

На правах рукописи

ГОНЧАРОВА ЮЛИЯ ОЛЕГОВНА

**АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ
СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА**

Специальность:

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Оболенск – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:

Тимофеев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория микробиологии сибирской язвы, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Еременко Евгений Иванович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория сибирской язвы, главный научный сотрудник, г. Ставрополь;

Солонин Александр Сергеевич, доктор биологических наук, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Министерства образования и науки Российской Федерации, лаборатория молекулярной микробиологии, заведующий лабораторией, г. Пушкино.

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Иркутск.

Защита состоится «03» февраля 2023 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г. о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Сибирская язва – особо опасная карантинная зоонозная инфекция, острое, и часто смертельное, заболевание травоядных животных и приматов. Этиологическим агентом сибирской язвы является *Bacillus anthracis* – спорообразующая грамположительная бактерия, относящаяся ко II группе патогенности (Маринин с соавт., 2008).

B. anthracis является патогенным членом группы *Bacillus cereus sensu lato* или *Bacillus cereus complex*, куда входят девять близкородственных видов бацилл, а именно: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. weihenstephanensis* и *B. wiedmannii* (Carroll *et al.*, 2017). Систематика группы *B. cereus* давно является источником дискуссий, поскольку для данных видов характерна удивительно высокая степень сходства на генетическом уровне, несмотря на различную вирулентность и другие фенотипические признаки (Helgason *et al.*, 2000). Главное отличие возбудителя сибирской язвы от близкородственных видов заключается в наличии двух плазмид вирулентности: рХО1 и рХО2, обуславливающих патогенность (Okinaka *et al.*, 1999). Факторами патогенности сибиреязвенного микроба, главным образом, являются трехкомпонентный токсин и капсула. На плазмиде рХО1 локализованы гены *pagA*, *lef* и *capA*, кодирующие субъединицы сибиреязвенного токсина, и ген *atxA*, кодирующий главный регулятор транскрипции *B. anthracis* (Okinaka *et al.*, 1999). На плазмиде рХО2 локализован оперон *capBCADE*, кодирующий ферменты синтеза поли- γ -D-глутаминовой капсулы *B. anthracis*, и гены регуляторных белков *acpA* и *acpB* (Makino *et al.*, 1989).

Как и в любых генетических структурах, в генах факторов патогенности могут накапливаться мутации, что может привести к выделению из глобальной популяции отдельных штаммов и групп штаммов, обладающих разными аллелями этих генов. Поскольку факторы патогенности опосредуют взаимодействие микроорганизма с хозяином, разные их аллели могут обеспечивать такое взаимодействие с разной эффективностью, что может выражаться в большей или меньшей вирулентности. Эти соображения легли в основу работ по изучению аллельного полиморфизма факторов патогенности ряда микроорганизмов и метода генотипирования, основанного на анализе нуклеотидных последовательностей генов вирулентности, получившего название MVLST (Multi Virulence Locus Sequence Typing). Полученные данные используются для изучения внутривидовой филогенетической структуры различных видов бактерий, сравнительной вирулентности штаммов-носителей того или иного сиквенс-типа и для попыток связать сиквенс-тип с географическим происхождением штамма (Anisimov *et al.*, 2010; Dentovskaya *et al.*, 2016; Kopylov *et al.*, 2016; Rakov *et al.*, 2019; Springman *et al.*, 2009). Однако для сибиреязвенного микроба подобные работы до настоящего времени не проводились. Для части белков-факторов патогенности *B. anthracis* описана доменная структура, а также роль доменов и некоторых аминокислот в функциональной активности белка (Klimpel *et al.*, 1994; Mourez *et al.*, 2003; Tsvetanova *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2016). Полиморфизм нуклеотидных последовательностей генов вирулентности и аминокислотных последовательностей соответствующих белков в глобальной популяции *B. anthracis* остается малоизученным. Были опубликованы лишь отдельные работы, в которых оценивался аллельный полиморфизм некоторых генов *B. anthracis* на основе немногочисленной выборки штаммов без детального анализа филогенетической и филогеографической значимости полученных результатов (Eremenko *et al.*, 2019; Price *et al.*, 1999).

Степень разработанности темы исследования

MVLST-анализ на момент написания работы не применялся в отношении природных и лабораторных штаммов возбудителя сибирской язвы. Был проведен лишь анализ полиморфизма гена *pagA* небольшой коллекции штаммов (Price *et al.*, 1999), а также опубликованы данные по значению индекса биоразнообразия при применении MVLST в отношении *B. anthracis* без детального описания выявленных генотипов (Eremenko *et al.*, 2019). Функциональная роль мутаций в генах вирулентности *B. anthracis* и их распространенность в глобальной популяции остается слабо изученной, несмотря на то, что во многих работах описано влияние мутаций в этих генах на ферментативную активность соответствующих белков в условиях *in vitro* и выявлена функциональная роль некоторых аминокислот в этих белках (Klimpel *et al.*, 1994; Mourez *et al.*, 2003; Tsvetanova *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2016). Подходы MLVA- и *can*SNP-типирования являются, на данный момент, основой генотипирования штаммов *B. anthracis*, однако на территории РФ проведено недостаточно много работ с использованием этих методов (Афанасьев с соавт., 2014; Еременко с соавт., 2012; Рязанова с соавт., 2011; Шишкова с соавт., 2011; Eremenko *et al.*, 2019; Timofeev *et al.*, 2019). MLST-генотипирование использовали авторы ряда работ для определения видовой принадлежности изолятов, принадлежащих группе *B. cereus sensu lato*, в том числе и для *B. anthracis* (Helgason *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004; Sorokin *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2004; Tourasse *et al.*, 2006). При этом, как подход для дифференцирования возбудителя сибирской язвы от других бацилл метод практически не получил применения.

Цель исследования

Изучение аллельного полиморфизма генов факторов патогенности *B. anthracis* и корреляции последовательностей этих генов с другими генетическими и фенотипическими признаками.

Задачи исследования

1. Провести *can*SNP-, MLVA- и MLST-генотипирование штаммов *B. anthracis* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН ГНЦ ПМБ и штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*, последовательности геномов которых депонированы в базе данных GenBank.
2. Описать аллельный полиморфизм генов факторов патогенности репрезентативной выборки штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* и на основе полученных данных провести MVLST-генотипирование.
3. Оценить степень соответствия результатов MVLST и других схем генотипирования, а также соответствие MVLST-профиля с географическим ареалом распространения штаммов *B. anthracis*.
4. Исследовать возможное влияние MVLST-генотипа штамма *B. anthracis* на вирулентность для лабораторных животных.

Научная новизна исследования

Впервые использован метод MVLST для генотипирования сибирезвенного микроба и показано, что одновременный анализ результатов MVLST и других методов генотипирования позволяет выявить комбинации генетических маркеров, указывающих на вероятное географическое происхождение штамма *B. anthracis*.

Впервые получены данные, позволяющие связать MVLST-профиль штамма *B. anthracis* с его вирулентностью для лабораторных грызунов.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты MVLST подтверждают гипотезу об антропогенном распространении *B. anthracis* через Евразию при монгольских завоеваниях в XIII-XVII вв.

Показано, что на севере России циркулируют штаммы *B. anthracis*, формирующие в рамках филогенетической группы V.Br.001/002 архаичную подгруппу, эволюционно тесно связанную со штаммами группы V.Br.CNEVA, эндемичной для Центральной Европы.

Депонировано в базу данных GenBank 50 нуклеотидных последовательностей генов факторов патогенности, полученных на основе данных полногеномного секвенирования штаммов *B. anthracis* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН ГНЦ ПМБ, которые могут быть использованы для прикладных и фундаментальных исследований возбудителя сибирской язвы – международный уровень внедрения.

Использование предложенного в работе порядка подтверждения видовой принадлежности штамма *B. anthracis*, определения его плазмидного профиля, проведения *can*SNP- и MLVA7- генотипирования, позволяет получить полноценную генетическую характеристику штамма и наиболее точно определить его относительное филогенетическое положение, что может быть использовано лабораториями, занимающимися проведением эпидрасследования вспышек сибирской язвы (Методические рекомендации «Генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis* перед депонированием в коллекцию культур микроорганизмов», утверждены ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ 01.07.2021 г., протокол № 5) – учрежденческий уровень внедрения.

Создан набор олигонуклеотидов для выявления генетических маркеров, указывающих на вероятную принадлежность штамма *B. anthracis* к определенной филогенетической группе и его географическое происхождение, а также показана возможность использования метода MLST-генотипирования для определения эволюционной линии штамма *B. anthracis* и его дифференцирования от других видов бацилл, что может быть использовано при проведении эпидрасследований и фундаментальных исследований сибиреязвенного микроба (справка о внедрении от 11.10.2022) – лабораторный уровень внедрения.

Материалы диссертационной работы используются в программе курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора «Микробиология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» (справка о внедрении от 12.10.2022) – учрежденческий уровень внедрения.

Методология и методы исследования

Методология исследования соответствовала поставленным задачам. Предметом исследования был аллельный полиморфизм генов факторов патогенности и филогенетическая структура выборки штаммов *B. anthracis* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН ГНЦ ПМБ и штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*, геномы которых депонированы в базе данных GenBank. В работе использовали молекулярно-биологические, микробиологические, биологические, генетические, биоинформатические и статистические методы.

