

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-43-50

УДК 616.98:579.852.11

Е.И. Еременко, А.Г. Рязанова, С.В. Писаренко, Н.П. Буравцева, Г.А. Печковский, Л.Ю. Аксенова, О.В. Семенова, Н.Г. Варфоломеева, Т.М. Головинская, Д.К. Чмеренко, Д.А. Ковалев, А.М. Жиров, Н.А. Шапаков, А.Н. Куличенко

НОВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS*

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Цель – выявление новых генетических маркеров для использования в молекулярном типировании *Bacillus anthracis*. **Материалы и методы.** Исследовали геномы 16 штаммов *B. anthracis* из коллекции ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 11 штаммов *B. anthracis* и 5 штаммов *Bacillus cereus* из GenBank. Использовали методы анализа *in vitro* и *in silico* канонических и полногеномных единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP), областей генома с варибельным числом tandemных повторов (VNTR). **Результаты и обсуждение.** У ряда штаммов *B. anthracis* главной генетической линии В в пределах гомологичных генов трицистронного оперона *gerH*, кодирующего белки, связанные прорастанием спор, имеются делеции и (или) замены единичных нуклеотидов. Гены *gerA* оперона содержат VNTR-локус *Bams34*, размеры генов у разных штаммов варьируют из-за разного числа tandemных повторов и наличия инделов, что предполагает варибельность белков GerA прорастания спор. В области обратного праймера у части из них имеются SNP или делеция, что делает невозможной ПЦР-амплификацию локуса *Bams34*. Идентифицированы не описанные VNTR-локус, SNP и индел в последовательностях плазмид *pXO1* и *pXO2*, а также SNP в хромосомном гене транспортера глицерол-3-фосфата. Сконструированы две пары ПЦР-праймеров к плазмидным областям, содержащим инделы. VNTR-локус, SNP и инделы в последовательностях плазмид *pXO1* и *pXO2* пригодны в качестве генетических маркеров для дифференциации типичных вирулентных диплазмидных штаммов по принадлежности к основным генетическим линиям *B. anthracis* А, В и С. Аллель Т SNP в пределах хромосомного гена *glpT* является специфичной для одного из двух штаммов, выделенных в ходе одной вспышки сибирской язвы, и отличает его от всех других штаммов *B. anthracis*.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, молекулярное типирование, SNP, VNTR, инделы, главные генетические линии.

Корреспондирующий автор: Еременко Евгений Иванович, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Буравцева Н.П., Печковский Г.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Варфоломеева Н.Г., Головинская Т.М., Чмеренко Д.К., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Шапаков Н.А., Куличенко А.Н. Новые генетические маркеры для молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-43-50

E.I. Eremenko, A.G. Ryazanova, S.V. Pisarenko, N.P. Buravtseva, G.A. Pechkovsky, L.Yu. Aksenova, O.V. Semenova, N.G. Varfolomeeva, T.M. Golovinskaya, D.K. Chmerenko, D.A. Kovalev, A.M. Zhiron, N.A. Shapakov, A.N. Kulichenko

New Genetic Markers for Molecular Typing of *Bacillus anthracis* Strains

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Objective: Identification of new markers for the molecular typing of *Bacillus anthracis*. **Materials and methods.** The genomes of 16 *B. anthracis* strains from the collection of the Stavropol Research Anti-Plague Institute, 11 *B. anthracis* strains and 5 strains of *Bacillus cereus* from GenBank were investigated. The methods of *in vitro* and *in silico* analysis of canonical and whole-genome single nucleotide polymorphisms (SNP), genome regions with variable number of tandem repeats (VNTR) were used for the analysis. **Results and discussion.** It has been established that there are deletions and (or) SNPs in some of *B. anthracis* strains of the main genetic lineage B, within the homologous genes of the tri-cistronic operon *gerH*, which encodes spore germination proteins. *gerA* genes contain the *Bams34* VNTR locus, the sizes of genes in different strains vary due to the different number of tandem repeats and the presence of indels, which suggests the variability of GerA spore germination proteins. In the area of reverse primer annealing, some of them have several SNPs or deletions, which makes impossible PCR amplification of the *Bams34* locus. Previously not described VNTR locus, SNPs and indels in sequences of plasmids *pXO1* and *pXO2*, as well as SNP in chromosomal gene of glycerol-3-phosphate transporter were identified. Two pairs of PCR primers for the variable regions of the plasmids were designed. VNTR-locus, SNP and indels in sequences of plasmids *pXO1* and *pXO2* are suitable genetic markers for the differentiation of typical virulent diploid strains belonging to the main genetic lineages of *B. anthracis* A, B and C. The allele T of SNP within chromosomal *glpT* gene is specific for one of two strains isolated during the outbreak of anthrax and distinguishes it from all other strains of *B. anthracis*.

Key words: *Bacillus anthracis*, molecular typing, SNP, VNTR, indels, main genetic lineages.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Eugeny I. Eremenko, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Buravtseva N.P., Pechkovsky G.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Varfolomeeva N.G., Golovinskaya T.M., Chmerenko D.K., Kovalev D.A., Zhiron A.M., Shapakov N.A., Kulichenko A.N. New Genetic Markers for Molecular Typing of *Bacillus anthracis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:43–50. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-43-50

Received 21.06.19. Revised 19.08.19. Accepted 22.08.19.

Bacillus anthracis – возбудитель особо опасной зоонозной инфекции с мировым распространением. Наиболее общее представление о филогенетической структуре глобальной популяции *B. anthracis* основано на клональном характере распространения возбудителя и данных многочисленных исследований с использованием MLVA-анализа нескольких VNTR-локусов и анализа SNP [1–13]. Ее определяют три основные генетические линии (клады) – А, В, С, и 12 «канонических» SNP-групп. Молекулярное типирование 16 штаммов *B. anthracis* из коллекции Ставропольского научно-исследовательского противочумного института, выделенных на территории России и республик Советского Союза, выявило их принадлежность к пяти canSNP-группам основной генетической линии А и к одной группе основной линии В [14]. Большинство исследованных штаммов из коллекции СтавНИПЧИ принадлежали к canSNP-подгруппе А.Br.008 и входили в субкладу Tsiankovskii группы ТЕА.

