DOI: 10.31082/1728-452X-2019-208-209-10-11-101-107
УДК 579.252.2

ПОИСК ПРИЕМЛЕМЫХ МЕТОДОВ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ FRANCISELLA TULARENSIS, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ КАЗАХСТАНА

Уйнкуль А. ИЗБАНОВА[1], https://orcid.org/0000-0002-4616-8728,
Елена С. ШЕВЦОВА[2], https://orcid.org/0000-0002-7221-5866,
Лариса Ю. ЛУХНОВА[1], https://orcid.org/0000-0002-5818-8021

[1]РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева» МЗ РК, г. Алматы, Республика Казахстан,
[2]РГП «Национальный центр биотехнологий» МОН РК, г. Нур-Султан, Республика Казахстан

Избанова У.А.

Туляремия является эндемичной инфекцией для Казахстана. Генетическое разнообразие *Francisella tularensis* в Казахстане изучено не достаточно хорошо. Знание генотипов циркулирующих штаммов в природных очагах туляремии важно для эпидемиологического мониторинга, что позволяет проследить источник и пути распространения инфекции, дифференцировать естественную вспышку от искусственно созданной вспышки, позволяет прослеживать эволюционные изменения.

Целью данной работы является анализ литературы по методам генотипирования, используемых для изучения возбудителя туляремийного микроба *F. tularensis*.

Материал и методы. Мы провели систематический поиск литературных данных и отобрали источники из PubMed, Thomson Reuters, Springer, e.library.ru, Google Scholar, базах данных Кокрейна. Были включены тридцать шесть работ, которые удовлетворяли критериям включения.

Результаты и обсуждение. Для генотипирования патогенов широко используется мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов (MLVA). Простота выполнения, экономичность, высокая пропускная способность, воспроизводимость результатов и наличие баз данных генотипов делают технологию MLVA типирования незаменимой в эпидемиологическом мониторинге туляремии.

Для MLVA типирования циркулирующих штаммов в Казахстане была проведена оптимизация условий генотипирования с использованием 11 VNTR локусов, предложенных A.J. Vogler с соавторами. Оптимизация заключалась в подборе оптимальных флуоресцентных красителей, адаптированных на имеющееся в Казахстане оборудование, а также оптимизации концентраций праймеров в реакционной смеси и условий амплификации. Разработанный протокол позволяет получать воспроизводимые результаты и будет использован для определения генетического разнообразия туляремийного микроба, проведения кластерного анализа и построения минимальных островных деревьев.

Вывод. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о перспективности использования MLVA для изучения генотипов и геномные особенности возбудителя туляремии, анализ данных которых позволит составить полноценную карту генотипов *F. tularensis,* циркулирующих в Казахстане.

Ключевые слова: *F. tularensis*, VNTR, MLVA, генотип.

Для цитирования: Избанова У.А., Шевцова Е.С., Лухнова Л.Ю. Поиск приемлемых методов генотипирования *Francisella tularensis,* циркулирующих на территории Казахстана // Медицина (Алматы). – 2019. – №10-11 (208-209). – С. 101-107. DOI: 10.31082/1728-452X-2019-208-209-10-11-101-107

Контакты: Избанова Уйнкуль Айтеновна, канд. мед. наук, заведующая лабораторией зоонозных бактериальных инфекций РГП на ПХВ «Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева» МЗ РК, г. Алматы, e-mail: uizbanova@gmail.com

Contacts: Uinkul Aytenovna Izbanova. PhD of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Zoonotic Bacterial Infections, Masgut Aykimbaev's Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Ministry of the Healthcare. Kazakhstan, Almaty, e-mail: uizbanova@gmail.com

Поступила: 17.10.2019

Т Ұ Ж Ы Р Ы М

ҚАЗАҚСТАН АУМАҒЫНДА ТАРАЛҒАН FRANCISELLA TULARENSIS-ТІҢ ГЕНОТИПТЕУДІҢ ҚОЛАЙЛЫ ӘДІСТЕРІН ІЗДЕУ

Уйнкүл А. ІЗБАНОВА[1], https://orcid.org/0000-0002-4616-8728,
Елена С. ШЕВЦОВА[2], https://orcid.org/0000-0002-7221-5866,
Лариса Ю. ЛУХНОВА[1], https://orcid.org/0000-0002-5818-8021

[1]Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігінің «М. Айқымбаев атындағы аса қауіпті инфекциялар ұлттық ғылыми орталығы» ШЖҚ РМК, Алматы қ., Қазақстан Республикасы,
[2]ҚР БҒМ «Ұлттық биотехнология орталығы» РМК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы

Туляремия Қазақстан үшін эндемиялық инфекция болып табылады. Francisella tularensis генетикалық әртүрлілігі Қазақстанда жеткіліксіз зерттелген. Туляремияның табиғи ошақтарын-

Рецензенты: Кудрявцева Т.Ю., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, г. Москва.

Мокриевич А.Н., доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, г. Москва, e-mail: mokrievich@obolensk.org

дағы айналмалы штаммдардың генотиптерін білу эпидемиологиялық мониторинг үшін маңызды, бұл инфекцияның көзі мен таралу жолдарын қадағалауға, жасанды өршуден табиғи өршуді саралауға, эволюциялық өзгерістерді қадағалауға мүмкіндік береді.

Мақсаты. Бұл жұмыстың мақсаты F. tularensis туляремиялық микроб қоздырғышын зерттеу үшін қолданылатын генотиптеу әдістері бойынша әдебиетті талдау болып табылады.