Штаммы микроорганизмов. Были исследованы 60 штаммов *B. anthracis* и 1 штамм *B. cereus* *bv anthracoid* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН ГНЦ ПМБ и «ГКПМ-Оболенск», имеющие различное географическое происхождение, выделенные на территории СССР, РФ и сопредельных государств в период 1940 – 2018 гг. В качестве основной группы сравнения в выборку включены 58 штаммов *B. anthracis*, 1 штамм *B. cereus* *bv anthracis* и 3 штамма *B. cereus*, геномы которых депонированы в базе данных GenBank. Для дополнительных исследований в выборку включены последовательности геномов 84 штаммов *B. anthracis*.

Микробиологические методы. Культуры штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* рассеивали до единичных колоний и выращивали на плотной питательной среде ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) при температуре 37°C в течение 12 часов. Морфологию колоний оценивали путем микроскопии с использованием микроскопа «Биолам П 2-1» (Scorica, Россия). Для получения споровых культур использовали голодный агар. Споровые суспензии *B. anthracis* готовили в забуференном физиологическом растворе с использованием стандарта мутности ОСО 42-28-85-2012 (ФГБУ НЦЭСМП, Россия).

Биологические методы. Были использованы беспородные белые мыши, мыши линии DBA и нелинейные морские свинки из вивария ФБУН ГНЦ ПМБ. Все протоколы экспериментов на животных были одобрены Комитетом по Биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ.

Вирулентность штаммов *B. anthracis* определяли по величине LD₅₀, проценту гибели и средней продолжительности жизни зараженных животных на модели беспородных белых мышей, мышей линии DBA и беспородных морских свинок. Заражение проводили введением под кожу бедра споровых суспензий исследуемых культур в изотоническом растворе хлорида натрия. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 суток. Выжившие животные были гуманно эвтаназированы ингаляцией CO₂. Погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Показатель продолжительности жизни рассчитывали, учитывая и выживших животных, для которых время жизни определяли как 21 день. Иммунизацию морских свинок проводили препаратом рекомбинантного протективного антигена PA63 в дозе 100 мкг белка/свинку, подкожно, двукратно с интервалом 21 сутки. Заражение свинок проводили для оценки протективности белка PA63 на 28 сутки после иммунизации.

Молекулярно-биологические методы. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, США).

Библиотеки подготовлены с помощью набора «Nextera DNA Library Preparation Kit» (Illumina, США). Полногеномное секвенирование осуществляли сотрудники отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ с на приборах «MiSeq» (Illumina, США) и «Ion Torrent PGM» (Thermo Fisher Scientific, США) и соответствующих наборов реагентов.

Реакции амплификации проводили с использованием термоциклеров «T100 thermal cycler» (Bio-Rad, США) и «CFX96» (Bio-Rad, США), и наборов реагентов «2,5 кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, Россия), «qPCRMix-HS» (Евроген, Россия) и «SNPdetect полимераза» (Евроген, Россия) согласно инструкциям производителей. Продукты реакции разделяли путем электрофореза в 0,7 – 3 % агарозном геле (Sigma-Aldrich, США) в 1 × TAE-буфере или 0,5 × TBE-буфере. Праймеры были синтезированы научно-производственной компанией «Синтол» (Россия).

MVLST-генотипирование осуществляли следующим образом: в соответствии с референсным геномом *B. anthracis* Ames Ancestor описывали выявленные мутации и их координаты в генах факторов патогенности (*pagA*, *lef*, *суа*, *capA*, *capB*, *capC*, *capD*, *capE*, *atxA*, *асрА*, *асрВ*) у штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*. В соответствии с полученными результатами выборку разделяли на сиквенс-типы (ST), а при филогенетическом анализе слитых последовательностей исследуемых генов плазмид rXO1 и rXO2 – на генотипы (GT).

CanSNP-генотипирование проводили в соответствии с работами (Birdsell *et al.*, 2012; Keim *et al.*, 2004) по 14-ти canSNP-локусам по результатам полногеномного секвенирования.

MLVA-генотипирование осуществляли согласно протоколу, описанному в работе (Thierry *et al.*, 2014) по 17 MLVA-маркерам. Генотипирование штамма включало 17 ПЦР-реакций и гель-электрофорез с определением размера фрагмента по маркерам молекулярных масс, размеры ампликонов переводили в количество tandemных повторов для каждого локуса. В результате получали MLVA-профили штаммов.

Для MLST-генотипирования использована схема, описанная в работе (Priest *et al.*, 2004). Были получены сборки последовательностей локусов *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *rusA*, *tpi* у исследуемой выборки. Последовательностям локусов присваивали номера аллелей в соответствии с базой данных PubMLST. На основе комбинации аллелей локусов определяли ST штаммов.

Биоинформационные методы. Сборки последовательностей плазмид pXO1 и pXO2, гена *alo*, *canSNP*- и MLST-локусов по результатам секвенирования осуществляли с использованием программного пакета Lasergene (DNASTAR, США). В качестве референсного генома использовали геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: GCA_000008445.1). Трансляцию *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные осуществляли с помощью программного пакета MEGA 7.0., а филогенетический анализ – с помощью программных пакетов MEGA 7.0 и PHYLLOViZ 2.0 (Nascimento *et al.* 2017). Дендрограммы построены с использованием метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA) и *gobBURST*-алгоритма (Francisco *et al.* 2009). Для филогенетического анализа методами MLST- и MVLST-генотипирования использовали слитые *in silico* последовательности интересующих локусов выявленных ST исследуемой выборки.

Статистические методы. В экспериментах с животными по результатам падежа построены кривые гибели, определены показатели продолжительности жизни животных в период эксперимента и уровни значимости (P) с помощью программы «GraphPad Prism 7.0» (GraphPad Software, США). Стандартные отклонения P менее чем 0,05 считали статистически значимыми. Индекс биоразнообразия Симпсона рассчитывали с помощью программы PHYLLOViZ 2.0 (Nascimento *et al.* 2017).

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана схема MVLST-генотипирования сибиреязвенного микроба, применимая для описания филогенетической структуры глобальной популяции *B. anthracis*. При этом MVLST_{pXO1}-профиль штамма *B. anthracis* обладает большей филогенетической значимостью, чем MVLST_{pXO2}-профиль.

2. Совместное использование *canSNP*- и MVLST-генотипирования позволяет выявить генетические маркеры, указывающие на вероятное географическое происхождение штамма *B. anthracis*.

3. MVLST_{pXO1}-профиль штамма *B. anthracis* в ряде случаев сцеплен с его вирулентностью для лабораторных животных.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках НИР 052 «Разработка алгоритмов индикации и идентификации сибиреязвенного микроба и неспецифической профилактики сибирской язвы» (номер регистрации в ЕГИСМ: 116030310009) и НИР 074 «Совершенствование алгоритмов идентификации сибиреязвенного микроба на основе молекулярно-биологических подходов» (номер регистрации в ЕГИСМ: 121022500008-3).

Достоверность результатов проведенных исследований определяется использованием современных методов исследования и оборудования, большим объемом полученных данных, использованием статистических методов обработки данных и сравнением полученных результатов с данными, опубликованными в научной литературе соответствующей тематики.

Материалы работы представлены и обсуждены на шести научных конференциях: Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения) (6-8 июня 2018 г., Санкт-Петербург); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2018» (9-13 апреля 2018 г., Москва); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020» (13-17 апреля 2020 г., Москва); XIII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: текущие и будущие угрозы» (24-26 мая 2021 г., Москва); XIV Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (28-30 марта 2022 г., Москва); Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2022» (27-28 апреля 2022 г., Москва).

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в анализе литературных данных, планировании экспериментов, в выполнении молекулярно-биологических и биоинформатических экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с Р.И. Мироновой, к.б.н. Т.Б. Кравченко, В.В. Евсеевой, к.м.н. И.В. Бахтеевой, к.м.н. Г.М. Титаревой, к.б.н. Т.И. Комбарово́й, К.В. Хлоповой и к.б.н. В.С. Тимофеевым. Полногеномное секвенирование осуществляли сотрудники отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль автора была определяющей.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях, 2 статьи в прочих изданиях и 6 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 181 странице машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, результатов исследования с их обсуждением, заключения, выводов, списка литературы, включающего 14 работ отечественных и 180 работ зарубежных авторов, а также трех приложений. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 21 таблицей.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Штаммы и геномы микроорганизмов

Создана коллекция из 61 штамма *B. anthracis* и *B. cereus*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». Кроме того, проанализированы 146 геномов *B. anthracis* и *B. cereus* из базы данных GenBank.

canSNP-типирование

CanSNP-типирование – первый этап генотипирования штамма сибиреязвенного микроба. Суть метода заключается в определении аллельного состояния 14 диагности-

чески-значимых канонических SNP (canSNP) и отнесении штамма к одной из трех эволюционных линий (А, В и С) и одной из 14 canSNP-групп (Keim *et al.*, 2004). Для определения принадлежности 98 штаммов *B. anthracis* к canSNP-группам и эволюционным линиям использованы данные полногеномного секвенирования. В результате среди исследуемой выборки обнаружены все три эволюционные линии и 14 canSNP-групп. Большая часть штаммов отнесена к линии А и canSNP-группе А.Br.008/009, 13 штаммов – к линии В и два штамма к линии С.

MLVA-генотипирование

MLVA является высокоразрешающим методом генотипирования и используется после определения canSNP-группы штамма *B. anthracis*. Суть метода заключается в подсчете числа tandemных повторов в нескольких VNTR-локусах путем их ПЦР-амплификации, определения длин амплифицированных фрагментов и получения MLVA-профиля штамма (Keim *et al.*, 2000).