MLVA 31 VNTR-локуса выявил отсутствие амплификации ДНК с праймерами к локусу Vams34 у изолятов штамма, вызвавшего вспышку сибирской язвы на Ямале в 2016 г., а также у штаммов 14/41, 1284, 140П и 1051/35, выделенных в разных регионах Российской Федерации. По данным canSNP-типирования, все эти штаммы принадлежали к канонической группе В.Br.003, а результаты филогенетического анализа, по данным WGS-SNP, показали, что изоляты 1339/24, 1342/12, штамм 14/41 и корейский штамм HYU01 относятся к одному кластеру. Анализ генов факторов патогенности выявил отличия в генах *lef*, *суа*, *асрА*, *сарА*, *асрВ* и *атхА* в виде единичных нуклеотидных замен, а также инсерций/делеций (инделов) [15].

Существование однотипных отличий в геномах определенных штаммов *B. anthracis* требовало объяснения их характера и могло предполагать возможность их использования в генотипировании.

Более тонкая филогенетическая структура установлена при анализе полногеномных (WG-SNP) 193 штаммов и включает 34 «канонические» SNP-группы. Широко распространенная линия А содержит 30 из них, линия В разделяется на три «канонические» группы – В.Br.002, В.Br.003 и В.Br.004, линия С (С.Br.001) представлена всего четырьмя штаммами. На основе WGS-SNP-типирования линия А подразделяется на 12 субклад и включает главную политомию, называемую транс-Евразийской (ТЕА) группой [16, 17].

Анализ WG-SNP сделал возможным идентификацию штамм-специфичных SNP-маркеров, которые в значительной степени помогают в расследовании вспышек сибирской язвы природного происхождения и вызванных преднамеренным использованием возбудителя сибирской язвы как агента биотерроризма [17, 18].

Ранее нами предложен алгоритм генотипирования штаммов *B. anthracis* при эпидемиологическом

расследовании вспышки сибирской язвы. Он предполагал последовательное выполнение canSNP13-анализа, MLVA, полногеномного секвенирования (WGS) и анализа SNP, SNR и генов факторов патогенности на основе данных WGS [15]. Теперь с учетом современных возможностей молекулярного анализа, изменившихся представлений о тонкой филогенетической структуре глобальной популяции *B. anthracis* и наличия необходимых баз данных генотипов и геномов анализ 13 «канонических» SNP в качестве первого этапа исследования становится не актуальным, решающее значение для заключения о родстве штаммов имеет анализ SNP на основании данных WGS, тем более что методы полногеномного секвенирования становятся все более доступными и быстрыми. В связи с этим целесообразным для выполнения оперативного анализа было бы использование методов генетического типирования с новыми молекулярными маркерами, проведение которых не занимает много времени.

Таким образом, поиск новых молекулярных маркеров для типирования штаммов *B. anthracis*, является актуальным.

Цель – выявление новых генетических маркеров для использования в молекулярном типировании *Bacillus anthracis*.

Задачи:

- анализ генома на наличие инделов и единичных нуклеотидных замен;
- выявление областей с варибельным числом tandemных повторов в геноме;
- определение природы нарушения амплификации VNTR-локуса Vams34 и оценка распространенности этой особенности среди штаммов *B. anthracis*;
- оценка возможности использования вновь идентифицированных маркеров при генотипировании.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. Исследовали полногеномные последовательности штаммов *B. anthracis* 14-41, 1284, 140П, 1051-35, 1339-24, 1342-12, 140Pcap-wm, 81-1, 1266, 1CO, I-35, 1284, 1307, I-35, I-29, I-373 из коллекции ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и штаммов *B. anthracis* из GenBank Ames Ancestor (референс-штамм, адреса доступа в GenBank NC_007530.2, NC_007322.2, NC_007323.3), Pollino (GenBank NZ_CP010813.1, NZ_CP010814.1, NZ_CP010815.1), CNĒVA 9066 (WGS link AAEN01), SVĀ11 (GenBank NZ_CP006742.1, NZ_CP006743.1, NZ_CP006744.1), Zimbabwe 89 (WGS link JMPU01), Kruger B (WGS link AAEQ01), HYU01 (GenBank NZ_CP008846.1, NZ_CP008847.1, NZ_CP008848.1), 2002013094 (NZ_CP009902.1, NZ_CP009901.1, NZ_CP009900.1), 2000031021 (NZ_CP007618.1, NZ_CP007617.1), 2000031052 (WGS link JSZS01), A1055 (WGS link AAEO01), штаммов *Bacillus cereus* BC-AK (NZ_CP020937.1, NZ_CP020938.1, NZ_CP020939.1, NZ_CP020940.1, NZ_CP020941.1), G9241 (NZ_

CP009590.1, NZ_CP009591.1, NZ_CP009592.1, NZ_CP009589.1), 03BB87 (NZ_CP009941.1, NZ_CP009939.1, NZ_CP009940.1), 03BB102 (NZ_CP009318.1, NZ_CP009317.1) и *Bacillus cereus bio-var anthracis* str C1(NC_014335.1, NC_014333.1, NC_014331.1, NC_014332.1).

MLVA. MLVA-31 штаммов *B. anthracis* из нашей коллекции проводили методом фрагментного анализа ампликонов, полученных в ПЦР, с определением размеров электрофорезом в геле агарозы либо с флуоресцентно-мечеными праймерами капиллярным электрофорезом в ДНК-анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, USA) по схеме [19]. Размеры ампликонов в парах оснований переводили в число повторов в соответствии с конвенцией, предложенной S. Thierry *et al.* [20].

Анализ геномов штаммов *B. anthracis*, депонированных в GenBank, а также некоторых штаммов из коллекции нашего института, для которых имелись полногеномные последовательности, осуществляли *in silico*, пользуясь online ресурсом MLVABank [<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/insilico.php>], для получения сравнимых результатов число повторов корректировали для локусов *vrnA*, *vrnB1*, *vrnB2* и *pXO2at* в соответствии с S. Thierry *et al.* [20].

Анализировали также MLVA-31 генотипы штаммов из базы данных MLVABank for microbes genotyping [<http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/881>].

