

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

На правах рукописи

Гончарова Юлия Олеговна

**АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ
СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА**

1.5.11. – Микробиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Тимофеев Виталий Сергеевич

Оболенск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Общая характеристика сибиреязвенной инфекции.....	10
1.2. Клинические проявления сибиреязвенной инфекции.....	11
1.3. Факторы патогенности сибиреязвенного микроба.....	12
1.4. Генотипирование <i>B. anthracis</i>	20
1.4.1. canSNP-генотипирование	21
1.4.2. MLVA-типирование	22
1.4.3. Мультилокусное сиквенс-типирование	25
1.4.4. MVLST-генотипирование	26
1.5. Заключение по обзору литературы	28
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	29
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1 Штаммы микроорганизмов	29
2.2 Среды и условия культивирования	34
2.3. Эксперименты с животными.....	34
2.3.1. Лабораторные животные.....	34
2.3.2. Определение вирулентности штаммов <i>B. anthracis</i>	35
2.3.3. Иммунизация животных.....	35
2.4. Молекулярно-биологические методы.....	35
2.4.1. Выделение геномной ДНК и приготовление термолизатов.....	35
2.4.2. Секвенирование.....	35
2.4.3. Полимеразная цепная реакция.....	36
2.4.4. Праймеры.....	36
2.4.5. Определение плазмидного профиля штамма <i>B. anthracis</i> и его дифференцирование от близкородственных видов бацилл.....	39
2.4.6. MVLST-генотипирование.....	39
2.4.7. CanSNP-генотипирование.....	39
2.4.8. MLVA-генотипирование.....	41
2.4.9. MLST-генотипирование.....	43
2.5. Биоинформационный анализ.....	43
2.6. Статистический анализ.....	43
Глава 3. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА.....	45

3.1. canSNP-типирование.....	45
3.2. MLVA-генотипирование.....	45
3.3. MLST-генотипирование.....	47
3.4. Заключение по главе 3.....	49
ГЛАВА 4. ОПИСАНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА.....	50
4.1. Аллельный полиморфизм генов факторов патогенности <i>B. anthracis</i> , расположенных на плазмиде pXO1.....	50
4.2. Аллельный полиморфизм генов факторов патогенности <i>B. anthracis</i> , расположенных на плазмиде pXO2.....	53
4.3. Аллельный полиморфизм гена синтеза антролизина O.....	56
4.4. Заключение по главе 4.....	57
Глава 5. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
5.1. Поиск взаимосвязей MVLST _{pXO1} -генотипа с другими генетическими признаками штамма <i>B. anthracis</i>	60
5.1.1. Корреляция MVLST _{pXO1} -генотипа с canSNP-группой штамма <i>B. anthracis</i>	60
5.1.2. eBURST популяционный анализ MVLST _{pXO1} -генотипирования штаммов <i>B. anthracis</i>	62
5.1.3. Эволюционная и филогеографическая значимость полученных данных.....	64
5.2. Поиск взаимосвязей MVLST _{pXO2} -генотипа с другими генетическими признаками штамма <i>B. anthracis</i>	71
5.2.1. Корреляция MVLST _{pXO2} -генотипа с эволюционной линией штамма <i>B. anthracis</i>	71
5.2.2. eBURST-популяционный анализ и эволюционная и филогеографиче- ская значимость полученных данных MVLST _{pXO2} -генотипирования штаммов <i>B. anthracis</i>	72
5.2.3. Применение для MLVA-генотипирования нового VNTR-локуса, расположенного на плазмиде pXO2 <i>B. anthracis</i>	77
5.3. Поиск взаимосвязей <i>alo</i> -сиквенс-типа с другими признаками штамма <i>B. anthracis</i>	80
5.4. Анализ результатов MLVA-генотипирования	80
5.4.1. Корреляция MLVA-профиля с canSNP-группой штамма <i>B. anthracis</i>	80

5.4.2. Популяционный анализ, эволюционная и филогеографическая значимость данных MLVA-генотипирования.....	81
5.4.3. Возможная роль VNTR-локусов в открытых рамках считывания.....	89
5.5. MLST-генотипирование.....	92
5.6. Создание панели олигонуклеотидов для детекции филогеографически-значимых мутаций в геноме возбудителя сибирской язвы.....	95
5.7. Заключение по главе 5.....	102
Глава 6. ПОИСК СВЯЗИ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ШТАММА <i>B. ANTHRACIS</i> К ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГРУППЕ С ЕГО ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ.....	104
6.1. Поиск причин качественных различий значения вирулентности штаммов <i>B. anthracis</i> для лабораторных животных	106
6.2. Оценка количественных различий вирулентности штаммов <i>B. anthracis</i> , принадлежащих к разным MVLST _{рХО1} -генотипам и canSNP-группам на модели беспородных белых мышей.....	108
6.3. Оценка сравнительной способности штаммов <i>B. anthracis</i> , обладающих разным MVLST _{рХО1} -генотипом, преодолевать поствакцинальный иммунитет на модели морских свинок.....	111
6.4. Заключение по главе 6.....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	116
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	117
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	140
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Результаты генотипирования исследуемой выборки штаммов.....	143
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Выявленные у исследуемой выборки штаммов сиквенс-типы и мутации генов <i>ragA</i> , <i>lef</i> , <i>суа</i> , <i>сарВ</i> , <i>сарС</i> , <i>сарА</i> , <i>сарD</i> , <i>асрА</i> и <i>асрВ</i> , а также изоформы кодируемых перечисленными генами белков.....	151
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Результаты MLVA-генотипирования штаммов из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы.....	180

ВВЕДЕНИЕ

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 [10, 88].

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* [40]. 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 [52, 86]. Главное отличие возбудителя сибирской язвы от близкородственных видов заключается в наличии двух плазмид вирулентности: рХО1 и рХО2, обуславливающих патогенность [33, 101, 129]. Факторами патогенности сибиреязвенного микроба главным образом являются трехкомпонентный токсин и капсула. На плазмиде рХО1 локализованы гены *pagA*, *lef* и *суа*, кодирующие субъединицы сибиреязвенного токсина [129], и ген *atxA*, кодирующий главный регулятор транскрипции *B. anthracis*. На плазмиде рХО2 локализован оперон *capBCADE*, кодирующий ферменты синтеза поли- γ -D-глутаминовой капсулы *B. anthracis*, и гены регуляторных белков *acrA* и *acrB* [33, 117, 129].

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 [19, 57, 104, 140, 154, 157]. 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 [43, 99, 121, 171, 190, 194]. 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 [72, 138] без детального анализа филогенетической и филогеографической значимости полученных результатов.

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 [138], а также опубликованы данные по значению индекса биоразнообразия при применении MVLST в отношении *B. anthracis* без детального описания выявленных генотипов [72]. 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 [43, 99, 121, 171, 190, 193]. Подходы MLVA- и canSNP-типирования являются на данный момент основой генотипирования штаммов *B. anthracis*, однако на территории РФ проведено недостаточно много работ с использованием этих методов [1, 5, 12, 14, 72, 167]. MLST-генотипирование использовали авторы ряда работ для определения видовой принадлежности изолятов, принадлежащих группе *B. cereus sensu lato*, в том числе и для *B. anthracis* [87, 100, 139, 153, 170]. 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 canSNP-, 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 capSNP- 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.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана схема MVLST-генотипирования сибиреязвенного микроба, применяемая для описания филогенетической структуры глобальной популяции *B. anthracis*. При этом MVLST_{рх01}-профиль штамма *B. anthracis* обладает большей филогенетической значимостью, чем MVLST_{рх02}-профиль.

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

3. MVLST_{рх01}-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 параграфы 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика сибиреязвенной инфекции

Сибирская язва – особо опасное заболевание животных и человека, вызываемое грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Главным образом оно поражает копытных млекопитающих, но может передаваться и другим теплокровным животным, в том числе и человеку [9]. Ключевой для эпидемиологии сибирской язвы характеристикой *B. anthracis* является присущая данному патогену, как представителю рода *Bacillus*, способность к формированию эндоспор, крайне устойчивых в окружающей среде [63, 68]. Попадая в организм теплокровного хозяина, споры прорастают и превращаются в вегетативные клетки, которые размножаются в точке проникновения или в ближайших лимфатических тканях. Затем, если болезнь переходит в следующую стадию, они распространяются по организму лимфогематогенным путем и вызывают геморрагические некротические поражения, токсемию и сепсис, которые могут привести к смерти. После этого вегетативные клетки, оставшиеся в трупe хозяина, погибают при его разложении под действием гнилостной микрофлоры. Но часть из них попадает в окружающую среду – в первую очередь в почву. При этом инфекция разносится по территориям при передвижении больного животного с кровянистыми выделениями на последних стадиях инфекции, а также при поедании трупа падальщиками. Часть попавших в почву вегетативных клеток *B. anthracis* образует споры, и, таким образом, жизненный цикл патогена замыкается, а вновь образованные споры способны вызвать новый цикл заражения. При этом они сохраняют жизнеспособность, и, что более важно, вирулентность, в течении как минимум десятков и даже сотен лет [9]. Место гибели животного от сибирской язвы сохраняет эпидемический потенциал – на нем возможны новые вспышки заболевания [9, 82, 167]. Именно благодаря сочетанию таких факторов, как жизнеспособность спор, способность вызывать заболевание у человека, тяжесть и высокая летальность заболевания, а также спектр основных хозяев, к которым относятся копытные травоядные животные, являющиеся основой сельского хозяйства, *B. anthracis* относят к особо опасным патогенам [9].

По современным оценкам вид *B. anthracis* сформировался 12–26 тыс. лет назад [104]. Уже начиная с ранних этапов исторического развития человечество сталкивалось с этой болезнью. Сибирская язва известна с древних времен под различными названиями, такими как «священный огонь» или «углевик», называемая в России общеизвестным именем в связи с преимущественным распространением в Сибири. Латинское название болезни «*antracis*» – происходит от греческого слова «*anthrax*» – «уголь», из-за характерного вида язв, образующихся при кожной форме инфек-

ции [10, 11]. Вплоть до новейшего времени сибирская язва была одной из основных причин неконтролируемой смертности домашнего скота – коров, овец, коз, лошадей и свиней [189]. Однако уже к XIX–началу XX вв. развитие медицинского и ветеринарного надзора позволило свести количество случаев сибирской язвы в развитых странах к минимуму [77], а изобретение и внедрение в практику вакцинопрофилактики и антибиотикотерапии в середине XX в. сделало эту болезнь исчезающе редкой [188]. Но если в развитых странах сибирская язва практически побеждена, то в слаборазвитых регионах Африки, Центральной и Южной Азии это заболевание остается достаточно актуальным. Ежегодная заболеваемость сибирской язвой колеблется от 20 до 100 тыс. человек, причем большая часть случаев приходится на долю указанных регионов [127]. При этом в ряде стран наблюдается тенденция к увеличению ежегодно выявляемых случаев [123], а непосредственно группа риска насчитывает 63,8 млн человек (проживающих в эндемичных по сибирской язве районах и постоянно контактирующих с животными) и 1,1 млрд голов скота [39]. Следует также учитывать риск заноса *B. anthracis* из неблагополучных районов в благополучные вместе с контаминированными *B. anthracis* товарами (мясо, шерсть, шкуры, костная мука и другие продукты животного происхождения) или зараженным скотом. Кроме того, и сейчас сохраняется возможность вспышек сибирской язвы в благополучных регионах при активизации старых либо ранее неизвестных почвенных очагов [82], а также угрозой использования *B. anthracis* как биологического оружия [183]. Все вышесказанное обуславливает необходимость постоянного контроля этой инфекции и пополнения знаний о ее эпидемиологии.

1.2. Клинические проявления сибирязвенной инфекции

На эпидемиологию сибирской язвы в первую очередь влияют входные ворота инфекции при заражении, абиогенные факторы окружающей среды и видовая принадлежность макроорганизма-хозяина. Пути передачи сибирязвенной инфекции обуславливают ее клинические формы, обладающие различными симптомокомплексами. Кожная форма наиболее распространена среди людей и возникает при попадании спор *B. anthracis* в открытые повреждения кожи, где они прорастают и развиваются [147]. Легочная форма возникает в результате вдыхания аэрозольных частиц диаметром от 1 до 5 мкм, содержащих споры *B. anthracis* (более крупные частицы удаляются с помощью мукоцилиарного клиренса легких). Споры захватываются альвеолярными фагоцитами и дендритными клетками, транспортируются в трахеобронхиальные и средостенные лимфатические узлы, где и прорастают. Эта форма проявляется на ранних стадиях как гриппоподобное заболевание, при котором по мере развития инфекционного процесса нарастает тяжесть симптомов, вплоть до возникновения отека органов грудной клетки, бактериемии и поражения головного мозга – так называемого сибирязвенного менингита. Без начала терапии на ранних

стадиях заболевания эта форма инфекции летальна в 100 % случаев [47, 147]. Орофарингеальная (ротоглоточная) и гастроинтестинальная (желудочно-кишечная) формы связаны с употреблением контаминированной спорами *B. anthracis* пищи. Проявляются эти формы либо изъязвлением ротовой полости, лимфаденопатией шейных и/или подчелюстных лимфатических узлов и отеком шеи в случае орофарингеальной формы, либо язвенными поражениями и отеками желудка и кишечника в случае гастроинтестинальной формы. Обе формы могут приводить к тяжелой интоксикации, бактериемии и летальному исходу [147].

Именно орофарингеальная и гастроинтестинальная формы наиболее значимы в эпидемиологии сибирской язвы, так как инфекция в природе протекает именно по такому пути. Заражение при этом происходит алиментарным путем. Травоядные животные, поедая приземные растения, съедают вместе с ними определенное количество почвы, которая может быть контаминирована спорами *B. anthracis* и служить источником заражения. Хищники и падальщики, поедая трупы умерших от сибирской язвы или ослабевших от нее же животных, способствуют попаданию вегетативных клеток возбудителя в почву, где происходит формирование эндоспор. Оставшиеся в тканях погибшего животного клетки *B. anthracis* гибнут под воздействием процессов, вызванных гнилостной микрофлорой при разложении туши. Именно благодаря трофической цепи растения-травоядные-хищники осуществляется жизненный цикл *B. anthracis*, и его циркуляция в природе [9]. Изучение этих процессов в природе затруднено тем, что тратить ресурсы лабораторий уровня BSL-3 и BSL-4, оборудованных для работы с опасными патогенами, на изучение эпидемически незначимых экологических аспектов не вполне целесообразно, а исследовательские коллективы, нацеленные на изучение почвенных взаимодействий микроорганизмов, как правило, не имеют возможности работать с опасными патогенами. Поэтому большая часть рассмотренных выше вопросов в отношении сибиреязвенного микроба исследована фрагментарно и основана в основном на разрозненных полевых наблюдениях, которые, тем не менее, являются весьма интересными.

Также стоит упомянуть крайне редкую и специфическую инъекционную форму сибирской язвы, возникающую при внутривенном введении препаратов, контаминированных спорами *B. anthracis*, которая была выявлена у инъекционных опиатных наркоманов. Она проявляется локальными поражениями мягких тканей с выраженными отеками и/или тяжелой системной сибирской язвой с полиорганный недостаточностью и сибиреязвенным менингитом. [192]. Однако, из-за крайне специфического способа передачи инфекции, эта форма болезни является эпизодической и не значимой для эпидемиологии.

1.3. Факторы патогенности сибиреязвенного микроба

Особенностью систематического положения сибиреязвенного микроба является высокая

генетическая схожесть с рядом других бацилл – *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. weihenstephanensis* и *B. wiedmannii*, настолько выраженная, что все эти виды объединяют в одну группу, называемую *Bacillus cereus sensu lato* или *Bacillus cereus complex* [40, 68]. Степень их генетического родства даже дает основания для предложений рассматривать всю эту группу как один вид, который состоит из групп штаммов, обладающих помимо общего, «корового генома», уникальными генетическими детерминантами, в первую очередь плазмидами и регуляторными генами, фенотипические проявления которых и служат на данный момент основанием для придания этим группам штаммов видового статуса [68, 86, 141]. Для *B. anthracis* такими детерминантами стали в первую очередь две плазмиды: рХО1 и рХО2, которые и обеспечили его патогенность и называются, соответственно, плазмидами вирулентности.

На плазмиде рХО1 расположены гены *pagA*, *lef* и *суа*, кодирующие компоненты сибиреязвенного токсина – протективный антиген (РА – protective antigen), летальный фактор (LF – lethal factor) и отечный фактор (EF – edema factor). Сибиреязвенный токсин относится к семейству бактериальных бинарных токсинов АВ-типа. Он состоит из рецептор-связывающей В-части РА и двух энзиматических А-частей: LF и EF. Эти комплексы РА с LF и EF имеют независимый токсический эффект и называются летальным (LT) и отечным (ET) токсинами, соответственно [190].

РА является белком, масса предшественника которого составляет 83 кДа (РА83), а длина – 735 а.к. [134, 190]. После связывания с рецепторами токсина сибирской язвы на клетках хозяина РА83 расщепляется специфическими клеточными протеазами (фурин или фурин-подобные протеазы), которые отщепляют от него N-концевой фрагмент весом 20 кДа (РА20) [157, 190]. Оставшийся связанный с мембраной С-концевой фрагмент (63 кДа), называемый РА63, собирается в кольцеобразный гептамер, называемый препорой, с которой конкурентно взаимодействуют до трех молекул LF и/или EF. РА опосредует проникновение EF и LF в цитозоль путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. После формирования эндосомы кислый рН обуславливает конформационные перестройки препоры с последующим формированием трансмембранной поры в мембране эндосомы, через которую EF и LF попадают в цитозоль. Без РА энзиматические субъединицы не могут осуществлять своей роли в организме хозяина [157].

Кристаллическая структура мономера выявила, что РА83 состоит из четырех доменов. I домен (1–258 а.к.) содержит последовательность RKKR (Arg164-Lys165-Lys166-Arg167), по которой происходит отщепление РА20 клеточными протеазами, после связывания РА83 с рецепторами [134, 157, 190]. Оставшийся участок – I' домен (168–258 а.к.) – главным образом участвует в связывании LF и/или EF. II домен (259–487 а.к.) ответственен за формирование трансмембранной поры. III домен (488–595 а.к.) необходим для самоассоциации РА63 в гептамеры [79, 190].

С-концевой IV домен РА (596–735 а.к.) необходим для распознавания и связывания с клеточными рецепторами [79, 157, 190].

РА является основным иммуногеном возбудителя сибирской язвы. Многочисленные исследования на животных подтвердили роль РА как основного защитного иммуногена в лицензированных вакцинах США и Великобритании. Все четыре домена РА имеют иммуногенные эпитопы, однако наиболее значимыми с точки зрения перспективы создания субъединичных вакцин на основе РА являются домены I и IV, которые приводят к формированию нейтрализующих токсинов антител [172].

LF – белок, весом 90 кДа и длиной 776 а.к [106]. LF является цинк-металлопротеазой, которая отрезает N-концевой фрагмент у митоген-активируемых киназ (МАРКК – mitogen-activated protein kinase), приводя к ингибированию сигнальных путей в клетках хозяина [99, 131].

Внутри белка LF выделяют четыре домена [131]. I домен – N-концевой домен (1–254 а.к.), функции которого заключаются в связывании с РА [79]. О функциях II домена в настоящий момент известно мало, однако описано, что он состоит из двух участков (263–297 и 385–550 а.к.) [131]. III домен (303–382 а.к.) необходим для активности LF [79, 131]. IV домен (552–776 а.к.) содержит цинк-металлопротеазный каталитический центр с цинк-связывающим мотивом His686-Glu687-X-X-His690 (686–690 а.к.). Этот домен взаимодействует с доменами II и III, вместе с которыми образует глубокую впадину, представляющую каталитический центр LF, в который попадает N-терминальный конец киназы, формируя активный комплекс с последующим ее разрезанием [79, 99, 131, 168].