В работе проведено MLVA-типирование для 39 вирулентных и 19 аттенуированных штаммов *B. anthracis*, и одного штамма *B. cereus* bv. *anthracoid*. Были использованы 17 VNTR-локусов, локализованных на хромосоме (*vrrA*, *bams03*, *bams05*, *bams22*, *bams34*, *bams44*, *VNTR23*, *vrrC2*, *bams01*, *bams21*, *bams23*, *bams24*, *bams25*, *bams28*, *bams51*, *vrrB1*, *vrrB2*) по двум схемам: MLVA7 и MLVA17.

Схема MLVA7 показала высокую разрешающую способность ($D=0,9439$: $[0,9195 \div 0,9682]$), несмотря на использование всего семи VNTR-локусов (*vrrA*, *bams03*, *bams05*, *bams22*, *bams34*, *bams44* и *VNTR23*). По результатам MLVA7 выборка разделилась на 25 MLVA7-GT, а 13 штаммов из 59 имеют индивидуальные MLVA7-GT. Для более высокого разрешения MLVA7 была дополнена десятью VNTR-локусами (MLVA17). При использовании 17 локусов в выборке выявлено 35 MLVA17-GT, а 22 штамма имели индивидуальный MLVA17-GT. При этом индекс биоразнообразия Симпсона составил $D=0,9649$ $[0,9413 \div 0,9885]$. Схема MLVA7 показала разрешающую способность, сравнимую с MLVA17, и близкие филогенетические результаты, и рекомендуется как метод генетического анализа первой линии (Thierry *et al.*, 2014).

В большинстве случаев разделение выборки на клональные комплексы по результатам MLVA7 и MLVA17 соответствует разделению на эволюционные линии и canSNP-группы в рамках этих линий. Согласно MLVA7, выборка разделяется на два клональных комплекса, в один из которых входят четыре MLVA7-GT (штаммы эволюционной линии В). По результатам MLVA17 также выделено два клональных комплекса, в один из которых вошли штаммы линии В, а в другой – все остальные штаммы выборки.

MLST-генотипирование

MLST – метод генотипирования штаммов группы *B. cereus*, основанный на определении нуклеотидных последовательностей локусов нескольких генов «домашнего хозяйства». Выявленным аллелям локусов присваивают номера, а на основе комбинации аллелей определяют ST штамма. Это позволяет определить его вид и выявить филогенетическое положение в пределах группы *B. cereus*.

В работе проведено MLST-генотипирование выборки из 98 штаммов *B. anthracis* и 4 штаммов *B. cereus* по схеме MLST, предложенной в работе (Priest *et al.*, 2004). В результате среди штаммов из «ГКПМ-Оболенск» обнаружены два ранее описанных ST: ST1 и ST3. Среди штаммов *B. anthracis*, геномы которых депонированы в GenBank, обнаружено четыре ST (ST1, ST2, ST3, ST933), а среди штаммов *B. cereus* – три ST (ST11, ST78, ST935). Штаммы ST1 и ST2 принадлежат эволюционной линии А,

штаммы ST3 – линии В, а штаммы ST933 – линии С. Мы впервые показали, что разделение выборки на MLST-ST соответствуют разделению на эволюционные линии А, В и С, и позволяет дифференцировать штаммы *B. anthracis* от *B. cereus*.

Аллельный полиморфизм генов факторов патогенности *B. anthracis*, расположенных на плазмиде рХО1

В данном разделе мы описали аллельный полиморфизм генов синтеза протективного антигена, отечного и летального факторов, и регулятора их экспрессии AtxA, локализованных на плазмиде рХО1. Была использована выборка из 96 штаммов *B. anthracis*, а также 2 штаммов *B. cereus* и 1 *B. cereus* bv. *anthracis*, обладающих рХО1-подобной плазмидой.

В исследованной выборке выявлено 11 аллелей (ST) гена *pagA* ($D = 0,7677 [0,7215 \div 0,8138]$), 9 ST гена *lef* ($D = 0,6206 [0,5279 \div 0,7133]$), 10 ST гена *суа* ($D = 0,657 [0,567 \div 0,747]$), и 2 ST гена *atxA* ($D = 0,0592 [-0,0059 \div 0,1242]$). Все ST отличаются только однонуклеотидными заменами. Для оценки фенотипического проявления выявленного нуклеотидного полиморфизма проведена трансляция *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные. В результате обнаружено 8 изоформ белка PA, 9 изоформ LF, 7 изоформ EF и 2 изоформы AtxA.

Штаммы распределены по 20 генотипам (GT) ($D = 0,9038 [0,8793 \div 0,9284]$), каждый из которых включает комбинацию ST генов *pagA*, *lef*, *суа* и *atxA*. Так как эти GT включают гены факторов патогенности, локализованные на плазмиде рХО1, они обозначены как MVLST_{рХО1}-GT, а схема генотипирования названа MVLST_{рХО1} (Goncharova *et al.*, 2021).

По результатам данного раздела в базу данных GenBank депонировано 50 нуклеотидных последовательностей генов исследуемой выборки штаммов *B. anthracis* из «ГКПМ-Оболенск».

Корреляция MVLST_{рХО1}-генотипа с canSNP-группой штамма *B. anthracis*

Разделение выборки штаммов на MVLST_{рХО1}-GT в целом повторяет ее разделение на canSNP-группы. Однако в ряде случаев некоторые GT объединяли штаммы нескольких canSNP-групп, а штаммы одной canSNP-группы распределялись по нескольким GT. Филогенетические отношения MVLST_{рХО1}-GT с указанием их принадлежности к эволюционным линиям и canSNP-группам проиллюстрированы рисунком 1.

Как видно на этом рисунке, MVLST_{рХО1}-GT формируют кластеры, относящиеся к разным эволюционным линиям – А, В, С. При этом кластер штаммов линии А формирует два подкластера.

Дендрограмма, построенная с помощью goeBURST-алгоритма, приведена на рисунке 2. На этом рисунке видно, что GT2 связан с девятью генотипами. GT2 отличается от GT1, использованного в качестве референсного (так как в него входит референсный штамм Ames Ancestor), тремя SNP: *pagA* 195С→Т, *pagA* 1799С→Т, *суа* 600С→Т. Все три SNP характерны для большинства исследованных штаммов в разном сочетании и одновременно обнаруживаются у 60 штаммов. Но у 42 штаммов присутствуют дополнительные SNP, благодаря наличию которых формируются другие GT. Поэтому именно GT2 можно считать «основным» GT, вероятно, в наибольшей степени связанным как минимум с предковым GT эволюционной линии А.

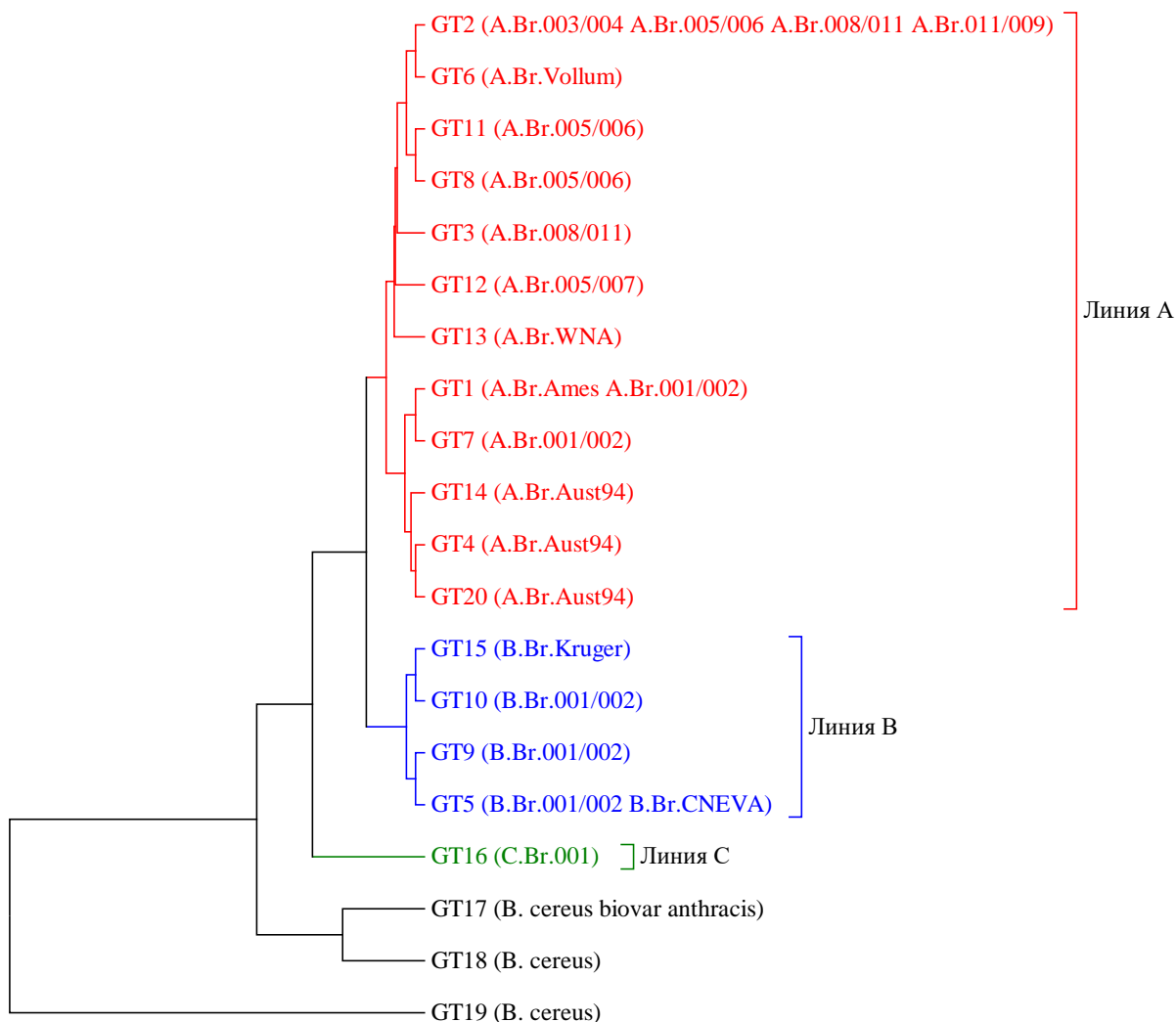


Рисунок 1 – UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая филогенетические отношения MVLST_{рх01}-генотипов. Красным цветом выделены генотипы, включающие штаммы линии А, синим – генотипы штаммов линии В, зеленым – линии С. В скобках указаны canSNP-группы, входящие в данный генотип, или видовая принадлежность неантрацидных штаммов