Множественное выравнивание геномов секвенированных штаммов *B. anthracis* и поиск SNP в коровом геноме проводили с помощью программы REALPHY 1.10. Выравнивание последовательностей генов проводили в программе CLC Sequence Viewer version 7.7.1. Сравнение последовательностей генов разных штаммов осуществляли в ресурсе BLASTn. Поиск генов разных штаммов проводили в базе данных GenBank.

Результаты и обсуждение

Особенности VNTR-локуса Vams34 и оперона *gerH*. Анализ *in silico* геномов штаммов *B. anthracis* из базы данных GenBank и штаммов из коллекции Ставропольского противочумного института показал, что у ряда штаммов *B. anthracis* главной генетической линии В в пределах гомологичных генов трицистронного оперона *gerH*, кодирующего белки, связанные с прорастанием спор, имеются делеции и (или) замены единичных нуклеотидов.

Гены *gerA* оперона содержат VNTR-локус Vams34. 10 штаммов из группы В.Br.004 основной генетической линии В и все штаммы основных линий А и С в ПЦР с праймерами к локусу Vams34 генерировали ампликоны, имеющие 4, 7, 9, 11 и 13 тандемных повторов с размером единицы повтора 39 п.н.

Локализация праймеров показала, что в геноме штамма *B. anthracis* Ames Ancestor весь ампликон хромосомного локуса Vams 34 размером 503 п.н.

в положении 4522317–4522819 приходился на ген *gerHA* размером 2244 п.н., кодирующий белок прорастания спор GerHA (WP_000638056.1, 747 а.о.).

Сайт для прямого праймера Vams34 занимал положение 4522317–4522338 в геноме штамма Ames Ancestor и 190–211 в последовательности гена *gerHA*. Такое же положение сайта для прямого праймера в структуре гена *gerHA* и гомологичных генов *gerA* и *gerIA* белков прорастания спор WP_000638058.1, WP_080287580.1 и WP_000638057.1 имели штаммы *B. anthracis* Pollino (GenBank NZ_CP010813.1), CNEVA 9066 (WGS link AAEN01), SVA11 (GenBank NZ_CP006742.1), Zimbabwe 89 (WGS link JMPU01), Kruger B (WGS link AAEQ01) и HYU01 (GenBank NZ_CP008846.1). Сайт для обратного праймера занимал положение 669–692 гена *gerHA* штаммов Ames Ancestor, Pollino и A1055, положение 593–614 гена *gerHA* штамма 2002013094, положение 749–770 гена *gerIA* штамма CNEVA 9066. У штаммов Kruger B, SVA11, Zimbabwe89 в этой области имелась делеция, а у штамма HYU01 – однонуклеотидные замены в позиции 669 (С→Т), 672 (С→Т), 681 (Т→С), 684 (Т→С), 686 (Т→С), 687 (А→С), 689 (С→А) и 690 (А→Т) (рис. 1).

Это объясняло отсутствие амплификации локуса Vams 34 с данными праймерами у штаммов HYU01, SVA11, Zimbabwe 89 и Kruger B, что могло быть причиной ее невозможности у штаммов 1339-24, 1342-12, 14/41, 1284, 140П, 1051/35 и служить маркером принадлежности к *canSNP* подгруппе В.Br.003.

Можно отметить, что тандемные повторы в локусе Vams34 отличались высокой степенью вырожденности, у штамма Ames Ancestor для 11 повторов существовало 7 вариантов, 2 варианта по 3 идентичных повтора и 5 вариантов повторов с числом однонуклеотидных замен 4, 8, 9, 11 и 20.

В целом, выявлено существование как минимум семи вариантов генов *gerHA*, *gerA* или *gerIA*, отличающихся размерами (2049, 2088, 2112, 2190, 2244, 2322 и 2385 п.н.). При этом размеры генов у разных штаммов варьируют как из-за разного числа тандемных повторов, так и наличия инделов. Варибельность этих генов предполагает варибельность белков GerA и вероятность отличий в реализации критически важной функции прорастания спор у разных штаммов *B. anthracis*, что может быть предметом специальных исследований.

Идентифицирован не описанный VNTR-локус с последовательностью единицы повтора ATATAGATA размером 9 п.н., занимающий положение с 1322 по 1339 в геноме референсного штамма Ames Ancestor, имеющего два повтора. Анализ последовательностей гена 46 штаммов, включая 10 штаммов из коллекции Ставропольского противочумного института, показал, что 10 штаммов главной генетической линии В и 3 штамма (2002013094, 2000031021 и A1055) линии С содержали в этой области три повтора, четвертый из известных штаммов линии С, 2000031052, содержал одну единицу повтора ATATAGATA. Остальные

