

А.Н.Куличенко<sup>1</sup>, Е.И.Еременко<sup>1</sup>, А.Г.Рязанова<sup>1</sup>, Л.Ю.Аксенова<sup>1</sup>, Д.А.Ковалев<sup>1</sup>, С.В.Писаренко<sup>1</sup>, Н.Г.Варфоломеева<sup>1</sup>, А.М.Жиринов<sup>1</sup>, А.С.Волынкина<sup>1</sup>, Н.П.Буравцева<sup>1</sup>, Т.М.Головинская<sup>1</sup>, Е.А.Котенева<sup>1</sup>, О.И.Цыганкова<sup>1</sup>, И.А.Дятлов<sup>2</sup>, В.С.Тимофеев<sup>2</sup>, А.Г.Богун<sup>2</sup>, И.В.Бахтеева<sup>2</sup>, А.А.Кисличкина<sup>2</sup>, Р.И.Миронова<sup>2</sup>, Г.М.Титарева<sup>2</sup>, Ю.П.Скрябин<sup>2</sup>, Ю.О.Селянинов<sup>3</sup>, И.Ю.Егорова<sup>3</sup>, Д.В.Колбасов<sup>3</sup>

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В ЯМАЛО-НЕНЕЦКОМ АВТОНОМНОМ ОКРУГЕ В 2016 г.

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь;

<sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk;

<sup>3</sup>ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Российской академии сельскохозяйственных наук, п. Вольгинский, Российская Федерация

**Цель работы** – определение фенотипических свойств и генетических особенностей штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 г. **Материалы и методы.** Исследовали штаммы сибирезявленного микроба по основным, дополнительным идентификационным тестам и методами canSNP-, MLVA-генотипирования и полногеномного секвенирования. **Результаты и выводы.** Выявлена идентичность фенотипических свойств, генотипов и профилей полногеномного секвенирования штаммов вне зависимости от источника выделения. Подтвержден общий источник заражения людей. Определены филогенетические взаимоотношения исследованных штаммов и их место в глобальной популяции *B. anthracis*. Впервые изучена вариабельность набора генов, связанных с патогенностью, и показана эффективность использования предложенного алгоритма генетического типирования.

**Ключевые слова:** сибирская язва, штаммы *Bacillus anthracis*, фенотипические свойства, генетическое типирование.

Корреспондирующий автор: Куличенко Александр Николаевич, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

A.N.Kulichenko<sup>1</sup>, E.I.Eremenko<sup>1</sup>, A.G.Ryazanova<sup>1</sup>, L.Yu.Aksenova<sup>1</sup>, D.A.Kovalev<sup>1</sup>, S.V.Pisarenko<sup>1</sup>, N.G.Varfolomeeva<sup>1</sup>, A.M.Zhirov<sup>1</sup>, A.S.Volynkina<sup>1</sup>, N.P.Buravtseva<sup>1</sup>, T.M.Golovinskaya<sup>1</sup>, E.A.Koteneva<sup>1</sup>, O.I.Tsygankova<sup>1</sup>, I.A.Dyatlov<sup>2</sup>, V.S.Timofeev<sup>2</sup>, A.G.Bogun<sup>2</sup>, I.V.Bakhteeva<sup>2</sup>, A.A.Kislichkina<sup>2</sup>, R.I.Mironova<sup>2</sup>, G.M.Titareva<sup>2</sup>, Yu.P.Skryabin<sup>2</sup>, Yu.O.Selyaninov<sup>3</sup>, I.Yu.Egorova<sup>3</sup>, D.V.Kolbasov<sup>3</sup>

## Biological Properties and Molecular-Genetic Characteristics of *Bacillus anthracis* Strains, Isolated during the Outbreak of Anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016

<sup>1</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; <sup>2</sup>State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation; <sup>3</sup>National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Volginsky, Russian Federation

**Objective** of the study was to identify phenotypic properties and genetic peculiarities of *Bacillus anthracis* strains, isolated during the outbreak of anthrax in the territory of Yamal in 2016. **Materials and methods.** Investigated were the strains of anthrax agent, applying basic and subsequent identification tests and canSNP-, MLVA-genotyping methods and whole genome sequencing. **Results and conclusions.** The results showed the identity of the phenotypic properties, canSNP- and MLVA25-genotypes, and profiles of whole genome-sequencing, regardless of the source of the strains isolation. Confirmed was a common source of human infection. Defined were phylogenetic interrelations of the tested strains and their position in global *B. anthracis* population. For the first time ever explored was variability of the gene pattern, associated with pathogenicity, and demonstrated – the efficiency of the proposed algorithm for genetic typing.