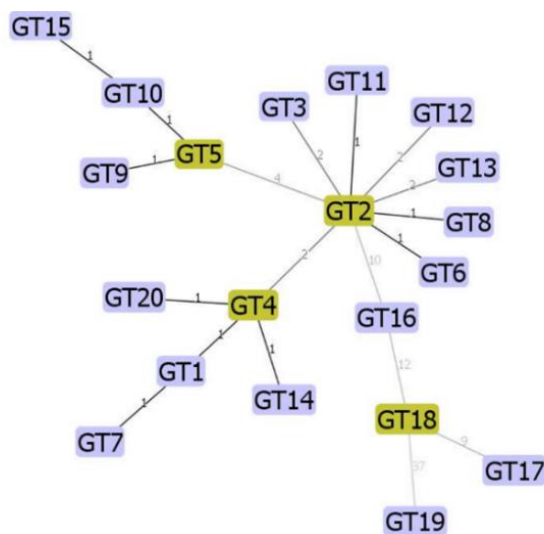


Рисунок 2 – Эволюционные отношения MVLST_{рх01}-генотипов, реконструированные с помощью goeBURST-алгоритма. Числами обозначена генетическая дистанция между отдельными генотипами (увеличивается по мере увеличения числа)

На рисунке 2 также видно, что выявленные GT образуют четыре клональных комплекса, два из которых объединяют генотипы линии А. Наиболее многочисленный комплекс штаммов линии А представлен сцепленными с GT2 генотипами GT3, GT6, GT8, GT11, GT12, GT13. Второй комплекс линии А образует GT4, с которым связаны GT14, GT20, а также GT1, связанный с GT7. В третий комплекс входят генотипы линии В – центральным GT этого кластера является GT5, объединяющий арктические штаммы группы В.Br.001/002 со штаммами группы В.Br.CNEVA. Четвертый комплекс образован штаммами *B. anthracis* линии С и *B. cereus*.

Эволюционная и филогеографическая значимость данных MVLST_{рх01}-генотипирования

Стоит подробнее остановиться на возможной связи MVLST_{рх01}-GT и формирующих его SNP с географической локализацией штамма, и оценить роль некоторых SNP в реконструкции эволюции сибирезвенного микроба.

Первое, на что мы обратили внимание – это MVLST_{рх01}-GT3 и характерная для него SNP *pagA* 981A→Т. Эта SNP обнаружена у 17 из 27 штаммов группы А.Br.008/011, выделенных на территории бывшего СССР, но не обнаружена ни в одном геноме, депонированном в GenBank. Поэтому, наши результаты дополняют данные Eremenko *et al.* (2019) и Okinaka *et al.* (2008) и указывают на то, что SNP *pagA* 981A→Т – маркер многочисленной подгруппы штаммов, входящей в А.Br.008/011. Эта подгруппа распространена на территории Средней Азии, Кавказа, причерноморских и прикаспийских степей, европейской части России и восточного Заполярья (Якутия). При этом наиболее вероятная генетическая датировка штаммов, выделенных в Якутии – XIII-XVII вв. (Timofeev *et al.*, 2019). Здесь мы можем предположить, что подгруппа А.Br.008/011 *pagA* 981A→Т (MVLST_{рх01}-GT3) включает не менее половины штаммов группы А.Br.008/011, циркулирующих на территории бывшего СССР. Ареал их распространения совпадает с территорией Монгольской империи и постмонгольских государств, зоны их политического влияния (Новгородская область) и территории, подвергшиеся монгольским походам (Венгрия и Словакия). Характерной чертой монгольских и постмонгольских государств являлось использование многочисленных контингентов конницы, численность которых могла достигать десятков тысяч человек, верховых лошадей и обозных животных, действующих на расстоянии в тысячи километров в течение одной военной кампании. Это создавало идеальные условия для быстрого распространения на огромные территории инфекционных заболеваний, поражающих домашний скот, каковым и является сибирская язва. Ранее мы высказывали гипотезу о значительной роли монгольского нашествия на запад в распространении сибирской язвы в Евразии (Timofeev *et al.*, 2019). Описанный здесь географический ареал распространения штаммов подгруппы А.Br.008/011 *pagA* 981A→Т дополнительно свидетельствует в пользу этой гипотезы (Goncharova *et al.*, 2021).

MVLST_{рх01}-GT14 (группа А.Br.Aust94) выделяется благодаря наличию SNP *pagA* 1803Т→С. Этот GT включает штамм Ohio ACB – единственный штамм группы А.Br.Aust94, выделенный в США, а не в Старом Свете. При дополнительном анализе геномов штаммов А.Br.Aust94, выделенных в США, SNP *pagA* 1803Т→С обнаружилась только у двух штаммов. Поэтому можно предположить, что эта SNP встречается у подгруппы штаммов А.Br.Aust94, циркулирующих в США (Goncharova *et al.*, 2021).

SNP *суа* 2178С→Т обнаружена у пяти штаммов А.Br.Aust94 подгруппы Kafkas-Geo 2, выделенных на территории Грузии и Турции и формирующих MVLST_{рх01}-GT20 (Sahin *et al.*, 2018). Причем у штаммов подгрупп Kafkas-Geo 1 и Kafkas-Geo 3

(MVLST_{рХО1}-GT4) из данного региона эта мутация не обнаружена. Можно предположить, что эта SNP является маркером штаммов canSNP-подгруппы Kafkas-Geo 2 группы A.Br.Aust94, выделенных на указанных территориях (Goncharova *et al.*, 2021).

Штаммы canSNP-группы A.Br.001/002 формируют два GT. Они входят в MVLST_{рХО1}-GT1 вместе со штаммами группы A.Br.Ames. Штаммы группы A.Br.001/002 MVLST_{рХО1}-GT1 выделены в России, Китае, Казахстане и Германии. Связанный с MVLST_{рХО1}-GT1 MVLST_{рХО1}-GT7 отличается наличием SNP *lef* 895G→T (он включает 5 из 12 штаммов A.Br.001/002). Штаммы, обладающие этой SNP, выделены в Новом Свете (США, Бразилия, Ямайка), и один из них выделен в Бангладеш. Чтобы проверить специфичность SNP *lef* 895G→T для штаммов группы A.Br.001/002 американского происхождения, мы проанализировали 42 дополнительных генома *B. anthracis* этой группы (три штамма американского происхождения, 28 – европейского и 11 – азиатского). В результате искомая SNP обнаружена у всех трех американских штаммов, а также у 23 европейских и 8 азиатских штаммов. Таким образом, SNP *lef* 895G→T характерна для большинства штаммов группы A.Br.001/002, вне зависимости от их географического происхождения. Штаммы A.Br.001/002, не имеющие SNP *lef* 895G→T, входят в MVLST_{рХО1}-GT1 вместе со штаммами группы A.Br.Ames, следовательно, более им родственны. Учитывая, что группа A.Br.Ames произошла от группы A.Br.001/002 (Simonson *et al.*, 2009), можно предположить, что MVLST_{рХО1}-GT1-подгруппа A.Br.001/002 представляет «переходное звено», которое приобрело плазмидные маркеры, характерные для A.Br.Ames, но у которого еще не возникли характерные для этой группы хромосомные canSNP (Goncharova *et al.*, 2021).

Наиболее интересны с филогенетической точки зрения штаммы линии В. В MVLST_{рХО1}-GT5 объединились штаммы группы V.Br.CNEVA и два штамма V.Br.001/002. Остальные штаммы линии В формируют MVLST_{рХО1}-GT9 (найжены в Сибири, Прибалтике и Корее), который отличается от MVLST_{рХО1}-GT5 дополнительной SNP *pagA* 1297A→G, а также MVLST_{рХО1}-GT10, куда входят два штамма из Швеции и ЮАР благодаря отсутствию SNP *pagA* 1799C→T. SNP *pagA* 1799C→T также отсутствует у штамма Kruger В (MVLST_{рХО1}-GT15), но у него обнаруживается SNP *pagA* 1765C→A.