EF – белок весом 89 кДа, состоящий из 735 а.к. [64, 79]. Он является кальмодулин-зависимой аденилатциклазой, которая изменяет клеточные сигнальные пути через повышение внутриклеточного уровня цАМФ [186].

EF состоит из трех доменов: N-концевой РА-связывающий домен (1–293 а.к.), аденилатциклазный домен и С-концевой спиральный домен (660–800 а.к.) [64, 79]. В аденилатциклазном домене выделяют домены С_A (294–349 а.к. и 490–622 а.к.) и С_B (350–489 а.к.), которые вместе образуют каталитический центр. Спиральный домен связывается с кальмодулином (CaM), что приводит к конформационным изменениям и высокой аденилатциклазной активности EF [64, 186]. CaM представлен у всех эукариот. Он преобразует внутриклеточные кальциевые сигналы и регулирует многие внутриклеточные процессы, включая трансдукцию, транскрипцию, ионную проводимость, везикулярное слияние и функции цитоскелета [64]. Поскольку CaM присутствует только внутри клеток хозяина, EF неактивен вне клетки [186]. Клинически действие EF проявляется как отек тканей, что и послужило основанием для названия этого белка [49, 132]. EF вносит значительный вклад как в кожную, так и в генерализованную форму сибирской язвы [186]. При

высоких концентрациях цАМФ приводит к снижению содержания хлорид-ионов и сильному увеличению оттока воды из пораженных клеток [64]. Это приводит к массивному отеку, характерному для кожной формы сибирской язвы [135].

Совокупное действие белков PA, LF и EF приводит к гибели клеток хозяина, поражениям его тканей и органов, и в итоге – к смерти.

На плазмиде pXO2 расположен оперон *capBCADE*, кодирующий ферменты синтеза капсулы *B. anthracis*, состоящей из поли- γ -D-глутаминовой кислоты [142].

Для многих бактериальных патогенов капсула является одним из основных факторов патогенности. Во время инфекции капсулированные микроорганизмы имеют избирательное преимущество перед некапсулированными по многим причинам. У некоторых видов бактерий капсулы позволяют избежать действия неспецифического иммунного ответа хозяина, препятствуя связыванию комплемента и последующему фагоцитозу [50]. Другие капсулы специфически связывают компоненты комплемента, что предотвращает образование комплекса при мембранной атаке [120]. В некоторых случаях капсулы слабо иммуногенны или неиммуногенны и отсутствие сильного специфического иммунного ответа против внешней поверхности бактериальных клеток способствует длительной персистенции в организме хозяина [120]. Наконец, капсулы некоторых бактерий играют роль в прикреплении к поверхности клеток хозяев [51, 65].

Белковая капсула является одним из главных факторов патогенности *B. anthracis*. Оказавшись внутри организма хозяина, спящие споры прорастают в бациллярную вегетативную форму, которая обволакивает поверхность капсулой. Капсула позволяет вегетативной клетке уклоняться от иммунного ответа и необходима для распространения бактерий из места проникновения, персистенции и выживания внутри макроорганизма [9, 66, 98, 116]. Важность капсулы *B. anthracis*, как вирулентного детерминанта, подтверждается наблюдениями о том, что клинические изоляты сибирской язвы являются инкапсулированными, а потеря капсулы в результате ферментативной деградации или генетических мутаций снижает вирулентность [9, 98]. В отличие от многих видов бактерий, имеющих полисахаридную капсулу, капсула *B. anthracis* состоит из поли- γ -D-глутамата и ковалентно связана с пептидогликаном [38, 65].

Поли- γ -глутамат (ПГА) описан у многих живых организмов. Это природный полимер, имеющий разнообразные функции, которые варьируют в зависимости от условий окружающей среды и вида, который его продуцирует. ПГА галофильных архей *Planococcus halophilus*, *Sporosarcina halophila* и *Natrialba asiatica* позволяет им противостоять высоким концентрациям солей. ПГА может быть источником глутамата для бактерий, находящихся в поздней стационарной фазе. ПГА также производится в нематоцистах обыкновенного пресноводного полипа *Hydra vulgaris*. ПГА продуцируют несколько видов бактерий, в основном из рода *Bacillus* (*B. anthracis*, *B. subtilis* 168, *B. subtilis natto*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* и *Staphylococcus*

epidermidis). У перечисленных видов ПГА состоит из D-глутамата или L-глутамата или D- и L- энантиомеров глутамата одновременно. ПГА *B. anthracis* состоит только из D-глутамата [38]. ПГА слабо иммуногенен, поэтому препятствует связыванию комплемента и фагоцитозу иммунной клетки, что позволяет возбудителю сибирской язвы избегать иммунного ответа хозяина. То есть специфический иммунный ответ в отношении капсулы практически отсутствует и бактерии остаются относительно «невидимыми» для иммунных клеток [9, 98].

Для биосинтеза капсулы необходимы две функции: синтез ПГА и его транспорт на поверхность клетки. Схематическое представление биосинтеза ПГА мембранно-закрепленным комплексом белков и прогнозируемой ориентацией комплекса в мембране *B. anthracis* описана в работе Candela и Fouet с соавт. (2006) [38]. Предположительно, ПГА синтезируется в цитоплазме и экспортируется на поверхность.

Как упоминалось выше, синтез капсулы определяется белками, кодируемыми опероном *capBCADE*, локализованном на плазмиде pXO2 [40, 117, 129]. Гены *cap* транскрибируются как один оперон, экспрессия которого зависит от концентрации CO₂ в среде [116, 117]. Гены *cap*-оперона располагаются в следующем порядке: *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE* и кодируют соответствующие белки у *B. anthracis*: CapB, CapC, CapA, CapD, CapE [38]. Предположительно, эти белки ответственны за биосинтез ПГА, а также транспорт и прикрепление остатков D-глутаминовой кислоты на поверхности бактериальных клеток [116, 117].

Функции белков CapB, CapC и CapA *B. anthracis* во многом были предсказаны по сходству с соответствующими белками у *B. subtilis*. Гены, гомологичные *capB*, *capC* и *capA* *B. anthracis*, были найдены в геномах *B. subtilis* IFO16449 (*ywsC*, *ywtA* и *ywtB*, соответственно) и *S. epidermidis* ATCC 12228 (*capB*, *capC* и *capA*). У *B. subtilis* описаны четыре гена, называемые *pgs* (*pgsB*, *pgsC*, *pgsAA* и *pgsE*), организованные в оперон и участвующие в синтезе ПГА [22, 38, 175]. Анализ последовательностей показывает, что белки CapB, CapC, CapA и CapE *B. anthracis* имеют схожие функции с PgsB, PgsC, PgsAA и PgsE *B. subtilis*, соответственно [38].

Ген *capA* кодирует белок CapA длиной 411 а.к. и весом 46 кДа [117]. Гомолог гена *capA* у *B. subtilis* IFO16449 – *ywtB*, хотя и не является существенным для синтеза, но необходим для получения максимально количества ПГА [175].

В работе Urushibata с соавт. в 2002 г. было показано, что гомолог CapB у *B. subtilis* IFO16449 – YwsC – катализирует полимеризацию остатков L-глутаминовой кислоты в присутствии АТФ и ионов Mn²⁺ с образованием ПГА. Белок YwsC схож с ферментами, принадлежащими к семейству АДФ-образующих амидных связи лигаз. Таким образом, YwsC называют поли-γ-глутамат-синтетазой и относят к АТФ-зависимым лигазам амидных связей [175]. YwsC состоит из двух субъединиц (44 кДа и 33 кДа), необходимых для синтеза ПГА. Предположительно, иницирующий

кодон субъединицы весом 33 кДа находится в положении 287 от иницирующего кодона субъединицы весом 44 кДа [175]. Т.е. субъединица весом 33 кДа получается не путем посттрансляционной модификации из субъединицы 44 кДа, а скорее синтезируется независимо. Также известно, что белок CapB тоже состоит из двух субъединиц: CapB и CapB'. Кодон инициации трансляции для CapB' – GTG-849 находится в одной рамке считывания с CapB. Белок CapB содержит 397 а.к., его молекулярный вес составляет 44 кДа. CapB' состоит из 208 а.к. и имеет молекулярную массу 23,3 кДа. Вероятно, они также совместно функционально взаимодействуют [117].

Белок CapC состоит из 149 а.к. и имеет молекулярную массу 16 кДа. Было установлено, что гомолог CapC у *B. subtilis* IFO16449 – YwtA – играет определенную роль в транспортировке ПГА, поскольку делеция гена *ywtA* приводит к неспособности *B. subtilis* выделять полимер в среду. Причем очищенный YwsC способен синтезировать определенное количество ПГА [117, 175]. Поиск гомологии показал, что YwtA имеет сходство с SmpA *S. epidermidis*, который функционирует как транспортный белок для эритромицина [145].

Предположительно CapA, CapB и CapC являются мембранно-связанными белками внешней поверхности клеток *B. anthracis*, поскольку продукты оперона экспрессируются в качестве мембранно-связанных белков в рекомбинантных клетках *E. coli* [117].

Четвертый ген оперона, *capD*, кодирует белок CapD, который представляет капсульную деполимеразу и γ -глутамилтранспептидазу. CapD имеет 32 % идентичности с γ -глутамилтранспептидазой *B. subtilis* и 35 % идентичности с описанным гомологом CapD у рода *Francisella* [161]. В опероне *pgs* *B. subtilis* гомолог гена *capD* называется *pgsS* [38]. Несмотря на сходство аминокислотных последовательностей, сообщается, что γ -глутамилтранспептидаза *B. subtilis* является секретуемым белком, в то время как CapD *B. anthracis* связан с мембраной [38, 149]. CapD состоит из 528 а.к., первые 28 из которых образуют сигнальный пептид [191]. CapD автокаталитически образует гетеродимер, состоящий из субъединиц весом 35 кДа (29–351 а.к) и 15 кДа (352–528 а.к.). Эти субъединицы ассоциируются с образованием функционального фермента [149, 191]. Кристаллическая структура CapD и его активного центра описаны в работах Wu с соавт. в 2009 г. и Khavrutskii с соавт. в 2014 г. [98, 191]. CapD расщепляет γ -пептидные связи полиглутаматной капсулы, перенося глутамат на молекулу воды (гидролиз) или аминокислоту (транспептидация). Этот механизм приводит к высвобождению низкомолекулярной капсулы или прикреплению капсулы к пептидогликановому слою [36, 116, 149, 174]. Белок деполимеризует крупные капсульные полимеры, высвобождая низкомолекулярные полимеры D-глутаминовой кислоты в окружающую среду [116, 174]. Таким образом вегетативные клетки *B. anthracis* синтезируют высокомолекулярную капсулу (H-капсулу > 100 кДа) на своей поверхности, но одновременно и последовательно деградируют ее до низкомолекулярной капсулы

(L-капсулы < 14 кДа), которая затем высвобождается с поверхности клетки, чтобы действовать как «приманка» для системы защиты хозяина при внеклеточном размножении патогенов [116].

СарЕ – маленький мембранный пептид, длина которого составляет 47 а.к. Известно, что белок необходим для синтеза капсулы, а делеция гена *capE* у нетоксигенного штамма *B. anthracis* приводит формированию авирулентного для мышей фенотипа. Предположительно, он функционально взаимодействует с СарА. В качестве альтернативы, благодаря своему взаимодействию с СарВ, СарС и СарА, он может внести вклад в формирование комплекса. Однако СарЕ не участвует ни в стабилизации, ни в мембранной локализации СарВ и СарА, а также не требуется для синтеза этих белков и не является регулятором *cap*-оперона [37]. До настоящего времени функциональная роль этого белка не установлена.

Стоит отметить, что приобретение микроорганизмом тех или иных факторов патогенности самих по себе зачастую недостаточно для реализации их патогенного потенциала. В подавляющем большинстве случаев эти факторы приобретаются уже эволюционно сложившимся организмом, адаптированным к своей экологической нише, с отлаженной системой регуляции экспрессии своих генов. Приобретение новых генов требует включения регуляции их экспрессии в общую систему регуляции, в том числе адаптации их к уже существующим в клетке транскрипционным регуляторам, или приобретение клеткой новых регуляторных механизмов [60]. У сибиреязвенного микроба этот процесс заключался в инактивации посредством точечной нонсенс-мутации глобального транскрипционного регулятора PlcR, отвечающего в том числе за экспрессию факторов патогенности группы *B. cereus* complex, и приобретении нового глобального регулятора транскрипции AtxA и регуляторных белков АспА и АспВ.

AtxA, АспА и АспВ принадлежат к классу регуляторов, называемых «PCVR» (Phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase regulation Domain-Containing Virulence Regulators – фосфоенолпироват-зависимые регуляторы вирулентности, содержащие домен регуляции фосфотрансферазы). Вместе или по отдельности такие регуляторы контролируют экспрессию классических генов вирулентности и сотен других генов без очевидной связи с вирулентностью. Большинство генов, контролируемых АспА или АспВ, расположены на хромосоме, в то время как AtxA-специфические гены находятся на всех трех элементах генома *B. anthracis* – хромосоме и плазмидах рХО1 и рХО2 [142].

AtxA является главным положительным транскрипционным регулятором генов вирулентности. Белок кодируется геном *atxA*, расположенным на плазмиде рХО1 [33, 53, 102]. Первоначально идентифицированный как регулятор генов биосинтеза токсина, этот белок также положительно регулирует экспрессию *cap*-оперона через положительную регуляцию экспрессии *aspA* и *aspB* [53, 65, 80, 102, 160, 173].

AtxA имеет примерно 27 % идентичности аминокислотных последовательностей с AspA и AspB. А AspA и AspB имеют 40 % идентичности и более похожи друг на друга, чем AtxA [142]. Предсказанная доменная организация AspA и AspB аналогична AtxA. На данный момент структура AtxA мало изучена, однако известно, что он предположительно содержит два ДНК-связывающих домена и мотивы двух регуляторных доменов фосфоенолпируват карбогидрат фосфотрансферазной системы. Белок представляет димер, каждый из мономеров которого содержит пять предполагаемых доменов [85].

Гены *aspA* и *aspB* локализованы на плазмиде pXO2 и кодируют белки AspA и AspB с частично перекрывающейся функцией. AspA и AspB независимо положительно контролируют транскрипцию *cap*-оперона, однако AspA оказывает большее влияние на его экспрессию, чем AspB [65, 142]. При этом AspB, как и AspA, может положительно влиять на экспрессию *capBCADE* в отсутствие других PCVR. Однако описано, что делеция *aspA* или *aspB* в штамме *B. anthracis* оказывает небольшое влияние на транскрипцию капсульного оперона и синтез капсулы, а двойной мутант не инкапсулируется при условии экспрессии *atxA*. Напротив, мутация, приводящая к инактивации гена *atxA*, резко нарушает экспрессию *capB* и синтез капсулы [65].

Известно, что CO₂ / бикарбонат служит сигналом для увеличения экспрессии AtxA-регулируемых генов [85, 142]. Как правило, штаммы pXO1⁻ pXO2⁺ не инкапсулируются во время роста на воздухе или при физиологически значимых уровнях CO₂/бикарбоната (0,8 % бикарбоната – 5 % CO₂) из-за отсутствия у них гена *atxA*. Однако при росте таких штаммов в буферных средах в условиях с высоким содержанием атмосферного CO₂ (20 %), экспрессия *aspA* повышается, что приводит к образованию капсулированных клеток. Индуцированное CO₂ увеличение экспрессии *aspA* и *aspB* может привести к увеличению экспрессии генов *cap* и синтезу капсулы даже в отсутствие *atxA* [65].

Ген *aspB* расположен ниже (в 3'-направлении) от *capBCADE*-оперона и находится в одной ориентации с ним. *AspB* экспрессируется в виде моноцистронного транскрипта, инициируемого слабым конститутивным промотором. Слабый терминатор транскрипции, расположенный между *capE* и *aspB*, приводит к котранскрипции *capBCADE* и *aspB* примерно у 10 % транскриптов, образуя, таким образом, положительную петлю обратной связи [142].

Но, хотя кодируемые плазмидами pXO1 и pXO2 факторы патогенности традиционно считаются видоспецифическими для *B. anthracis*, относительно недавно были обнаружены штаммы *B. cereus*, обладающие pXO-подобными плазмидами, и генами факторов вирулентности, гомологичными *B. anthracis*. Часть из них выделили в самостоятельную филогенетическую единицу – *B. cereus* biovar *anthracis* [20, 90, 103]. Штаммы *B. cereus* bv. *anthracis* и *B. cereus* не отнесенные к этому биовару, но обладающие pXO-подобными плазмидами, все же отличаются от сибирез-

венного микроба рядом генетических и фенотипических признаков. В первую очередь эти различия заключаются в патогенности – данные штаммы практически никогда не вызывают заболевания у людей (описано лишь несколько клинических случаев), но вирулентны для животных, в том числе человекообразных обезьян [20, 90, 103]. Подобные штаммы остаются довольно редкими и недостаточно изученными. В том числе малоизучены эпидемиология и клинические проявления вызываемых ими инфекций, а также особенности экспрессии и последовательности факторов патогенности, схожих с сибиреязвенными.

Резюмируя, мы можем сказать, что патогенный потенциал *B. anthracis* реализуется за счет трех эффекторных белков – PA, LF и EF, образующих два белковых комплекса LT и ET, которые поражают клетки и ткани хозяина, приводя в итоге к его смерти, белков синтеза капсулы, которая защищает вегетативные клетки возбудителя от иммунного ответа, а также белков AtxA, AspA и AspB, регулирующих экспрессию генов токсино- и капсулообразования.

1.4. Генотипирование *B. anthracis*

Для эпидемиологии инфекционных заболеваний крайне важна не только идентификация возбудителя инфекции, но и выяснение закономерности распространения, циркуляции и эволюции патогена. Для этого необходимо выделить из глобальной популяции микроорганизма отдельные штаммы и группы штаммов, объединенные тем или иным признаком, и описать закономерности распространения таких групп в том или ином регионе, их миграции в другие регионы, особенности течения вызываемых ими инфекций и т.д. *B. anthracis* – достаточно молодой вид [103]. К тому же, ключевая особенность его биологии заключается в существовании споровой стадии между стадиями заражения животного. В споровой форме клетка *B. anthracis* может проводить многие годы, а возможно, и столетия. Поэтому за свою эволюционную историю вид *B. anthracis* не успел разделиться на подвиды, биовары, серовары и какие-либо другие внутривидовые группы, отличающиеся между собой фенотипически [9, 167]. Поэтому этот вид традиционно считается в большой степени мономорфным. Однако, в последние десятилетия, по мере развития молекулярной биологии и технологий полногеномного секвенирования, были проведены исследования генетического полиморфизма многих микроорганизмов, в том числе и *B. anthracis*. В результате, именно типирование по генетическим маркерам позволило выделить в рамках вида *B. anthracis* определенные группы штаммов и даже составить индивидуальные генетические портреты штаммов.

К настоящему времени было выявлено и описано несколько классов таких генетических маркеров и разработано несколько методов генотипирования сибиреязвенного микроба, которые применяются при проведении эпидемиологических расследований вспышек сибирской язвы и

при характеристике рабочих коллекций научно-исследовательских лабораторий, занимающихся изучением *B. anthracis*.

