штаммов. Ограничением для применения метода VNTR-типовирования является его слабая применимость для анализа последовательности генома, собранной

из коротких ридов. Во всех упомянутых работах результаты кластеризации генотипов, полученные разными методами, оценивают визуально по составу кластеров и их взаимному расположению. Более обоснованной может быть статистически значимая оценка сходства или расхождения результатов кластеризации, что и предполагается осуществить в данном исследовании, используя метод танглограмм. Очевидным преимуществом метода является возможность сравнения результатов кластеризации методов генотипирования с использованием разного типа данных (SNP vs VNTR). Успешным образцом применения метода является сравнение результатов анализа INDEL-, вируло- и WG-SNP-типовирования штаммов *P. aeruginosa* различного происхождения [23].

Для сравнительного анализа кластеризации методами wgSNP и MLVA-типовирования использована выборка из 31 штамма подвида *holarctica*, выделенных ранее в Ростовской области, ДНР и ЛНР [21]. Проведен сравнительный анализ UPGMA дендрограмм методом танглограмм, позволяющим оценить сопоставимость кластеризации данных, полученных при разных способах генотипирования (рис. 1).

Рассчитанный BGI равен 0,76, что соответствует сильной корреляции разных методов кластеризации. Кластеры, полученные при разных методах типирования, соответствуют canSNP типам B.26 и B.27, описанным ранее [24]. При подробном рассмотрении танглограммы становится очевидной более высокая дифференцирующая способность метода wgSNP. Соответственно, при разработке комбинированного метода генотипирования штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* на первом этапе может быть использован метод VNTR с последующим wgSNP-анализом штаммов с одинаковым VNTR-генотипом (рис. 2).

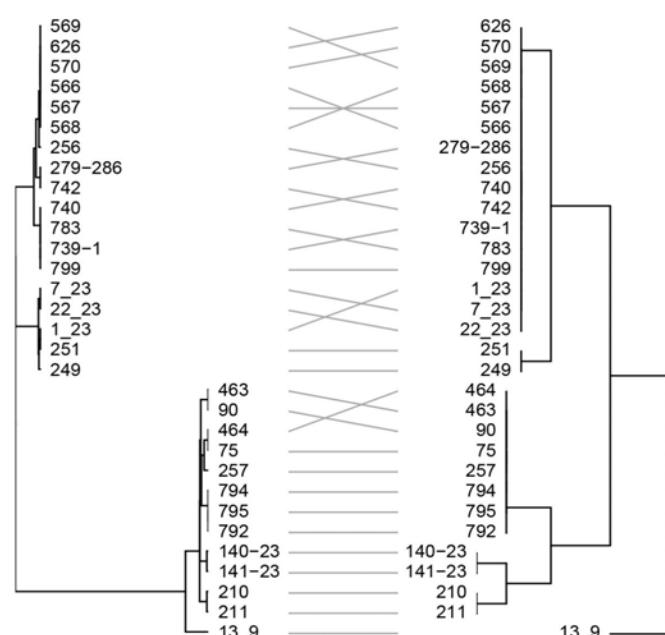


Рис. 1. Танглограмма, отражающая согласованность между WG-SNP типированием и VNTR-типованием штаммов подвида *holarctica*. Дендрограмма, построенная на основе wgSNP-анализа – слева, построенная по VNTR-локусам – справа.

Fig. 1. A tanglegram reflecting the agreement between wgSNP typing and VNTR typing of strains subsp. *holarctica*. A dendrogram based on wgSNP analysis is on the left, and a dendrogram based on VNTR loci is on the right.