Материал және әдістері. Біз әдеби деректерді жүйелі түрде іздеп, PubMed, Thomson Reuters, Springer, e.library.ru, Google Scholar, Кокрейн деректер базасынан материал іріктедік. Қосу критерийлерін қанағаттандыратын отыз алты жұмыс енгізілді.

Нәтижелері және талқылауы. Патогендерді генотиптеу үшін вариабельді тандемді қайталау мультилокусты санын талдау (MLVA) кеңінен қолданылады. Орындау қарапайымдылығы, үнемділігі, жоғары өткізу қабілеті, нәтижелердің жаңғыртылуы және генотиптердің деректер қорының болуы туляремияның эпидемиологиялық мониторингінде MLVA типтеу технологиясын бірегей етіп отыр.

Қазақстанда айналмалы штамдарды типтеу үшін A.J. Vogler тең авторлармен ұсынған 11 VNTR локустарын пайдалана отырып, генотиптеу жағдайларын оңтайландыру жүргізілді. Оңтайландыру Қазақстанда бар жабдыққа бейімделген оңтайлы флуоресцентті бояғыштарды таңдау, сондай-ақ реакциялық қоспадағы праймерлердің шоғырлануын және амплификация жағдайларын оңтайландыру болып табылады. Әзірленген хаттама жаңғыртылатын нәтижелерді алуға мүмкіндік береді және туляремиялық микробтың генетикалық әртүрлілігін анықтау, кластерлік талдау жүргізуге және ең аз аралдық ағаштарды құру үшін пайдаланылатын болады.

Қорытынды. Осылайша, ұсынылған деректер туляремия қоздырғышының генотиптерін және геномдық ерекшеліктерін зерттеу үшін MLVA пайдалану перспективасын дәлелдеп отыр, олардың деректерін талдау Қазақстанда таралған F. tularensis генотиптерінің толыққанды картасын жасауға мүмкіндік береді.

Негізгі сөздер: F. tularensis, VNTR, MLVA, генотип.

SUMMARY

FRANCISELLA TULARENSIS, CIRCULATING IN THE TERRITORY OF KAZAKHSTAN

Uinkul A IZBANOVA[1], https://orcid.org/0000-0002-4616-8728,
Elena S SHEVTSOVA[2], https://orcid.org/0000-0002-7221-5866,
Larisa Yu LUKHNOVA[1], https://orcid.org/0000-0002-5818-8021

[1]National Scientific Center for Highly Infectious Infections n.a. M. Aikimbayev, Almaty, Republic of Kazakhstan,
[2]National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

Francis disease is an endemic infection for Kazakhstan. The genetic diversity of *Francisella tularensis* in Kazakhstan has not been studied well. Knowledge of the genotypes of circulating strains in the hot spots of Francis disease is important for epidemiological monitoring, which makes it possible to trace the source and pathways of infection, differentiate a natural outbreak from an artificially created outbreak and make it possible to trace evolutionary changes.

The goal of this work is to analyze the literature on genotyping methods used to study the causative agent of Francis disease microbe *F. tularensis*.

Material and methods. We conducted a systematic literature search and selected sources from PubMed, Thomson Reuters, Springer, e.library.ru, Google Scholar, Cochrane databases. Thirty-six papers that met the inclusion criteria were included.

Results and discussion. Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA) is widely used for genotyping of pathogens. Ease of execution, cost-effectiveness, high throughput, reproducibility of results, and the availability of genotype databases make MLVA typing technology irreplaceable in the epidemiological monitoring of Francis disease.

Genotyping conditions were optimized using 11 VNTR loci proposed by A.J. Vogler et al., for MLVA typing of circulating strains in Kazakhstan. Optimization consisted in the selection of optimal fluorescent dyes adapted to the equipment available in Kazakhstan, as well as optimization of primer concentrations in the reaction mixture and amplification conditions. The developed protocol allows to obtain reproducible results and will be used to determine the genetic diversity of Francis disease microbe, conduct cluster analysis and build minimal island trees.

Conclusions. Thus, the presented data indicate the prospects of using MLVA to study the genotypes and genomic features of the causative agent of Francis disease, the analysis of the data of which will allow us to compile a complete map of the genotypes of *F. tularensis* circulating in Kazakhstan.

Keywords: *F. tularensis*, VNTR, MLVA, genotype.

For reference: Izbanova UA, Shevtsova ES, Lukhnova LYu. Francisella tularensis, circulating in the territory of Kazakhstan. *Meditsina (Almaty) = Medicine (Almaty).* 2019;10-11(208-209):101-107. (In Russ.). DOI: 10.31082/1728-452X-2019-208-209-10-11-101-107

Туляремия является эндемичной инфекцией для Казахстана. Существование природных очагов туляремии в Казахстане обусловлено ландшафтно-географическими особенностями территории республики, способствующими укоренению возбудителя этой инфекции в природных очагах. Природные очаги туляремии разного типа зарегистрированы почти на всей территории республики, кроме двух областей. Общая площадь природных очагов туляремии составляет 20,5% территории страны.

Эпидемическая и эпизоотическая обстановка в Казахстане по туляремии требует проведения постоянного мониторинга за состоянием эндемичных очагов с использованием современных методов исследования туляремийного микроба.