1.4.1. canSNP-генотипирование

SNP (Single Nucleotide Polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм) представляют отличия в интересующих нуклеотидных последовательностях размером в один нуклеотид. SNP-маркеры характеризуются относительно низкой частотой мутаций, порядка 10^{-10} /поколение. Однако при достаточно большом размере генома и высокой скорости деления клеток с течением времени накапливаются различия в SNP-профиле у разных штаммов одного вида, что позволяет разделять эти штаммы и анализировать их филогенетическое положение в глобальной популяции. Количество SNP может достигать многих десятков и сотен, что делает их анализ довольно трудоемким и дорогостоящим, даже при использовании технологий полногеномного секвенирования. Поэтому оптимальным является выбор ограниченного числа SNP-маркеров, в наибольшей степени отражающих эволюционную историю вида, что позволяет снизить затратность генотипирования с сохранением достаточной разрешающей силы [133]. В настоящее время для типирования возбудителя сибирской язвы широко используется анализ с применением 14 диагностически-значимых SNP – так называемых канонических SNP или, сокращенно, canSNP [93].

С использованием метода canSNP-генотипирования глобальная популяция *B. anthracis* была разделена на три филогенетических линии (А, В и С) и 14 canSNP-групп [93, 176]. Наиболее генетически разнообразна линия А, объединяющая группы А.Br.008/009, А.Br.001/002, А.Br.Ames, А.Br.003/004, А.Br.005/006, А.Br.Aust94, А.Br.Vollum и А.Br.WNA. Штаммы этих групп встречаются по всему миру, но можно выделить некоторые географические закономерности их распространения [59, 135]. Наиболее широко распространена canSNP-группа А.Br.008/009, также обозначаемая как ТЕА (Trans-Eurasian), штаммы которой циркулируют в Евразии и широко представлены в России. Эта группа разделяется на две подгруппы: А.Br.008/011 и А.Br.011/009 [45]. Группа А.Br.001/002 распространена в Китае (Центральные и Восточные регионы). От нее произошла малочисленная группа А.Br.Ames, занесенная из Китая в США [152]. Группы А.Br.WNA и А.Br.003/004 представлены в Северной и Южной Америках, группа А.Br.005/006 обнаруживается в Австралии, Африке и Европе, группа А.Br.Aust94 распространена в Юго-Восточной Азии, Индии, Австралии, Западном Китае, и Турции, а группа А.Br.Vollum – в Южной Африке и некоторых регионах Азии (Пакистан и Афганистан) [59]. Линия В более ограничена в своем ареале распространения, она включает canSNP-группы В.Br.CNEVA, распространенную в Центральной Европе, В.Br.Kruger, распространенную в Южной Африке, и В.Br.001/002, штаммы которой встречаются в Южной Африке, Европе, Корее, а недавно были обнаружены также на севере России [59, 167]. Линия С, представленная группой С.Br.001, крайне малочисленна, а относящиеся к ней штаммы обитают в Северной Америке. Эта

линия отличается наибольшей степенью генетического отличия от остальной популяции сибиреязвенного микроба и филогенетически наиболее близка к предполагаемому общему предку всех линий *B. anthracis* [133, 176].

Для более подробного филогенетического анализа иногда предлагаются дополнительные SNP, использование которых позволяет выделять новые филогеографические группы. В качестве примеров можно привести выделение из группы A.Br.Aust94 трех подгрупп Kafkas-Geo 1-3, распространенных в Кавказском регионе [146], и группы A.Br.005/007, произошедшей от A.Br.Vollum, циркулирующей в Корее [58].

Несомненным преимуществом canSNP-генотипирования является возможность использования в качестве матрицы небольших количеств ДНК, и/или деградированных ДНК, что может иметь важное значение в судебно-медицинской практике [30, 93]. Кроме того, метод позволяет выявить различия на уровне генома внутри вида *B. anthracis* между штаммами. В настоящий момент описанный метод имеет широкое применение и был использован в ряде работ, посвященных филогенетической структуре вида *B. anthracis* [7, 45, 58, 59, 93, 135, 146, 152, 167, 176].

1.4.2. MLVA-типирование

MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis – мультилокусный анализ переменных нуклеотидных тандемных повторов) – метод, основанный на анализе комбинации числа повторов в определенном наборе VNTR-локусов в геномах штаммов. VNTR-локусы (Variable Number Tandem Repeat – переменные тандемные нуклеотидные повторы) представляют участки генома, организованные в виде повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей – тандемных повторов. Для таких участков характерна повышенная частота мутаций вследствие ошибок репликации, во время которой происходит «скольжение» ДНК-полимеразы вперед или назад по матричной цепи ДНК, содержащей тандемные повторы, и последующей репарации несоответствия скользящих цепей. Вследствие таких процессов происходят инсерция или делеция повторяющегося фрагмента. Быстрая эволюция приводит к возникновению различного числа повторов в любом локусе. Эти области генома обладают высокой скоростью мутирования (10^{-5} – 10^{-4} инсерций/делеций на поколение) и большим числом возможных аллельных состояний [96]. Таким образом, тандемные повторы часто различаются по числу копий, обуславливая полиморфизм длины VNTR-локусов у разных штаммов. Суть метода MLVA заключается в определении числа тандемных повторов в нескольких VNTR-локусах путем их ПЦР-амплификации с использованием фланкирующих праймеров и определении длин амплифицированных фрагментов путем электрофореза [85].

Последние несколько лет VNTR-локусы все чаще используются как маркеры для генотипирования ряда патогенов [112], таких как *Mycobacterium tuberculosis* [109], *Yersinia pestis* [46, 107, 137], а также штаммов рода *Brucella* [107].

Явление полиморфизма на примере одного VNTR-локуса *B. anthracis* было впервые описано в гипотетическом белок-кодирующем гене, названным *vrrA* (variable repeat region A) в работе Andersen с соавт. в 1996 г. [18]. Затем у *B. anthracis* был идентифицирован 31 полиморфный locus [94, 95, 107]. После установления полной последовательности генома *B. anthracis* последовательности-кандидаты для VNTR были обнаружены *in silico* рядом авторов на плаزمидах pXO1, pXO2 и хромосоме [95, 112]. В итоге было предложено использовать VNTR-локусы для генотипирования штаммов возбудителя сибирской язвы [95]. В настоящий момент в геноме *B. anthracis* описан 31 VNTR-locus и предложен ряд схем MLVA [28, 159].

В 2000 году была разработана первая схема MLVA с использованием шести хромосомных (*vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC1*, *vrrC2*, CG3) и двух плазмидных (pXO1, pXO2) locuses [95]. Однако данная схема имеет ограниченную дискриминационную способность. В работе Keim с соавт. в 2000 г. [95] маркеры MLVA8 в среднем имеют по 5 аллелей на locus (от 2 до 9). Кроме того, два плазмидных locuses (pXO1, pXO2) могут отсутствовать у штаммов, лишенных этих плазмид, и имеют короткую длину повтора (2 и 3 п.н.). В связи с этим для определения количества повторов в locuses pXO1 и pXO2 необходимо высокоточное дорогостоящее оборудование [21, 166]. Для повышения дискриминационной способности метода и обеспечения лучшей филогенетической оценки различными исследовательскими группами были поставлены задачи по выявлению дополнительных locuses VNTR. В работе Le Flèche с соавт. в 2001 г. была разработана база данных тандемных повторов для ряда бактерий, архей и вирусов (URL: <http://minisatellites.u-psud.fr>) [107]. Авторами были оценены минисателлитные последовательности в геноме *B. anthracis* с длиной повтора не менее 9 п.н., что позволило бы разделять амплифицированные фрагменты в агарозном геле. Было выявлено 30 тандемных повторов, в которых фрагмент повторяется не менее 10 раз. В результате были предложены 14 вновь описанных VNTR-locuses (*bams01*, *bams03*, *bams05*, *bams07*, *bams13*, *bams15*, *bams21-25*, *bams28*, *bams30*, *bams31*) [107]. В работе Van Ert с соавт. в 2007 г. [176] была предложена схема MLVA15, где совмещаются locuses MLVA8 и 7 дополнительных маркеров: VNTR12, VNTR16, VNTR17, VNTR19, VNTR23, VNTR32 (другое наименование – *bams01*) и VNTR35. В работе Lista с соавт. в 2006 г. [112] разработана система генотипирования *B. anthracis* MLVA25, сочетающая locuses, входящие в состав MLVA8, 13 из 14 locuses, предложенных Le Flèche с соавт. в 2001 г. (locus *bams07* был исключен в связи с большим размером амплифицируемого фрагмента), и 4 новых locuses (*bams34*, -44, -51 и -53). Полный набор из 31 VNTR-маркера (MLVA31), присутствующих в MLVA8, MLVA15 и MLVA25, был применен совместно с *cap*SNP-типированием [176] при оценке генотипического разнообразия штаммов *B. anthracis* из Намибии [28].

В работе [166] проводилось исследование коллекции штаммов *B. anthracis* Французской Национальной Референсной Лабораторной коллекции (French National Reference Laboratory

collection, Франция) методом MLVA31. Авторы работы выявили панель из семи MLVA-маркеров (MLVA7): *vrrA*, *bams03*, *bams05*, *bams22*, *bams34*, *bams44* и *VNTR23*, определение размера которых возможно при использовании агарозного гель-электрофореза. При этом все они имеют хромосомную локализацию, то есть могут быть использованы для генотипирования штаммов, утративших одну или обе плазмиды. Несмотря на снижение числа используемых локусов, результаты применения MLVA7 и MLVA31 в значительной мере совпадают. А неизбежное снижение разрешающей силы метода компенсируется возможностью применения MLVA7 для генотипирования штаммов *B. anthracis* в ситуации, когда технология капиллярного электрофореза является недоступной или необходимо выполнить быстрый анализ филогенетической принадлежности штамма. При необходимости возможно дополнение MLVA7 другими локусами [166].

Генотипы (GT), полученные в результате MLVA, могут быть представлены в виде цифрового кода и опубликованы в базах данных [109, 166]. Существует открытая *online*-база данных MLVAbank (URL: <http://mlva.i2bc.paris-saclay.fr/mlvav4/genotyping/>), в которую депонированы результаты MLVA-, *can*SNP- и MLST-генотипирования различных видов бактерий, в том числе и *B. anthracis* [28, 95, 109, 112, 166, 176]. Кроме того, база позволяет осуществлять поиск штаммов, исходя из интересующего GT [109, 166].

MLVA-генотипирование *B. anthracis* используются в лабораторной практике зарубежными и отечественными исследователями для генотипирования изолятов и штаммов, выделенных на территории различных государств, включая: США [176], Польшу [81], Казахстан [17], Болгарию [21], Нигерию [32], Францию [112, 166], Италию [112, 143], Грузию [119], Китай [182, 193], Россию [1, 5, 6, 12, 14, 136, 167].

Интересно отметить, что большинство используемых VNTR-маркеров локализируются внутри открытых рамок считывания, причем изменение числа повторов не приводит к сдвигу рамки в связи с размером повторов, кратном трем [95]. Некоторые из этих генов кодируют факторы, которые обуславливают выживаемость бактериальных клеток в окружающей среде и способность к спорообразованию, а также факторы патогенности, влияющие на инфицирующую дозу, скорость деления бактериальных клеток внутри организма хозяина, устойчивость к врожденным иммунным механизмам. Например, четыре VNTR-локуса локализованы в генах, кодирующих основные компоненты экзоспориума *B. anthracis* (*bams13*, *bams15*, *bams30* и *bams31*), и относятся к числу самых полиморфных локусов в работах с применением MLVA31 [25, 103, 158]. Однако, до сих пор не известно, за некоторыми исключениями, влияет ли число повторов на свойства продуктов генов, в которых они расположены, и доминируют ли наиболее часто встречающиеся генотипы из-за преимуществ в приспособленности [25].

В работе Keim с соавт. в 2004 г. [93] предложен подход иерархического использования *can*SNP- и VNTR-маркеров. При этом сначала используются более стабильные и обладающие

меньшей разрешающей способностью *can*SNP-маркеры и определяется принадлежность штамма к *can*SNP-группе и одной из трех эволюционных линий. Затем в пределах одной *can*SNP-группы применяется MLVA-генотипирования для дальнейшей дифференциации штаммов. В завершении авторы предлагают использовать высоко изменчивые однонуклеотидные повторы, которые, по сути, представляют VNTR с размером повтора равным 1 п.н., что служит инструментом для дифференциации близкородственных изолятов в пределах одного MLVA-GT [93, 97, 158, 159]. Эта иерархическая система генотипирования получила название PHRANA (Progressive Hierarchical Resolving Assays using Nucleic Acids – прогрессивный анализ иерархического разрешения с использованием нуклеиновых кислот) и обычно используется для эпидемиологического расследования вспышек, а также для создания доказательной базы в судебной биологии [42, 93]. Например, эта схема была использована в расследовании биотеррористических атак с использованием спор сибиреязвенного микроба в США в 2001 г. [135] и некоторых исследованиях, посвященных экологии *B. anthracis* [21].

1.4.3. Мультилокусное сиквенс-типирование

Мультилокусное сиквенс-типирование, оно же MLST (Multilocus Sequence Typing) является популярным методом генотипирования, основанном на определении нуклеотидных последовательностей нескольких локусов, представляющих участки генов домашнего хозяйства, локализованных на бактериальной хромосоме. Для каждого локуса уникальным последовательностям (аллелям) присваиваются номера, после чего специфической аллельной комбинации (сиквенс-типу – ST) также присваивается номер [115]. Гены домашнего хозяйства высоко консервативны и находятся под влиянием стабилизирующего отбора, в связи с чем мутации в них накапливаются сравнительно медленно. Поэтому область применения метода обусловлена его относительно низким разрешением и заключается в основном определением видовой принадлежности изолятов микроорганизмов внутри группы близкородственных видов. Впервые метод был предложен для *Neisseria meningitidis* в 1998 году [114]. Позднее схемы MLST были разработаны для многих важных бактериальных патогенов [69, 70, 71, 97, 105, 177], в том числе и для группы *B. cereus* [87, 100, 139, 153, 170].

Секвенирование нуклеотидных последовательностей для генотипирования методом MLST дает несколько преимуществ, по сравнению с другими методами генотипирования. Полученные данные хорошо воспроизводимы среди лабораторий, а широкая доступность полных последовательностей генома позволяет проводить исследования *in silico*. Кроме того, существует 2 базы данных (URL: <https://pubmlst.org/bcereus/>) [170], в которых представлены MLST-профили большого количества патогенных микроорганизмов, в том числе штаммов группы *B. cereus sensu lato* и *B. anthracis* в частности.

Существует несколько схем MLST, используемых для определения видовой принадлежности изолятов, принадлежащих к группе *B. cereus*, и исследования общей филогенетической структуры этой группы [87, 100, 139, 153, 170]. В протоколах используется от пяти до семи локусов. Поскольку все используемые локусы находятся на хромосоме, метод не имеет ограничений для штаммов *B. anthracis*, лишенных плазмид вирулентности, например, вакцинных, или штаммов *B. cereus*, содержащих в геноме рХО-подобные плазмиды.

Авторы ряда работ показали, что по результатам MLST-типирования, группа *B. cereus* состоит из трех основных филогенетических кластеров (клад). Один кластер содержит изоляты *B. anthracis* и ряд штаммов *B. cereus* и *B. thuringiensis*, многие из которых взяты из клинических источников. Второй кластер включает изоляты *B. cereus* и *B. thuringiensis* различного происхождения. Ряд изолятов *B. cereus* относятся к третьей кладе [179]. Штаммы *B. anthracis* представляют отдельную клональную эволюционную линию внутри клады 1 [139].

Схема MLST-типирования группы *B. cereus*, представленная в работе Priest с соавт. в 2004 г. [139] является наиболее широко используемой [23, 40, 179]. Она основана на определении последовательностей семи генов домашнего хозяйства: *glpF* (белок-посредник поглощения глицерина), *gmk* (предположительно гуанилаткиназа), *ilvD* (дегидратаза дигидроксикислот), *pta* (фосфат-ацетилтрансфераза), *pur* (фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамид формилтрансфераза), *pusA* (пируваткарбоксилаза), и *tpi* (триозофосфатизомераза) [139]. На общедоступной базе данных, в разделе, посвященном группе *B. cereus*, используется именно эта схема, которая была применена к сотням изолятов бацилл (URL: <https://pubmlst.org/bcereus/>). Однако для *B. anthracis* данный метод применяется весьма ограниченно, так как он не обладает для этого вида достаточной разрешающей способностью.

1.4.4. MVLST-генотипирование

MVLST-генотипирование (Multi Virulence Locus Sequence Typing – мультилокусное сиквенс-типирование генов вирулентности) является одним из вариантов MLST. Суть метода заключается в сравнительном анализе последовательностей определенного набора генов вирулентности или генов, ассоциированных с вирулентностью, в отличие от MLST, где используются последовательности локусов, расположенных в генах домашнего хозяйства. Такой подход позволяет не только отнести штамм к тому или иному GT, но и исследовать мутации, приводящие к заменам аминокислот в белках, определяющих ключевые факторы патогенности того или иного вида микроорганизмов. В работах отечественных и зарубежных авторов применен метод MVLST-генотипирования или описан полиморфизм генов отдельных факторов патогенности у возбудителей ряда инфекционных заболеваний, таких как *Yersinia pestis* [19, 57, 104], *Vibrio cholerae* [165], *Listeria monocytogenes* [62], *Mycobacterium tuberculosis* [150], *Salmonella*

enterica [56], *Staphylococcus aureus* [180]. При этом, помимо описательных целей, авторы старались использовать полученные данные для уточнения внутривидовой филогенетической структуры изучаемого вида, сравнительной патогенности штаммов-носителей того или иного ST и для попыток связать ST с географическим происхождением штамма.

Но 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 [40, 99, 121, 171, 190]. Полиморфизм нуклеотидных последовательностей и аминокислотных последовательностей соответствующих белков в глобальной популяции *B. anthracis* остается малоизученным. Были опубликованы некоторые работы, в которых оценивался аллельный полиморфизм отдельных генов *B. anthracis* на основе немногочисленной выборки [138], или же приводится только показатель индекса биоразнообразия Симпсона для данного метода, без детального описания выявленных GT и их филогенетических отношений [72]. Также нам не удалось найти публикаций, в которых полиморфизм генов вирулентности *B. anthracis* оценивался с точки зрения корреляции результатов с другими генотипическими или фенотипическими признаками штаммов. В качестве единственной такой работы, которую нам удалось найти, можно упомянуть статью Okinaka с соавт. 2008 г. [130], в которой SNP 981A→T в последовательности гена *pagA* была предложена в качестве маркера подгруппы штаммов canSNP-группы A.Br.008/009.

Таким образом, аллельный полиморфизм факторов патогенности сибиреязвенного микроба остается на данный момент не изученным, а метод MVLST к данному микроорганизму практически не применяется. В то же время, именно полиморфизм генов факторов патогенности представляет особый интерес, так как эти гены кодируют детерминанты, непосредственно вовлеченные в развитие инфекционного процесса и во взаимодействие патогена с хозяином. Кроме того, эволюционная история *B. anthracis* как вида началась лишь после приобретения плазмид, несущих эти гены, следовательно, данные MVLST теоретически отражают историю вида. Таким образом, изучение полиморфизма генов факторов патогенности сибиреязвенного микроба может в некоторой степени приблизить нас к пониманию истории, механизма возникновения и эволюции вирулома *B. anthracis*. А использование MVLST в сочетании с другими, более распространенными схемами генотипирования, может способствовать более полному пониманию закономерностей эволюции сибиреязвенного микроба и распространения его отдельных внутривидовых групп по земному шару.