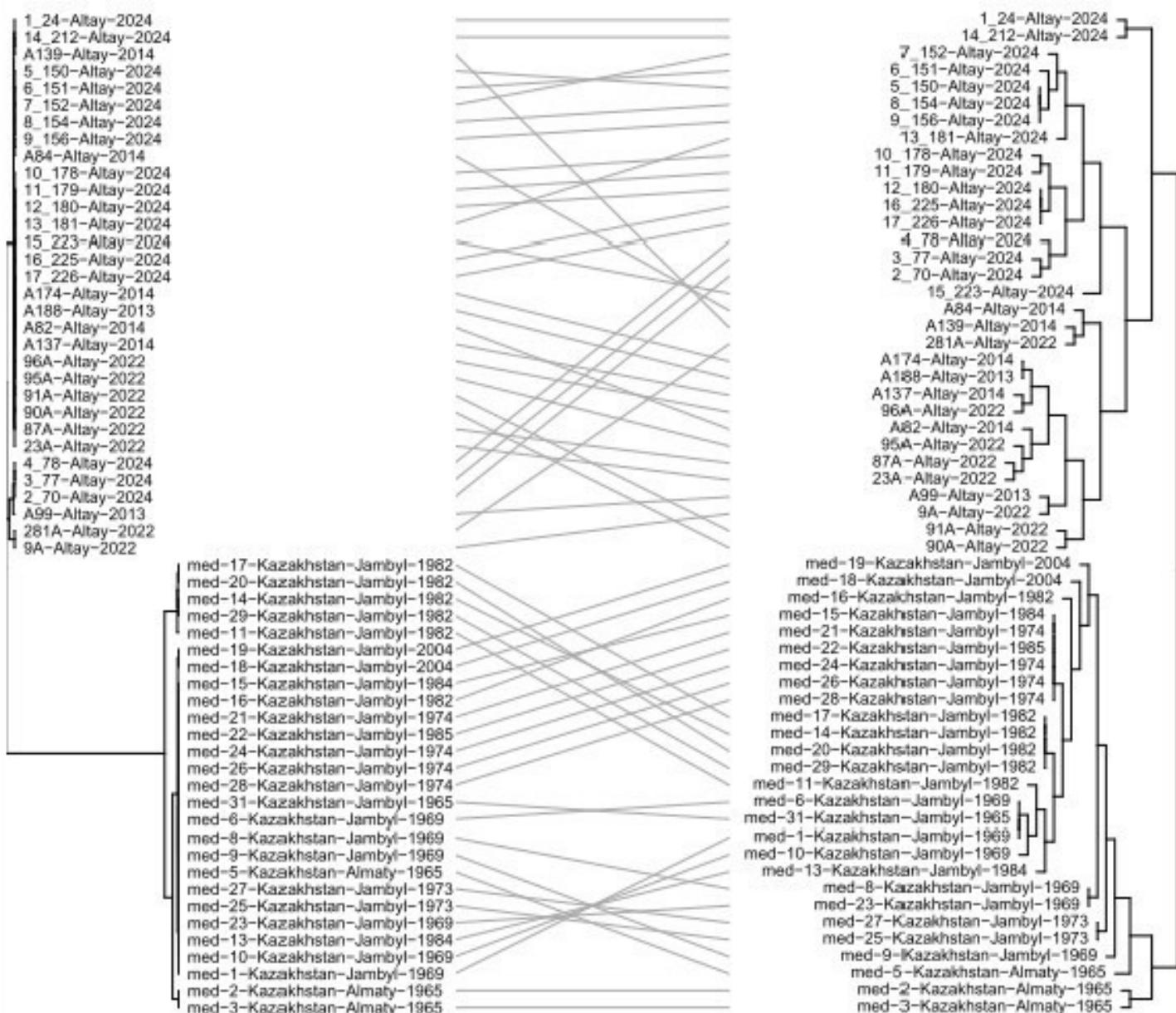


Рис. 2. Танглограмма, отражающая согласованность между wgSNP-типованием и VNTR-типованием штаммов подвида *mediasiatica*. Дендрограмма, построенная на основе wgSNP-анализа – слева, построенная по VNTR-локусам – справа.

Fig. 2. A tanglegram reflecting the consistency between wgSNP typing and VNTR typing of strains subsp. *mediasiatica*. A dendrogram based on wgSNP analysis is on the left, and a dendrogram based on VNTR loci is on the right.