Достоверное, воспроизводимое и высокодискриминационное генотипирование является неотъемлемой частью эпидемиологического мониторинга во всем мире и позволяет изучать вспышки, описывать естественные пути передачи, филогенетические отношения, пространственное и временное распределение штаммов, всесторонний анализ динамики популяции с целью быстрого выявления новых или появляющихся вариантов биологического агента с измененными характеристиками вирулентности или устойчивости. Выполнение этих основных задач является особенно важным, но также и сложным для высокопатогенного и генетически мономорфного патогена, такого как *Francisella tularensis* [1]. Международные базы данных, содержащие информацию по циркулирующим генотипам, способствуют развитью глобального мониторинга за патогенами и позволяют отслеживать эволюционные изменения [2].

Генетическое разнообразие *Francisella tularensis* в Казахстане изучено не достаточно хорошо.

Целью данной работы является анализ литературы по методам генотипирования, используемых для изучения возбудителя туляремийного микроба *Francisella tularensis*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведен онлайн поиск литературы по современным методам генотипирования туляремийного микроба в базах данных PubMed, Thomson Reuters, Springer, e.library.ru, Google Scholar, базах данных Кокрейна. Были включены тридцать шесть работ, которые удовлетворяли критериям включения.

Критерии включения

Мы включили 36 источников литературы, соответствовавших нашим критериям включения: работы, в которых описаны научные исследования в области генотипирования туляремийного микроба: мультилокусный анализ (MLVA), полногеномное секвенирование и другие методы исследования. Использованы литературные источники, опубликованные за последние 20 лет.

Оценка достоверности и извлечение данных

Оценена выборка из 36 источников, в которых изучались методы молекулярного типирования патогенов, в том числе возбудителя туляремийного микроба *F. tularensis.* Мы оценивали статьи в случайном порядке, основанном на ключевых аспектах. Элементы данных, взятые для этой статьи, включали: методы генотипирования, генетическое разнообразие и эволюция *F. tularensis*, результаты исследования MLVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Грамотрицательная бактерия *F. tularensis* является возбудителем туляремии, зоонозной болезни, широко распространенной во многих странах мира. Циркуляция *F. tularensis* в природе сложна и включает множество млекопитающих-хозяев и членистоногих-переносчиков [3]. У людей клиническая картина варьирует от кожных проявлений до тяжелой пневмонии или сепсиса с летальным исходом в зависимости от путей заражения и подвида микроба, вызвавшего заболевание [4]. Низкая инфекционная доза 10 - 50 КОЕ, в сочетании с высокой потенциальной летальностью были причинами для включения *F. tularensis* в программы по использованию в качестве биологического оружия [5]. Таким образом, *F. tularensis* был внесен в список препаратов категории А согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний [6]

В настоящее время род *Francisella* включает два вида - *Francisella tularensis* и *Francisella philomiragia*, а вид *F. tularensis* представлен четырьмя подвидами - *F. tularensis subsp. tularensis* (тип А), *F. tularensis subsp. holarctica* (тип В), *F. tularensis subsp. mediaasiatica* и *F. tularensis subsp. novicida* [7]. Идентичность нуклеотидной последовательности составляет *16S rRNA* и варьирует от 98,5 - 99,9%, даже при высокой гомологии ДНК каждый подвид демонстрирует заметные различия в вирулентности [8]. Кроме того, каждый подвид преимущественно связан с конкретным географическим распределением, например, *F. tularensis subsp. tularensis* преобладает в Северной Америке, но в последнее время выделен и в Центральной Европе [9]. Подвид *F. tularensis subsp. holarctica* распространен на большей части северного полушария, встречается в Европе, Азии и на севере Америки [10, 11]. Штаммы подвида *F. tularensis subsp. mediasiatica* выделялись только на территории Центрально-Азиатских республик, но в последнее время появились публикации, где описаны данные о циркуляции этого подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края Российской Федерации [12]. До 2003 года подвид *F. tularensis subsp. novicida* был зарегистрирован только в Северной Америке, но недавно был изолирован и в Австралии [13].

В лабораторной практике Казахстана для проведения индикации и идентификации возбудителя туляремии используются микробиологические методы, основанные на выявлении фенотипических признаков: биохимической активности, ростовых характеристик, степени патогенности для животных, чувствительности к некоторым антибактериальным препаратам.

К недостаткам этих методов, помимо трудоемкости и повышенного биологического риска при выполнении лабораторных процедур, можно отнести невозможность оценки филогенетической структуры и эволюционной связи бактериальных популяций. В связи с этим для решения этого вопроса возникает необходимость внедрения методов, основанных на анализе ДНК, обладающих достаточной разрешающей способностью и позволяющих

совершенствовать деятельность лаборатории в области биологической безопасности.

Для генотипирования *F. tularensis* предложен ряд методов, обладающих различной степенью воспроизводимой и дискриминационной возможностью к подвидам.

Мультилокусное сиквенс типирование (multi locus sequence typing - MLST) основано на прямом определении нуклеотидной последовательности генов «домашнего хозяйства», имеющих достаточное число аллелей. Высокая воспроизводимость и наличие доступных баз данных позволили использовать MLST в качестве «золотого стандарта» для ряда патогенов [14]. Тем не менее, традиционный MLST не обеспечивает достаточную дискриминацию между отдельными штаммами генетически однородных видов, таких как *F. tularensis, Y. pestis* или *B. anthra*cis [15]. Генетическая мономорфность, консервативность генома *F. tularensis* и трудная воспроизводимость результатов не позволили использовать в эпидемиологической практике методы, основанные на повторяющихся последовательностях нуклеотидных полиндромов REP-PCR и ERIC-PCR, метод случайной амплификации полиморфной ДНК и полиморфизмом длины рестрикционных фрагментов (RFLP) [16].