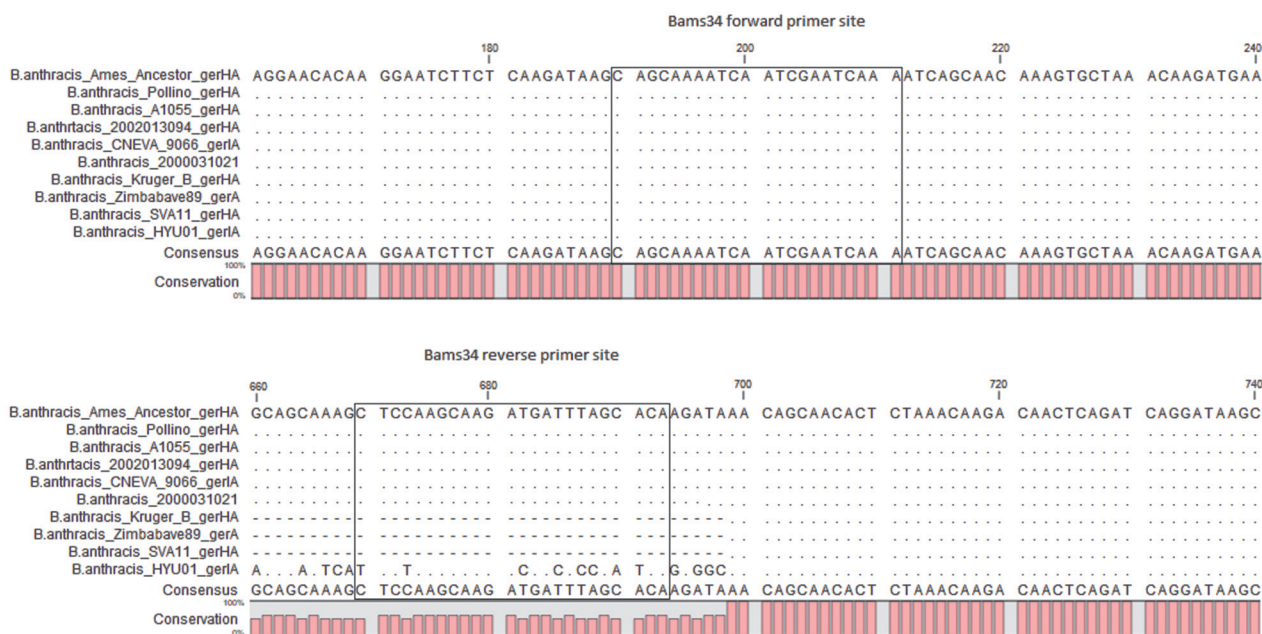


Рис. 1. Сайты для прямого и обратного праймера VNTR-локуса Bams34. Праймеры, описанные в работе S. Thierry *et al.* [20]

Fig. 1. Sites for forward and reverse primer VNTR-locus Bams34. Primers are described in reference [20] S. Thierry *et al.*

33 штамма (один штамм был рХО2) имели, как и штамм Ames Ancestor, два повтора и принадлежали к линии А (рис. 2, А). Из 37 штаммов из GenBank с полными последовательностями плазмид рХО2 у 29 штаммов, по результатам BLAST, ген *acpA* был идентичен гену штамма Ames Ancestor, у 8 штаммов имелись отличия. При этом у штамма 14RA5914, имевшего две отличающиеся копии гена *acpA*: в одной имелась делеция 1035А, в другой – 83А. Этот штамм принадлежал линии А. У остальных семи штаммов отличия состояли в замене 853G→А по сравнению со штаммом Ames Ancestor (рис. 2, В) и описанного выше VNTR-локуса с тремя повторами.

Все проверенные штаммы из коллекции Ставропольского противочумного института, относящиеся к линии В, также имели замену 853G→А и VNTR-локус с тремя повторами, у штаммов линии А в положении 853 был аденин А, а VNTR-локус содержал два повтора.

Сравнение последовательностей плазмиды рХО1 выявило наличие варибельной области протяженностью 408 п.н. между геном GBAA_pХО1_0149 гипотетического белка и геном GBAA_pХО1_0150 консервативного доменного белка, обусловленной инделом размером 38 п.н. в позиции 130776–130813 референсного штамма Ames Ancestor. Делеция 38 п.н. была присуща 10 штаммам главной генетической линии В, включая штаммы из коллекции Ставропольского НИПЧИ № 1339-24, 14-41, 1284, 140П и 1051-35, из общего числа 46 штаммов. Остальные штаммы, относящиеся к генетической линии А, имели вставку, но у штаммов 1СО и I-35 эта варибельная область имела размер 37 п.н. из-за делеции Т7 (рис. 2, С). У штамма 2002013094, одного из четырех известных штаммов линии С, имелась

такая же вставка, как у штаммов линии А. В геноме штамма линии С 2000031021 не было плазмиды рХО1, у остальных штаммов линии С гомологии индела 38 п.н. не наблюдалось.

Таким образом, VNTR-локус с единицей повтора АТАТАGАТА, SNP853G-А в последовательности гена *acpA* плазмиды рХО2, индел 38(37) п.н. (СТТТТТТТАААGАААТТАТТАТТТААТТТТАТАТААТТТ) в межгенной области плазмиды рХО1 можно расценивать как маркеры, позволяющие в совокупности дифференцировать диплазмидные штаммы в соответствии с принадлежностью к главным генетическим линиям *B. anthracis* А, В и С.

Сконструированы две пары ПЦР-праймеров к этим варибельным областям (табл. 1).

Они позволяют дифференцировать штаммы по признаку принадлежности к основным генетическим линиям при ПЦР-амплификации ДНК с детекцией результатов методом простого гель-электрофореза (рис. 3, А). Дендрограмма, построенная по результатам анализа нуклеотидных последовательностей штаммов, показывает четкое разделение на два кластера, соответствующие основным генетическим линиям *B. anthracis* А и В, при этом штамм 2002013094, относящийся к генетической линии С, представленной всего четырьмя штаммами, кластеризуется вместе со штаммами линии В (рис. 3, В). Обращает на себя внимание тот факт, что штамм 140Р и его производный 140Рсар-wm относятся к двум разным генетическим линиям.

Все штаммы по отношению к главным генетическим линиям А, В и С разделяют сочетания однонуклеотидных замен в SNP853G-А и каноническом SNP А/В.Br.001 [2] (табл. 2).