Для сравнительного анализа кластеризации методами wgSNP и MLVA-типовирования использована выборка из 32 штаммов подвида *mediasiatica*, выделенных ранее в Республике Алтай и Алтайском крае, а также 27 штаммов из Казахстана [25]. BGI оказался равен 0,89, что приближено к оценке очень сильной корреляции использованных методов кластеризации. Два основных кластера, образованных при обоих методах типирования, совпадают с группами M.I и M.II, описанными ранее [8]. Структура генетических линий группы M.I совпадает с таковой, определенной в работе, несмотря на независимый выбор SNP для анализа [22]. По версии wgSNP-типовирования и «алтайская», и «казахстанская» популяции штаммов подвида *mediasiatica* проявляют достаточно высокую гомогенность, причем факт однородности «казахстанской» популяции отмечен и другими авторами [25]. Метод MLVA-типовирования проявляет более высокую диффе-

ренцирующую способность для штаммов данного подвида и может быть использован на втором этапе схемы генотипирования.

Каждый из примененных методов генотипирования обладает своими преимуществами и недостатками. К достоинствам MLVA-типовирования следует отнести высокую дискриминирующую способность для близкородственных штаммов, что делает метод особенно ценным при расследовании локализованных вспышек заболевания. Метод отличается относительной простотой выполнения и доступностью по сравнению с методами секвенирования и требует всего 1–2 дня для получения результатов. К недостаткам относится риск ошибочной оценки родства между штаммами на больших генетических расстояниях из-за высокой скорости мутаций VNTR-локусов [25]. Метод широко применяется для регионального мониторинга возбудителя туляремии, эпиде-

миологического надзора и расследования вспышек заболевания.

Для wgSNP-типовирования характерна высокая стабильность SNP-маркеров, что делает их надежными эволюционными индикаторами [26]. Его применение позволяет реконструировать глобальную филогеографию *F. tularensis* и проследить пути распространения различных линий патогена. В отличие от метода MLVA полногеномный SNP-анализ требует значительных вычислительных ресурсов и биоинформационической экспертизы. Результаты филогенетического анализа в большой степени зависят от выбора SNP. Необходимо отметить его высокую стоимость и технологическую сложность, а также значительное время исполнения – от 7 до 14 дней.

В настоящее время для внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей инфекционных заболеваний актуальным является использование двух и более типов молекулярных маркеров. Для филогенетического анализа популяций различных микроорганизмов успешно применяются как SNP-, так и VNTR-методы. В представленной работе проведен сравнительный анализ результатов SNP- и VNTR-типовирования штаммов двух подвидов *F. tularensis* (*holarctica* и *mediasiatica*). Для сравнения UPGMA дендрограмм впервые использован метод танглограмм, позволяющий оценить согласованность кластеризации данных, полученных при разных способах генотипирования. Корреляция согласованности кластеризации генотипов для обоих методов находится в пределах от сильной до очень сильной, что дает возможность их использования в иерархической схеме генотипирования штаммов *F. tularensis* двух изученных подвидов и повышает достоверность полученных результатов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