1.5. Заключение по обзору литературы

Сибирская язва – особо опасный зооантропоноз, вызываемый грамположительной спорообразующей бактерией *B. anthracis*. Патогенность сибиреязвенного микроба обеспечивается наличием двух плазмид вирулентности, которые несут гены синтеза токсина, поражающего хозяина, капсулы, защищающей микроорганизм от иммунного ответа, и гены регуляторов экспрессии генов токсино- и капсулообразования. Несмотря на то, что сибирская язва в последние десятилетия стала исчезающе редким в развитых странах явлением, за предшествующую историю *B. anthracis* успел довольно широко распространиться по планете. Для изучения внутривидовой структуры вида *B. anthracis* и выявления закономерностей распространения филогенетических групп в различных регионах или по планете в целом, используется ряд методов генотипирования. Наиболее широко для этого применяются методы *can*SNP- и *MLVA*-генотипирования. В то же время, метод *MVLST*, основанный на анализе последовательностей генов патогенности, для сибиреязвенного микроба не разработан и практически не применяется, а аллельный полиморфизм этих генов остается практически не описанным. Изучение полиморфизма генов патогенности и закономерностей распространения отдельных *MVLST*-GT в глобальной популяции сибиреязвенного микроба может помочь лучшему пониманию эволюции и филогеографии *B. anthracis*. Именно этой проблеме посвящена данная работа.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ¹

2.1. Штаммы микроорганизмов

В работе были исследованы 60 штаммов *B. anthracis* и 1 штамм *B. cereus* bv *anthracoid* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ и «ГКПМ-Оболенск», имеющие различное географическое происхождение, выделенные на территории СССР, РФ и сопредельных государств в период с 1940 по 2018 годы (Таблица 1). В качестве основной группы сравнения в выборку включены 58 штаммов *B. anthracis*, 1 штамм *B. cereus* biovar *anthracis* и 3 штамма *B. cereus*, геномы которых депонированы в базе данных GenBank (Таблица 2, № 1–62). Также для дополнительных сравнительных исследований в выборку включены последовательности геномов 84 штаммов *B. anthracis* (Таблица 2, № 63–146).

Таблица 1 – Перечень штаммов из «ГКПМ-Оболенск» и географические точки их выделения

№	Штамм *	Географическое происхождение	canSNP-группа
1	2	3	4
1	I-271	ЯНАО	A.Br.001/002
2	34(738)	Казахстан	A.Br.001/002
3	53169 (52/33)	НД**	A.Br.001/002
4	1259 (1273)	Ставропольский край	A.Br.008/011
5	1273 (53169)	Волгоградская обл.	A.Br.008/011
6	1(14) Stavropol	Украина	A.Br.008/011
7	1030/213	Карачаево-Черкессия	A.Br.008/011
8	1055/38	Самарская обл.	A.Br.008/011
9	1056/51	Ставропольский край	A.Br.008/011
10	219/6	Узбекистан	A.Br.008/011
11	367/17	Тульская обл.	A.Br.008/011
12	46/27	Чечено-Ингушетия	A.Br.008/011
13	47/28	Чечено-Ингушетия	A.Br.008/011
14	48/29	Чечено-Ингушетия	A.Br.008/011
15	531/17	Калмыкия	A.Br.008/011
16	546/714	Воронежская обл.	A.Br.008/011
17	555/288	Оренбургская обл.	A.Br.008/011

¹ П р и м е ч а н и е – Все представленные исследования проводили в соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и МУ 1.3.2569-2009 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
18	592/10	Молдавия	A.Br.008/011
19	644/268	Украина	A.Br.008/011
20	68/12	Азербайджан	A.Br.008/011
21	7(992)	Новгородская область	A.Br.008/011
22	8(2099)	Татарстан	A.Br.008/011
23	914/213	Чечено-Ингушетия	A.Br.008/011
24	LP50/3YA	Якутия	A.Br.008/011
25	LP51/4YA	Якутия	A.Br.008/011
26	1173(1183)	Ставропольский край	A.Br.008/011
27	1298	Волгоград	A.Br.008/011
28	52/33(1173)	Чечено-Ингушетия	A.Br.Aust94
29	1199(1259)	Дагестан	A.Br.Aust94
30	1183(1199)	Кабардино-Балкарская республика	A.Br.Aust94
31	331/214	Азербайджан	A.Br.Aust94
32	822/7	Чечено-Ингушетия	A.Br.Aust94
33	11(1940)	Туркменистан	A.Br.Vollum
34	15(1345)	Таджикистан	A.Br.Vollum
35	157(B-1107)	Эстония	B.Br.001/002
36	I-364	Сибирь	B.Br.001/002
37	LP53/5YA	Якутия	B.Br.001/002
38	Yamal_2	Ямал	B.Br.001/002
39	44	Н/Д**	B.Br.CNEVA
40	25/71	Дагестан	Н/Д
41	658/543	Воронежская область	Н/Д
42	474/635	Азербайджан	Н/Д
43	STI-1	Лабораторный штамм	A.Br.008/011
44	STI PR-3	Лабораторный штамм	Н/Д
45	Partec	Лабораторный штамм	Н/Д
46	STI-5	Лабораторный штамм	Н/Д
47	M-71R	Лабораторный штамм	Н/Д
48	M-71S	Лабораторный штамм	Н/Д
49	228/8	Лабораторный штамм	Н/Д
50	220 (Malachite)	Лабораторный штамм	Н/Д
51	34F2 Sterne	Лабораторный штамм	Н/Д
52	Lange-1	Лабораторный штамм	Н/Д
53	Lange-2	Лабораторный штамм	Н/Д
54	STI-3 (401 SU)	Лабораторный штамм	Н/Д
55	Ihtiman	Лабораторный штамм	Н/Д
56	71/12	Лабораторный штамм	Н/Д
57	Ames-delta	Лабораторный штамм	A.Br.Ames
58	STI-1-Rif4	Лабораторный штамм	Н/Д
59	55 VNIIVViM	Лабораторный штамм	Н/Д
60	Pasteur II	Лабораторный штамм	Н/Д
61	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracoid</i> Dakkar	Лабораторный штамм	Н/Д

П р и м е ч а н и я

1 * – Перечислены штаммы *B. anthracis*, если не указан другой вид.

2 ** – Н/Д – нет данных.

Таблица 2 – Перечень штаммов, геномы которых депонированы в базе данных GenBank

№	Штамм*	Географическое происхождение	canSNP-группа	Номер доступа в GenBank***
1	2	3	4	5
1	14RA5914	Германия	A.Br.001/002	GCA_002277915.1
2	A16	Китай	A.Br.001/002	GCA_000512835.2
3	Stendal	Германия	A.Br.001/002	GCA_001543225.1
4	Tangail-1	Бангладеш	A.Br.001/002	GCA_001654475.1
5	BFV	Ямайка	A.Br.001/002	GCA_000742875.1
6	FDAARGOS 341	США	A.Br.001/002	GCA_002208785.2
7	SPV842 15	Бразилия	A.Br.001/002	GCA_001990245.1
8	A16R	Китай	A.Br.001/002	GCA_000512775.2
9	Sterne	США	A.Br.001/002	GCA_000832635.1
10	BA1015	США	A.Br.003/004	GCA_000832665.1
11	V770-NP-1R	США	A.Br.003/004	GCA_000832785.1
12	A0135	Танзания	A.Br.005/006	SRR2968157
13	A2075	Танзания	A.Br.005/006	SRR2968187
14	K3	ЮАР	A.Br.005/006	GCA_000832465.1
15	CZC5	Замбия	A.Br.005/006	GCA_000534935.2
16	A2079	Танзания	A.Br.005/006	SRR2968188
17	H9401	Корея	A.Br.005/007	GCA_000258885.1
18	Larissa	Греция	A.Br.008/011	GCA_001277955.1
19	Turkey32	Турция	A.Br.008/011	GCA_000833275.1
20	PAK-1	Пакистан	A.Br.008/011	GCA_000832425.1
21	K1285	Намибия	A.Br.008/011	SRR2071843
22	Pasteur	Н/Д**	A.Br.011/009	GCA_000832585.1
23	Pollino	Италия	A.Br.011/009	GCA_000831505.1
24	London 499	Великобритания	A.Br.011/009	GCA_003227955.1
25	A1144	Аргентина	A.Br.011/009	GCA_000875715.1
26	Shikan-NIID	Япония	A.Br.Ames	GCA_002356575.1
27	Ames Ancestor	США	A.Br.Ames	GCA_000008445.1
28	A0248	США	A.Br.Ames	GCA_000022865.1
29	A2012	США	A.Br.Ames	GCA_000006155.2
30	Ohio ACB	США	A.Br.Aust94	GCA_000832505.1
31	Kanchipuram	Индия	A.Br.Aust94	GCA_014249775.1
32	A3716	Намибия	A.Br.Aust94	SRR2968149
33	52-G	Грузия	A.Br.Aust94	GCA_000559005.1
34	Ba-1802_12-Geo	Грузия	A.Br.Aust94	GCA_002025435.1
35	Ba-1897_12-Geo	Грузия	A.Br.Aust94	GCA_002025375.1
36	8903-G	Грузия	A.Br.Aust94	GCA_000558965.1
37	Kafkas-60	Турция	A.Br.Aust94	GCA_002896695.1
38	Kafkas-68	Турция	A.Br.Aust94	GCA_002896665.1
39	Kafkas-78	Турция	A.Br.Aust94	GCA_002896595.1
40	Kafkas-86	Турция	A.Br.Aust94	GCA_002896635.1
41	Kafkas-100	Турция	A.Br.Aust94	GCA_002896575.1
42	Kafkas-149	Турция	A.Br.Aust94	GCA_002896585.1
43	Kafkas-215	Турция	A.Br.Aust94	GCA_002896655.1
44	SK-102	США	A.Br.Vollum	GCA_000832565.1
45	Vollum 1B	США	A.Br.Vollum	GCA_000832445.1
46	Vollum	США	A.Br.Vollum	GCA_000742895.1

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
47	CDC 684	США	A.Br.Vollum	GCA_000021445.1
48	Canadian bison	Канада	A.Br.WNA	GCA_000833125.1
49	BA1035	ЮАР	B.Br.001/002	GCA_000832725.1
50	HYU01	Корея	B.Br.001/002	GCA_000725325.1
51	SVA11	Швеция	B.Br.001/002	GCA_000583105.1
52	Tyrol 4675	Австрия	B.Br.CNEVA	GCA_001936375.1
53	RA3	Франция	B.Br.CNEVA	GCA_000832745.1
54	BF1	Германия	B.Br.CNEVA	GCA_000295695.2
55	17OD930	Швейцария	B.Br.CNEVA	GCA_006088855.1
56	Kruger B	ЮАР	B.Br.Kruger	GCA_000167295.1
57	2002013094	США	C.Br.001	GCA_000832965.1
58	2000031021	США	C.Br.001	GCA_000742655.1
59	<i>B. cereus</i> BC-AK	Китай	-	GCA_002117465.1
60	<i>B. cereus</i> G9241	США	-	GCA_000832805.1
61	<i>B. cereus</i> 03BB102	США	-	GCA_000022505.1
62	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	Кот-д'Ивуар	-	GCA_000143605.1
63	2000031027	США	A.Br. Aust94	SRR1739963
64	2000032893	США	A.Br. Aust94	SRR2339639
65	2002734034	США	A.Br. Aust94	SRR2340252
66	2002734153	США	A.Br. Aust94	SRR2340480
67	2002734167	США	A.Br. Aust94	SRR5811018
68	2002734054	США	A.Br. Aust94	SRR5811121
69	2002734036	США	A.Br. Aust94	SRR5811124
70	2002734037	США	A.Br. Aust94	SRR5811125
71	2002013170	США	A.Br. Aust94	SRR2339643
72	2002721571	США	A.Br. Aust94	SRR2340230
73	K2	Намибия	A.Br.Aust94	GCA_001677295
74	K1	Намибия	A.Br.Aust94	GCA_001677305
75	2000031103 (Strain 32)	Великобритания	A.Br.Aust94	GCA_003367985
76	2007740863 (SK57)	Великобритания	A.Br.Aust94	GCA_003368005
77	BA_104	Япония	A.Br.Aust94	DRR000184
78	BA_104	Япония	A.Br.Aust94	DRR000186
79	BA105	Япония	A.Br.Aust94	DRR128184
80	1409	Дания	A.Br.Aust94	ERR930300
81	K2883	Индия	A.Br.Aust94	SRR2071849
82	K4834	Австралия	A.Br.Aust94	SRR2071866
83	2002721539	ЮАР	A.Br.Aust94	SRR2339898
84	2002734039	Великобритания	A.Br.Aust94	SRR2340304
85	A0088	ЮАР	A.Br.Aust94	SRR2968133
86	A0002	Турция	A.Br.Aust94	SRR2968144
87	A0656	КНР	A.Br.Aust94	SRR2968145
88	A0659	КНР	A.Br.Aust94	SRR2968146
89	A0083	Германия	A.Br.Aust94	SRR2968155
90	A0252	Зимбабве	A.Br.Aust94	SRR2968160
91	A0455	Мозамбик	A.Br.Aust94	SRR2968165
92	2000031009	Таиланд	A.Br.Aust94	SRR5811187
93	COVASU	Индия	A.Br.Vollum	GCA_003045745
94	2000031008	США	A.Br.Vollum	SRR1739961

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
95	2002734255	США	A.Br.Vollum	SRR2339356
96	2002734264	США	A.Br.Vollum	SRR2339406
97	2002734276	США	A.Br.Vollum	SRR2339549
98	2002013132	Пакистан	A.Br.Vollum	SRR2339634
99	A0363	Норвегия	A.Br.Vollum	SRR2968161
100	A0380	Ирландия	A.Br.Vollum	SRR2968162
101	A0615	КНР	A.Br.Vollum	SRR2968173
102	2002734049	Великобритания	A.Br.Vollum	SRR5811120
103	Brazilian Vaccinal	Бразилия	A.Br.001/002	GCA_002007035
104	2000032979	США	A.Br.001/002	SRR1739979
105	2011218264	США	A.Br.001/002	SRR5811142
106	ANSES_08-07	Франция	A.Br.001/002	ERR1596542
107	ANSES_08-09	Франция	A.Br.001/002	ERR1596543
108	ANSES_08-10	Франция	A.Br.001/002	ERR1596544
109	ANSES_08-11	Франция	A.Br.001/002	ERR1596545
110	ANSES_08-13	Франция	A.Br.001/002	ERR1596546
111	ANSES_08-14	Франция	A.Br.001/002	ERR1596547
112	ANSES_08-15	Франция	A.Br.001/002	ERR1596548
113	ANSES_08-16	Франция	A.Br.001/002	ERR1596549
114	ANSES_08-19	Франция	A.Br.001/002	ERR1596550
115	ANSES_08-20	Франция	A.Br.001/002	ERR1596551
116	ANSES_08-21-1	Франция	A.Br.001/002	ERR1596552
117	ANSES_08-21-2	Франция	A.Br.001/002	ERR1596553
118	ANSES_08-21-3	Франция	A.Br.001/002	ERR1596554
119	ANSES_08-22-2	Франция	A.Br.001/002	ERR1596555
120	ANSES_08-24	Франция	A.Br.001/002	ERR1596556
121	ANSES_08-25	Франция	A.Br.001/002	ERR1596557
122	ANSES_08-26	Франция	A.Br.001/002	ERR1596558
123	ANSES_08-27	Франция	A.Br.001/002	ERR1596559
124	ANSES_08-28	Франция	A.Br.001/002	ERR1596560
125	ANSES_08-29	Франция	A.Br.001/002	ERR1596561
126	ANSES_11-04	Франция	A.Br.001/002	ERR1596590
127	strain C (DK9)	Дания	A.Br.001/002	ERR930304
128	K929	Дания	A.Br.001/002	ERR930299
129	2008725092	Бангладеш	A.Br.001/002	SRR5810961
130	2008724724	Бангладеш	A.Br.001/002	SRR5811059
131	2008724999	Бангладеш	A.Br.001/002	SRR5811137
132	2008724997	Бангладеш	A.Br.001/002	SRR5811143
133	2008724832	Бангладеш	A.Br.001/002	SRR5811158
134	3000015248	Бангладеш	A.Br.001/002	SRR5811175
135	3000015250	Бангладеш	A.Br.001/002	SRR5811176
136	3000015251	Бангладеш	A.Br.001/002	SRR5811188
137	ANSES_052 (CIP 53.169)	Франция	A.Br.001/002	ERR1841046
138	ANSES_054 (CIP 81.89)	Франция	A.Br.001/002	ERR1841047
139	ANSES_058 (CIP A211)	Франция	A.Br.001/002	ERR1841049
140	strain A	Дания	A.Br.001/002	ERR930302
141	strain B (DK8)	Дания	A.Br.001/002	ERR930303
142	2002734373	Гонконг	A.Br.001/002	SRR5811212

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
143	A0389 (ABLB)	Индонезия	A.Br.001/002	GCA_000219895
144	2000031042	Пакистан	A.Br.001/002	SRR5811167
145	KZ-174	Казахстан	B.Br.001/002	SRR16079480
146	KZ-178	Казахстан	B.Br.001/002	SRR16079479
<p>П р и м е ч а н и я 1 * – Перечислены штаммы <i>B. anthracis</i>, если не указан другой вид. 2 ** – Н/Д – нет данных. 3 *** – Номер доступа к последовательности генома или к архиву с необработанными результатами полногеномного секвенирования.</p>				

2.2. Среды и условия культивирования

Культуры штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* рассеивали до единичных колоний и выращивали на плотной питательной среде ГРМ-агар (состав: панкреатический гидролизат рыбной муки – 12 г/л, пептон сухой ферментативный – 12 г/л; NaCl – 6 г/л; агар микробиологический – 10 г/л) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) при температуре 37 °С в течение 12 часов. Морфологию колоний оценивали путем микроскопии с использованием микроскопа «Биолам П 2-1» (Scorica, Россия) (окуляр – 10×, объектив – 10×).

Для получения спорных культур штаммов использовали голодный агар (пептон – 5 г/л, дрожжевой экстракт 2,5 г/л, NaCl – 5 г/л, агар микробиологический – 15 г/л). Споровые суспензии *B. anthracis* готовили в забуференном физиологическом растворе с использованием стандарта мутности ОСО 42-28-85-2012 (ФГБУ НЦЭСМП, Россия).

2.3. Эксперименты с животными

2.3.1. Лабораторные животные

В работе использованы беспородные белые мыши, мыши линии DBA и нелинейные морские свинки из вивария ФБУН ГНЦ ПМБ в соответствии с требованиями к качеству лабораторных грызунов и условиям их содержания [8]. Все протоколы экспериментов на животных были одобрены комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ. Работы выполняли в соответствии с руководством и правилами Евросоюза по обращению, уходу и защите лабораторных животных (URL: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

2.3.2. Определение вирулентности штаммов *B. anthracis*

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 десятикратных разведений споровых суспензий исследуемых культур в изотоническом растворе хлорида натрия (0,9 % NaCl) в объеме 0,2 мл на животное. 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 в том числе и выживших животных, для которых время жизни определяли как 21 день (время наблюдения). Данный показатель был введен для более наглядной демонстрации различий между группами в количестве выживших и умерших животных.