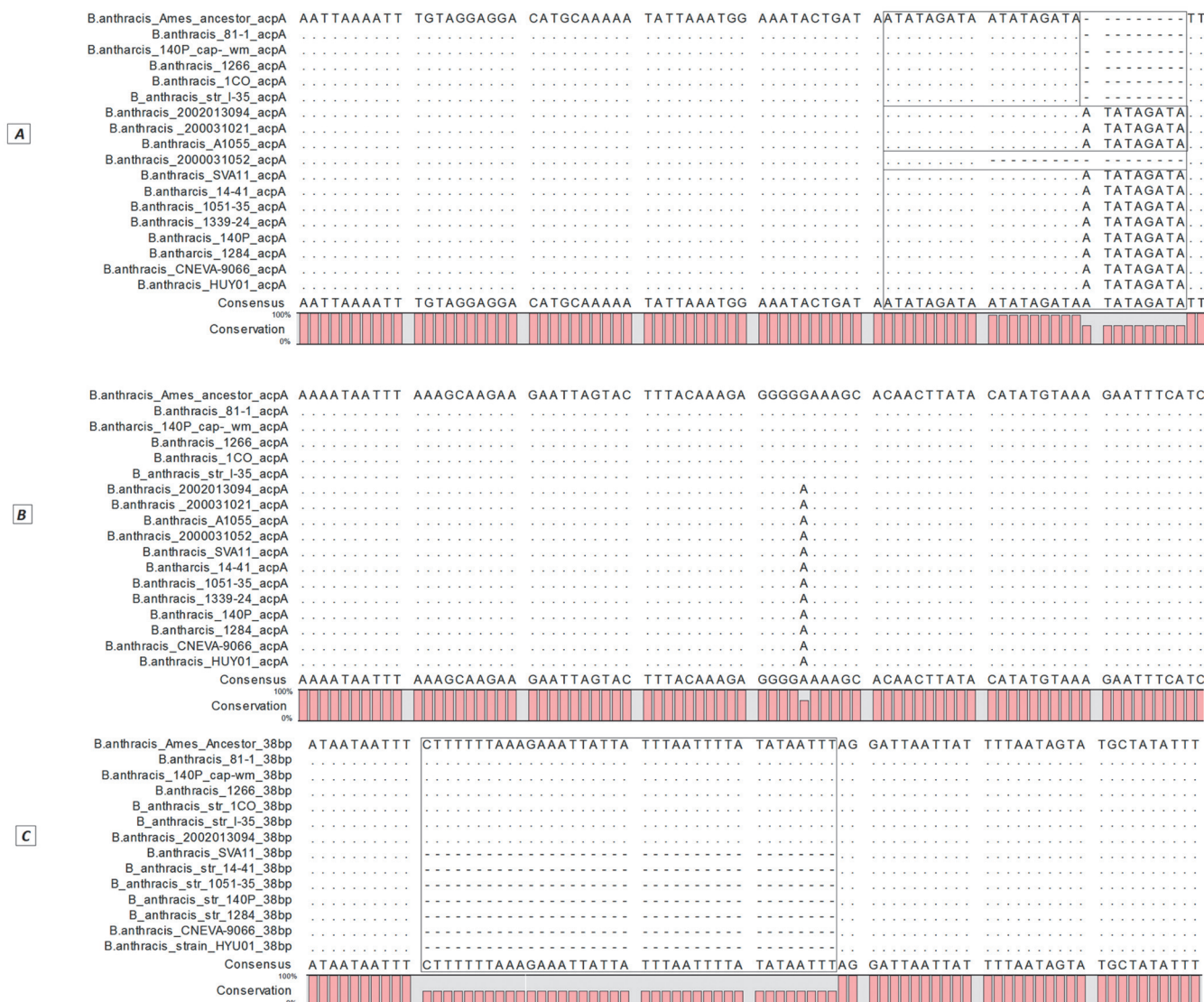


Рис. 2. Отличия последовательностей гена *acpA* плазмиды pXO2 и межгенной области плазмиды pXO1:

A – VNTR-локус гена *acpA*, B – SNP 853G →A гена *acpA*, C – полиморфная межгенная область плазмиды pXO1

Fig. 2. Differences in sequences of plasmid pXO2 *acpA* gene and the intergenic region of plasmid pXO1:

A – VNTR-locus of *acpA* gene; B – SNP 853G →A of *acpA* gene; C – polymorphic intergenic region of pXO1 plasmid

У штаммов *Bacillus cereus* BC-AK и *Bacillus cereus* biovar *anthracis* str. CI, несущих плазмиды, подобные pXO1 и pXO2 *B. anthracis*, размеры областей составляли 493 и 233 п.н. соответственно, как у штаммов *B. anthracis* линии A. При этом, у штамма *B. cereus* biovar *anthracis* str. CI был аллель G SNP 853, а у штамма *B. cereus* BC-AK – аллель A. У обоих штам-

мов присутствовал аллель G SNP A/B.Br.001. Штаммы *B. cereus*, несущие только pXO1-подобные плазмиды, имели размер варибельной области 493 п.н. (штаммы G9241 и 03BB87) или 454 п.н. (штамм 03BB102).

Особенности SNP гена *glpT*. В коровом геноме штаммов *B. anthracis* 1342-12 и 1339-24 в сравнении с референсным геномом штамма *B. anthracis* Ames

Таблица 1 / Table 1

Дифференциация главных генетических линий *B. anthracis* на основании результатов ПЦР с праймерами к области с инделом плазмиды pXO1 и VNTR-локусу плазмиды pXO2

Differentiation of major genetic lineages of *B. anthracis* based on the results of PCR with primers to the region with pXO1 plasmid indel and VNTR locus of pXO2 plasmid

Праймеры, 5' – 3' Primers, 5' – 3'	Размер ампликона для штаммов основных генетических линий, п.н. The size of the amplicon for the strains of the major genetic lineages, bp		
	A	B	C
9bp for ACCGGTGAAGGAAAAAGTTG 9bp rev ATTCTATTTTCATAAAAATCA	233	242(243)	242 (224)
38bp for TTTGCGGGGTTTTGTATTTC 38bp rev CACCAATAATACTTCTCTC	493(492)	455(456)	493(492)

Таблица 2 / Table 2

Дифференциация главных генетических линий *B. anthracis* на основании сочетания однонуклеотидных замен в двух SNP

Differentiation of major genetic lineages of *B. anthracis* based on combination of single nucleotide substitutions in two SNP

Обозначения SNP SNP designations	Однонуклеотидные замены в SNP, соответствующие главным генетическим линиям Single nucleotide substitutions in SNP corresponding to the main genetic lineages		
	A	B	C
SNP 853G-A	G	A	A
SNP A/B.Br.001	A	A	G

Ancestor обнаружено 598 и 599 SNP соответственно.

Между собой штаммы отличает один полиморфизм в позиции 679227 по референсному геному, который присутствует у штамма 1339-24 и отсутствует у штамма 1342-12 (рис. 4). Замена С→Т в позиции 679227 приводит к аминокислотной замене Gly→Glu в гене *glpT*, кодирующем транспортер глицерол-3-фосфата. Эта замена не выявлена у других штаммов из GenBank и нашей коллекции, она встречалась только у штамма 1339-24 и являлась штаммоспецифичной. Кроме того, в гене *glpT* у обоих штаммов есть еще одна общая несинонимичная замена С→Т по сравнению с референсным геномом в позиции 679557, которая приводит к аминокислотной замене Gly→Asp. Та же замена была у штаммов 1051-35, 14-41, 140P, I-29, I-373 и 12-16, но не отмечалась у 1284, NYU01, SVA11, а также у двух штаммов линии А, 140Pcap-wm и 14-41-1, производных штаммов 140P и 14-41 соответственно, которые имели эту замену и относились к линии В. Это совпадает с распределением штаммов 140Pcap-wm и 140P в две основные генетические линии, А и В, полученным при анализе VNTR-локуса и индела в последовательностях плазмид (рис. 2, А и С).