Оба штамма V.Br.001/002 MVLST_{рХО1}-GT5 выделены в Арктике: Yamal_2 выделен во время вспышки сибирской язвы среди оленей на Ямале в 2016 г., произошедшей из-за оттаивания законсервированного в мерзлоте почвенного очага сибирской язвы, а LP53/5YA извлечен из вечной мерзлоты при палеонтологических раскопках в Якутии. Приблизительная генетическая датировка относит время консервации штаммов в мерзлоте к периоду XIII-XVII вв. (Timofeev *et al.* 2019). Эта датировка вместе с фактом выделения в арктическом регионе из вечной мерзлоты косвенно указывает на то, что их возраст, вероятно, больше, чем у других штаммов группы V.Br.001/002. В таком случае в MVLST_{рХО1}-GT5 попадают вместе с группой V.Br.CNEVA именно архаичные штаммы группы V.Br.001/002, наиболее генетически близкие с последним общим предком этих групп. Поэтому этот GT, вероятно, сформировался до эволюционного расхождения этих групп. По всей видимости, мы можем говорить о заносе общего предка V.Br.CNEVA и подгруппы V.Br.001/002 в Центральную Европу из северной Азии, или наоборот, либо о практически одновременном заносе общего предка из неизвестного третьего региона. В любом случае, интересен факт филогенетической близости штаммов, циркулирующих в Центральной Европе, со штаммами, выделенными в Арктике, которая удалена от Европы и не связана путями миграции животных и торговыми связями (Goncharova *et al.*, 2021). Однако ареал распространения подгруппы MVLST_{рХО1}-

GT5 В.Вr.001/002 не ограничивается Арктическим регионом, т.к. недавно два штамма этой подгруппы были обнаружены в северном Казахстане (Shevtsov *et al.* 2021).

Важно подчеркнуть, что именно штаммы линии В сохранили наибольшее число «архаичных» маркеров, общих с другими, эволюционно отделенными группами штаммов, в том числе *B. cereus*. Так, SNP *lef* 2126A→G встречается у всех штаммов линии В и у MVLST_{pXO1}-GT3 (группа штаммов А.Вr.008/011, обладающая SNP *pagA* 981A→Т). SNP *суа* 953Т→С выявлена у всех штаммов линии В, штамма линии С и у *B. cereus*. Отсутствие SNP *pagA* 1799С→Т объединяет штаммы линии В (MVLST_{pXO1}-GT10 и MVLST_{pXO1}-GT14) со штаммами линии А *can*SNP-групп А.Вr.001/002, А.Вr.Aust94 и А.Вr.Ames (MVLST_{pXO1}-GT1, MVLST_{pXO1}-GT4, MVLST_{pXO1}-GT7) (Goncharova *et al.*, 2021).

Также выявлено, что четыре вакцинных штамма *B. anthracis* (A16R, Sterne, V770-NP-1R и STI-1), полученные независимо в различных частях света, сохранившие плазмиду pXO1, но утратившие pXO2, не приобрели особенностей последовательности генов токсинообразования, отличающих их от вирулентных штаммов. Поэтому, если аттенуирование *B. anthracis* обусловлено изменениями генома, помимо утери плазмиды капсулообразования (Cohen-Gihon *et al.* 2014), то они во всех четырех случаях не затрагивают гены синтеза токсина.

Аллельный полиморфизм генов факторов патогенности *B. anthracis*, расположенных на плазмиде pXO2

В данном разделе мы описали аллельный полиморфизм *capBCADE*-оперона (гены *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*), кодирующего белки биосинтеза капсулы *B. anthracis* и генов *асрА* и *асрВ*, кодирующих регуляторы экспрессии этого оперона. Все перечисленные гены локализованы на плазмиде pXO2. Данная схема генотипирования была названа MVLST_{pXO2}. Исследуемая выборка состояла из 88 штаммов *B. anthracis* и 2 штаммов *B. cereus*, содержащих pXO2-подобные плазмиды.

В выборке выявлено 9 ST гена *capD* ($D = 0,3076 [0,1713 \div 0,4439]$), по 5 ST генов *capA* ($D = 0,2143 [0,0956 \div 0,333]$) и *асрВ* ($D = 0,1497 [0,0402 \div 0,2592]$), 4 ST генов *capC* ($D = 0,1722 [0,0582 \div 0,2863]$) и *асрА* ($D = 0,31 [0,1895 \div 0,4304]$), 3 ST гена *capB* ($D = 0,0516 [-0,0181 \div 0,1213]$), 2 ST гена *capE* ($D = 0,026 [-0,0243 \div 0,0762]$). При этом все ST отличаются между собой нуклеотидными заменами либо инсерцией, в случае с геном *асрА*. ST отдельных генов встречались в исследованной выборке в 16 комбинациях, обозначаемых как MVLST_{pXO2}-GT (Goncharova *et al.*, 2022).

В результате трансляции *in silico* выявлено 6 изоформ белка CapD, по 4 изоформы AspA и AspB, по 3 изоформы CapB и CapA, и по 2 изоформы CapC и CapE.

Корреляция MVLST_{pXO2}-генотипа с *can*SNP-группой штамма *B. anthracis*

Схема MVLST_{pXO2} обладает меньшей разрешающей способностью ($D=0,5895 [0,4579 \div 0,7212]$), чем MVLST_{pXO1} ($D=0,9038 [0,8793 \div 0,9284]$). Филогенетические отношения MVLST_{pXO2}-GT с указанием принадлежности их к эволюционным линиям проиллюстрированы рисунком 3. Анализ кластеризации исследуемой выборки на основе MVLST_{pXO2}-GT показывает, что схема MVLST_{pXO2} в отличие от MVLST_{pXO1}, не позволяет четко разделить выборку в соответствии с принадлежностью штаммов к *can*SNP-группе. Однако MVLST_{pXO2}-профили коррелируют с видовой принадлежностью и принадлежностью к эволюционным линиям в рамках вида *B. anthracis* (Гончарова с соавт., 2022).



Рисунок 3 – UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая филогенетические отношения MVLST_{pXO2}-генотипов. Красным цветом выделены генотипы, включающие штаммы линии А, синим – генотипы, включающие штаммы линии В, зеленым – линии С.

ГоeBURST-анализ данных MVLST_{pXO2}-генотипирования приведен на рисунке 4.

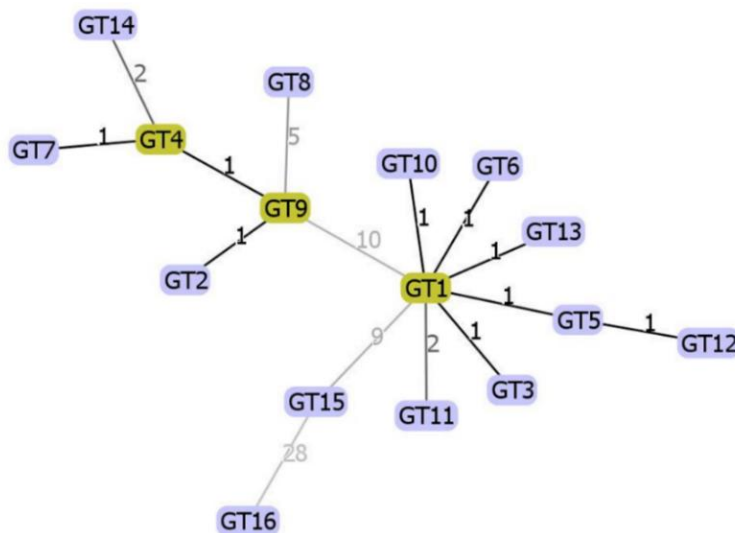


Рисунок 4 – Филогенетические отношения MVLST_{pXO2}-генотипов, реконструированные с помощью гоeBURST-алгоритма. Цифрами обозначена генетическая дистанция между отдельными генотипами, сцепленными между собой

MVLST_{pXO2}-GT1 является центральным в исследованной выборке. Это наиболее распространенный GT линии А, встречающийся среди штаммов практически всех canSNP-групп. Большинство других GT линии А отличаются от GT1 одной SNP и содержат один или небольшие подгруппы штаммов одной canSNP-группы.

Генотипы линии В связаны с MVLST_{pXO2}-GT1 через MVLST_{pXO2}-GT9, который является центральным для линии В. С MVLST_{pXO2}-GT9 связан MVLST_{pXO2}-GT8 (линия С). Все эти GT обладают маркерами SNP *acrA* 853G→А и INS *acrA* 1337-АТА-ТАGАТА-1345 (Еременко с соавт., 2019). Центральный MVLST_{pXO2}-GT9 представлен единственным штаммом группы В.Br.CNEVA из коллекции «ГКПИМ-Оболенск» (штамм 44). Остальные штаммы В.Br.CNEVA отличаются от штамма 44 дополнительной SNP *capD* 234Т→С и формируют MVLST_{pXO2}-GT2. Штаммы группы В.Br.001/002 вместо этой SNP обладают SNP *capA* 1033А→G. Только SNP *capA* 1033А→G обладает MVLST_{pXO2}-GT4 (штаммы, выделенные в Арктике, Сибири и Корее). Два других GT линии В приобрели либо SNP *capD* 1320Т→С (MVLST_{pXO2}-GT7, два штамма из ЮАР и Швеции) либо две SNP *capD* 1120Т→G и *capD* 1183А→G (MVLST_{pXO2}-GT14, штамм из Эстонии).