2.3.3. Иммунизация животных

Иммунизацию морских свинок (60 штук) проводили препаратом рекомбинантного протективного антигена PA63 в дозе 100 мкг белка/свинку, подкожно, двукратно с интервалом 21 сутки. Заражение морских свинок проводили для оценки протективности белка PA63 на 28 сутки после иммунизации животных.

2.4. Молекулярно-биологические методы

2.4.1. Выделение геномной ДНК и приготовление термолизатов

Выделение ДНК осуществляли с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, США). Приготовление термолизатов осуществляли следующим образом: была приготовлена взвесь биомассы ночных культур в физиологическом растворе до концентрации 1×10^9 кл/мл и проинкубирована в течение 30 минут при температуре 94 °С. Супернатант отделяли путем центрифугирования при скорости вращения 7000 об/мин в течение 10 мин и использовали для дальнейших манипуляций (как источник матрицы ДНК). Обеззараживание материала осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-2009 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

2.4.2. Секвенирование

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

Reagent Kit v3» (Illumina, США), «Ion PGM Reagents 400 Kit», «Ion 318 Chip Kit» (Thermo Fisher Scientific, США).

2.4.3. Полимеразная цепная реакция

Реакции амплификации фрагментов ДНК 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 полимеразы» (Евроген, Россия) согласно инструкциям производителей. В качестве источника ДНК-матрицы добавляли термолизаты культур исследуемых штаммов (5-20 нг ДНК). Продукты реакции разделяли путем электрофореза в 0,7–3 % агарозном геле (Sigma-Aldrich, США) в 1× ТАЕ-буфере (0,04 М Трис-(гидрокси-симетил) аминотетан, 1 мМ ЭДТА, 0,02 М уксусная кислота, pH 8,4) или 0,5× ТВЕ-буфере (44,5 мМ Трис-(гидрокси-симетил) аминотетан, 44,5 мМ борная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8,3), с последующим окрашиванием бромистым этидием (100 мг/л). Детекцию результатов проводили с использованием трансиллюминатора «ECX-15.L» (Vilber Lourmat, Франция) при длине волны 365 нм, и системы гель-документирования «Взгляд» (Хеликон, Россия), а также программного обеспечения «IC Measure» (Imaging Source Europe GmbH, Германия). Либо о наличии продукта судили по анализу кривой амплификации по оптическому каналу SYBR/FAM.

2.4.4. Праймеры

Последовательности праймеров, используемых для дифференцирования *B. anthracis* от близкородственных видов бацилл и определения плазмидного профиля штамма путем ПЦР-анализа приведены в Таблице 3. Последовательности праймеров, используемых для MLVA-генотипирования, приведены в Таблице 4. Праймеры были синтезированы научно-производственной компанией «Синтол» (Россия).

Таблица 3 – Праймеры для видовой дифференциации и определения плазмидного профиля штамма *B. anthracis*

Локус	Последовательность 5'→3'	
	Прямой	Обратный
<i>alo</i>	GCCGGTAATGCAACTGGTGCAAT	CCGTTTGAATTGATACTCTCTTTCGGAGTA
<i>plcR</i>	GCGCATTATACTTGGACAATCAATACGCAT	CGAAAAAGAAGTAAGCTTTTTCGTAAGCATC
<i>pagA</i>	ATGACCAAGAAGTGATTAATAAAGCTTCTA	TGCCTCTGGTGATACATTCTTATCAAT
<i>lef</i>	GTAACAAATTACTTAGTTGATGGTAATGGA	TGAGTTAATAATGAACCTTAATCTGATCGTT
<i>capC</i>	ATGTTTGGATCAGATTTATATATTGCATTA	GTAATAAATATTCATGATTGCAAATGTTGC
<i>capD</i>	GAGGAAGGTATGAAAGTATTAAGAACGGT	GTCTGGATAAGTGTTTCTCCAGTTTCAATA

Таблица 4 – Праймеры для MLVA-генотипирования

Локус	Наименование праймера	Последовательность 5'→3'
1	2	3
<i>vrrA</i>	<i>vrrA</i> -F	CACAACCTACCACCGATGGCACA
	<i>vrrA</i> -R	GCGCGTTTCGTTTGATTCATAC
<i>vrrB1</i>	<i>vrrB1</i> -F	ATAGGTGGTTTTCCGCAAGTTATTC
	<i>vrrB1</i> -R	GATGAGTTTGATAAAGAATAGCCTGTG
<i>vrrB2</i>	<i>vrrB2</i> -F	CACAGGCTATTCTTTATCAAACCTCATC
	<i>vrrB2</i> -R	CCCAAGGTGAAGATTGTTGTTGA
<i>vrrC2</i>	<i>vrrC2</i> -F	CCAGAAGAAGTGGAACCTGTAGCAC
	<i>vrrC2</i> -R	GTCTTTCCATTAATCGCGCTCTATC
<i>bams01</i>	<i>bams01</i> -F	GTTGAGCATGAGAGGTACCTTGTCCTTTTT
	<i>bams01</i> -R	AGTTCAAGCGCCAGAAGGTTATGAGTTATC
<i>bams03</i>	<i>bams03</i> -F	GCAGCAACAGAAAACCTTCTCTCCAATAACA
	<i>bams03</i> -R	TCCTCCCTGAGAAGTCTATCACCTTTAAC
<i>bams05</i>	<i>bams05</i> -F	GCAGGAAGAACAAAAGAACTAGAAAGAGCA
	<i>bams05</i> -R	ATTATTAGCAGGGGCCTCTCCTGCATTACC
<i>bams21</i>	<i>bams21</i> -F	TGTAGTGCCAGATTTGTCTTCTGTA
	<i>bams21</i> -R	CAAATTTTGAGATGGGAGTTTACT
<i>bams22</i>	<i>bams22</i> -F	ATCAAAAATTCTTGGCAGACTGA
	<i>bams22</i> -R	ACCGTTAATTCACGTTTAGCAGA

Продолжение таблицы 4

1	2	3
bams23	bams23-F	CGGTCTGTCTCTATTATTCAGTGGT
	bams23-R	CCTGTTGCTCCTAGTGATTTCTTAC
bams24	bams24-F	CTTCTACTTCCGTACTTGAAATTGG
	bams24-R	CGTCACGTACCATTTAATGTTGTTA
bams25	bams25-F	CCGAATACGTAAGAAATAAATCCAC
	bams25-R	TGAAAGATCTTGAAAAACAAGCATT
bams28	bams28-F	CTCTGTTGTAACAAAATTTCCGTCT
	bams28-R	TATTAAACCAGGCGTACTTACAGC
bams34	bams34-F	CAGCAAAATCAATCGAATCAAA
	bams34-R	TGTGCTAAATCATCTTGCTTGG
bams44	bams44-F	GCGAATTAATTGCTCCTCAAAT
	bams44-R	GCACTTGAATATTTGGCGGTAT
bams51	bams51-F	ATTCCTGAGCAGGTTGTGTT
	bams51-R	TGCATCTAACAATGCAGAACAA
VNTR23	VNTR23-F	TTTAGAAACGTTATCACGCTTA
	VNTR23-R	GTAATACGTATGGTTCATTCCC

2.4.5. Определение плазмидного профиля штамма *B. anthracis* и его дифференцирование от близкородственных видов бацилл

Для подтверждения видовой принадлежности штамма *B. anthracis* использовали набор праймеров, комплементарных участкам генов с хромосомной (*plcR*, *alo*) и плазмидной рХО1- (*pagA*, *lef*) и рХО2- (*capC*, *capD*) локализацией, разработанный в лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН ГНЦ ПМБ, с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [3].

Анализ включал 6 ПЦР-реакций для каждого штамма с использованием 6-ти пар праймеров (Таблица 3). Положительным результатом анализа считали пробы, которые детектируются до 35 цикла. Во время проведения ПЦР-РВ происходила амплификация шести локусов, являющихся участками генов, расположенных на каждом из трех элементов генома *B. anthracis*. Амплификация по этим локусам позволяет дифференцировать штамм *B. anthracis* от близкородственных видов бацилл и выявить наличие плазмид рХО1 и рХО2 в составе его генома. Наличие экспоненциального накопления продукта по локусам *plcR* и *alo* свидетельствовало о принадлежности штамма к виду *B. anthracis*. Аналогично для определения плазмидного профиля (наличие/отсутствие плазмиды) исследуемых штаммов *B. anthracis* оценивали результаты амплификации по локусам *pagA* и *lef* (рХО1), и *capC* и *capD* (рХО2). Отсутствие одной или обеих плазмид вирулентности свидетельствовало о том, что штамм *B. anthracis* является аттенуированным при условии положительного результата по локусам *plcR* и *alo*.

2.4.6. MVLST-генотипирование

В соответствии с референсным геномом *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: GCA_000008445.1) описывали выявленные мутации и их координаты в следующих генах факторов патогенности: *pagA*, *lef*, *суа*, *capA*, *capB*, *capC*, *capD*, *capE*, *atxA*, *асрА*, *асрВ* у штаммов *B. anthracis* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы и штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*, геномы которых депонированы в базе данных GenBank. В соответствии с полученными результатами исследуемую выборку разделяли на ST, а при филогенетическом анализе слитых последовательностей исследуемых генов плазмид рХО1 и рХО2 – на GT.

2.4.7. CanSNP-генотипирование

CanSNP-генотипирование проводили в соответствии с работами [30, 93] по 14-ти canSNP-локусам по результатам полногеномного секвенирования. Определение canSNP-группы и эволюционной линии осуществляли в соответствии с Таблицей 5.

Таблица 5 – Определение canSNP-группы штамма *B. anthracis*

canSNP	canSNP-группа														
	Позиция в геноме*	C.Br.A1055	B.Br.Kruger B	B.Br.001/002	B.Br.CNEV A	A.Br.Ames	A.Br.001/002	A.Br.Aust94	A.Br.003/004	A.Br.Vollum	A.Br.005/006	A.Br.008/009	A.Br.008/011	A.Br.011/009	A.Br.WNA
A.Br.001	182106	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T
A.Br.002	947760	G	G	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G
A.Br.003	1493280	A	A	A	A	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A
A.Br.004	3600786	T	T	T	T	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T
A.Br.006	162509	C	C	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A.Br.007	266439	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
A.Br.008	3947375	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	G	G	G
A.Br.009	2589947	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G
B.Br.001	1455402	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
B.Br.002	1056740	G	T	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
B.Br.003	1494392	G	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
B.Br.004	69952	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
A/B.Br.001	3698013	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A.Br.011	2552486	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A

П р и м е ч а н и е – * – в геноме референсного штамма Ames Ancestor (GenBank: GCA_000008445.1)

2.4.8. MLVA-генотипирование

MLVA-генотипирование осуществляли согласно протоколу, описанному в работе [107] по 17 MLVA-маркерам [95, 107, 112, 166, 176]: *vrrA*, *bams03*, *bams05*, *bams22*, *bams34*, *bams44*, *VNTR23*, *vrrC2*, *bams01*, *bams21*, *bams23*, *bams24*, *bams25*, *bams28*, *bams51*, *vrrB1*, *vrrB2*. Генотипирование штамма включало 17 ПЦР-реакций с каждой парой MLVA-праймеров, представленных в таблице 4.

Регистрацию результатов проводили путем электрофореза в 2–3 % агарозном геле и 0,5× TBE-буфере с использованием трансиллюминатора «ECX-F15.L» (Vilber Lourmat, Франция) при длине волны 365 нм и системы гель-документирования «Взгляд» (Хеликон, Россия), а также программного обеспечения «IC Measure» (Imaging Source Europe GmbH, Германия). Размер фрагмента определяли по маркерам молекулярных масс в зависимости от размера повторяющегося участка: «GeneRuler 50 bp DNA Ladder» (Thermo Fisher Scientific, США); «GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder» (Thermo Fisher Scientific, США); «EZ Load 20 bp Molecular Ruler» (Bio-Rad, США) с использованием программы «PhotoCamptMw 99.04» (VilberLourmat, Франция). В качестве референсного штамма для сравнения длин фрагментов использовали *B. anthracis* Pasteur II («ГКПМ-Оболенск»). Полученные размеры ампликонов переводили в количество tandemных повторов для данного локуса, как описано в работе [166] и в соответствии с Таблицей 6. В результате получали MLVA-профили штаммов.

Таблица 6 – Определение ожидаемой длины VNTR-локуса в соответствии с числом повторов

VNTR-локус	Длина повтора (п.н.)	Число повторов	Ожидаемая длина ампликона (п.н.)	Число повторов у <i>B. anthracis</i> Pasteur II
1	2	3	4	5
bams03	15	24	520	30
		26	550	
		27	565	
		28	580	
		30	610	
		35	685	
bams05	39	5	307	6
		6	346	
		7	385	
bams22	36	11	555	16
		14	663	
		15	699	
		16	735	
		21	915	
bams34	39	7	307	10
		10	424	
		12	502	
		14	619	

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5
bams44	39	3	222	8
		6	339	
		8	417	
VNTR23	12	2	173	4
		3	185	
		4	197	
		5	209	
vrrA	12	9	302	10
		10	314	
		11	326	
bams21	45	9	631	10
		10	676	
bams23	42	9	567	11
		10	609	
		11	651	
		12	693	
bams24	42	8	469	11
		9	511	
		10	553	
		11	595	
bams25	15	12	376	13
		13	391	
		14	406	
vrrC2	18	13	464	21
		17	532	
		21	600	
vrrB1	9	15	220	16
		16	229	
		19	256	
vrrB2	9	5	144	7
		6	153	
		7	162	
		8	171	
		9	180	
bams51	45	6	358	9
		9	493	
bams01	21	8	317	13
		12	401	
		13	422	
		14	443	
		16	485	
bams28	24	6	304	15
		10	400	
		12	448	
		14	496	
		15	520	

2.4.9. MLST-генотипирование

Для MLST-генотипирования была использована схема, описанная в работе Priest с соавт. в 2004 г. [139]. Были получены сборки последовательностей следующих локусов: *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *rusA*, *tpi* у исследуемой выборки. В качестве референсного генома использовали геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: GCA_000008445.1), в соответствии с которым описывали выявленные мутации и их координаты. Полученным последовательностям локусов присваивали номера аллелей в соответствии с сервисом базы данных PubMLST. На основе комбинации номеров аллелей локусов определяли ST штаммов в соответствии с работой [139].

2.5. Биоинформационный анализ

Сборки последовательностей плазмид pXO1 и pXO2, хромосомных гена *alo*, *canSNP*-локусов и MLST-локусов по результатам полногеномного секвенирования осуществляли с использованием программного пакета Lasergene (DNASTAR, США) (URL: <https://www.dnastar.com/>). В качестве референсного генома, на последовательность которого осуществляли сборку, использовали геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: GCA_000008445.1).

Поиск интересующих нуклеотидных последовательностей штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*, геномы которых депонированы в GenBank, проводили с использованием программы BLAST (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Трансляцию *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные и множественные выравнивания осуществляли с помощью программного пакета MEGA 7.0 (URL: <http://www.megasoftware.net>).

Филогенетический анализ осуществляли с помощью программного пакета MEGA 7.0 и PHYLONiZ 2.0 [125]. Филогенетические деревья (дендрограммы) были построены с использованием метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA) или *goeBURST*-алгоритма [78]. Для филогенетического анализа штаммов методами MLST- и MVLST-генотипирования использовали слитые *in silico* последовательности интересующих локусов выявленных ST исследуемой выборки.

2.6. Статистический анализ

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. URL:

<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Стандартные отклонения P менее чем 0,05 считали статистически значимыми. Индекс биоразнообразия Симпсона рассчитывали с помощью программы PHYLOVIZ 2.0 [125].

Глава 3. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

На первом этапе мы провели генотипирование штаммов *B. anthracis* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ и штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*, геномы которых депонированы в GenBank, включенных в выборку в качестве группы сравнения (Таблицы 1 и 2). Все полученные в данной главе результаты систематизированы в приложении А.

3.1. canSNP-типирование

Как было указано выше, canSNP-типирование используется для определения принадлежности штамма *B. anthracis* к основным эволюционным линиям и canSNP-группам и применяется на первом этапе иерархического генотипирования [93]. Этот метод позволяет реконструировать основные эволюционные тенденции вида *B. anthracis*.

В данном параграфе для определения принадлежности 99 исследуемых штаммов к canSNP-группам мы оперировали данными полногеномного секвенирования, а в ряде случаев и аннотированными последовательностями геномов, депонированных в базе данных GenBank. Нами были использованы 14 диагностически-значимых canSNP, описанных в работах [93, 176]. Данные о canSNP-группе исследованных штаммов, как самый важный генотипический признак, указаны в Таблицах 1 и 2. В выборку не были включены штаммы *B. cereus*, так как используемые canSNP применяются только для генотипирования вида *B. anthracis*.

3.2. MLVA-генотипирование

MLVA является одним из наиболее высокоразрешающих методов генотипирования штаммов *B. anthracis* и используется на втором этапе иерархического генотипирования [93]. В данном параграфе работы мы провели MLVA для 39 вирулентных и 19 аттенуированных штаммов *B. anthracis* и одного штамма *B. cereus* bv. *anthracoid* из рабочей коллекции. Поскольку особенностью подхода является отсутствие необходимости результатов секвенирования, мы смогли провести генотипирование и аттенуированных штаммов, хотя на настоящий момент полногеномный сиквенс доступен только для одного вакцинного штамма – STI-1. Работа сочетает несколько ранее предложенных вариантов методики MLVA сибиреязвенного микроба [95, 107, 112, 166].

Так как аттенуированные штаммы *B. anthracis*, как правило, не имеют одной или обеих плазмид вирулентности, считается, что к ним не применимы системы MLVA, включающие

VNTR-локусы, расположенные на этих плаزمидах, хотя другими авторами проводились исследования штаммов, имеющих разный набор плазмид вирулентности [1, 5, 14, 21, 119, 152]. Кроме того, плазмидные VNTR-локусы имеют небольшой размер повтора, в связи с чем не применимы для исследования с использованием агарозного геля [95]. Поэтому, нами было принято решение не включать VNTR-локусы, локализованные на плазмидах рХО1 и рХО2. Помимо этого мы исключили из анализа локусы с маленьким размером tandemного повтора, так как размер повторяющегося участка менее девяти п.н. не позволяет с достаточной точностью и воспроизводимостью дифференцировать аллели локусов, различающиеся между собой, и определять в них число tandemных повторов.

Мы проводили MLVA-типирование, основываясь на 17 агарозо-совместимых локусах: *vrrA*, *bams03*, *bams05*, *bams22*, *bams34*, *bams44*, *VNTR23*, *vrrC2*, *bams01*, *bams21*, *bams23*, *bams24*, *bams25*, *bams28*, *bams51*, *vrrB1*, *vrrB2*. Упомянутая в обзоре литературы схема MLVA7, согласно предложенной в работе [166] идее, была использована нами в качестве анализа первой линии. Благодаря небольшому количеству анализируемых локусов MLVA7 позволяет проводить типирование нескольких десятков изолятов в течении одного рабочего дня, что оказалось крайне важным при проведении эпидрасследования вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 г. и при анализе содержащего *B. anthracis* материала, полученного при палеонтологических раскопках котят пещерного льва в Якутии в 2016-2017 гг. [167]. Несмотря на использование всего семи VNTR-локусов, MLVA7 показала довольно высокую разрешающую способность. Индекс биоразнообразия Симпсона при применении этой схемы для исследованной выборки составил 0,9439: [0,9195÷0,9682].