**Key words:** anthrax, *Bacillus anthracis* strains, phenotypic properties, genotyping.

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

**Corresponding author:** Alexander N. Kulichenko, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

**Citation:** Kulichenko A.N., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Aksenova L.Yu., Kovalev D.A., 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., Kislichkina A.A., Mironova R.I., Titareva G.M., Skryabin Yu.P., 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; 1:94–99. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99

2016 год отмечен крупнейшей эпизоотией сибирской язвы среди северных оленей в Ямало-Ненецком автономном округе (ЯНАО), повлекшей за собой за-

болевание 36 человек с одним летальным исходом. В ходе эпидемиологического расследования выделены штаммы возбудителя сибирской язвы в пробах

от больных людей и трупов оленей. Исследование штаммов имело целью определить биологические свойства, выявить генетические особенности, сходство их генотипа с известными вариантами для обоснования эпидемиологических данных об источнике заражения людей, получить представление о генетических взаимоотношениях штаммов, определения их места в глобальной популяции *Bacillus anthracis*.

**Материалы и методы**

Исследовали 10 штаммов сибирезвездного микроба, выделенных в 2016 г. в ЯНАО. Для сравнения генотипов использовали 10 штаммов из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», а также литературные данные о генотипе штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (табл. 1).

Фенотипические свойства штаммов оценивали в соответствии со схемой идентификации сибирезвездного микроба, приведенной в методических указаниях МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы».

Молекулярно-генетическое типирование проводили методами с разной разрешающей способно-

стью. Анализ «канонических» единичных нуклеотидных полиморфизмов (canSNP-типирование) проводили по схеме [1], используя аллельспецифическую ПЦР-амплификацию с LNA-модифицированными зондами и учетом результатов в формате реального времени по модифицированной методике на амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия). MLVA-типирование осуществляли по 25 VNTR-локусам с ПЦР-праймерами, описанными F.Lista *et al.* [2], путем секвенирования каждого из локусов в автоматическом ДНК-анализаторе ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Полногеномное секвенирование (ПГС) проводили с помощью секвенатора Ion Torrent PGM, чипов Ion 316 Chips Kit V2 (Life Technologies, США) и набора реагентов Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США) в соответствии с протоколом производителя. Анализ данных ПГС проводили с применением программ Wombac 2.0 (VBC (Monash University, Австралия), SplitsTree 4 (version 4.14.4) (Universität Tübingen, Германия), CLC Sequence Viewer Version 7.0 (QIAGEN, Германия, CLCbio, Aarhus A/S).

Анализ структурных и регуляторных генов, факторов патогенности (*pagA*, *lef*, *cyu*, *capA*, *capB*, *capC*, *capD*, *capE*, *abrB*, *acpA*, *acpB*, *atxA*, *pagR*), по дан-