- 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.1409.0111
- Aikimbaev MA. Taxonomy of the genus *Francisella*. Rep Acad Sci Kaz SSR Ser Biol. 1966;5:42-44.
- Olsufjev NG, Meshcheryakova IS. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. Int J Syst Bacteriol. 1983;33:872-874. DOI: 10.1099/00207713-33-4-87221
- Johansson A, Göransson I, Larsson P, Sjöstedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. J Clin Microbiol. 2001 Sep;39(9):3140-6. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001
- Farlow J, Smith KL, Wong J, Abrams M, Lytle M, Keim P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. J Clin Microbiol. 2001 Sep;39(9):3186-92. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3186-3192.2001
- Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Byström M, et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J Bacteriol. 2004 Sep;186(17):5808-18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004
- Vogler AJ, Birdsall D, Wagner DM, Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. Lett Appl Microbiol. 2009 Jan;48(1):140-4. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02484.x
- 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 Sep 5;12(9):e0183714. DOI: 10.1371/journal.pone.0183714
- Сорокин ВМ, Павлович НВ, Водопьянов АС, Цимбалистова МВ, Писанов РВ, Носков АК. Молекулярно-генетические методы типирования: филогенетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis* различного происхождения. Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермольевские чтения. 2022;301-306.
- Okutani A, Inoue S, Noguchi A, Kaku Y, Morikawa S. Whole-genome sequence-based comparison and profiling of virulence-associated genes of *Bacillus cereus* group isolates from diverse sources in Japan. BMC Microbiol. 2019 Dec 16;19(1):296. DOI: 10.1186/s12866-019-1678-1
- Gupta S, Almeida A. Integration of metagenome-assembled genomes with clinical isolates reveals genomic signatures of *Klebsiella pneumoniae* in carriage and disease. bioRxiv. 2024;2024-12. DOI: 10.1101/2024.12.17.628241
- Bankovich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012 19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
- Водопьянов АС, Писанов РВ, Водопьянов СО, Олейников ИП. Совершенствование методики SNP-типовирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвенирования. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020;97(6):587-593. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-9
- Водопьянов АС, Писанов РВ, Водопьянов СО, Цимбалистова МВ, Пичурина НЛ, Сорокин ВМ, и др. Сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов *Francisella tularensis*, изолированных в Ростовской области в 2020 г., и последовательностей геномов штаммов, выделенных в различных регионах мира. Проблемы особо опасных инфекций. 2023;3:59-65. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-59-65
- Galili T. dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. Bioinformatics. 2015 Nov 15;31(22):3718-20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv428
- Baker FB. Stability of two hierarchical grouping techniques case I: sensitivity to data errors. J of the American Statistical Association. 1974;69(346):440-445.
- Timofeev VS, Bakhteeva IV, Dyatlov IA. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. Russ. J Genet. 2018;54(1):1-11. DOI: 10.1134/S1022795418010118
- Anisimova EA, Fakhrutdinov NA, Mirgazov DA, Dodonova EA, Elizarova IA, Gorbunova M, et al. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2022;26(6):560-567.
- Леденева МЛ, Ткаченко ГА, Захарова ИБ. Новые генетические маркеры для типирования штаммов *Burkholderia pseudomallei*. Инфекция и иммунитет. 2022;12(6):1091-1102. DOI: 10.15789/2220-7619-NGM-1965
- Bidet P, Birgy A, Brethon B, Dalle JH, Mariani-Kurdjian P, Courroux C, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates including multidrug-resistant serogroup O12 isolates, by use of a rapid and simplified multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis and whole genome sequencing. J Hosp Infect. 2022 Dec;130:56-62. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.012