С целью получить более высокое разрешение, схема MLVA7 была дополнена десятью другими агарозо-совместимыми VNTR-локусами (*vrrC2*, *bams01*, *bams21*, *bams23*, *bams24*, *bams25*, *bams28*, *bams51*, *vrrB1*, *vrrB2*). Эта схема была названа MLVA17. Однако, несмотря на использование дополнительных локусов, разрешающая сила метода возрастает не столь значительно, а индекс Симпсона для MLVA17 равняется 0,9649 [0,9413÷0,9885]. Результаты MLVA-генотипирования представлены в Таблице 7 и приложениях А и В.

Таблица 7 – Выявленные MLVA7-генотипы

№ MLVA7-генотип	Перечень штаммов	Количество штаммов
1	2	3
GT1	228/8, STI-5, M-71R, 55 VNIIVViM, PARTEC, STI PR-3, STI-1, 592/10	8
GT2	Ihtiman, STI-3 (401 SU), 47/28, LP50/3YA, 1056/51, 1030/213, 48/29, 531/17	8
GT3	822/7, 1173, 914/213, LP51/4YA, 53169, 8(2099)	6
GT4	Pasteur 2, Lange-1, Lange-2, 15(1345), 11(1940)	5
GT5	STI-1-Rif4, 1298, 1183, 546/714	5

Продолжение таблицы 7

1	2	3
GT6	71/12, M-71S, 219/6	3
GT7	220 (Малахит), 34F2 Sterne	2
GT8	68/12, 367/17	2
GT9	I-271, 34(738)	2
GT10	644/268, 1055/38	2
GT11	LP53/5YA, Yamal_2	2
GT12	7(992), 555/288	2
GT13	157(B-1107)	1
GT14	1(14) Stavropol	1
GT15	52/33	1
GT16	1259	1
GT17	331/214	1
GT18	I-364	1
GT19	1199	1
GT20	46/27	1
GT21	1273	1
GT22	44	1
GT23	V-770 NP1R	1
GT24	Ames-delta	1
GT25	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracoid</i> Dakkar	1

3.3. MLST-генотипирование

В данном параграфе мы провели MLST-генотипирование выборки, состоящей из 98 штаммов *B. anthracis* и 4 штаммов *B. cereus* по наиболее широко используемой схеме MLST, предложенной в работе Priest с соавт. в 2004 г. [139].

В связи с необходимостью использования в данном подходе нуклеотидных последовательностей интересующих локусов, мы провели MLST-генотипирование 40 штаммов *B. anthracis* из «ГКПМ-Оболensk», для которых осуществлено полногеномное секвенирование. Также мы включили в выборку 62 штамма *B. anthracis* и *B. cereus*, геномы которых депонированы в базе данных GenBank. Для большинства из них в базе данных PubMLST указаны номера MLST-ST. В случае их отсутствия в базе, мы провели для них MLST-генотипирование *in silico*.

На основе данных секвенирования нового поколения получены сборки последовательностей локусов, используемых для MLST-генотипирования по Priest с соавт. [139]. Выявленным аллелям локусов каждого штамма присвоены номера в соответствии с сервисом PubMLST. На основе комбинации аллелей штамм был отнесен к тому или иному ST в соответствии с тем же сервисом. Результаты представлены в Таблице 8. В исследованной выборке среди штаммов из «ГКПМ-Оболensk» обнаружены два ранее описанных ST:ST1 и ST3. Среди штаммов *B. anthracis*

из GenBank обнаружено 4 ранее описанных ST (ST1, ST2, ST3, ST933), а среди четырех штаммов *B. cereus* – 3 ST (ST11, ST78, ST935).

К сожалению, в связи с отсутствием данных полногеномного секвенирования 19 аттенуированных штаммов нашей коллекции, за исключением STI-1, мы не смогли применить в их отношении используемый здесь метод. Однако, согласно PubMLST, к ST1 относился и вакцинный штамм *B. anthracis* 55-VNIIVViM (GenBank: GCA_001835485.1), с полученным в другой работе MLST-профилем, а штамм V770-NP-1R отнесен к ST2 [139].

Таблица 8 – Выявленные MLST-профили и MLST-сиквенс-типы

Перечень штаммов*	Аллельный профиль							ST	Кол-во штаммов
	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>pur</i>	<i>pusA</i>	<i>tpi</i>		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ames Ancestor, 1173, 1183, 1199, 1259, 1273, 1298, 53169, 1(14) Stavropol, 1030/213, 1055/38, 1056/51, 11(1940), 15(1345), 219/6, 331/214, 34(738), 367/17, 46/27, 47/28, 48/29, 52/33, 531/17, 546/714, 555/288, 592/10, 644/268, 68/12, 7(992), 8(2099), 822/7, 914/213, I-271, LP50/3YA, LP51/4YA, STI-1, 14RA5914, A16, A16R, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, FDAARGOS 341, SPV842 15, Sterne, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, K3, Turkey32, Pollino, Vollum, A0248, CDC 684, A2012, London_499, Tangail-1, H9401, PAK-1, BFV, CZC5, Kanchipuram, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	1	1	1	1	1	1	1	1	81
BA1015, V770-NP-1R	1	1	2	1	1	2	1	2	2
44, 157(B-1107), I-364, LP53/5YA, Yamal_2, BF1, 17OD930, Tyrol 4675, BA1035, RA3, HYU01, SVA11, Kruger B	2	1	1	1	1	1	1	3	13
2002013094, 2000031021	65	1	1	1	1	1	1	933	2
<i>B. cereus</i> 03BB102	34	1	32	1	33	37	24	11	1
<i>B. cereus</i> BC-AK, <i>B. cereus</i> G9241	24	22	33	37	34	38	5	78	2

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	34	1	83	1	18	29	5	935	1
Примечание – * – Перечислены штаммы <i>B. anthracis</i> , если не указан другой вид									

3.4. Заключение по главе 3

На первом этапе определена принадлежность 99 исследуемых штаммов *B. anthracis* к одной из основных эволюционных линий (А, В и С) и одной из 14-ти canSNP-групп в рамках этих линий [93, 176] на основе анализа данных полногеномного секвенирования. 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.

На следующем этапе в рамках иерархической схемы генотипирования [93] проведено MLVA-типирование 39 вирулентных и 19 аттенуированных штаммов *B. anthracis*, и одного штамма *B. cereus* bv. *anthracoid* из коллекции «ГКПМ-Оболенск» (всего 59 штаммов), с использованием 17 хромосомных VNTR-локусов, 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 локусов. По результатам MLVA7 выборка разделена на 25 MLVA7-GT, а 13 штаммов из 59 имеют индивидуальные MLVA7-GT. Для более высокого разрешения MLVA7 дополнена десятью другими VNTR-локусами (MLVA17). При использовании 17 локусов в выборке выявлено 35 MLVA17-GT, а 22 штамма имеют индивидуальный MLVA17-GT. При этом индекс биоразнообразия Симпсона MLVA17 составил $D = 0,9649 [0,9413 \div 0,9885]$. Таким образом, схема MLVA7 показала разрешающую способность, сравнимую с MLVA17 [166].

На основе данных секвенирования нового поколения проведено MLST-генотипирование выборки из 98 штаммов *B. anthracis* и 4 штаммов *B. cereus* по схеме, предложенной в работе [139]. 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).

ГЛАВА 4. ОПИСАНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

В этой главе описан аллельный полиморфизм генов факторов патогенности сибиреязвенного микроба, локализованных на плаزمидах рХО1 и рХО2, а также хромосомного гена *alo*, на основе данных полногеномного секвенирования. В изучаемые выборки вошли штаммы, депонированные в рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ и «ГКПМ-Оболенск», и штаммы, аннотированные геномы и/или архивы с данными полногеномного секвенирования которых депонированы в GenBank (Таблица 1). В выборки по возможности включены наиболее генетически отличающиеся между собой штаммы, выделенные в разных регионах мира. Так как в работе используются в том числе и аттенуированные штаммы, лишенные плазмид рХО1 и/или рХО2, а также по причине того, что качество результатов полногеномного секвенирования в ряде случаев не позволяет определить последовательность некоторых генов, выборки штаммов, использованных в анализе полиморфизма тех или иных наборов генов, несколько отличаются между собой. Все полученные в данной главе результаты систематизированы в приложении А.

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

В данном параграфе мы описали аллельный полиморфизм генов синтеза протективного антигена, отечного и летального факторов, и регулятора их экспрессии *AtxA*, локализованных на плазмиде рХО1. Мы использовали выборку из 96 штаммов и геномов *B. anthracis*, а также трех геномов неантрацидных штаммов, обладающих рХО1-подобной плазмидой – двух *B. cereus* и одного *B. cereus* *bv. anthracis*.

В исследованной выборке, состоящей из 99 геномов штаммов, 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 два ST *atxA* ($D = 0,0592 [-0,0059 \div 0,1242]$). Выявленные ST с указанием их отличий от ST референсного генома, перечислены в приложении Б (Таблицы Б1-Б3).

Для каждого гена ST, к которому относится референсный штамм Ames Ancestor, был обозначен как ST1. Далее нумерация велась в порядке уменьшения числа входящих в них штаммов *B. anthracis*, после чего нумеровались ST, к которым относятся штаммы *B. cereus*. При этом все ST отличаются между собой только однонуклеотидными заменами. Делеций, инсерций не было обнаружено.

Для оценки фенотипического проявления выявленного нуклеотидного полиморфизма, то есть того, является нуклеотидная замена в каждой выявленной позиции синонимичной или приводит к аминокислотной замене соответствующего белка, либо, его инактивации из-за появления стоп-кодона, мы провели трансляцию *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные (приложение Б, Таблицы Б4-Б6). При этом мы картировали выявленные аминокислотные замены на соответствующий структурный домен белка. Координаты аминокислотных замен указаны для полной последовательности транслированных белков, не учитывая их посттрансляционной модификации, которая заключается в отщеплении N-концевой сигнальной последовательности. У белка РА она составляет 29 аминокислотных остатков (а.о.), поэтому в результате процессинга его длина сокращается с 764 до 735 а.о. [134], и 33 а.о. в случае с белками LF и EF, длина которых сокращается с 808 до 776 [131] и с 800 до 767 а.о. [64], соответственно.

Распределение исследованной выборки по последовательностям транслированных белков РА, LF и EF указано в приложении Б (Таблицы Б7-Б9). Распределение штаммов осуществляли аналогично тому, как это было сделано для ST нуклеотидных последовательностей. Всего выявлено 8 изоформ белка РА, 9 изоформ LF и 7 изоформ EF.

В таблицах не приведены данные для гена *atxA*, так как для этого гена полиморфизм практически отсутствует. Даже штаммы *B. cereus* 03BB102 и G9241, принадлежащие к другому виду бацилл и отличающиеся от штаммов *B. anthracis*, несут тот же аллель гена *atxA*, что и остальная выборка. Единственная мутация этого гена была обнаружена у штамма *B. cereus* bv. *anthracis* CI и представляет замену *atxA* 563T→A, приводящую при трансляции *in silico* к аминокислотной замене 188I→N белка AtxA. Тем не менее, несмотря на крайне низкую степень полиморфизма этого гена, мы не исключили его из дальнейшей работы и использовали SNP *atxA* 563T→A в качестве маркера, наличие которого дополнительно подчеркивает генетическую обособленность штамма CI от остальной выборки.

Распределение изучаемых штаммов по генотипам, каждый из которых включает определенную комбинацию ST генов *pagA*, *lef*, *суа* и *atxA*, указано в Таблице 9. Нумерацию GT осуществляли по указанному выше принципу – GT, в который вошел референсный штамм, был обозначен как GT1, последующие GT нумеровались в порядке уменьшения количества штаммов, у которых они были выявлены, последние номера присвоили GT, характерным для *B. cereus*. Кроме того, у нескольких позже включенных в выборку штаммов *B. anthracis* обнаружена ранее не описанная мутация в гене *суа*, в результате чего в таблицу 9 был включен дополнительный GT20. Таким образом, всего мы выявили 20 GT ($D = 0,9038 [0,8793 \div 0,9284]$). Учитывая, что эти GT включают только гены факторов патогенности, локализованные на плазмиде рХО1, в дальнейшем они обозначены как MVLST_{рХО1}-генотипы, или MVLST_{рХО1}-GT [83], а схема генотипирования названа MVLST_{рХО1}.

Таблица 9 – Распределение исследуемых штаммов по генотипам на основе комбинации сиквенс-типов генов *pagA*, *lef*, *суа* и *atxA*

MVLST _{рХО1} -генотип	Штаммы	Количество штаммов
GT1	Ames Ancestor, A0248, A16, Shikan-NIID, 14RA5914, A2012, 34(738), I-271, A16R, 53169, Stendal	11
GT2	644/268, A0135, PAK-1, Turkey32, LP51/4YA, 1273, STI-1, BA1015, 1259, 8(2099), Larissa, Pollino, V770-NP-1R, 592/10, A1144, K1285, London 499, 1055/38	18
GT3	46/27, 1030/213, 914/213, 48/29, 1056/51, 1(14)Stavropol, 219/6, 1298, 531/17, 1173, 47/28, 555/288, 68/12, 546/714, 367/17, LP50/3YA, 7(992),	17
GT4	1199, 331/214, 822/7, 1183, 52/33, Kanchipuram, A3716, 52-G, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	13
GT5	LP53/5YA, Yamal 2, 44, 17OD930, Tyrol 4675, RA3, BF1	7
GT6	CDC_684, Vollum 1B, Vollum, 11(1940), 15(1345), SK-102	6
GT7	Sterne, SPV842_15, BFV, FDAARGOS 341, Tangail-1	5
GT8	A2075, K3, CZC5	3
GT9	HYU01, I-364, 157(B-1107)	3
GT10	BA1035, SVA11	2
GT11	A2079	1
GT12	H9401	1
GT13	Canadian bison	1
GT14	Ohio ACB	1
GT15	Kruger_B	1
GT16	2002013094	1
GT17	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1
GT18	<i>B. cereus</i> 03BB102	1
GT19	<i>B. cereus</i> G9241	1
GT20	Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68	5

По результатам, описанным в данном параграфе, в базу данных GenBank депонировано 50 нуклеотидных последовательностей генов исследуемой выборки штаммов из «ГКПМ-Оболенск», полученных в результате сборки (Таблица 10).

Таблица 10 – Номера полученных в работе сборок нуклеотидных последовательности генов *lef* и *суа*, депонированных в GenBank

Штамм <i>B. anthracis</i>	Ген	Номер сборки	Дата размещения
1	2	3	4
44	<i>lef</i>	MN536466	04.10.2019
52/33	<i>lef</i>	MN536469	04.10.2019
1173	<i>lef</i>	MN536462	04.10.2019
	<i>суа</i>	MN536483	04.10.2019
1183	<i>lef</i>	MN536443	04.10.2019
1199	<i>lef</i>	MN536450	04.10.2019
1259	<i>lef</i>	MN536452	04.10.2019
1298	<i>lef</i>	MN536472	04.10.2019
	<i>суа</i>	MN536480	04.10.2019

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4
1273	<i>lef</i>	MN536444	04.10.2019
1(14) Stavropol	<i>lef</i>	MN536435	04.10.2019
	<i>cya</i>	MN536474	04.10.2019
1030/213	<i>lef</i>	MN536461	04.10.2019
	<i>cya</i>	MN536482	04.10.2019
1055/38	<i>lef</i>	MN536455	04.10.2019
1056/51	<i>lef</i>	MN536448	04.10.2019
11(1940)	<i>lef</i>	MN536465	04.10.2019
15(1345)	<i>lef</i>	MN536449	04.10.2019
157(B-1107)	<i>lef</i>	MN536471	04.10.2019
219/6	<i>lef</i>	MN536463	04.10.2019
	<i>cya</i>	MN536484	04.10.2019
331/214	<i>lef</i>	MN536456	04.10.2019
34(738)	<i>lef</i>	MN536447	04.10.2019
367/17	<i>lef</i>	MN536440	04.10.2019
	<i>cya</i>	MN536477	04.10.2019
46/27	<i>lef</i>	MN536453	04.10.2019
47/28	<i>lef</i>	MN536467	04.10.2019
48/29	<i>lef</i>	MN536468	04.10.2019
53169	<i>lef</i>	MN536454	04.10.2019
531/17	<i>lef</i>	MN536441	04.10.2019
	<i>cya</i>	MN536478	04.10.2019
546/714	<i>lef</i>	MN536457	04.10.2019
555/288	<i>lef</i>	MN536458	04.10.2019
592/10	<i>lef</i>	MN536459	04.10.2019
644/268	<i>lef</i>	MN536451	04.10.2019
68/12	<i>lef</i>	MN536437	04.10.2019
	<i>cya</i>	MN536476	04.10.2019
7(992)	<i>lef</i>	MN536442	04.10.2019
	<i>cya</i>	MN536479	04.10.2019
8(2099)	<i>lef</i>	MN536464	04.10.2019
822/7	<i>lef</i>	MN536460	04.10.2019
914/213	<i>lef</i>	MN536470	04.10.2019
	<i>cya</i>	MN536481	04.10.2019
I-271	<i>lef</i>	MN536446	04.10.2019
I-364	<i>lef</i>	MN536445	04.10.2019
LP50/3YA	<i>lef</i>	MN536436	04.10.2019
	<i>cya</i>	MN536475	04.10.2019
LP51/4YA	<i>lef</i>	MN536438	04.10.2019
LP53/5YA	<i>lef</i>	MN536439	04.10.2019
STI-1	<i>lef</i>	MN536473	04.10.2019

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

В данном параграфе мы описали аллельный полиморфизм *capBCADE*-оперона (гены *capB*,

capC, *capA*, *capD*, *capE*), кодирующего белки биосинтеза капсулы *B. anthracis*, и генов *acrA* и *acrB*, кодирующих регуляторы экспрессии этого оперона. Все перечисленные гены локализованы на плазмиде pXO2. В выборку вошли только штаммы, содержащие эту плазмиду. Таким образом, был исключен ряд аттенуированных штаммов *B. anthracis* (pXO1+; pXO2-): STI-1, A16R, Sterne, V770-NP-1R и других штаммов *B. anthracis*, для которых нет доступа к последовательности pXO2 в GenBank, либо утративших эту плазмиду: Kruger B, FDAARGOS 341, SPV842 15, PAK-1, 1055/38 и 592/10. При этом были дополнительно исследованы штаммы, содержащие только плазмиду pXO2, геномы которых депонированы в GenBank: 2000031021 и Pasteur. Были также исследованы штаммы *B. cereus*, содержащие pXO2-подобные плазмиды: *B. cereus* bv. *anthracis* CI и *B. cereus* BC-AK. Штамм *B. cereus* 03BB102 содержит в pXO2-подобной плазмиде делеции в десятки нуклеотидов по некоторым исследованным генам, а штамм G9241 не содержит pXO2-подобной плазмиды вообще, поэтому эти штаммы не были включены. Таким образом, исследуемая в данном параграфе выборка состояла из 88 геномов штаммов *B. anthracis* и 2 штаммов *B. cereus*.

В исследуемой выборке, состоящей из 90 штаммов, выявлено 9 ST гена *capD* ($D = 0,3076$ [0,1713÷0,4439]), по 5 ST *capA* ($D = 0,2143$ [0,0956÷0,333]) и *acrB* ($D = 0,1497$ [0,0402÷0,2592]), 4 ST *capC* ($D = 0,1722$ [0,0582÷0,2863]) и *acrA* ($D = 0,31$ [0,1895÷0,4304]), 3 ST *capB* ($D = 0,0516$ [-0,0181÷0,1213]), 2 ST *capE* ($D = 0,026$ [-0,0243÷0,0762]). Выявленные ST с указанием их отличий от ST референсного генома перечислены в приложении Б (Таблицы Б10-Б15).