Таблица 1

Происхождение и canSNP-генотипы штаммов *B. anthracis*

Штамм <i>B. anthracis</i>	Источник выделения	Место выделения	Год выделен	Локусы canSNP												canSNP-генотип	
				A.Br.001	A.Br.002	A.Br.003	A.Br.004	A.Br.006	A.Br.007	A.Br.008	A.Br.009	B.Br.001	B.Br.002	B.Br.003	B.Br.004		A.Br.001
11	Больной человек	ЯНАО, Салехард	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
12	Больной человек	ЯНАО, Салехард	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
23	Больной человек	ЯНАО, Салехард	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
24	Труп оленя	ЯНАО, район озера Письёто	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
25	Труп оленя	ЯНАО, район озера Письёто	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
26	Труп оленя	ЯНАО, район озера Письёто	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
27	Труп оленя	Ямальский р-н, Новопортовская тундра	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
28	Труп оленя	ЯНАО, район озера Письёто	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
29	Зольный остаток с места сжигания оленя	ЯНАО, район реки Еваяха	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
5876	Труп оленя	ЯНАО, район озера Письёто	2016	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
1051/35	Труп лошади	г. Уфа	1935	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
14/41	Содержимое язвы больного	Дагестан	1963	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
1284	Пельмени «Особые»	г. Омск	2010	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
140П	Почва скотомогильника	Тверская область	1979	T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A	B.Br.001/002
81/1	Содержимое карбункула больного	Ставропольский край	1969	T	G	A	T	A	T	G	A	T	G	G	T	A	A.Br.008/009
1266	Почва подворья	Ставропольский край	2006	T	G	A	T	A	T	G	A	T	G	G	T	A	A.Br.008/009
1269	Спинально-мозговая жидкость больного	PCO-A	2007	T	G	A	T	A	T	G	A	T	G	G	T	A	A.Br.008/009
1(CO)	Материал от КРС	PCO-A	1968	T	G	A	T	A	T	G	A	T	G	G	T	A	A.Br.008/009
1307	Струп язвы больного	Ставропольский край	2013	T	G	A	T	A	T	G	A	T	G	G	T	A	A.Br.008/009
1322	Мясо овцы	Ставропольский край	2013	T	G	A	T	A	T	G	A	T	G	G	T	A	A.Br.008/009
И-271	Почва с места падежа скота	Якутская АССР	1980	T	A	G	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A	A.Br.001/002
Ames Ancestor	Труп коровы	США, Техас	1981	C	A	G	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A	A.Br.Ames

ным черновой сборки полногеномного секвенирования штаммов, проводили *in silico*, сравнивая с последовательностями генов *B. anthracis* Ames Ancestor с использованием ресурса NCBI BLASTn ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)).

Анализ SNR по нескольким генетическим областям проводили с применением праймеров, описанных L.J.Kenefic *et al.* [3].

Филогенетический анализ проводили в программе FYLOViZ 2.0 ([www.phyloviz.net](http://www.phyloviz.net)) по алгоритмам UPGMA и Neighbor-Joining.

### Результаты и обсуждение

Все выделенные в ЯНАО штаммы имели биологические свойства, характерные для типичных штаммов *B. anthracis*, в том числе типичную бактериоскопическую морфологию при окрашивании по Грамму специфическими иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибиреязвенными вегетативными адсорбированными, формировали колонии в R-форме на плотных питательных средах и придонный рост с сохранением прозрачности среды в питательном бульоне, обладали способностью к спорообразованию. У штаммов не выявлялась фосфатазная, лецитиназная, гемолитическая активность на кровяном агаре, они проявляли гемолитическую активность на специальных средах, продуцировали протеолитические ферменты и протокатеховую кислоту, обладали способностью к токсинообразованию *in vitro*, капсулообразованию *in vitro* и *in vivo*, давали положительную реакцию Асколи. ПЦР с ДНК штаммов была положительной с праймерами к генам *pag*, *сya*, *capA* и хромосомной областью *prophage 03*. Штаммы чувствительны к сибиреязвенным бактериофагам Fah-ВНИИВВиМ R/D-ph-6, Гамма А26, широкому спектру антибактериальных препаратов

групп пенициллинов, тетрациклинов, фторхинолонов, рифампицину, аминогликозидов, левомицетину, тилозину и устойчивы к полимиксину. Значение LD<sub>50</sub> для белых беспородных мышей составило 5÷23 споры, для морских свинок – 237÷830 (подкожное заражение), что свидетельствует о высокой вирулентности штаммов.