Генотипирование бактерий с использованием пульсгельэлектрофореза (ПГЭФ) широко используется в клинической практике с 80-х годов прошлого столетия. Использование различных рестриктаз и их подбор на основе полногеномных данных улучшило дискриминационную способность, а стандартизация протоколов для ряда патогенов позволила повысить воспроизводимость полученных результатов [17, 18]. Генотипирование штаммов *F. tularensis* позволяет разделять их на подвиды и сублинии с характерной географической локализацией и уровнем вирулентности [19, 20]. Однако трудоемкость, время-затратность, сложная воспроизводимость результатов, работа с высококачественным ДНК и живыми культурами являются основными сдерживающими факторами использования ПГЭФ в рутинной лабораторной практике [21, 22].

Для генотипирования патогенов наиболее широко используется и мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов (multilocus variable number tandem repeat analysis – MLVA). Из-за высокой степени мутирования количество VNTR повторов в одинаковых локусах варьирует между штаммами одного вида, что потенциально может быть использовано для генотипирования. С целью генотипирования амплифицируется участок, содержащий гипервариабельный регион тандемных повторов, используя праймеры, подобранные к фланкирующим консервативным участкам ДНК. Последующее электрофоретическое разделение позволяет определить размер ПЦР продукта и вычислить количество повторов. Использование флуоресцентно меченных праймеров позволяет мультиплексировать ПЦР и проводить высокоточное разделение на капиллярном генетическом анализаторе [23, 24, 25]. Простота выполнения, экономичность, высокая пропускная способность, воспроизводимость результатов и наличие баз данных генотипов делают технологию MLVA типирования незаменимой в эпидемиологическом мониторинге циркулирующих штаммов ряда патогенов на глобальном и локальном уровнях [26]. MLVA обладает высокой дискриминацией в отношении генетически мономорфных патогенов, включая *Francisella spp.* [27]. Дискриминационная способность MLVA позволяет диференцировать подвиды *F. tularensis*, а также географическую особенность циркулирующих штаммов [28, 29].

23 канонических однонуклеотидных полиморфизма canSNP были выявлены в популяции *F. tularensis* на основании полногеномных данных 13 штаммов и анализа 95 штаммов, тестированных с применение чиповой технологии. Данный анализ позволяет дифференцировать 4 подвида *F. tularensis* и сублинии для каждого подвида с характерной географической обособленностью. Важно подчеркнуть, что распределение сублиний коррелирует с MLVA данными [30].

Несмотря на высокое филогенетическое разнообразие циркулирующих штаммов в определенных географических регионах, получаемое на основе ПГЭФ, MLVA и canSNP, точная географическая локализация затруднительна. В связи с этим секвенирование всего генома следует (WGS) рассматривать как оптимальный метод для идентификации штамма с конкретной геологией [31, 32].

Развитие технологий и снижение стоимости секвенирования дало новый толчок в развитии геномной эпидемиологии [33]. Тем не менее, финансирование системы контроля за распространением инфекций в Казахстане не позволяет использовать WGS в качестве стандартного метода генотипирования. Более целесообразно проводить селекцию штаммов для полногеномного секвенирования на основании результатов генотипирования с использованием высокодискриминационных методов и эпидемиологических данных указывающих источник, место и время выделения штаммов. Оптимальным методом генотипирования штаммов *F. tularensis* в Казахстане является MLVA из-за высокой дискриминационной способности, воспроизводимости, простоты выполнения и анализа полученных результатов.

Несмотря на широкое использование MLVA-анализа в генотипировании *F. tularensis* стандартный протокол отсутствует. В связи с этим на этапе внедрения протокола генотипирования исследователи сталкиваются с сложностью выбора оптимального протокола, который будет обладать высокой дискриминационной способностью, воспроизводим и экономически целесообразен. В литературе описано множество протоколов генотипирования, использующих различные комбинации VNTR-локусов и технический подход для визуализации и интерпретации результатов. Первый протокол MLVA основывался на анализе 6 VNTR-повторов с разделением на автоматическом электрофорезе [34]. Позднее был предложен протокол, основанный на анализе 25-VNTR маркеров, апробированный на коллекции образцов разных подвидов *F. tularensis* [35].

Половина из предложенных маркеров обладает низкой дискриминационной способностью, а также не применима технология мультимплексирования, что повышает стоимость анализа и увеличивает время. В случае визуализации ПЦР продуктов в агарозном или полиакриламидном геле возрастает вероятность недостоверной интерпретации патерного профиля. Для регулярного эпидемиологи-

ческого мониторинга целесообразно использовать протокол, предложенный A.J. Vogler с соавторами, основанный на анализе 11 высокодискриминационных MLVA-локусах, с возможностью мультиплексирования в три реакции. Селекция дискриминационных локусов позволила авторам разработать протокол не уступающий по уровню дискриминации панели MLVA-25 [36].

Для MLVA типирования циркулирующих штаммов в Казахстане была проведена оптимизация условий генотипирования с использованием 11 VNTR локусов, предложенных A.J. Vogler с соавторами. Оптимизация заключалась в подборе оптимальных флуоресцентных красителей адаптированных на имеющееся в Казахстане оборудование, а также оптимизации концентраций праймеров в реакционной смеси и условий амплификации. Разработанный протокол позволяет получать воспроизводимые результаты на автоматическом генетическом анализаторе Applied Biosystems (Thermo Scientifics).

Разработанный протокол MLVA-типирования *F. tularensis* будет использован для определения генетического разнообразия, проведения кластерного анализа и построения минимальных островных деревьев. Полученные данные позволят создать карту распределения генотипов штаммов туляремийного микроба на территории Казахстана, необходимую при мониторинге и глобальном контроле за туляремией.