Для каждого гена ST, к которому относится референсный штамм Ames Ancestor, был обозначен как ST1, далее нумерация велась в порядке уменьшения численности входящих в них штаммов *B. anthracis*, после чего нумеровались ST, к которым относятся штаммы *B. cereus*. При этом все ST отличаются между собой нуклеотидными заменами либо инсерцией, в случае с геном *acrA*.

Для оценки фенотипического проявления выявленного нуклеотидного полиморфизма, то есть того, является нуклеотидная замена в каждой выявленной позиции синонимичной или приводит к аминокислотной замене соответствующего белка, либо его инактивации из-за появления стоп-кодона, мы провели трансляцию *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные (Приложение Б, Таблицы Б16-Б21). Координаты аминокислотных замен указаны для полной последовательности транслированных белков, не учитывая их посттрансляционной модификации, которая описана только для белка CapD и заключается в отщеплении N-концевой сигнальной последовательности размером 28 а.о. [191]. К сожалению, в литературе не описаны кристаллические структуры белков, соответствующих исследуемым в данном параграфе генам, за исключением CapD [98, 191], поэтому аминокислотные замены в белках описаны без указания локализации в том или ином домене.

Распределение выборки по последовательностям транслированных белков *CapB*, *CapC*, *CapA*, *CapD*, *AspA* и *AspB* указано в приложении Б, таблицах Б22-Б27. Распределение штаммов осуществляли аналогично тому, как это было сделано на ST нуклеотидных последовательностей. Всего выявлено 6 изоформ белка *CapD*, по 4 изоформы *AspA* и *AspB*, по 3 изоформы *CapB* и *CapA*, и по 2 изоформы *CapC* и *CapE*.

В таблицах не приводятся данные для гена *capE*, так как по последовательности этого гена исследованная выборка оказалась мономорфной, за исключением одного неантрацидного штамма *B. cereus* BC-AK, у которого обнаружено две SNP – 49T→G (17L→V) и 138C→T (синонимичная). Такая низкая вариабельность может быть отчасти объяснена небольшой длиной гена – всего 144 п.н. При равной частоте возникновения мутаций по всему *cap*-оперону вероятность того, что мутация возникнет именно на столь небольшом его отрезке довольно невелика.

Интересно, что в отличие от генов патогенности, расположенных на плазмиде *pXO1*, в генах, расположенных на *pXO2*, перечень мутаций не ограничился только SNP. Как видно из таблицы Б14, в последовательности гена *asrA* выявлена инсерция длиной девять п.н. Это мотив AT-ATAGATA, который представляет тандемный повтор в гене *asrA*. У большинства штаммов из изученной выборки он встречается в виде трехкратного повтора, а у 14 штаммов, принадлежащих ST2 *asrA* и эволюционным линиям В и С – в виде четырехкратного [6, 7, 84].

ST отдельных генов встречались в исследованной выборке в 16 комбинациях или GT, обозначаемых как MVLST_{pXO2}-GT (Таблица 11) [84]. Схема генотипирования, использованная в данном параграфе названа MVLST_{pXO2}. Так как 11 позже включенных в выборку штаммов *B. anthracis* отнесены к GT1 и GT3 – в GT3 входит больше штаммов (n = 7), чем в GT2 (n = 4). Таблица 11 – Распределение исследуемых штаммов по генотипам на основе комбинации сиквенс-типов генов *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*, *asrA* и *asrB*

MVLST _{pXO2} -генотип	Штаммы	Количество штаммов
1	2	3
GT1	Ames Ancestor, CZC5, London_499, 14RA5914, A16, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, Ohio ACB, K3, Turkey32, BFV, Kanchipuram, A0248, A2012, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1183, 1273, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 46/27, 52169, 546/714, 1030/213, 1173, 219/6, 8(2099), 11(1940), 47/28, 48/29, 914/213, 1298, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	57
GT2	BF1, 17OD930, RA3, Tyrol 4675	4
GT3	1199, 331/214, 822/7, 52/33, 52-G, Kafkas-78, Kafkas-86	7
GT4	LP53/5YA, I-364, Yamal-2, HYU01	4
GT5	Vollum 1B, Vollum, CDC 684	3
GT6	1(14) Stavropol, 555/288, 644/268	3

Продолжение таблицы 11

1	2	3
GT7	BA1035, SVA11	2
GT8	2000031021, 2002013094	2
GT9	44	1
GT10	Tangail-1	1
GT11	H9401	1
GT12	SK-102	1
GT13	Pollino	1
GT14	157(B-1107)	1
GT15	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1
GT16	<i>B. cereus</i> BC-AK	1

Как видно из Таблицы 11, MVLST_{pXO2}-генотипирование обладает меньшей разрешающей способностью ($D=0,5895 [0,4579\div 0,7212]$), чем MVLST_{pXO1} ($D=0,9038 [0,8793\div 0,9284]$).

4.3. Аллельный полиморфизм гена синтеза антролизина O

В данном параграфе мы описали аллельный полиморфизм гена *alo*, имеющего хромосомную локализацию и кодирующего синтез антролизина O. Этот белок хотя и не считается классическим фактором патогенности *B. anthracis*, однако обладает литической активностью и способен разрушать ткани хозяина, что, по некоторым данным, является ключевым моментом для перехода инфекции из локальной в генерализованную летальную форму [31].

Мы исследовали выборку из 97 штаммов *B. anthracis*, а также трех штаммов *B. cereus* и одного *B. cereus* bv. *anthracis*, имеющих pXO1- и pXO2-подобные плазмиды. В исследованной выборке, состоящей из 101 штамма, выявлено 7 ST гена *alo* ($D = 0,4262 [0,3238\div 0,5286]$). Выявленные ST, с указанием их отличий от ST референсного генома, перечислены в приложении Б, Таблице Б28.

ST, к которому относится референсный штамм Ames Ancestor обозначен как ST1, далее нумерация велась в порядке уменьшения числа входящих в ST штаммов *B. anthracis*, после чего нумеровались ST, к которым относятся штаммы *B. cereus*. При этом все ST отличаются между собой только нуклеотидными заменами.

Для оценки фенотипического проявления нуклеотидного полиморфизма проведена трансляция *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные (приложение Б, таблица Б29). К сожалению, на данный момент не описана доменная структура белка Alo, в связи с чем выявленные аминокислотные замены не были картированы на соответствующие домены. Рас-

пределение исследованной выборки по изоформам транслированного белка Alo указано в приложении Б, Таблице Б30. Распределение штаммов осуществляли аналогично тому, как это было сделано для ST нуклеотидных последовательностей. Всего выявлено 7 изоформ белка Alo.

По гену *alo* обнаружено наибольшее количество мутаций среди всех исследованных в работе генов, однако подавляющее большинство нуклеотидных замен обнаружено у штаммов *B. cereus*. При этом мутации распределены по нуклеотидной последовательности равномерно, и большая их часть является синонимичными. Однако большинство несинонимичных мутаций среди выявленных приводят к аминокислотным заменам, локализованным с 1 по 300 а.о. белка Alo.

4.4. Заключение по главе 4

В главе 4 описан аллельный полиморфизм генов факторов патогенности сибиреязвенного микроба, локализованных на плаزمиде рХО1 и рХО2, а также хромосомного гена *alo*, на основе данных полногеномного секвенирования штаммов *B. anthracis* из «ГКПМ-Оболенск» и геномов штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* из GenBank.

Описан аллельный полиморфизм генов синтеза протективного антигена (*pagA*), отечного (*суа*) и летального (*lef*) факторов, и регулятора их экспрессии *AtxA* (*atxA*), локализованных на плазмиде рХО1, для выборки из 96 штаммов *B. anthracis*, а также двух штаммов *B. cereus* и одного *B. cereus* bv. *anthracis*, обладающих рХО1-подобной плазмидой (всего 99 штаммов). В исследованной выборке выявлено 11 ST гена *pagA*, 9 ST *lef*, 10 ST *суа*, и 2 ST *atxA*. Все ST отличаются однонуклеотидными заменами. Штаммы распределены по 20 GT, каждый из которых включает комбинацию ST четырех исследуемых генов. Так как эти GT включают гены факторов патогенности, локализованные на плазмиде рХО1, они обозначены как MVLST_{рХО1}-GT, а схема генотипирования названа MVLST_{рХО1} [83]. В результате трансляции *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные для оценки фенотипического проявления выявленного полиморфизма, обнаружено 8 изоформ белка PA, 9 изоформ LF, 7 изоформ EF и 2 изоформы AtxA.

Описан аллельный полиморфизм локализованных на плазмиде рХО2: *capBCADE*-оперона (гены *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*), кодирующего белки биосинтеза капсулы *B. anthracis* и генов *асрА* и *асрВ*, кодирующих регуляторы экспрессии этого оперона. Исследуемая выборка состояла из 88 штаммов *B. anthracis* и 2 штаммов *B. cereus*, содержащих рХО2-подобные плазмиды (всего 90 штаммов). Схема генотипирования названа MVLST_{рХО2}. В выборке выявлено 9 ST гена *capD*, по 5 ST *capA* и *асрВ*, 4 ST *capC* и *асрА*, 3 ST *capB*, 2 ST *capE*. Все ST отличаются нуклеотидными заменами, либо инсерцией, в случае с геном *асрА*. ST генов встречались в исследованной выборке

в 16 комбинациях, обозначаемых как MVLST_{pXO2}-GT [84]. В результате трансляции *in silico* выявлено 6 изоформ белка SapD, по 4 изоформы AspA и AspB, по 3 изоформы SapB и SapA, и по 2 изоформы SapC и SapE.

Описан аллельный полиморфизм гена *alo*, кодирующего синтез белка антролизина O возбудителя сибирской язвы [31], для выборки из 97 штаммов *B. anthracis*, а также трех штаммов *B. cereus* и одного *B. cereus* bv. *anthracis*, имеющих pXO1- и pXO2-подобные плазмиды (всего 101 штамм). В исследованной выборке выявлено 7 ST гена *alo* и 7 изоформ белка Alo.

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

Глава 5. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Описав в главе 4 аллельный полиморфизм генов факторов патогенности *B. anthracis*, выявив их ST, и кластеризовав штаммы изучаемой выборки по GT, включающим определенный набор ST отдельных генов, мы, по сути, применили к сибиреязвенному микробу метод MVLST. Поскольку с помощью других известных методов было проведено генотипирование, по возможности, этой же выборки (глава 3), мы сопоставили MVLST-профили штаммов с другими их генетическими признаками. Полная информация по результатам исследования штаммов приведена в приложении А. Понимая целесообразность такого сопоставления и с фенотипическими признаками штамма, мы должны принять во внимание, что *B. anthracis* – очень мономорфный вид, который практически не разделяется на фенотипически отличающиеся группы. Кроме того, мы можем описать фенотипические характеристики только для штаммов из нашей рабочей коллекции, но не выборку, которая была использована в качестве группы сравнения. Единственный признак, известный для большинства изучаемых штаммов – место их выделения. Но здесь стоит сделать важную оговорку. Как мы отмечали выше, *B. anthracis* способен формировать эндоспоры, сохраняющие жизнеспособность в течении десятков и даже сотен лет [167]. При этом он вызывает болезнь, поражающую копытных, в том числе лошадей и домашний скот, то есть животных, которые и сегодня являются основой сельского хозяйства, а до недавнего времени были единственным наземным транспортом. В результате эти два фактора приводят к тому, что *B. anthracis* легко может быть занесен в тот или иной регион не только путем природных миграций копытных, но и при деятельности людей – колонизации, военных действиях и торговых экспедициях. Такая деятельность требует перемещения не только людей, но и ездовых, вьючных животных, домашнего скота и продукции животноводства – кожаной, меховой, шерстяной одежды, упряжи. Животные и товары при этом могут быть заражены спорами *B. anthracis*, которые легко переносят транспортировку, сохраняя жизнеспособность. По-видимому, именно антропогенная транспортировка спор в течении сотен лет стала основной причиной распространения *B. anthracis* по планете [181]. В результате природного и антропогенного переноса генетически родственные штаммы могут оказаться занесенными в далеко находящиеся друг от друга регионы, где их дальнейшая эволюция может проходить по-разному. Таким образом могут накапливаться мутации, в том числе и в генах вирулентности, по которым локальные популяции *B. anthracis* могут отличаться друг от друга. В то же время в одну и ту же область могут раз за разом заноситься штаммы из разных источников. В итоге локальные популяции сибиреязвенного микроба могут быть представлены штаммами различных генетических линий. Поэтому само по себе географическое происхождение штамма *B. anthracis* мало информативно и обязательно должно рассматриваться в связке с его генетическим профилем, учитывая также природные, исторические и экономические

особенности местности, где штамм был выделен. Исходя из этого, мы предприняли попытку выявить связи между географическим происхождением штаммов нашей выборки, их MVLST-GT и другими генетическими признаками. Проанализировав полученный массив данных генотипирования, приведенный в приложении А, мы пришли к выводу, что таким наиболее наглядным признаком является *can*SNP-группа, поскольку именно с ней в ряде случаев в совокупности с географическим происхождением наиболее коррелирует MVLST-GT и другие генетические маркеры.

5.1. Поиск взаимосвязей MVLST_{рХО1}-генотипа с другими генетическими признаками штамма *B. anthracis*

5.1.1. Корреляция MVLST_{рХО1}-генотипа с *can*SNP-группой штамма *B. anthracis*

Разделение выборки штаммов на MVLST_{рХО1}-GT в целом повторяет ее разделение на *can*SNP-группы. Даже индекс разнообразия схож – 0,9038 [0,8793÷0,9284] для MVLST_{рХО1}-генотипирования и 0,8596 [0,8176÷0,9016] для *can*SNP-генотипирования. Однако замеченная зависимость не была абсолютной: в ряде случаев некоторые GT объединяли штаммы нескольких *can*SNP-групп, а штаммы одной *can*SNP-группы распределялись по нескольким GT.

Так, MVLST_{рХО1}-GT1 включает 11 штаммов: 7 из 12 штаммов *can*SNP-группы A.Br.001/002 и все 4 штамма группы A.Br.Ames. 5 штаммов группы A.Br.001/002, не вошедшие в GT1 формируют GT7, отличающийся одной несинонимичной SNP *lef*895G→T (LF 299A→S).

MVLST_{рХО1}-GT2 включает 18 штаммов: 15 из 32 штаммов линии TEA (12 штаммов *can*SNP-группы A.Br.008/011 и 3 штамма A.Br.011/009), оба штамма группы A.Br.003/004 и 1 из 5 штаммов группы A.Br.005/006. Все штаммы *can*SNP-группы A.Br.008/011 (n = 17), не вошедшие в GT2, формируют GT3, который отличается от GT2 двумя SNP – *pagA* 981A→T и SNP *lef* 2126A→G. Четыре штамма группы A.Br.005/006, не вошедшие в GT2, формируют два отдельных генотипа – GT8 (n = 3), у которого присутствует дополнительная уникальная несинонимичная SNP *суа* 2129A→C (EF 710H→P), и GT11 (n = 1), у которого нет характерной для GT2 SNP *суа* 600C→T.

GT5 включает 7 штаммов: все 5 штаммов группы V.Br.CNEVA, которые были выделены в центральной Европе (для штамма 44 место выделения неизвестно), и два штамма группы V.Br.001/002, выделенные в Русской Арктике. В этот GT не вошли другие 5 штаммов группы V.Br.001/002. Три из них были найдены в Сибири, Прибалтике и Корее, и формируют GT9, который отличается от GT5 дополнительной уникальной несинонимичной SNP *pagA* 1297A→G. Два штамма, выделенные в Швеции и ЮАР благодаря отсутствию SNP *pagA* 1799C→T формируют отдельный GT10. SNP *pagA* 1799C→T также отсутствует у штамма Kruger V, единственного в

нашей выборке представителя группы V.Br.Kruger (GT15). Вместо этой SNP у GT15 обнаруживается уникальная SNP *pagA* 1765C→A.

Штаммы canSNP-группы A.Br.Aust94 формируют три GT. 13 из 19 штаммов этой группы вошли в GT4, включая штаммы, недавно выделенные на территории Турции и Грузии, относящиеся к canSNP-подгруппам Kafkas-Geo 1 и Kafkas-Geo 3 [146]. Штамм Ohio ACB, единственный из A.Br.Aust94, выделенный в Америке, формирует GT14 благодаря наличию синонимичной SNP *pagA* 1803T→C. Штаммы группы A.Br.Aust94, выделенные на территории Турции и Грузии, формируют дополнительный GT20 из-за наличия синонимичной SNP *суа* 2178 C→T, характерной для данного GT и, вероятно, подгруппы Kafkas-Geo 2. Подгруппы Kafkas-Geo 1, Kafkas-Geo 2 и Kafkas-Geo 3 были выделены в пределах группы A.Br.Aust94 в работе [144] на территории Грузии и Турции на основании трех предложенных SNP: 4385818 T/C (Kafkas-Geo 1), 127121 A/G (Kafkas-Geo 2), 3960657 G/A (Kafkas-Geo 3) относительно референсного генома *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: GCA_000008445.1).

Филогенетические отношения MVLST_{рх01}-GT с указанием принадлежности их к эволюционным линиям и canSNP-группам проиллюстрированы Рисунком 1.

Как видно из этого рисунка, и что вполне ожидаемо ввиду изложенного выше, MVLST_{рх01}-GT формируют кластеры, относящиеся к разным эволюционным линиям – А, В, С. При этом кластер штаммов линии А формирует два подкластера. Первый из них объединяет GT1, GT4, GT7, GT14 и GT20, то есть штаммы canSNP-групп A.Br.001/002, A.Br.Ames и A.Br.Aust94. Во второй подкластер входят GT2, GT3, GT6, GT8, GT11, GT12, и GT13, то есть штаммы canSNP-групп A.Br.003/004, A.Br.005/006, A.Br.005/007, A.Br.Vollum, A.Br.WNA, и группы A.Br.008/009 (A.Br.008/011 и A.Br.011/009). GT16, в который входит единственный в выборке штамм линии С отстоит далеко от кластеров А и В и, по сути, занимает промежуточное положение между штаммами *B. anthracis* и *B. cereus*. *B. cereus* bv. *anthracis* оказался наиболее обособленным от остальной выборки [83].