21. Myrtennäs K, Escudero R, Zaballos Á, González-Martín-Niño R, Gyuranecz M, Johansson A. Genetic Traces of the *Francisella tularensis* Colonization of Spain, 1998–2020. *Microorganisms*. 2020 Nov 14;8(11):1784. DOI: 10.3390/microorganisms8111784
22. Shevtsov V, Kairzhanova A, Shevtsov A, Shustov A, Kalendar R, Abdurakhmanov S, et al. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 May 17;15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419
23. Ковалевич АА, Писанов РВ, Водопьянов АС. Сравнительный анализ методов генотипирования штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. *Бактериология*. 2025;10(2):67–73. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-67-73
24. Кудрявцева ТЮ, Водопьянов АС, Писанов РВ, Сорокин ВМ, Мокриевич АН. Филогенетическое типирование штаммов *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, выделенных на территории Российской Федерации. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2024;42(2):16–24. DOI: 10.17116/molgen20244202116
25. Shevtsov A, Izbanova U, Amirkazin A, Kairzhanova A, Dauletov A, Kiyan V, et al. Genetic Homogeneity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* Strains in Kazakhstan. *Pathogens*. 2024 Jul 12;13(7):581. DOI: 10.3390/pathogens13070581
26. Fu S, Octavia S, Wang Q, Tanaka MM, Tay CY, Sintchenko V, et al. Evolution of Variable Number Tandem Repeats and Its Relationship with Genomic Diversity in *Salmonella* Typhimurium. *Front Microbiol*. 2016 Dec 26;7:2002. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02002
- group isolates from diverse sources in Japan. *BMC Microbiol*. 2019 Dec 16;19(1):296. DOI: 10.1186/s12866-019-1678-1
11. Gupta S, Almeida A. Integration of metagenome-assembled genomes with clinical isolates reveals genomic signatures of *Klebsiella pneumoniae* in carriage and disease. *bioRxiv*. 2024;2024-12. DOI: 10.1101/2024.12.17.628241
12. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
13. Vodopianov AS, Pisanov RV, Vodopianov SO, Oleynikov IP. Improvement of the technique of SNP-typing of *Vibrio cholerae* strains on the basis of the analysis of the primary data of whole genome sequencing. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2020;97(6):587–593. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-9 (In Russian).
14. Vodop'yanov AS, Pisanov RV, Vodop'yanov SO, Tsimbalistova MV, Pichurina NL, Sorokin VM, et al. Comparative Molecular-Genetic Analysis of *Francisella tularensis* Strains Isolated in the Rostov Region in 2020 and Genome Sequences of the Strains Collected in Various Regions of the World. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(3):59–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-59-65 (In Russian).
15. Galili T. dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 2015 Nov 15;31(22):3718–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv428
16. Baker FB. Stability of two hierarchical grouping techniques case I: sensitivity to data errors. *J of the American Statistical Association*. 1974;69(346):440–445.
17. Timofeev VS, Bakhteeva IV, Dyatlov IA. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. *Russ. J Genet*. 2018;54(1):1–11. DOI: 10.1134/S1022795418010118
18. Anisimova EA, Fakhrutdinov NA, Mirgazov DA, Dodonova EA, Elizarova IA, Gorbunova M, et al. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):560–567.
19. Ledenyova ML, Tkachenko GA, Zakharchova IB. New genetic markers for *Burkholderia pseudomallei* strains typing. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(6):1091–1102. DOI: 10.15789/2220-7619-NGM-1965 (In Russian).
20. Bidet P, Birgy A, Brethon B, Dalle JH, Mariani-Kurdjian P, Courroux C, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates including multidrug-resistant serogroup O12 isolates, by use of a rapid and simplified multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis and whole genome sequencing. *J Hosp Infect*. 2022 Dec;130:56–62. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.012
21. Myrtennäs K, Escudero R, Zaballos Á, González-Martín-Niño R, Gyuranecz M, Johansson A. Genetic Traces of the *Francisella tularensis* Colonization of Spain, 1998–2020. *Microorganisms*. 2020 Nov 14;8(11):1784. DOI: 10.3390/microorganisms8111784
22. Shevtsov V, Kairzhanova A, Shevtsov A, Shustov A, Kalendar R, Abdurakhmanov S, et al. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 May 17;15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419
23. Kovalevich AA, Pisanov RV, Vodopyanov AS. Comparative analysis of methods of genotyping *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Bacteriology*. 2025;10(2):67–73. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-67-73 (In Russian).
24. Kudryavtseva TYu, Vodopyanov AS, Pisanov RV, Sorokin VM, Mokrievich AN. Phylogenetic typing of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains isolated on the Russian Federation territory. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2024;42(2):16–24. 10.17116/molgen20244202116 (In Russian).
25. Shevtsov A, Izbanova U, Amirkazin A, Kairzhanova A, Dauletov A, Kiyan V, et al. Genetic Homogeneity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* Strains in Kazakhstan. *Pathogens*. 2024 Jul 12;13(7):581. DOI: 10.3390/pathogens13070581
26. Fu S, Octavia S, Wang Q, Tanaka MM, Tay CY, Sintchenko V, et al. Evolution of Variable Number Tandem Repeats and Its Relationship with Genomic Diversity in *Salmonella* Typhimurium. *Front Microbiol*. 2016 Dec 26;7:2002. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02002