Наиболее интересный момент касается центрального для линии В MVLST_{pXO2}-GT9. Если рассмотреть филогенетическое дерево, построенное по слитым последовательностям обоих наборов генов MVLST_{pXO1} и MVLST_{pXO2}, то центральным генотипом линии В оказывается штамм 44, принадлежащий группе В.Br.CNEVA. Именно от него дихотомически расходятся два GT, один из которых объединяет остальные штаммы группы В.Br.CNEVA (17OD930, BF1, RA3, Tyrol 4675), а второй представлен арктическими штаммами группы В.Br.001/002 (LP53/5YA, Yamal_2) (рисунок 5).

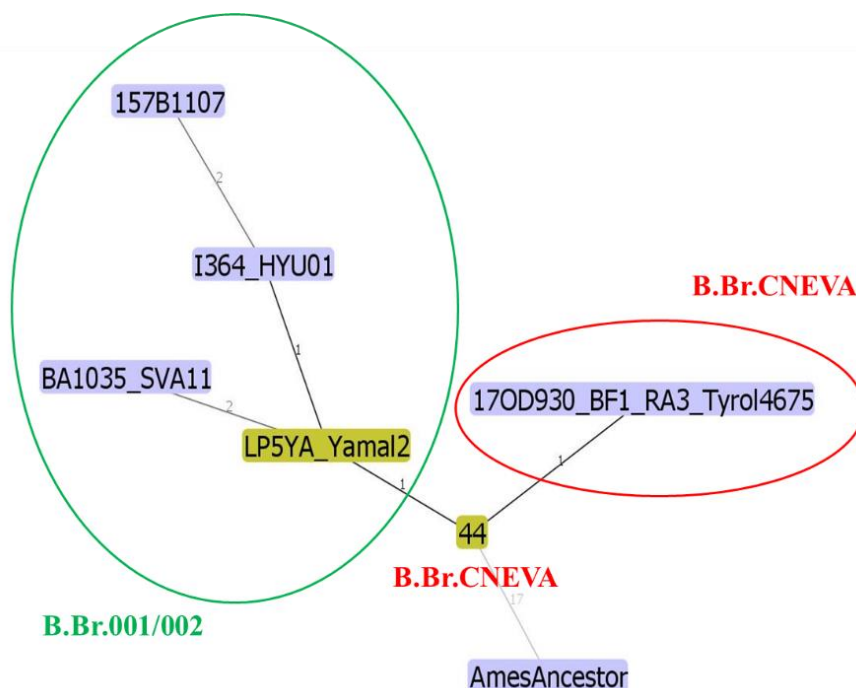


Рисунок 5 – Филогенетические отношения генотипов линии В, полученных путем слияния последовательностей наборов генов MVLST_{pXO1} и MVLST_{pXO2}, реконструированные с помощью goeBURST-алгоритма. Цифрами обозначена генетическая дистанция между отдельными генотипами, сцепленными между собой

К сожалению, информация о месте выделения штамма 44 не сохранилась, но его присутствие в нашей коллекции с определенной вероятностью означает, что он был

выделен на территории СССР. Это дает некие основания утверждать, что именно в северной Евразии происходило эволюционное разделение линии В на группы В.Br.CNEVA и В.Br.001/002, а арктический GT (LP53/5YA, Yamal_2) представляет «промежуточную форму» между линиями В.Br.CNEVA и В.Br.001/002.

В MVLST_{pXO2}-GT3 вошли 7 штаммов группы А.Br.Aust94, благодаря наличию синонимичной SNP *capC* 351A→G. Все эти штаммы были выделены в Кавказском регионе – Дагестане, Чеченской республике, Грузии, Азербайджане и северо-восточной части Турции. Однако данный маркер отсутствует у нескольких штаммов группы А.Br.Aust94, выделенных в том же регионе – Кабардино-Балкарии, Турции и Грузии. При дополнительной проверке специфичности SNP *capC* 351A→G для «кавказских» штаммов группы А.Br.Aust94 в геномах 23 штаммов этой группы, выделенных в различных регионах за пределами Кавказа, искомым SNP обнаружить не удалось. Учитывая совокупность полученных результатов, можно предположить, что подгруппа А.Br.Aust94 *capC* 351A→G сформировалась именно на территории Кавказа, где и циркулирует совместно с «родительской» формой. Поэтому SNP *capC* 351A→G может быть использована как маркер, свидетельствующий о регионе происхождения штамма.

Дополнительный анализ с использованием goeBURST-алгоритма, проведенный для слитых последовательностей наборов генов MVLST_{pXO1} и MVLST_{pXO2}, показал, что штаммы 1183, A3716, Kanchipuram, Kafkas-100, Kafkas-149 и Kafkas-215 представляют центральный генотип для canSNP-группы А.Br.Aust94 и наиболее близко находятся к общему предку генотипов этой группы (рисунок 6). Другие генотипы этой canSNP-группы приобрели следующие мутации: штамм OhioACB отличается наличием мутации *pagA* 1803T→C (MVLST_{pXO1}-GT14, MVLST_{pXO2}-GT1), штаммы MVLST_{pXO1}-GT4 и MVLST_{pXO2}-GT3 приобрели SNP *capC* 351A→G, а штаммы MVLST_{pXO1}-GT20 и MVLST_{pXO2}-GT1 приобрели дополнительную SNP *суа* 2178C→Т.

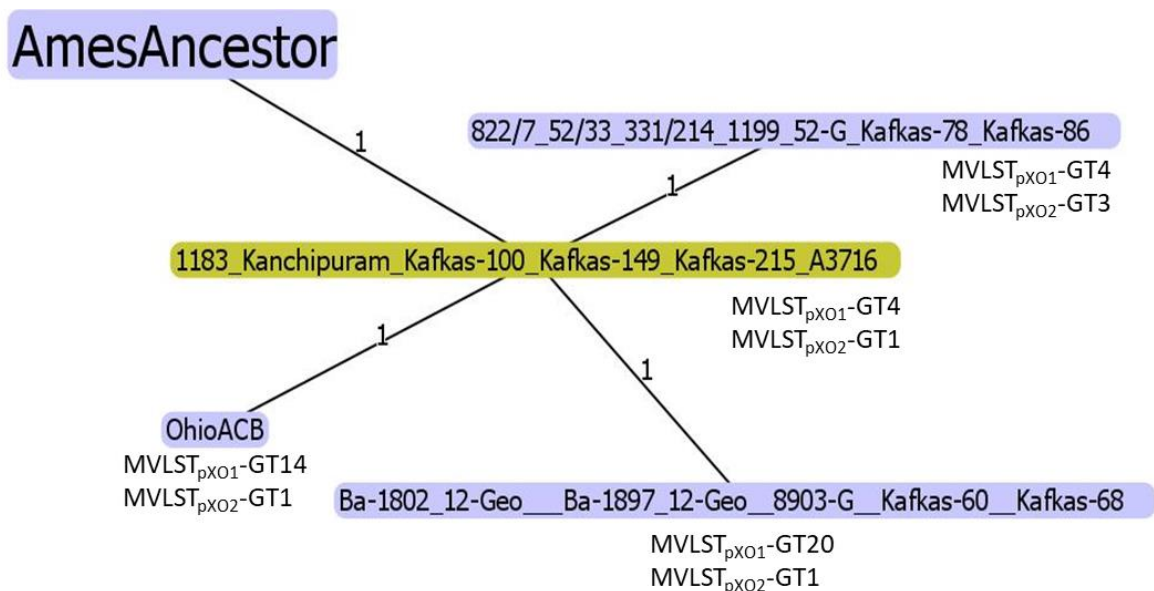


Рисунок 6 – Филогенетические отношения штаммов canSNP-группы А.Br.Aust94, полученных путем слияния последовательностей наборов генов MVLST_{pXO1} и MVLST_{pXO2}, реконструированные с помощью goeBURST-алгоритма. Цифрами обозначена генетическая дистанция между отдельными генотипами, сцепленными между собой

CanSNP-группа A.Br.Vollum в исследованной выборке разделилась на три генотипа. Два штамма, выделенных в Средней Азии, принадлежат MVLST_{pXO2}-GT1. Три американских штамма отличаются от MVLST_{pXO2}-GT1 наличием SNP *acpB* 1381A→G (461I→V) и принадлежат MVLST_{pXO2}-GT5. У MVLST_{pXO2}-GT12, куда входит один американский штамм, обнаруживаются SNP *acpB* 1381A→G (461I→V) и *acpB* 563C→T (188S→L). При дополнительном поиске этих SNP мы обнаружили 9 штаммов группы A.Br.Vollum различного географического происхождения, принадлежащих MVLST_{pXO2}-GT1 (n=4) и MVLST_{pXO2}-GT (n=8).