Проведение сравнительного анализа генетических признаков возбудителя туляремии поможет оптимизировать диагностику, эпидемиологический мониторинг при расследовании вспышек инфекции, случаях биотеррористических актов, улучшить профилактику, выявить связь генотипов с географическим регионом, природно-климатическими факторами, вирулентностью.

Полученные нуклеотидные последовательности полных геномов и MLVA-профили позволят закрыть белое пятно в знаниях о циркулирующих генотипах возбудителя туляремии в Казахстане.

ВЫВОДЫ

Исследование генома туляремийного микроба является одним из важных направлений решения проблем, связанных с разработкой новых и совершенствованием уже имеющихся средств и методов борьбы с туляремией.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о перспективности использования молекулярно-генетических методов для изучения генотипов и геномных особенностей возбудителя туляремии.

После анализа просмотренной информации мы пришли к выводу, что для оценки генетического разнообразия *F. tularensis,* относящихся к различным подвидам и имеющих различное географическое происхождение, для проведения исследования, на сегодняшний день, самыми приемлемыми методами являются MLVA и полногеномное секвенирование, которые обладают самым высоким разрешением и мощной филогенетической способностью.

С помощью выбранного метода генотипирования, впервые в Казахстане будет проведено изучение генотипов и генетических особенностей *F. tularensis,* выделенных на территории Казахстана с 1948 года по настоящее время.

Последующий анализ данных позволит составить полноценную карту генотипов *F. tularensis,* циркулирующих в Казахстане, позволит улучшить понимание клональности и сформировать стратегию выявления новых или появляющихся вариантов биологического агента с измененными характеристиками вирулентности или устойчивости.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

Вклад авторов

Избанова Уйнкуль Айтеновна - проводила поиск литературы по современным методам генотипирования туляремийного микроба в базах данных PubMed, Thomson Reuters, Springer, e.library.ru, Google Scholar, базах данных Кокрейна. Анализировала статью по методам молекулярного типирования возбудителя туляремийного микроба. Проводила работу по выбору протокола МЛВА типирования туляремийного микроба. Осуществляла постановку экспериментов при разработке протокола для MLVA типирования F. tularensis.

Лухнова Лариса Юрьевна - проводила обзор литературы, оценивала достоверность данных в выбранных источниках. Анализировала воспроизводимость результатов, выполнения, экономичность, высокую пропускную способность технологии MLVA типирования. Выполняла работу по выбору протокола MLVA типирования, основанную на анализе MLVA-локусах (A.J. Vogler с соавторами), написание раздела «Выводы».

Шевцова Елена Сергеевна - оптимизация условий генотипирования с использованием 11 VNTR локусов, работа по подбору оптимальных флуоресцентных красителей адаптированных на имеющееся оборудование, оптимизацию концентраций праймеров и условий амплификации. Осуществляла постановку экспериментов при разработке протокола для MLVA типирования F. tularensis.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Johansson A., Petersen J.M. Genotyping of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia // J AOAC Int. – 2010. – Vol. 93(6). – P. 1930–43.

2 Guigon G., Cheval J., Cahuzac R., Brisse S. MLVA-NET-a standardised web database for bacterial genotyping and surveillance // Euro Surveill. - 2008 May 8. – Vol. 13(19). - pii: 18863.

3 Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella* // Ann NY Acad Sci. – 2007. - No 1105. – P. 30–66. DOI: 10.1196/annals.1409.011. [Indexed for MEDLINE]

REFERENCES

1 Johansson A, Petersen JM. Genotyping of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *J AOAC Int.* 2010;93(6):1930-43

2 Guigon G, Cheval J, Cahuzac R, Brisse S. MLVA-NET-a standardised web database for bacterial genotyping and surveillance. *Euro Surveill.* 2008 May 8;13(19):pii:18863

3 Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella. Ann NY Acad Sci.* 2007;1105:30-66. DOI: 10.1196/annals.1409.011. [Indexed for MEDLINE]

4 Sjostedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology,

4 Sjostedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations // Ann NY Acad Sci. – 2007. – No 1105. – P. 1–29. DOI: 10.1196/annals.1409.009. [Indexed for MEDLINE]

5 Dennis D.T., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E. et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management // Jama. – 2001. – Vol. 285(21). – P. 2763–73. DOI: 10.1001/jama.285.21.2763. [Indexed for MEDLINE]

6 CDC. Bioterrorism Agents/Diseases Atlanta 2014. Available from: http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp.

7 Sjostedt, A. Family XVII, *Francisellaceae*, Genus I. *Francisella*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. Brenner, D., Krieg, N., Staley, J., Garrity G. P. 200-210. New York. Springer. 2005

8 Titball R., Johansson A., Forsman M. Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved? // Trends Microbiol. – 2003. – Vol. 11(3). – P. 118–123. DOI: 10.1016/s0966-842x(03)00020-9

9 Gurycova D. First isolation of *Francisella tularensis*sub sp. *Tularensis* in Europe // Eur. J. Epidemiol. - 1998. – Vol. 14. – P. 797-802

10 Appelt S., Köppen K., Radoni´c A., Drechsel O., Jacob D., Grunow R., Heuner K. Genetic Diversity and Spatial Segregation of Francisella tularensis Subspecies holarctica in Germany/Frontiers in Cellular and Infection Microbiology / www.frontiersin.org. Nov. 2019. Volume 9. Article 376, P. 1-10.