SNP-типирование показало, что все штаммы, выделенные в 2016 г. в ЯНАО, независимо от источника и места выделения имеют одинаковый canSNP-генотип V.Br.001/002. Аналогичный генотип характерен для штаммов *B. anthracis* 1284, *B. anthracis* 1051/35, *B. anthracis* 14/41 и *B. anthracis* 140П. Штаммы *B. anthracis* 81/1, *B. anthracis* 1266, *B. anthracis* 1307 и *B. anthracis* 1322, имели генотип A.Br.008/009, а штамм *B. anthracis* Ames Ancestor – A.Br.Ames (табл. 1).

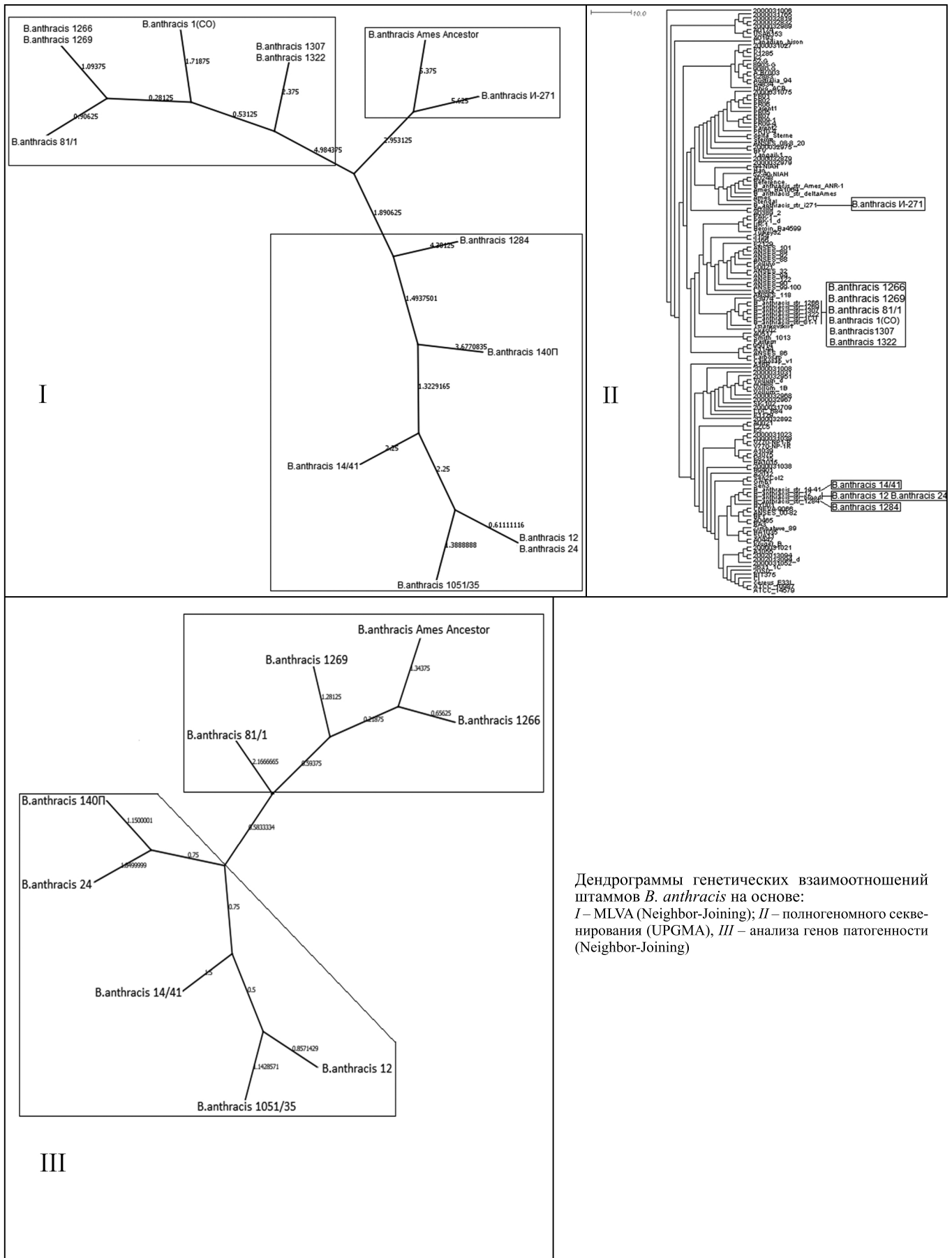
Эти данные стали первым свидетельством принадлежности штаммов из вспышки в ЯНАО к одному источнику и близости их генотипа с генотипами штаммов *B. anthracis* 1051/35, *B. anthracis* 1284, *B. anthracis* 14/41 и *B. anthracis* 140П.