References

1. 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.1409.0111
2. Aikimbaev MA. Taxonomy of the genus *Francisella*. *Rep Acad Sci Kaz SSR Ser Biol*. 1966;5:42–44.
3. Olsufjev NG, Meshcheryakova IS. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int J Syst Bacteriol*. 1983;33:872–874. DOI: 10.1099/00207713-33-4-87221
4. Johansson A, Göransson I, Larsson P, Sjöstedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep;39(9):3140–6. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3140-3146.2001
5. Farlow J, Smith KL, Wong J, Abrams M, Lytle M, Keim P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep;39(9):3186–92. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3186-3192.2001
6. Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Byström M, et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Bacteriol*. 2004 Sep;186(17):5808–18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004
7. Vogler AJ, Birdsall D, Wagner DM, Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett Appl Microbiol*. 2009 Jan;48(1):140–4. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02484.x
8. 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 Sep 5;12(9):e0183714. DOI: 10.1371/journal.pone.0183714
9. Sorokin VM, Pavlovich NV, Vodopyanov AS, Tsybalistova MV, Pisanov RV, Noskov AK. Molecular genetic typing methods: phylogenetic characteristics of *Francisella tularensis* strains of different origins. Current issues of epidemiological surveillance of infectious and parasitic diseases in the south of Russia. *Ermoliev Readings*. 2022;301–306. (In Russian).
10. Okutani A, Inoue S, Noguchi A, Kaku Y, Morikawa S. Whole-genome sequence-based comparison and profiling of virulence-associated genes of *Bacillus cereus*
- group isolates from diverse sources in Japan. *BMC Microbiol*. 2019 Dec 16;19(1):296. DOI: 10.1186/s12866-019-1678-1
11. Gupta S, Almeida A. Integration of metagenome-assembled genomes with clinical isolates reveals genomic signatures of *Klebsiella pneumoniae* in carriage and disease. *bioRxiv*. 2024;2024-12. DOI: 10.1101/2024.12.17.628241
12. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
13. Vodopianov AS, Pisanov RV, Vodopianov SO, Oleynikov IP. Improvement of the technique of SNP-typing of *Vibrio cholerae* strains on the basis of the analysis of the primary data of whole genome sequencing. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2020;97(6):587–593. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-9 (In Russian).
14. Vodop'yanov AS, Pisanov RV, Vodop'yanov SO, Tsimbalistova MV, Pichurina NL, Sorokin VM, et al. Comparative Molecular-Genetic Analysis of *Francisella tularensis* Strains Isolated in the Rostov Region in 2020 and Genome Sequences of the Strains Collected in Various Regions of the World. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(3):59–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-59-65 (In Russian).
15. Galili T. dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 2015 Nov 15;31(22):3718–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv428
16. Baker FB. Stability of two hierarchical grouping techniques case I: sensitivity to data errors. *J of the American Statistical Association*. 1974;69(346):440–445.
17. Timofeev VS, Bakhteeva IV, Dyatlov IA. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. *Russ. J Genet*. 2018;54(1):1–11. DOI: 10.1134/S1022795418010118
18. Anisimova EA, Fakhrutdinov NA, Mirgazov DA, Dodonova EA, Elizarova IA, Gorbunova M, et al. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):560–567.
19. Ledenyova ML, Tkachenko GA, Zakharchova IB. New genetic markers for *Burkholderia pseudomallei* strains typing. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(6):1091–1102. DOI: 10.15789/2220-7619-NGM-1965 (In Russian).
20. Bidet P, Birgy A, Brethon B, Dalle JH, Mariani-Kurdjian P, Courroux C, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates including multidrug-resistant serogroup O12 isolates, by use of a rapid and simplified multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis and whole genome sequencing. *J Hosp Infect*. 2022 Dec;130:56–62. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.012
21. Myrtennäs K, Escudero R, Zaballos Á, González-Martín-Niño R, Gyuranecz M, Johansson A. Genetic Traces of the *Francisella tularensis* Colonization of Spain, 1998–2020. *Microorganisms*. 2020 Nov 14;8(11):1784. DOI: 10.3390/microorganisms8111784
22. Shevtsov V, Kairzhanova A, Shevtsov A, Shustov A, Kalendar R, Abdurakhmanov S, et al. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 May 17;15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419
23. Kovalevich AA, Pisanov RV, Vodopyanov AS. Comparative analysis of methods of genotyping *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Bacteriology*. 2025;10(2):67–73. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-67-73 (In Russian).
24. Kudryavtseva TYu, Vodopyanov AS, Pisanov RV, Sorokin VM, Mokrievich AN. Phylogenetic typing of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains isolated on the Russian Federation territory. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2024;42(2):16–24. 10.17116/molgen20244202116 (In Russian).
25. Shevtsov A, Izbanova U, Amirkazin A, Kairzhanova A, Dauletov A, Kiyan V, et al. Genetic Homogeneity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* Strains in Kazakhstan. *Pathogens*. 2024 Jul 12;13(7):581. DOI: 10.3390/pathogens13070581
26. Fu S, Octavia S, Wang Q, Tanaka MM, Tay CY, Sintchenko V, et al. Evolution of Variable Number Tandem Repeats and Its Relationship with Genomic Diversity in *Salmonella* Typhimurium. *Front Microbiol*. 2016 Dec 26;7:2002. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02002