11 Samrakandia M.M., Zhang C., Zhang M., Nietfeldt J., Kim J., Iwen P.C., Olsond M.E., Fey P.D., Duhamel G.E., Hinrichs S.H., Cirillo J.D., Benson A.K.. Genome diversity among regional populations of Francisella tularensis subspecies tularensis and Francisella tularensis subspecies holarctica isolated from the US // FEMS Microbiology Letters .- 2004. – Vol. 237(1). - P. 9-17. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.008

12 Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2013. – № 1. – С. 66-69

13 Whipp M.J., Davis J.M., Lum G., de Boer J., Zhou Y., Bearden S.W., Petersen J.M., Chu M.C., Hogg G. Characterization of a novicida-like subspecies of Francisella tularensis isolated in Australia // J Med Microbiol. – 2003 Sep. – Vol. 52(Pt 9). – P. 839-42. DOI: 10.1099/jmm.0.05245-0

14 Larsen M.V., Cosentino S., Rasmussen S., Friis C., Hasman H., Marvig R.L., Jelsbak L., Sicheritz-Pontén T., Ussery D.W., Aarestrup F.M., Lund O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria // J. Clin. Microbiol. - 2012. - Vol. 50(4). - P. 1355-1361. DOI: 10.1128/JCM.06094-11

15 Nubel U., Reissbrodt R., Weller A., Grunow R., Porsch-Ozcurumez M., Tomaso H. et al. Population Structure of *Francisella tularensis* // Journal of bacteriology. – 2006. – Vol. 188(14). – P. 5319–24. DOI: 10.1128/jb.01662-05

16 Pilo P. Phylogenetic Lineages of Francisella tularensis in Animals // Front Cell Infect Microbiol. - 2018 Jul 31. – No 8. – P. 258. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00258. eCollection 2018.

17 Herschleb J., Ananiev G., Schwartz D.C. Pulsed-field gel electrophoresis // Nat. Prot. - 2007. - Vol. 2(3). - P. 677–684. DOI: 10.1038/nprot.2007.94

18 Gerner-Smidt P., Hise K., Kincaid J., Hunter S., Rolando S., Hyytiä-Trees E., Ribot E.M., Swaminathan B. PulseNet USA: a five-year update // Foodborne Pathog. Dis. - 2006. - Vol. 3(1). - P. 9-19. DOI: 10.1089/fpd.2006.3.9

19 J. Erin Staples, Kristy A. Kubota, Linda G. Chalcraft, Paul S. Mead, Jeannine M. Petersen Epidemiologic and Molecular Analysis of Human Tularemia, United States, 1964–2004 // Emerg Infect Dis. - 2006 Jul. – Vol. 12(7). – P. 1113–1118. DOI: 10.3201/eid1207.051504

20 Wahab T., Birdsell D.N., Hjertqvist M., Mitchell C.L., Wagner D.M., Keim P.S., Hedenström I., Löfdahl S.Insights to genetic characterization tools for epidemiological tracking of Francisella tularensis in Sweden // PLoS One. - 2014 Nov 17. – Vol. 9(11). - e112167. DOI: 10.1371/journal.pone.0112167. eCollection 2014.

21 Chung M., H. de Lencaste, Matthews P., Tomasz A. et al. Molecular typing of methicillin-resistantStaphylococcus aureusby pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains // Microb. Drug. Resist. - 2000. - Vol. 6(3). - P. 189–198. DOI: 10.1089/mdr.2000.6.189

22 Davis M.A., Hancock D.D., Besser T.E., Call D.R. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains ofEscherichia coli and clinical manifestations. *Ann NY Acad Sci.* 2007;1105:1-29. DOI: 10.1196/annals.1409.009. [Indexed for MEDLINE]

5 Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *Jama.* 2001;285(21):2763-73. DOI: 10.1001/jama.285.21.2763. [Indexed for MEDLINE]

6 CDC. Bioterrorism Agents/Diseases Atlanta 2014. Available from: http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp

7 Sjostedt, A. Family XVII, *Francisellaceae*, Genus I. *Francisella*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. Brenner, D., Krieg, N., Staley, J., Garrity G. New York. Springer. 2205. P. 200-210

8 Titball R, Johansson A, Forsman M. Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved? *Trends Microbiol.* 2003;11:118–123. DOI: 10.1016/s0966-842x(03)00020-9

9 Gurycova D. First isolation of *Francisella tularensis*sub sp. *Tularensis* in Europe. *Eur. J. Epidemiol.* 1998;14:797-802

10 Appelt S, Köppen K, Radoni´c A, Drechsel O, Jacob D, Grunow R, Heuner K. Genetic Diversity and Spatial Segregation of Francisella tularensis Subspecies holarctica in Germany. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* Nov. 2019;9(376):1-10. www.frontiersin.org

11 Samrakandia MM, Zhang C, Zhang M, Nietfeldt J, Kim J, Iwen PC, Olsond ME, Fey PD, Duhamel GE, Hinrichs SH, Cirillo JD, Benson AK. Genome diversity among regional populations of Francisella tularensis subspecies tularensis and Francisella tularensis subspecies holarctica isolated from the US. *FEMS Microbiology Letters*. 2004;237:9-17. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.008

12 Mokrıevıch AN, Tımofeev VS, Kýdrıavtseva TÍý, Ýlanova GI, Karbysheva SB, Mıronova RI, Vahrameeva GM, Gýbareva TI, Pavlov VM, Dıatlov IA. Isolation of Central Asian Subspecies of Tularemia Agent in Altai Territory. *Problemy osobo opsanykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2013;1:66-69 (In Russ.)