Все изоляты, выделенные в 2016 г. в ЯНАО, имеют один и тот же MLVA-генотип (табл. 2). Это подтвердило предварительный вывод на основании SNP-генотипирования об общности их происхождения, связи заболевания людей с эпизоотией сибирской язвы оленей в ЯНАО. На дендрограммах, построенных по результатам MLVA, хорошо видно разделение штаммов на три кластера (рисунок, II). Первый кластер включает все ямальские штаммы, а также штаммы 1051/35, 1284, 14/41 и 140П; второй – штаммы 81/1, 1(CO), 1266, 1269, 1307 и 1322; третий – штаммы И-271 и Ames Ancestor. Особенностью ямальских штаммов, как и других штаммов из первого кластера, является отсутствие амплификации с праймерами к локусу Vams34. Наиболее близким к

Таблица 2

MLVA25- и canSNP-генотипы штаммов *B. anthracis*

Штамм, №	vtrA	vtrB1	vtrB2	vtrC1	vtrC2	CG3	pX-Olaat	pXO2at	Vams01	Vams03	Vams05	Vams13	Vams15	Vams21	Vams22	Vams23	Vams24	Vams25	Vams28	Vams30	Vams31	Vams34	Vams44	Vams51	Vams53
11, 12, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 5876	9	19	7	53	17	2	9	7	14	27	7	27	45	10	15	10	11	13	12	17	85	-1	8	6	6
1051/35	9	19	7	53	17	2	7	7	14	27	7	27	45	10	15	10	11	27	12	17	85	-1	8	6	6
14/41	9	19	7	53	17	2	8	8	14	27	7	27	45	10	15	10	11	13	13	17	84	-1	8	8	6
1284	9	19	9	53	17	2	9	8	14	26	7	7	45	10	15	9	11	13	14	17	84	-1	8	6	8
140П	9	19	7	53	17	2	8	8	13	27	7	27	24	10	17	10	11	13	12	17	30	-1	8	9	8
81/1	10	16	7	57	21	1	11	8	13	27	7	30	45	10	15	9	11	13	14	76	65	9	8	9	8
1266	11	16	7	57	21	1	11	8	13	30	7	30	45	10	15	9	11	13	14	76	65	9	8	9	8
1269	11	16	7	57	21	1	11	8	13	30	7	30	45	10	15	9	11	13	14	76	65	9	8	9	8
1(CO)	10	16	7	57	21	1	11	8	13	30	7	33	45	10	15	9	11	13	14	76	40	9	8	9	8
1307	10	16	7	57	21	1	11	8	14	30	7	30	45	10	15	10	11	13	14	76	65	9	8	9	6
1322	10	16	7	57	21	1	11	8	14	30	7	30	45	10	15	10	11	13	14	76	65	9	8	9	6
И-271	10	16	7	53	17	2	7	11	16	28	7	5	45	10	16	11	13	7,3	57	64	8	11	8	9	8
Ames Ancestor	10	16	6	53	17	2	7	10	16	26	5	70	24	10	16	11	11	13	14	57	64	11	8	9	8



Дендрограммы генетических взаимоотношений штаммов *B. anthracis* на основе: I – MLVA (Neighbor-Joining); II – полногеномного секвенирования (UPGMA), III – анализа генов патогенности (Neighbor-Joining)

штаммам из Ямала был генотип штамма 1051/35, отличающийся только по двум локусам, и затем штамм

14/41 (отличия по пяти локусам). Уникальность MLVA25-генотипа ямальских штаммов установлен