В итоге результаты проведенного исследования выявили некоторые значимые особенности генома сибирезявленного микроба. Установлено, что область отжига праймеров к VNTR-локусу Vams34 приходится на ген прорастания спор *gerHA* штамма *B. anthracis* Ames Ancestor. У ряда штаммов главной генетической линии В отсутствие амплификации локуса Vams34 с данными праймерами связано с делецией или заменами оснований в области отжига обратного праймера, что в свою очередь обусловлено существованием гомологичных генов в геномах разных штаммов. Кроме того, что данная особенность может использоваться для молекулярного субтипирования, изучение различий генов и влияние их на функцию белков прорастания спор возбудителя сибирской язвы важно, поскольку процесс прорастания спор является критическим в жизненном цикле этого патогена и становлении инфекции.

Идентификация ранее не описанных VNTR-локуса, SNP и индела в последовательностях плазмид рХО1 и рХО2 дает возможность использовать их в качестве генетических маркеров для дифференциации типичных вирулентных диплазмидных штаммов по принадлежности к основным генетическим линиям *B. anthracis* А, В и С. Дифференциация проводится на основе результатов ПЦР с разработанными двумя парами праймеров в электрофорезном формате или аллель-специфической ПЦР с детекцией в режиме реального времени с зондами и праймерами к двум SNP – каноническому А/В.Br.001 [2] и описанному нами SNP 853G-A. Определение принадлежности штамма к одной из главных генетических линий *B. anthracis* предложено нами в качестве быстрого первого предварительного этапа в алгоритме молекулярного типирования, что особенно важно в ходе эпидемиологического расследования вспышки сибирской язвы, когда необходимо как можно скорее

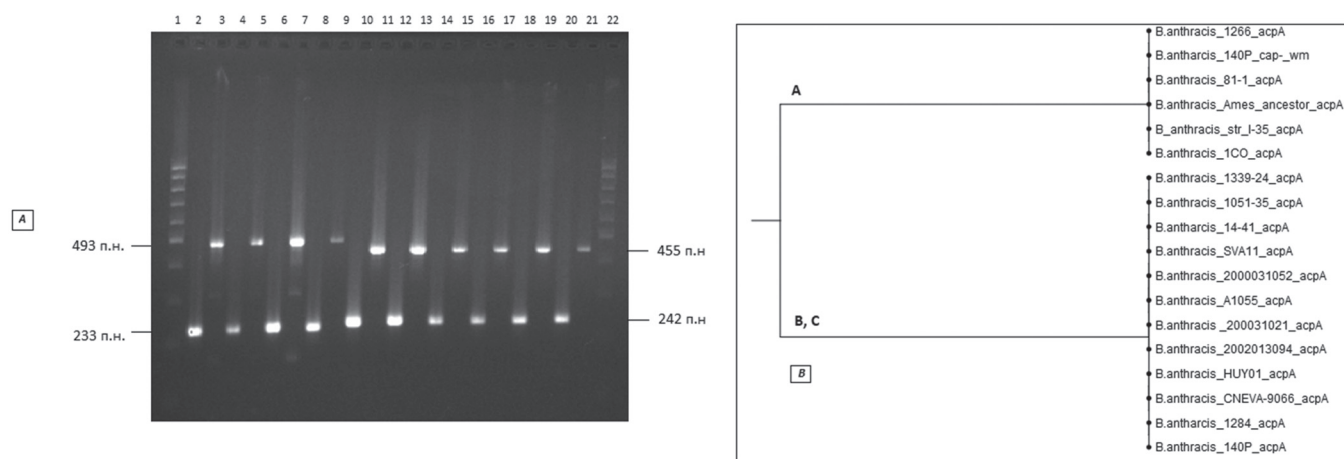


Рис. 3. А – амплификация ДНК штаммов *B. anthracis* с праймерами 38 bp и 9 bp: треки 1, 22 – ladder 100 bp; четные треки – ампликоны с праймерами 9bp, нечетные – ампликоны с праймерами 38bp; 2, 3 – 1266; 4, 5 – 81-1; 6, 7 – 1CO; 8, 9 – 140Pcap-wm; 10, 11 – 1051-35; 12, 13 – 14-41; 14, 15 – 140P; 16, 17 – 1339-24; 18, 19 – 1284; 20, 21 – 14-41. В – кластеризация штаммов *B. anthracis*

Fig. 3. А – amplification of DNA of *B. anthracis* strains with primer 38 bp and 9 bp: tracks 1, 22 – ladder 100 bp; the even-numbered tracks – amplicon with primers 9bp, odd tracks – amplicon with primers 38 bp; 2, 3 – 1266; 4, 5 – 81-1; 6, 7 – 1CO; 8, 9 – 140Pcap-wm; 10, 11 – 1051-35; 12, 13 – 14-41; 14, 15 – 140P; 16, 17 – 1339-24; 18, 19 – 1284; 20, 21 – 14-41. В – clustering of *B. anthracis* strains

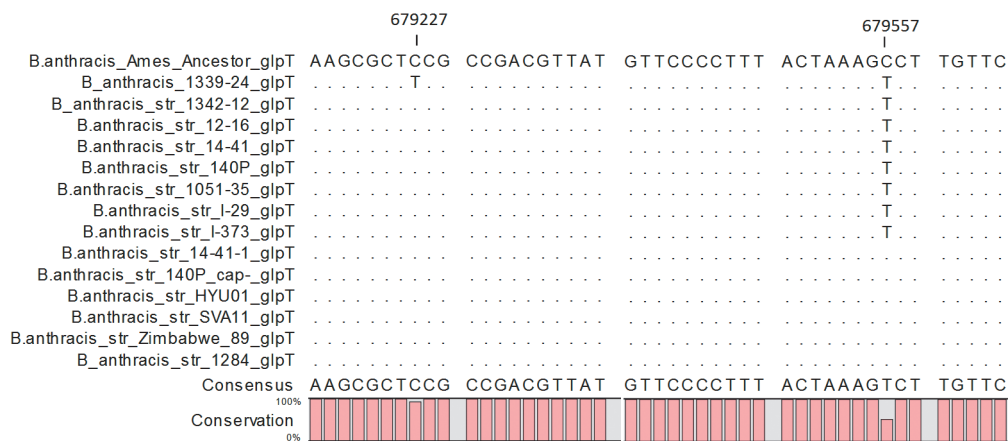


Рис. 4. Единичные нуклеотидные замены в области гена *glpT* штаммов *B. anthracis*