13 Whipp MJ, Davis JM, Lum G, de Boer J, Zhou Y, Bearden SW, Petersen JM, Chu MC, Hogg G. Characterization of a novicida-like subspecies of Francisella tularensis isolated in Australia. *J Med Microbiol*. 2003 Sep;52(9): 839-42. DOI: 10.1099/jmm.0.05245-0

14 Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:1355-1361. DOI: 10.1128/JCM.06094-11

15 Nubel U, Reissbrodt R, Weller A, Grunow R, Porsch-Ozcurumez M, Tomaso H, et al. Population Structure of *Francisella tularensis*. *Journal of bacteriology.* 2006;188(14):5319–24. DOI.10.1128/jb.01662-05

16 Pilo P. Phylogenetic Lineages of Francisella tularensis in Animals. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Jul 31;8:258. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00258. eCollection 2018

17 Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat. Prot.* 2007;2:677–684. DOI: 10.1038/nprot.2007.94

18 Gerner-Smidt P, Hise K, Kincaid J, Hunter S, Rolando S, Hyytiä-Trees E, Ribot EM, Swaminathan B. PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog. Dis.* 2006;3:9-19. DOI: 10.1089/fpd.2006.3.9

19 J Erin Staples, Kristy A Kubota, Linda G Chalcraft, Paul S Mead, Jeannine M Petersen. Epidemiologic and Molecular Analysis of Human Tularemia, United States, 1964–2004. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jul;12(7):1113–1118. DOI: 10.3201/eid1207.051504

20 Wahab T, Birdsell DN, Hjertqvist M, Mitchell CL, Wagner DM, Keim PS, Hedenström I, Löfdahl S. Insights to genetic characterization tools for epidemiological tracking of Francisella tularensis in Sweden. *PLoS One.* 2014 Nov 17;9(11):e112167. DOI: 10.1371/journal.pone.0112167. eCollection 2014.

21 Chung M, de LH, Matthews P, et al. Molecular typing of methicillin-resistantStaphylococcus aureusby pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug. Resist.* 2000;6:189-198. DOI: 10.1089/mdr.2000.6.189

22 Davis MA, Hancock DD, Besser TE, Call DR. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains ofEscherichia coli O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:1843-1849. DOI: 10.1128/jcm.41.5.1843-1849.2003

O157:H7 // J. Clin. Microbiol. - 2003. - Vol. 41(5). - P. 1843–1849. DOI: 10.1128/jcm.41.5.1843-1849.2003

23 Yan C., Sun H., Xue G., Zhao H., Wang L., Feng Y., Li S. A single-tube multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of Mycoplasma pneumoniae clinical specimens by use of multiplex PCR-capillary electrophoresis // J. Clin. Microbiol. - 2014. - Vol. 52(12). - P. 4168-4171. DOI: 10.1128/JCM.02178-14

24 Sobral D., Mariani-Kurkdjian P., Bingen E., Vu-Thien H., Hormigos K., Lebeau B., Loisy-Hamon F., Munck A., Vergnaud G., Pourcel C. A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. - 2012. - Vol. 31(9). - P. 2247-2256. DOI: 10.1007/s10096-012-1562-5

25 Navarro Y., Herranz M., Romero B., Bouza E., Domínguez L., de Juan L., García-de-Viedma D. High-throughput multiplex MIRU-VNTR typing of Mycobacterium bovis // Res Vet Sci. - 2014. - Vol. 96(3). - P. 422-425. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.03.012

26 Lindstedt B.A., Torpdahl M., Vergnaud G., Le Hello S., Weill F.X., Tietze E., Malorny B., Prendergast D.M., Ní Ghallchoir E., Lista R.F., Schouls L.M., Söderlund R., Börjesson S., Åkerström S. Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012 // Euro Surveill. - 2013 - Vol. 18(4). - P. 20385. DOI: 10.2807/ese.18.04.20385-en

27 Fujita O.1., Hotta A., Uda A., Yamamoto Y., Fujita H., Shinya F., Asano S., Morikawa S., Tanabayashi K., Yamada A. Identification of the source of Francisella tularensis infection by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis // Jpn J Infect Dis. – 2013. – Vol. 66(6). – P. 543-5. DOI: 10.7883/yoken.66.543

28 Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christiany D., Mokrievich A., Dyatlov I., Vergnaud G. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of Francisella tularensis subsp. Mediasiatica // PLoS One. - 2017 Sep 5. – Vol. 12(9). - e0183714. DOI: 10.1371/journal.pone.0183714. eCollection 2017.

29 Lu Y., Yu Y., Feng L., Li Y., He J., Zhu H., Duan Q., Song L .Phylogeography of Francisella tularensis from Tibet, China: Evidence for an asian origin and radiation of holarctica-type Tularemia. // Ticks Tick Borne Dis. - 2016 Jul. – Vol. 7(5). – P. 865-868. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.04.001. Epub 2016 Apr 11.

30 Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., Beckstrom-Sternberg J.S., Johansson A., Clare A., Buchhagen J.L., Petersen J.M., Pearson T., Vaissaire J., Dempsey M.P., Foxall P., Engelthaler D.M., Wagner D.M., Keim P. Phylogeography of Francisella tularensis: global expansion of a highly fit clone // J Bacteriol. - 2009 Apr. – Vol. 191(8). – P. 2474-84. DOI: 10.1128/JB.01786-08. Epub 2009 Feb 27.