Создание панели олигонуклеотидов для детекции филогеографически-значимых мутаций в геноме возбудителя сибирской язвы

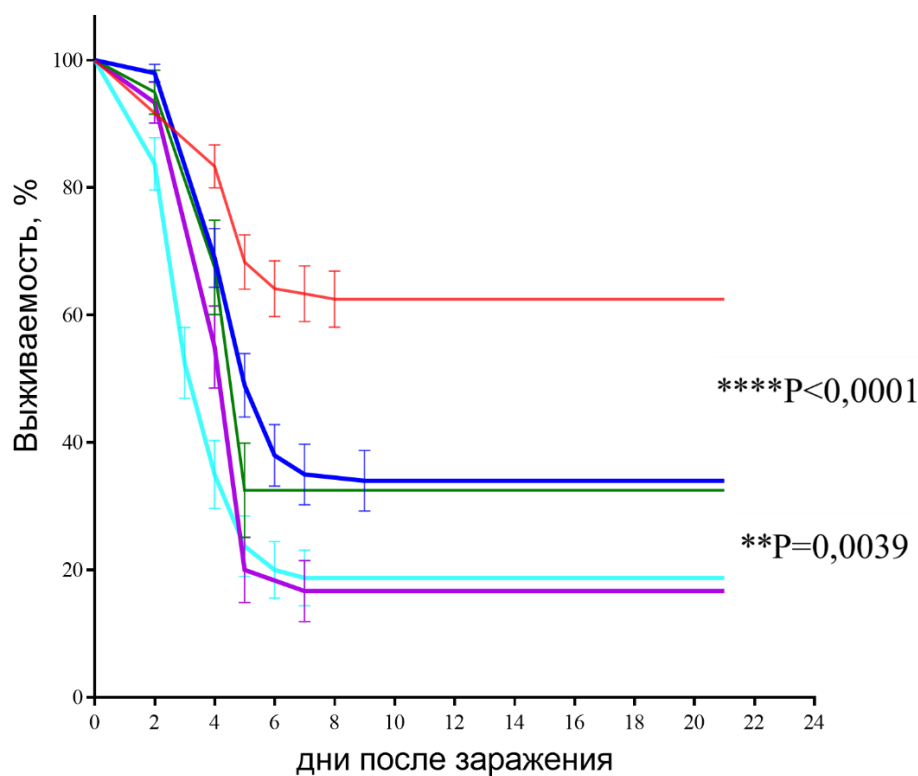
При проведении эпидрасследования, выявление в геноме штамма мутаций, характерных для разных MVLST-GT, может указывать на вероятный ареал его происхождения. Нами сконструирован набор праймеров для детекции филогеографически-значимых мутаций в генах факторов патогенности *B. anthracis* методом AS-ПЦР (Birdsell *et al.*, 2012). Ряд праймеров испытан на панели из 10 штаммов *B. anthracis*, для которых осуществлено MVLST. Полученный набор праймеров после проведения canSNP- и MLVA-генотипирования позволяет определить принадлежность штаммов *B. anthracis* к эволюционным линиям А, В и С, а также филогенетическим группам штаммов: canSNP-группы A.Br.008/011, выделенных на территории бывшего СССР, и A.Br.Aust94, выделенных на территории Кавказа.

Поиск связи принадлежности штамма *B. anthracis* к определенной филогенетической группе с его вирулентностью

Согласно паспортным данным штаммов *B. anthracis* из рабочей коллекции, среди них присутствовало несколько штаммов со значительно сниженной вирулентностью. Если для остальных штаммов значение LD₅₀ для беспородных мышей составляет 10¹, то для слабовирулентных – 10²-10⁷ КОЕ/мышь при внутрибрюшинном заражении. Это натолкнуло нас на мысль выявить аллели генов факторов патогенности, приводящие к снижению вирулентности. Но в ходе работы мы выявили, что причинами снижения вирулентности являлись: 1) Утеря плазмид вирулентности всеми клетками штамма или его частью. 2) Загрязнение культуры бесплазмидными штаммами, такими, как вакцинный штамм STI-1, лишенный плазмиды pXO2, и слабовирулентный для лабораторных животных. 3) Снижение жизнеспособности спор *B. anthracis*, используемых для заражения животных, при хранении. Анимализация таких штаммов приводила к восстановлению вирулентности.

Но тем не менее, мы попытались выявить менее выраженные отличия штаммов, обладающих разным MVLST-GT и относящихся к разным canSNP-группам, по вирулентности для лабораторных животных. Учитывая, что именно токсин опосредует основное воздействие на организм хозяина, мы исследовали штаммы, отличающиеся именно MVLST_{pXO1}-GT. Были использованы две биологические модели.

В первом эксперименте определена вирулентность для беспородных мышей 20 штаммов, относящихся к пяти MVLST_{pXO1}-GT. Заражение проводили дозами 100 и 1000 спор/животное подкожно (n=400, по 20 мышей на штамм). Кривые выживаемости приведены на рисунке 7.



- MVLST_{pXO1}-GT2 – A.Br.008/011
- MVLST_{pXO1}-GT3 – A.Br.008/011
- MVLST_{pXO1}-GT5 – B.Br.001/002, B.Br.CNEVA
- MVLST_{pXO1}-GT9 – B.Br.001/002
- MVLST_{pXO1}-GT4 – A.Br.Aust94

Рисунок 7 – Кривые выживаемости белых мышей после заражения штаммами *B. anthracis*, принадлежащих разным MVLST_{pXO1}-генотипам и canSNP-группам, построенные с помощью GraphPad Prism 7. Отмечены средние значения с верхним и нижним пределами

Как видно из приведенного рисунка, штаммы, принадлежащие MVLST_{pXO1}-GT3, достоверно менее вирулентны для мышей по сравнению с остальными GT. А штаммы MVLST_{pXO1}-GT4 (A.Br.Aust94) и MVLST_{pXO1}-GT5 (B.Br.001/002 и B.Br.CNEVA) более вирулентны для мышей по сравнению с MVLST_{pXO1}-GT2 и MVLST_{pXO1}-GT9 ($P \leq 0.0001$ и $P = 0,0039$, соответственно).

Во втором эксперименте исследована вирулентность штаммов, обладающих разными MVLST_{pXO1}-GT, для морских свинок. Ранее были опубликованы данные, согласно которым различие штаммов *B. anthracis* по вирулентности для морских свинок можно определить лишь по способности этих штаммов преодолевать поствакцинальный иммунитет (Gierczyński *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2016). Поэтому мы предварительно вакцинировали морских свинок ($n=60$) препаратом рекомбинантного протективного антигена PA63 в дозе 100 мкг белка/свинку, подкожно, двукратно, с интервалом 21 сутки. На 28 сутки после иммунизации животных (по 30 в группе) заразили штаммами *B. anthracis* LP51/4YA (A.Br.008/011, MVLST_{pXO1}-GT2) и LP53/5YA (B.Br.001/002, MVLST_{pXO1}-GT5) дозой $2,5 \times 10^3$ спор/животное. Кривые выживаемости приведены на рисунке 8.

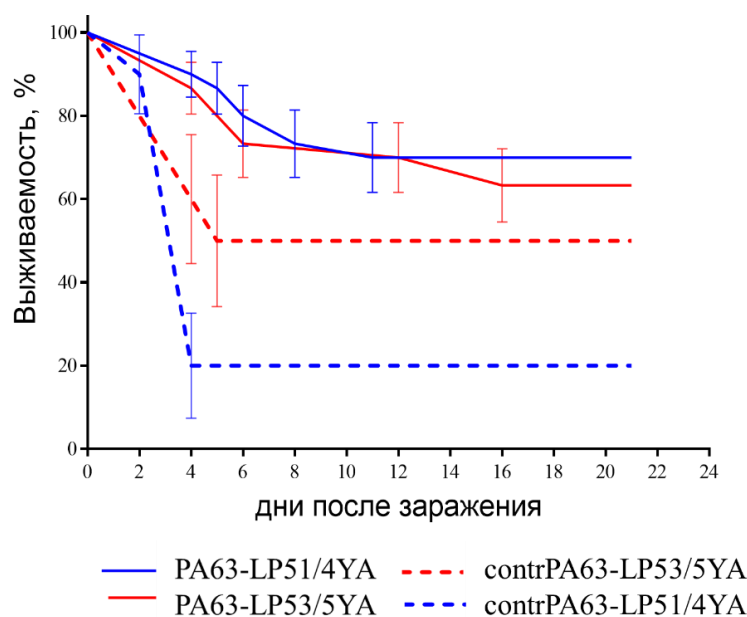


Рисунок 8 – Выживаемость морских свинок, иммунизированных белком PA63, после заражения штаммами *B. anthracis* LP51/4YA и LP53/5YA

Анализируя полученные данные, мы обнаружили, что достоверная разница между вакцинированными и интактными животными (30 и 80 % гибели, соответственно) наблюдается у морских свинок, зараженных штаммом LP51/4YA, но не штаммом LP53/5YA (37 и 50 % гибели, соответственно). Несмотря на то, что интактные морские свинки были более устойчивы к LP53/5YA по сравнению с LP51/4YA, иммунизированные животные были защищены препаратом PA63 одинаково как при заражении штаммом LP53/5YA, так и LP51/4YA – кривые выживаемости иммунных свинок, зараженных разными штаммами, практически совпадают. Это говорит о том, что проведенная иммунизация морских свинок в большей степени защищала их от заражения штаммом LP51/4YA и в меньшей степени – от LP53/5YA. Этот факт довольно интересен, если учесть то, что животные были вакцинированы белком PA63, последовательность которого совпадает с последовательностью этого белка у штамма LP51/4YA, но отличается от таковой у штамма LP53/5YA. Поэтому у нас есть основания предположить, что сходство или различие последовательности PA63 вакцинного препарата и заражающего штамма оказывает влияние на протективность, по крайней мере для морских свинок.

Таким образом, на двух биологических моделях мы показали, что различия последовательности основных факторов патогенности *B. anthracis* могут влиять на его вирулентные свойства. К сожалению, у нас нет оснований экстраполировать данные, полученные на мелких грызунах, на крупных копытных, являющихся основными хозяевами сибирской язвы в природе. Но в виду отсутствия возможности проведения экспериментов над копытными и даже соответствующих полевых наблюдений, полученные здесь данные могут послужить лучшему пониманию биологии сибиреязвенного микроба.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная схема MVLST-генотипирования показала в отношении выборки, состоящей из 99 геномов штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* высокую разрешающую способность (MVLST_{рх01} D=0,9038 [0,8793÷0,9284], MVLST_{рх02} D=0,5895 [0,4579÷0,7212]), и может быть использована для описания филогенетической структуры глобальной популяции *B. anthracis*.