Информация о соавторах:

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Цимбалистова Марина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-4091-649X

Аронова Надежда Валентиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7772-9276

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7178-8021

Семенко Юлия Геннадьевна, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0001-3436-5249

Махмудов Раджаб Сейфулахович, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0006-7679-032X

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, и.о. заведующего отделом природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-8287-4294

Information about co-authors:

Alexey S. Vodopyanov, PhD, MD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute
ORCID: 0000-0002-9056-3231

Marina V. Tsimbalistova, PhD, MD, Senior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute
ORCID: 0000-0002-4091-649X

Nadezhda V. Aronova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute
ORCID: 0000-0002-7772-9276

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute
ORCID: 0000-0002-7178-8021

Yulya G. Semenko, Junior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute
ORCID: 0009-0001-3436-5249

Radghab S. Mahmudov, Junior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute
ORCID: 0009-0006-7679-032X

Natalia V. Pavlovich, MD, PhD, DSc, Chief Researcher, Acting Head of the Department of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute
ORCID: 0000-0001-8287-4294

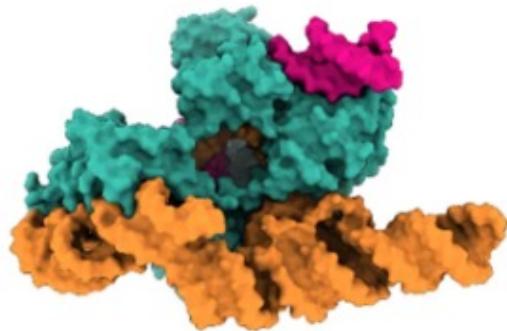
НОВОСТИ НАУКИ

Нуклеазы CRISPR нового поколения расширяют терапевтические возможности

Компания Caszyme (Вильнюс, Литва), пионер в разработке и применении технологии редактирования генов *CRISPR*, и компания Integra Therapeutics (Барселона, Испания), лидер в создании передовых методов лечения на основе инструментов генной инженерии нового поколения, объявили о заключении лицензионного соглашения на использование новых нуклеаз Cas12l компании Caszyme для разработки более безопасных и эффективных методов генной и клеточной терапии.

В рамках соглашения компания Integra Therapeutics включит геномный редактор Cas12l в свою платформу для написания генов FiCAT 2.0 (Find and Cut-And-Transfer) после успешных исследований *in vivo* и *ex vivo*, которые дали весьма положительные результаты с точки зрения безопасности и функциональности в клетках человека. Caszyme получит поэтапные выплаты в размере до 40 миллионов евро в дополнение к роялти с продаж.

Cas12l – это уникальное семейство CRISPR-нуклеаз с размером эфектора приблизительно 850 аминокислот, которое отличается малым размером и универсальностью. Поскольку спрос на эффективные и безопасные инструменты для редактирования генов в терапевтических целях продолжает расти, эти небольшие нуклеазы представляют собой многообещающее решение, сочетающее эффективность с практическими преимуществами уменьшенного размера. Разработанный Caszyme Cas12l демонстрирует высокую активность в клетках человека по нескольким мишениям. По сравнению с другими нуклеазами, Caszyme Cas12l предлагает дополнительные возможности доставки, особенно в сочетании с другими эфекторными доменами. Более того, нуклеазы меньшего размера из непатогенных бактерий могут быть менее иммуногенными по сравнению с более крупными аналогами, что еще больше подчеркивает их терапевтический потенциал. Нуклеазы, обнаруженные Caszyme, обладают характеристиками, отличными от нуклеаз Cas9, которые легли в основу модуля find в FiCAT 1.0, что расширяет их потенциальные возможности применения в передовых терапевтических решениях.



Caszyme and Integra Therapeutics sign licensing agreement for novel CRISPR Cas12l nucleases – Caszyme [Электронный ресурс].

Available at: <https://caszyme.com/news/caszyme-and-integra-therapeutics-sign-licensing-agreement-for-novel-crispr-cas12l-nucleases/> (дата обращения: 07.12.2025).