31 Wahab T., Birdsell D.N., Hjertqvist M., Mitchell C.L., Wagner D.M., Keim P.S., Hedenström I., Löfdahl S. Insights to genetic characterization tools for epidemiological tracking of Francisella tularensis in Sweden // PLoS One. - 2014 Nov 17. – Vol. 9(11). - e112167. DOI: 10.1371/journal.pone.0112167. eCollection 2014.

32 Vergnaud G., Girault G., Thierry S., Pourcel C., Madani N., Blouin Y. Comparison of French and Worldwide Bacillus anthracis Strains Favors a Recent, Post-Columbian Origin of the Predominant North-American Clade // PLoS One. - 2016 Feb 22. – Vol. 11(2). - e0146216. DOI: 10.1371/journal.pone.0146216.

33 Deng X., den Bakker H.C., Hendriksen R.S. Genomic Epidemiology: Whole-Genome-Sequencing-Powered Surveillance and Outbreak Investigation of Foodborne Bacterial Pathogens // Annu Rev Food Sci Technol. - 2016. - Vol. 7. - P. 353-374. DOI: 10.1146/annurev-food-041715-033259

34 Farlow J., Smith K.L., Wong J., Abrams M., Lytle M., Keim P. *Francisella tularens*is strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis // J Clin Microbiol. - 2001 Sep. – Vol. 39(9). – P. 3186-92. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3186-3192.2001

35 Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Byström M., Fox J., Chu M., Forsman M, Sjöstedt A, Keim P. Worldwide genetic relationships among Francisella tularensis isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis // J Bacteriol. - 2004 Sep. – Vol. 186(17). – P. 5808-18. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004

36 Vogler A.J., Birdsell D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis* // Lett. Appl. Microbiol. – 2009 Jan; – Vol. 48(1). – P. 140-4. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02484.x

23 Yan C, Sun H, Xue G, Zhao H, Wang L, Feng Y, Li S. A single-tube multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of Mycoplasma pneumoniae clinical specimens by use of multiplex PCR-capillary electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52:4168-4171. DOI: 10.1128/JCM.02178-14

24 Sobral D, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Vu-Thien H, Hormigos K, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Munck A, Vergnaud G, Pourcel C. A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:2247-2256. DOI: 10.1007/s10096-012-1562-5

25 Navarro Y., Herranz M., Romero B., Bouza E., Domínguez L., de Juan L., García-de-Viedma D.. High-throughput multiplex MIRU-VNTR typing of Mycobacterium bovis. Res Vet Sci. - 2014. - Vol. 6. - P. 422-425. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.03.012

26 Lindstedt BA, Torpdahl M, Vergnaud G, Le Hello S, Weill FX, Tietze E, Malorny B, Prendergast DM, Ní Ghallchoir E, Lista RF, Schouls LM, Söderlund R, Börjesson S, Åkerström S. Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries 2012. *Euro Surveill.* 2013;18: 20385. DOI: 10.2807/ese.18.04.20385-en

27 Fujita O1, Hotta A, Uda A, Yamamoto Y, Fujita H, Shinya F, Asano S, Morikawa S, Tanabayashi K, Yamada A. Identification of the source of Francisella tularensis infection by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(6):543-5. DOI: 10.7883/yoken.66.543

28 Timofeev V, Bakhteeva I, Titareva G, Kopylov P, Christiany D, Mokrievich A, Dyatlov I, Vergnaud G. 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. eCollection 2017.

29 Lu Y, Yu Y, Feng L, Li Y, He J, Zhu H, Duan Q, Song L. Phylogeography of Francisella tularensis from Tibet, China: Evidence for an asian origin and radiation of holarctica-type Tularemia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016 Jul;7 5):865-868. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.04.001. Epub 2016 Apr 11

30 Vogler AJ, Birdsell D, Price LB, Bowers JR, Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach RK, Beckstrom-Sternberg JS, Johansson A, Clare A, Buchhagen JL, Petersen JM, Pearson T, Vaissaire J, Dempsey MP, Foxall P, Engelthaler DM, Wagner DM, Keim P. Phylogeography of Francisella tularensis: global expansion of a highly fit clone. *J Bacteriol.* 2009 Apr;191(8):2474-84. DOI: 10.1128/JB.01786-08. Epub 2009 Feb 27.

31 Wahab T, Birdsell DN, Hjertqvist M, Mitchell CL, Wagner DM, Keim PS, Hedenström I, Löfdahl S. Insights to genetic characterization tools for epidemiological tracking of Francisella tularensis in Sweden. *PLoS One.* 2014 Nov 17;9(11):e112167. DOI: 10.1371/journal.pone.0112167. eCollection 2014

32 Vergnaud G, Girault G, Thierry S, Pourcel C, Madani N, Blouin Y. Comparison of French and Worldwide Bacillus anthracis Strains Favors a Recent, Post-Columbian Origin of the Predominant North-American Clade. *PLoS One.* 2016 Feb 22;11(2):e0146216. DOI: 10.1371/journal.pone.0146216

33 Deng X, den Bakker HC, Hendriksen RS. Genomic Epidemiology: Whole-Genome-Sequencing-Powered Surveillance and Outbreak Investigation of Foodborne Bacterial Pathogens. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2016;7:353-374. DOI: 10.1146/annurev-food-041715-033259

34 Farlow J, Smith KL, Wong J, Abrams M, Lytle M, Keim P. *Francisella tularens*is 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

35 Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Byström M, Fox J, Chu M, Forsman M, Sjöstedt A, Keim P. 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

36 Vogler AJ, Birdsell 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