Fig. 4. Single nucleotide substitutions in the *glpT* gene region of *B. anthracis* strains

получить представление о возможном происхождении штамма, вызвавшего вспышку.

Два SNP в гене *glpT* разных штаммов возбудителя сибирской язвы также являются маркерными. Замена С→Т в позиции 679227 по референсному геному свойственна единственному штамму 1339-24, специфична для него и отличает этот штамм, выделенный из крови оленя, от штамма 1342-12, выделенного от человека в ходе вспышки сибирской язвы в 2016 г. на Ямале. Такая же замена в позиции 679557 характерна для этих двух и части других штаммов, относящихся к подгруппе В.Вг.002, а также двух производных штаммов данной подгруппы с таким полиморфизмом, но относящихся к подгруппе А.Вг.008.

Таким образом, идентифицированы ранее не описанные VNTR-локус, SNP и инделы в последовательностях плазмид, пригодные в качестве генетических маркеров для молекулярного типирования *B. anthracis*. Сконструированы две пары праймеров для ПЦР, по результатам которой достигается дифференциация типичных вирулентных диплазмидных штаммов по принадлежности к основным генетическим линиям *B. anthracis*. Показано, что VNTR-локус Vams34 локализуется в пределах генов *gerA*, размеры и последовательности которых и кодируемых ими белков варьируются у разных штаммов. Определена природа нарушения амплификации VNTR-локуса Vams34, оценена распространенность этой особенности среди штаммов *B. anthracis*, которая может служить маркером принадлежности к *can*SNP подгруппе В.Вг.003. Подчеркнуто, что вариабельность генов *gerA* предполагает вариабельность белков GerA и вероятность отличий в реализации критически важной функции прорастания спор у разных штаммов *B. anthracis*, что может быть предметом специальных исследований.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000;

182(10):2928–36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000.

2. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.

3. Gierczyński R., Jakubczak A., Jagielski M. Extended Multiple-Locus Variable Tandem-Repeat Analysis of *Bacillus anthracis* Strains Isolated in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 2009; 58(1):3–7. PMID: 19469279.

4. Okutani A., Sekizuka T., Boldbaatar B., Yamada A., Kuroda M., Inoue S. Phylogenetic Typing of *Bacillus anthracis* Isolated in Japan by Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats and the Comprehensive Single Nucleotide Polymorphism. *J. Vet. Med. Sci.* 2010; 72(1):93–7. DOI: 10.1292/jvms.09-0213.

5. Antwerpen M., Ilin D., Georgieva E., Meyer H., Savov E., Frangoulidis D. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30(7):923–30. DOI: 10.1007/s10096-011-1177-2.

6. Jung K.H., Kim S.H., Kim S.K., Cho S.Y., Chai J.C., Lee Y.S., Kim J.C., Kim S.J., Oh H.B., Chai Y.G. Genetic populations of *Bacillus anthracis* isolates from Korea. *J. Vet. Sci.* 2012; 13(4):385–93. DOI: 10.4142/jvs.2012.13.4.385.

7. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Buravtseva N.P., Kulitchenko A.N. Genotype Diversity of *Bacillus anthracis* Strains Isolated from the Caucasus Region. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(2):74–8. DOI: 10.3103/S0891416812020024.

8. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C.B. Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3):e1534. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001534.

9. 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; 11(2):e0146216. DOI: 10.1371/journal.pone.0146216.

10. Derzelle S., Thierry S. Genetic Diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: Genotyping Methods in Forensic and Epidemiologic Investigations. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science.* 2013; 11(1):166–76. DOI: 10.1089/bsp.2013.0003.

11. Aikembayev A. M., Lukhnova L., Temiraliyeva G., Meka-Mechenko T., Pazylov Y., Zakaryan S., Denissov G., Easterday W. R., Van Ert M. N., Keim P., Francesconi S. C., Blackburn J. K., Hugh-Jones M., Hadfield T. Historical Distribution and Molecular Diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5):789–96. DOI: 10.3201/eid1605.091427.

12. Durmaz R., Doganay M., Sahin M., Percin D., Karahocagil M.K., Kayabas U., Otlu B., Karagoz A., Buyuk F., Celebi O., Ozturk Z., Ertek M. Anthrax Study Group. Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31(10):2783–90. DOI: 10.1007/s10096-012-1628-4.

13. Okutani A., Tungalag H., Boldbaatar B., Yamada A., Tserenrorov D., Otgonchimeg I., Erdenebat A., Otgonbaatar D., Inoue S. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8). *Jpn J. Infect. Dis.* 2011; 64:345–8. PMID: 21788715.

14. Еременко Е.И., Писаренко С.В., Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Жиров А.М., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Ковалев

Д.А., Куличенко А.Н. Филогенетика, эволюция и филогеография *Bacillus anthracis*. *Бактериология*. 2018; 3(2):57–63.

15. Куличенко А.Н., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Варфоломеева Н.Г., Жиров А.М., Волинкина А.С., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Богун А.Г., Бахтеева И.В., Кисличкина А.А., Миронова Р.И., Титарева Г.М., Скрябин Ю.П., Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю., Колбасов Д.В. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 1:94–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99.

16. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.

17. Sahl J.W., Pearson T., Okinaka R., Schupp J.M., Gillette J.D., Heaton H., Birdsell D., Hepp C., Fofanov V., Noseda R., Fasanella A., Hoffmaster A., Wagner D.M., Keim P. A *Bacillus anthracis* genome sequence from the Sverdlovsk 1979 autopsy specimens. *mBio*. 2016; 7(5):e01501–16. DOI: 10.1128/mBio.01501-16.