на при сравнительном анализе генотипов 1713 изолятов, представленных в базе данных из ресурса MLVAbank for Bacterial Genotyping (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping>). Идентичность генотипов ямальских штаммов, выделенных в трех отдаленных очагах (район озера Письёто, Новопортовская тундра, район реки Еваяха), может быть свидетельством разлитых эпизоотий в прошлом, вызванных одним типом *B. anthracis*. В связи с идентичностью генотипов всех штаммов из вспышки для дальнейшего исследования были отобраны штаммы *B. anthracis* 12 (выделен от человека) и *B. anthracis* 24 (выделен от оленя), а также штаммы сравнения *B. anthracis* 1284, 14/41, 140П, 81/1, 1(CO), 1266, 1269, 1051/35, 1307, 1322 и Ames Ancestor.

Изучение полногеномных нуклеотидных последовательностей 149 штаммов *B. anthracis* и одного штамма *Bacillus cereus* позволило получить представление о генетических взаимоотношениях штаммов и их месте в глобальной популяции *B. anthracis*. Из дендрограммы, построенной по результатам анализа, видно, что штаммы *B. anthracis* 12 и 24, выделенные в ЯНАО, группируются вместе со штаммами *B. anthracis* 14/41, *B. anthracis* 1284, а также со штаммом *B. anthracis* NYU01 (выделен в Корее в 2009 г.) (рисунок, II). Штаммы сравнения *B. anthracis* 1(CO), 81/1, 1266, 1269, 1307 и 1322 группируются отдельно. Штамм *B. anthracis* И-237 является отдельной ветвью, связанной с группой Ames. Такой характер распределения штаммов соответствует данным canSNP-генотипирования и MLVA (рисунок, I, II).

Изучение генетической вариабельности 9 исследуемых штаммов (рисунок, III) проводили на основании данных черновой сборки при условии, что каждый из генов располагался в пределах одного из контигов сборки. На основании указанного критерия из исследования исключены ген *pagA* у штаммов *B. anthracis* 12 и *B. anthracis* 24 и гены *lef*, *acpV* и *atxA* у штамма *B. anthracis* 1284. Штаммы *B. anthracis* 12 и 24 отличались от референсного штамма заменами и делециями в пяти генах и вставкой из девяти оснований в *acpA*. Последняя встречается также у штаммов *B. anthracis* 140П и 141/41, у шести штаммов *B. anthracis* из базы данных NCBI, один из которых (*B. anthracis* NYU01, Корея), по данным ПГС, близок к *B. anthracis* 12 и 24. Изменения в гене *acpV* у штаммов *B. anthracis* 12 и 24 отличают их от всех остальных штаммов. Между собой эти штаммы отличались генами *суа*, *acpV* и *atxA*. В совокупности отличия в исследованных генах позволили идентифицировать от 4 до 7 типов генов *lef*, *суа*, *acpA*, *capA* и *acpV* и три типа генов *atxA*. У генов *pagR*, *capB*, *capC*, *capD* и *capE* вариабельности не отмечено.

Филогенетический анализ показывает, что изученные штаммы делятся на 9 индивидуальных генотипов, составляющих две группы (рисунок, III). Штамм *B. anthracis* 12 по этим данным ближе всего к штамму *B. anthracis* 1051/35, а штамм *B. anthracis* 24 – к штамму 140П. Впервые примененный анализ

последовательностей генов патогенности позволил получить разделение генотипов штаммов *B. anthracis* 12 и 24, недостижимое при canSNP-анализе и MLVA.

Исследование штаммов *B. anthracis* 12 и 24, выделенных от человека и трупа оленя соответственно, показало, что существуют различия в числе единичных повторов адениновых нуклеотидов в трех SNR-локусах (CL10, CL12 и CL35): у *B. anthracis* 12 – 20, 13 и 12 повторов, соответственно, у *B. anthracis* 24 – 18, 12, 11, у штамма Ames Ancestor – 16, 15 и 15.

Эти отличия между двумя ямальскими штаммами могли быть следствием неоднократных трансмиссий инфекций между оленями и передачи к человеку в ходе одной вспышки, так как скорость мутации в SNR-локусах наиболее высока и достаточна для возникновения новых генетических вариантов.