2. MVLST_{рх01}-профиль штамма *B. anthracis* коррелирует с его принадлежностью к эволюционной линии и canSNP-группе. MVLST_{рх02}-профиль штамма *B. anthracis* коррелирует только с принадлежностью к эволюционной линии. Комбинирование MVLST- и canSNP- генотипирования позволяет выявить ряд генетических маркеров, указывающих на географическое происхождение штамма *B. anthracis*.

3. Штаммы *B. anthracis* подгруппы A.Br.008/011 *pagA* 981A→T превалируют на территории бывшего СССР, ареал их распространения подтверждает гипотезу об антропогенном переносе *B. anthracis* через Евразию при монгольских завоеваниях в XIII-XVII вв.

4. CanSNP-группа *B. anthracis* A.Br.Aust94 на территории Кавказа представлена тремя субпопуляциями, одна из которых обладает маркером *capC* 351A→G, а другая – маркером *суа* 2178C→T, характерным для canSNP-подгруппы Kafkas-Geo 2.

5. В рамках canSNP-группы *B. anthracis* A.Br.001/002 выявлена подгруппа, являющаяся переходным звеном к canSNP-группе A.Br.Ames.

6. Штаммы *B. anthracis* canSNP-группы B.Br.001/002, выделенные в Русской Арктике, близкородственны по MVLST-генотипу Центрально-Европейским изолятам группы B.Br.CNEVA.

7. Последовательности генов токсинообразования вакцинных бескапсульных штаммов *B. anthracis* A16R, Sterne, V770-NP-1R и STI-1 не имеют особенностей, отличающих их от полностью вирулентных штаммов.

8. Штаммы *B. anthracis* разных MVLST_{рх01}-генотипов статистически достоверно отличаются по вирулентности для мышей и морских свинок. Для мышей наиболее вирулентными являются штаммы MVLST_{рх01}-GT5 (B.Br.001/002 и B.Br.CNEVA) и MVLST_{рх01}-GT4 (A.Br.Aust94), наименее вирулентными – штаммы MVLST_{рх01}-GT3 (A.Br.008/011); для вакцинированных от сибирской язвы морских свинок иммунизация в большей степени защищает от заражения штаммом MVLST_{рх01}-GT2 (A.Br.008/011), чем от заражения штаммом MVLST_{рх01}-GT5 (B.Br.001/002).

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Полученные в ходе исследования результаты могут быть использованы для фундаментальных филогенетических исследований и филогеографии вида *B. anthracis*.

2. Данные последовательного canSNP- и MVLST-генотипирования штаммов *B. anthracis* могут быть использованы при проведении эпидемических расследований вспышек сибирской язвы, в случае выявления у исследуемого штамма описанных в работе генетических маркеров, указывающих на его филогеографическое происхождение.

3. При исследовании выделенного штамма возбудителя сибирской язвы рекомендуется проведение его MLVA-генотипирования по схеме MLVA7, как метода генетического анализа первой линии.

4. Перед определением вирулентности штамма *B. anthracis* рекомендуем провести его анимализацию, рассеять до единичных колоний и убедиться в том, что колонии идентичны по плазмидному составу и MLVA-профилю, это позволит исключить загрязнение посторонними штаммами и возможную гибель спор при длительном хранении.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) статьи в реферируемых научных журналах

1. **Гончарова, Ю.О.** Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов сибирезвенного микроба, выделенных на территории России и сопредельных государств / **Ю.О. Гончарова**, И.В. Бахтеева, Р.И. Миронова, А.Г. Богун, К.В. Хлопова, В.С. Тимофеев // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2021. – № 1. – С. 95-102. (SCOPUS SJR = 0.216).

2. Тимофеев, В.С. Пути распространения сибирской язвы в природных экосистемах / В.С. Тимофеев, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, **Ю.О. Гончарова**, И.А. Дятлов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2021. №3. – С. 23-32. (SCOPUS, SJR = 0.216).

3. **Goncharova, Y.** Sequence variability of pXO1-located pathogenicity genes of *Bacillus anthracis* natural strains of different geographic origin / **Y. Goncharova**, I. Bahtejeva, G. Titareva, T. Kravchenko, A. Lev, I. Dyatlov, V. Timofeev // Pathogens. – 2021. – Vol.10, N12. – P.1556. (WoS, IF = 4.531), цит.: 2.

4. **Гончарова, Ю.О.** Аллельный полиморфизм генов факторов патогенности возбудителя сибирской язвы как метод оценки микробиологических рисков при изменении климата / **Ю.О. Гончарова**, А.Г. Богун, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Р.И. Миронова, Т.Б. Кравченко, Н.А. Остарков, А.В. Брушков, В.С. Тимофеев, С.Г. Игнатов // Прикл. Биохим. Микробиол. – 2022. – Т.58. – № 4. – С. 1–13. (WoS, IF = 1.065).

б) статьи в других научных изданиях

1. **Гончарова, Ю.О.** Аллельный полиморфизм гена *lef* у штаммов возбудителя сибирской язвы из государственной коллекции патогенных микроорганизмов («ГКПМ-Оболенск») / **Ю.О. Гончарова**, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Р.И. Миронова, А.А. Кисличкина, Н.В. Майская, А.Н. Мокриевич, В.С. Тимофеев // Бактериология. – 2019. – Т. 4, № 2. – С. 7-12.

2. Бахтеева, И.В. Прототип мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации сибирезвенного микроба от близкородственных бацилл / И.В. Бахтеева, В.В. Каптелова, Г.М. Титарева, Т.Б. Кравченко, **Ю.О. Гончарова**, К.В. Хлопова, В.С. Тимофеев // Бактериология. – 2020. – Т. 5, № 3. – С.14-24.

в) тезисы докладов на научных конференциях

1. **Гончарова, Ю.О.** Исследование мутаций в генах факторов патогенности в геномах штаммов *Bacillus anthracis* / **Ю.О. Гончарова**, В.С. Тимофеев // Пробл. Мед. Микол. Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения), тезисы. – 2018. – Т. 20. № 2 – С.63.

2. **Гончарова, Ю.О.** Исследование аллельного полиморфизма генов факторов патогенности в геномах штаммов возбудителя сибирской язвы [Электронный ресурс] / **Ю.О. Гончарова** // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2018»; отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. – Москва: МАКС Пресс, 2018. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

3. **Гончарова, Ю.О.** Генотипирование вакцинных и аттенуированных штаммов возбудителя сибирской язвы, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ-Оболенск) методом MLVA [Электронный ресурс] / **Ю.О. Гончарова** // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020». Второе издание: переработанное и дополненное; отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. – Москва: МАКС Пресс, 2020. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

4. **Гончарова, Ю.О.** Полиморфизм генов оперона *capABCD* и генов регуляторных белков биосинтеза капсулы *acrA* и *acrV* у штаммов сибирезвенного микроба /

Ю.О. Гончарова, Т.Б. Кравченко, В.В. Евсеева, К.В. Хлопова, А.Г. Богун, В.С. Тимофеев // Материалы XIII ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням имени академика В. И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», IV Всероссийской научно практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных», VI Всероссийского симпозиума «Папилломавирусная инфекция и рак: эпидемиология, диагностика, вакцинопрофилактика». – Москва: Медицинское маркетинговое агентство, 2021. – С. 47–485.

5. **Гончарова, Ю.О.** MLVA-генотипирование как метод дифференцирования штаммов возбудителя сибирской язвы / **Ю.О. Гончарова**, Т.Б. Кравченко, В.В. Евсеева, В.С. Тимофеев // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XIV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, Москва, 28–30 марта 2022 года. – Москва: Медицинское маркетинговое агентство, 2022. – С. 45.

6. **Гончарова, Ю.О.** Разделение штаммов возбудителя сибирской язвы на филогенетические группы на основе полиморфизма генов факторов патогенности, локализованных на плазмиде рХО1 / **Ю.О. Гончарова**, Т.Б. Кравченко, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, К.В. Хлопова, В.В. Евсеева, В.С. Тимофеев; под редакцией академика РАН В.Г. Акимкина, профессора М.Г. Твороговой // Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022: сборник материалов конгресса с международным участием, Москва, 27–28 апреля 2022 г. – Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. – С. 54.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,

«ГКПМ-Оболенск» – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов – Оболенск

ГРМ – гидролизат рыбной муки, питательная среда для роста бактерий

КОЕ – колониеобразующая единица

ФБУН ГНЦ ПМБ – Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

AS-ПЦР – allele specific (аллель-специфичная) ПЦР

canSNP – канонические SNP

EF – edema factor, отечный фактор

GT – genotype, генотип

LD50 – Dosis Letalis 50, доза, при которой гибнет 50 % экспериментальных животных

LF – lethal factor, летальный фактор

MLST – Multilocus Sequence Typing, мультилокусное сиквенс-типирование

MLVA – Multilocus VNTR Analysis, мультилокусный анализ числа варьируемых тандемных повторов

MVLST – Multi Virulence Locus Sequence Typing, мультилокусное сиквенс-типирование по генам вирулентности

PA – protective antigene, протективный антиген

SNP – Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм

ST – sequence type, сиквенс-тип

UPGMA – Unweighted pair group method with arithmetic, метод невзвешенного попарного среднего

VNTR – Variable Number Tandem Repeat, варьируемые тандемные повторы