18. Van Ert M.N., Easterday W.R., Simonson T.S., U'Ren J.M., Pearson T., Kenefic L.J., Busch J.D., Huynh L.Y., Dukerich M., Trim C.B., Beaudry J., Welty-Bernard A., Read T., Fraser C.M., Ravel J., Keim P. Strain-Specific Single-Nucleotide Polymorphism Assays for the *Bacillus anthracis* Ames Strain. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(1):47–53. DOI: 10.1128/JCM.01233-06.

19. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C. Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3):e1534. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001534.

20. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS One*. 2014; 9(6):e95131. DOI: 10.1371/journal.pone.0095131.

References

1. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(10):2928–36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000.

2. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.

3. Gierczyński R., Jakubczak A., Jagielski M. Extended Multiple-Locus Variable Tandem-Repeat Analysis of *Bacillus anthracis* Strains Isolated in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 2009; 58(1):3–7. PMID: 19469279.

4. Okutani A., Sekizuka T., Boldbaatar B., Yamada A., Kuroda M., Inoue S. Phylogenetic Typing of *Bacillus anthracis* Isolated in Japan by Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats and the Comprehensive Single Nucleotide Polymorphism. *J. Vet. Med. Sci.* 2010; 72(1):93–7. DOI: 10.1292/jvms.09-0213.

5. Antwerpen M., Ilin D., Georgieva E., Meyer H., Savov E., Frangoulidis D. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30(7):923–30. DOI: 10.1007/s10096-011-1177-2.

6. Jung K.H., Kim S.H., Kim S.K., Cho S.Y., Chai J.C., Lee Y.S., Kim J.C., Kim S.J., Oh H.B., Chai Y.G. Genetic populations of *Bacillus anthracis* isolates from Korea. *J. Vet. Sci.* 2012; 13(4):385–93. DOI: 10.4142/jvs.2012.13.4.385.

7. Eremenko E.I., Ryzanova A.G., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Buravtseva N.P., Kulitchenko A.N. Genotype Diversity of *Bacillus anthracis* Strains Isolated from the Caucasus Region. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(2):74–8. DOI: 10.3103/S0891416812020024.

8. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C.B. Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3):e1534. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001534.

9. 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; 11(2):e0146216. DOI: 10.1371/journal.pone.0146216.

10. Derzelle S., Thierry S. Genetic Diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: Genotyping Methods in Forensic and Epidemiologic Investigations. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science*. 2013; 11(1):166–76. DOI: 10.1089/bsp.2013.0003.

11. Aikembayev A. M., Lukhnova L., Temiraliyeva G., Meka-Mechenko T., Pazylov Y., Zakaryan S., Denissov G., Easterday W. R., Van Ert M. N., Keim P., Francesconi S. C., Blackburn J. K., Hugh-Jones M., Hadfield T. Historical Distribution and Molecular Diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5):789–96. DOI: 10.3201/eid1605.091427.

12. Durmaz R., Doganay M., Sahin M., Percin D., Karahocagil M.K., Kayabas U., Oflu B., Karagoz A., Buyuk F., Celebi O., Ozturk Z., Ertek M. Anthrax Study Group. Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31(10):2783–90. DOI: 10.1007/s10096-012-1628-4.

13. Okutani A., Tungalag H., Boldbaatar B., Yamada A., Tserennorov D., Otgonchimeg I., Erdenebat A., Otgonbaatar D., Inoue S. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8). *Jpn J. Infect. Dis.* 2011; 64:345–8. PMID: 21788715.

14. Eremenko E.I., Pisarenko S.V., Aksенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Зhirov А.М., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Ковалев Д.А., Куличенко А.Н. [Phylogeny, evolution, and phylogeography of *Bacillus anthracis*]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2018; 3(2):57–63.

15. Kulichenko A.N., Eremenko E.I., Ryzanova A.G., Aksенова Л.Ю., Ковалев Д.А., Pisarenko S.V., Varfolomeeva N.G., Zhirov A.M., Volynkina A.S., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Bogun A.G., Bakhteeva I.V., Kislchikina A.A., Mironova R.I., Titareva G.M., Skryabin Yu. O., Selyaninov Yu. O., Egorova I. Yu., Kolbasov D.V. [Biological properties and molecular-genetic characteristics of *Bacillus anthracis* strains, isolated during the outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 1:94–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99.

16. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.

17. Sahl J.W., Pearson T., Okinaka R., Schupp J.M., Gillette J.D., Heaton H., Birdsell D., Hepp C., Fofanov V., Noseda R., Fasanella A., Hoffmaster A., Wagner D.M., Keim P. A *Bacillus anthracis* genome sequence from the Sverdlovsk 1979 autopsy specimens. *mBio*. 2016; 7(5):e01501–16. DOI: 10.1128/mBio.01501-16.

18. Van Ert M.N., Easterday W. R., Simonson T.S., U'Ren J.M., Pearson T., Kenefic L.J., Busch J.D., Huynh L.Y., Dukerich M., Trim C.B., Beaudry J., Welty-Bernard A., Read T., Fraser C.M., Ravel J., Keim P. Strain-Specific Single-Nucleotide Polymorphism Assays for the *Bacillus anthracis* Ames Strain. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(1):47–53. DOI: 10.1128/JCM.01233-06.

19. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C. Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3):e1534. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001534.

20. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS One*. 2014; 9(6):e95131. DOI: 10.1371/journal.pone.0095131.

Authors:

Eremenko E.I., Ryzanova A.G., Pisarenko S.V., Buravtseva N.P., Pechkovskiy G.A., Aksенова Л.Ю., Семенова О.В., Варфоломеева Н.Г., Головинская Т.М., Чмеренко Д.К., Ковалев Д.А., Зhirov А.М., Шапков Н.А., Куличенко А.Н. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Буравцева Н.П., Печковский Г.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Варфоломеева Н.Г., Головинская Т.М., Чмеренко Д.К., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Шапков Н.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 21.06.19.

Отправлена на доработку 19.08.19.

Принята к публ. 22.08.19.