Проведенное исследование показало, что все штаммы *B. anthracis*, выделенные в ходе вспышки сибирской язвы в ЯНАО в 2016 г., имеют одинаковые типичные морфологические, биохимические, генетические свойства и высокую вирулентность. Штаммы *B. anthracis*, выделенные от оленей и больных людей, имеют одинаковые canSNP- и MLVA25-генотипы, идентичный профиль полногеномного секвенирования, что подтверждает заражение людей при различного рода контакте с заболевшими животными. Совпадение их генотипов может объясняться циркуляцией одного штамма возбудителя сибирской язвы на территории ЯНАО сейчас и во время разлитых эпизоотий в прошлом. Наиболее близким к ним является штамм *B. anthracis* 1051/35, выделенный в 1935 г. в Уфе. Выявлена внутривидовая вариабельность нуклеотидных последовательностей генов, ассоциированных с патогенностью *B. anthracis*. Штаммы *B. anthracis* 12 (от больного человека) и *B. anthracis* 24 (от оленя) имеют тип гена *acpV*, который отличает их от других штаммов *B. anthracis*, и тип генов *суа*, *acpV* и *atxA*, отличающий их между собой. Анализ SNR предполагает существование неоднократной трансмиссии возбудителя в ходе вспышки сибирской язвы. В целом, выбранный алгоритм и набор методов молекулярного анализа штаммов – canSNP-типирование, MLVA25-типирование, полногеномное секвенирование – показал пригодность для проведения оперативного молекулярно-эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zaneckil S. R., Pearson T., Simonson S.T., 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.
2. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., Vaissaire J., Doujet C., Olivier G., De Santis R., Carattoli A., Ciervo A., Fasanella A., Orsini F., D'Amelio R., Pourcel C., Cassone A.,

Vergnaud G. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis. *BMC Microbiol.* 2006; 6:33. DOI: 10.1186/1471-2180-6-33.

3. Kenefic L.J., Beaudry J., Trim C., Huynh L., Zanecki S., Matthews M., Schupp J., Van Ert M., Keim P. A high resolution four-locus multiplex single nucleotide repeat (SNR) genotyping system in *Bacillus anthracis*. *J. Microbiol. Methods.* 2008; 73(3):269–72. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.11.014.

#### References

1. 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 S.T., 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.

2. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciannaruconi A., Vaissaire J., Doujet C., Olivier G., De Santis R., Carattoli A., Ciervo A., Fasanella A., Orsini F., D'Amelio R., Pourcel C., Cassone A., Vergnaud G. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis. *BMC Microbiol.* 2006; 6:33. DOI: 10.1186/1471-2180-6-33.

3. Kenefic L.J., Beaudry J., Trim C., Huynh L., Zanecki S., Matthews M., Schupp J., Van Ert M., Keim P. A high resolution four-locus multiplex single nucleotide repeat (SNR) genotyping system in *Bacillus anthracis*. *J. Microbiol. Methods.* 2008; 73(3):269–72. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.11.014.

#### Authors:

Kulichenko A.N., Eremanko E.I., Ryazanova A.G., Aksenova L.Yu., Kovalev D.A., Pisarenko S.V., Varfolomeeva N.G., Zhirov A.M., Volynkina

A.S., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Koteneva E.A., Tsygankova O.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Bogun A.G., Bakhteeva I.V., Kislichkina A.A., Mironova R.I., Titareva G.M., Skryabin Yu.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu., Kolbasov D.V. National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 1, Akademika Bakulova St., Volginsky, Vladimir Region, 601125, Russian Federation. E-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru.

#### Об авторах:

Куличенко А.Н., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Варфоломеева Н.Г., Жилов А.М., Волынкина А.С., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Котенева Е.А., Цыганкова О.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Бозун А.Г., Бахтеева И.В., Кисличкина А.А., Миронова Р.И., Титарева Г.М., Скрябин Ю.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org.

Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю., Колбасов Д.В. Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии. Российская Федерация, 601125, Владимирская обл., Петушинский р-н, п. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, 1. E-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru.

Поступила 24.01.17.