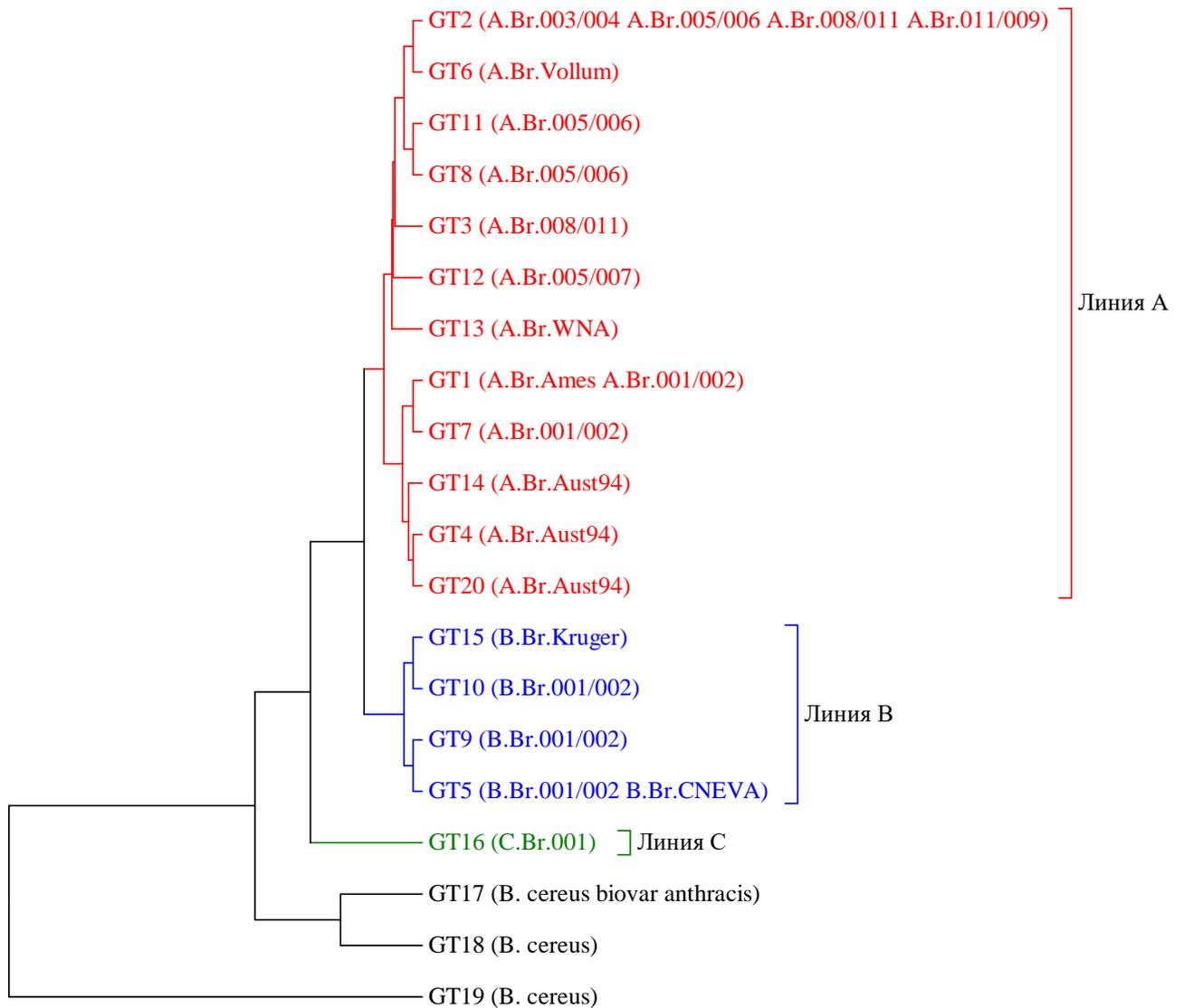


Рисунок 1 – UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая филогенетические отношения MVLST_{рх01}-генотипов. Красным цветом выделены генотипы, включающие штаммы линии А, синим – генотипы штаммов линии В, зеленым – линии С. В скобках указаны canSNP-группы, входящие в данный генотип, или видовая принадлежность неантрацидных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

5.1.2. eBURST популяционный анализ MVLST_{рх01}-генотипирования штаммов *B. anthracis*

Различные методы генотипирования, в том числе MLST, показывают, что популяции многих микроорганизмов состоят из некоторого числа кластеров близкородственных генотипов, называемых клональными комплексами. Клональные комплексы обычно состоят из одного основного GT, эволюционно связанного с минорными GT. При использовании MVLST, как варианта MLST, мы можем ожидать такого же принципа разделения исследуемой выборки. Однако визуализация разделения популяции на клональные комплексы с помощью традиционных денд-

программ, например UPGMA-дендрограмм, достаточно затруднена. Для выявления эволюционных связей кластеров родственных бактериальных GT на основе данных MLST был разработан eBURST алгоритм [74], модификация которого Global optimal eBURST (goeBURST) [78] реализована в том числе в программном пакете PHYLOViZ 2.0 [125].

Дендрограмма, построенная в результате применения goeBURST алгоритма для нашего набора данных MVLST с помощью программы PHYLOViZ 2.0, приведена на Рисунке 2. На этом рисунке мы видим, что GT2 связан одновременно с девятью генотипами – GT3, GT4, GT5, GT6, GT8, GT11, GT12, GT13, GT16. GT2 отличается от GT1, использованного в качестве референсного генотипа (так как в него входит геном штамма Ames Ancestor, традиционно используемый как референсный при генотипировании сибиреязвенного микроба), тремя SNP: *pagA* 195C→T, *pagA* 1799C→T, *суа* 600C→T.

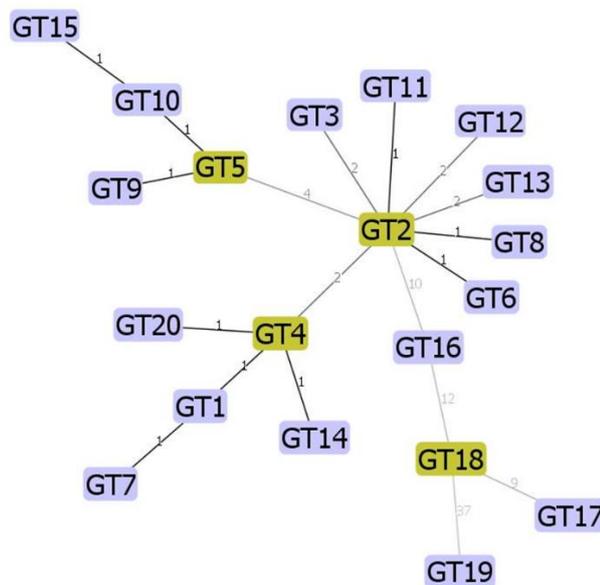


Рисунок 2 – Эволюционные отношения MVLST_{рх01}-генотипов, реконструированные с помощью goeBURST-алгоритма. Числами обозначена генетическая дистанция между отдельными генотипами (увеличивается по мере увеличения числа)

Эти SNP характерны для большинства штаммов исследованной выборки: синонимичная SNP *pagA* 195C→T обнаруживается у 64 штаммов, SNP *pagA* 1799C→T (PA 600A→V) – у 61 штамма, которые при этом обладают и SNP *pagA* 195C→T. Синонимичная SNP *суа* 600C→T обнаруживается у 82 штаммов. Все три SNP одновременно выявлены у 60 штаммов. Но у 42 штаммов присутствуют дополнительные SNP, благодаря наличию которых формируются другие GT. Таким образом, можно считать, что именно GT2 является «основным» GT для исследо-

ванной выборки и видимо, в наибольшей степени связан если не с неким «предковым» генотипом-основателем глобальной популяции сибирезвеного микроба, то, как минимум, с предковым GT эволюционной линии А. Таким образом, было бы корректнее говорить не о заменах *pagA* 195C→T, *pagA* 1799C→T и *суа* 600C→T, отличающих GT2 от GT1, а о маркерах SNP: *pagA* 195T, *pagA* 1799T и *суа* 600T, которых лишена меньшая часть генотипов исследованной выборки. Но для того, чтобы по ходу изложения данных придерживаться единой терминологии, мы не будем менять эти обозначения.

На Рисунке 2 мы также видим, что все выявленные GT образуют четыре основных клональных комплекса, два из которых объединяют генотипы линии А.

Наиболее многочисленный клональный комплекс представлен тесно сцепленными с GT2 генотипами GT6, GT8, GT11 (то есть штаммами групп А.Br.003/004, А.Br.005/006 и А.Br. Vollum, а также штаммами линии ТЕА (А.Br.008/011 и А.Br.011/009), не имеющими SNP *pagA* 981A→T), и менее сцепленными генотипами GT3, GT12, GT13 (группы А.Br.005/007, А.Br. WNA, а также штаммы А.Br.008/011, обладающие SNP *pagA* 981A→T).

Второй клональный комплекс имеет более сложную структуру. С центральным для выборки GT2 связан центральный для этого комплекса GT4, в который входит часть штаммов группы А.Br. Aust94. С GT4 связаны еще два GT – GT14 и GT20, в которые входит остаток штаммов этой группы, и GT1, объединяющий часть штаммов группы А.Br.001/002 со штаммами группы А.Br. Ames. С GT1 в свою очередь связан GT7, в который входит остаток штаммов группы А.Br.001/002.

В третий клональный комплекс входят генотипы линии В (группы В.Br.001/002, В.Br. CNEVA и В.Br. Kruger). Интересно, что центральным GT для этого кластера, связанным с GT2 является GT5, объединяющий арктические штаммы группы В.Br.001/002 со штаммами группы В.Br. CNEVA. Эволюционное значение этого факта мы обсудим немного ниже.

Четвертый комплекс образован штаммами *B. anthracis* линии С и *B. cereus*.

5.1.3. Эволюционная и филогеографическая значимость полученных данных

Описав MVLST_{рх01}-профили изучаемых штаммов, построив на их основе дендрограммы, приведенные на Рисунках 1 и 2, и сопоставив полученные данные с принадлежностью этих штаммов к той или иной *can*SNP-группе, мы бы хотели более подробно остановиться на вопросе о том, связан ли MVLST_{рх01}-профиль штамма в целом и отдельные SNP, формирующие этот профиль, с географической локализацией этого штамма, а также оценить роль некоторых SNP в реконструкции эволюции сибирезвеного микроба.

Первое, на что мы обратили внимание – это MVLST_{рх01}-GT3, и характерная для него синонимичная SNP *pagA* 981A→T. Ранее эта SNP была предложена в качестве специфического мар-

кера немногочисленной группы евразийских штаммов *canSNP*-группы A.Br.008/009, выделенных в России, Норвегии, Венгрии и Словакии [130]. Чуть позже Eremenko с соавт. в 2019 г. при генотипировании штаммов из коллекции Ставропольского противочумного института выявили SNP *pagA* 981A→T у всех штаммов исследованной выборки, принадлежащих к *canSNP*-группе A.Br.008/009 [72]. В нашей работе мы обнаружили SNP *pagA* 981A→T у 17 штаммов группы A.Br.008/011 из 27, выделенных на территории бывшего СССР (Приложение А), но не обнаружили ее ни в одном геноме, депонированном в GenBank. Все эти 17 штаммов относятся к MVLST_{рХО1}-GT3. Таким образом, наши результаты дополняют данные Eremenko с соавт. и Okinaka с соавт. 1999 г. [72, 130] и указывают на то, что SNP *pagA* 981A→T является маркером многочисленной подгруппы штаммов группы A.Br.008/011 [83]. Эта подгруппа распространена на территории протяженностью более 6000 км с запада на восток и около 4000 км с севера на юг, которая включает Среднюю Азию, Кавказ, причерноморские и прикаспийские степи, европейскую часть России и даже восточное Заполярье (Якутия). Экстраполируя наши данные и данные Eremenko с соавт., мы можем утверждать, хоть и достаточно спекулятивно, что подгруппа A.Br.008/011 *pagA* 981A→T (MVLST_{рХО1}-GT3) включает если не большинство, то не менее половины штаммов группы A.Br.008/011, циркулирующих на территории бывшего СССР. Причем ареал их распространения в более глубокой исторической перспективе совпадает с территорией, объединенной в XII-XVIII вв. Монгольской империей, и входившей в государства, на которые она распалась (Золотая Орда, Чагатайская Орда, Ильханат), а также зоны их политического влияния (Новгородская область) и территории, непосредственно подвергшиеся монгольским походам (Венгрия и Словакия). Характерной чертой монгольских и постмонгольских государств являлось использование в военных конфликтах многочисленных контингентов легкой конницы, численность которых могла достигать нескольких десятков тысяч человек (а следовательно, в несколько раз большего количества верховых лошадей и большого количества обозных животных – лошадей, ослов, быков и верблюдов), действующих на расстоянии в тысячи километров в течение одной военной кампании. Это создавало идеальные условия для быстрого распространения на огромные территории инфекций, в первую очередь поражающих лошадей. Именно такой инфекцией и является сибирская язва. Кроме того, в этих же государствах, а позднее и в русских княжествах и Московском царстве, существовала ямская служба – сеть почтовых станций, расположенных на расстоянии 30–50 км друг от друга – то есть на расстоянии, которое способна пройти лошадь за один перегон без отдыха. За счет смены лошадей на каждой станции грузы и документы могли быстро перевозиться через все государство. Но в то же время это создавало дополнительную возможность молниеносного распространения заболеваний, в том числе сибирской язвы, которая могла переноситься с грузами и больными лошадьми [83].

Ранее мы высказывали гипотезу о значительной роли монгольского нашествия на запад в

распространении сибирской язвы в Евразии [166]. Описанный здесь географический ареал распространения штаммов подгруппы A.Br.008/011 *pagA* 981A→T дополнительно свидетельствует в пользу этой гипотезы. И даже то, что один из штаммов подгруппы A.Br.008/011 *pagA* 981A→T был обнаружен в Норвегии, вполне укладывается в рамки этой концепции, если принять во внимание то, что северо-восток Руси (Новгород и Псков) большую часть своей истории был связан со Скандинавией не только торговыми связями, но и безостановочной чередой военных конфликтов, что могло привести к заносу в Скандинавию штаммов A.Br.008/011 *pagA* 981A→T с товарами и/или военными трофеями [83, 130].

Следующий момент, на котором мы хотели бы остановиться, касается разделения штаммов группы A.Br.Aust94 на три GT. Один из них, MVLST_{рХО1}-GT14, выделяется благодаря наличию SNP *pagA* 1803T→C. Этот GT включал один штамм Ohio ACB, причем это единственный штамм этой группы, который был выделен в США, а не в Старом Свете. Это натолкнуло нас на мысль оценить возможность использования SNP *pagA* 1803T→C как маркера для определения происхождения штамма группы A.Br.Aust94 из Америки. Не имея таких штаммов в своей коллекции, мы были вынуждены ограничиться небольшим количеством депонированных архивов с данными полногеномного секвенирования американских штаммов группы A.Br.Aust94 (Таблица 12). При этом SNP *pagA* 1803T→C обнаружилась лишь у двух штаммов – 2002013170 и 2002721571. Поэтому, все что можно сказать о диагностической роли этой SNP, это то, что она встречается у некоей подгруппы штаммов A.Br.Aust94, циркулирующих в США [83].

Таблица 12 – Распространение SNP *pagA* 1803T→C среди штаммов группы A.Br.Aust94 американского происхождения

Наименование штамма	Место выделения	Номер доступа в GenBank	SNP <i>pagA</i> 1803T→C
2000031027	США	SRR1739963	-
2000032893	США	SRR2339639	-
2002734034	США	SRR2340252	-
2002734153	США	SRR2340480	-
2002734167	США	SRR5811018	-
2002734054	США	SRR5811121	-
2002734036	США	SRR5811124	-
2002734037	США	SRR5811125	-
2002013170	США	SRR2339643	+
2002721571	США	SRR2340230	+

SNP *суа* 2178C→T была обнаружена нами у пяти штаммов группы A.Br.Aust94 подгруппы Kafkas-Geo 2, выделенных на территории Грузии и Турции и добавленных в исследование позже, и формирующих дополнительный GT20 [146]. Кроме того, у штаммов подгрупп Kafkas-Geo 1 и Kafkas-Geo 3, выделенных в данном регионе, эта мутация не обнаружена. Отсюда можно предположить, что эта SNP является маркером *can*SNP-подгруппы Kafkas-Geo 2 группы A.Br.Aust94

у штаммов, выделенных в Кавказском регионе.

Как мы заметили при описании дендрограммы, изображенной на Рисунке 1, штаммы *can*SNP-группы A.Br.001/002 также формируют два GT. При этом один из них (MVLST_{pXO1}-GT1) включает также штаммы группы A.Br.Ames. Связанный с ним MVLST_{pXO1}-GT7 отличается наличием SNP *lef* 895G→T, он включает 5 из 12 штаммов A.Br.001/002. Нас заинтересовало то, что штаммы, обладающие этой SNP, были выделены в основном в Новом Свете – США, Бразилии и на Ямайке, и только один из них выделен в Бангладеш. Штаммы A.Br.001/002, не имеющие этой SNP, были выделены в России, Китае, Казахстане и Германии. Чтобы проверить, насколько SNP *lef* 895G→T характерна для штаммов группы A.Br.001/002 именно американского происхождения, мы проанализировали 42 дополнительных генома штаммов *B. anthracis* этой линии, из которых три штамма были американского происхождения, 28 – европейского и 11 – азиатского. Мы обнаружили искомую SNP у всех трех американских штаммов. Но также она обнаружилась у 23 из 28 европейских и 8 из 11 азиатских штаммов (Таблица 13). Таким образом, оказалось, что SNP *lef* 895G→T характерна для большинства штаммов группы A.Br.001/002, вне зависимости от их географического происхождения. Поэтому говорить скорее можно об отсутствии этой SNP как о маркере подгруппы штаммов в рамках группы A.Br.001/002. Штаммы этой подгруппы обладают одинаковым MVLST_{pXO1}-GT со штаммами группы A.Br.Ames, следовательно, они более родственны штаммам A.Br.Ames в рамках используемой схемы типирования. Учитывая, что группа A.Br.Ames произошла от группы A.Br.001/002 [152], можно предположить, что MVLST_{pXO1}-GT1-подгруппа A.Br.001/002 представляет собой некое «переходное звено», которое уже приобрело плазмидные маркеры, характерные для A.Br.Ames, но у которого еще не возникли характерные для этой группы хромосомные *can*SNP [83]. К сожалению, в отличие от подгруппы A.Br.008/011 *pagA* 981A→T, мы не располагаем данными, которые могли бы как-то объяснить причины и закономерности географического распространения MVLST_{pXO1}-генотипов группы A.Br.001/002.

Таблица 13 – Распространение SNP *lef* 895G→T у штаммов *can*SNP-группы A.Br.001/002 различного географического происхождения

Наименование штамма	Место выделения	Номер доступа в GenBank	SNP <i>lef</i> 895G→T
1	2	3	4
Brazilian Vaccinal	Бразилия	GCA_002007035	+
2000032979	США	SRR1739979	+
2011218264	США	SRR5811142	+
ANSES_08-07	Франция	ERR1596542	+
ANSES_08-09	Франция	ERR1596543	+
ANSES_08-10	Франция	ERR1596544	+
ANSES_08-11	Франция	ERR1596545	+
ANSES_08-13	Франция	ERR1596546	+

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4
ANSES_08-14	Франция	ERR1596547	+
ANSES_08-15	Франция	ERR1596548	+
ANSES_08-16	Франция	ERR1596549	+
ANSES_08-19	Франция	ERR1596550	+
ANSES_08-20	Франция	ERR1596551	+
ANSES_08-21-1	Франция	ERR1596552	+
ANSES_08-21-2	Франция	ERR1596553	+
ANSES_08-21-3	Франция	ERR1596554	+
ANSES_08-22-2	Франция	ERR1596555	+
ANSES_08-24	Франция	ERR1596556	+
ANSES_08-25	Франция	ERR1596557	+
ANSES_08-26	Франция	ERR1596558	+
ANSES_08-27	Франция	ERR1596559	+
ANSES_08-28	Франция	ERR1596560	+
ANSES_08-29	Франция	ERR1596561	+
ANSES_11-04	Франция	ERR1596590	+
strain C (DK9)	Дания	ERR930304	+
K929	Дания	ERR930299	+
2008725092	Бангладеш	SRR5810961	+
2008724724	Бангладеш	SRR5811059	+
2008724999	Бангладеш	SRR5811137	+
2008724997	Бангладеш	SRR5811143	+
2008724832	Бангладеш	SRR5811158	+
3000015248	Бангладеш	SRR5811175	+
3000015250	Бангладеш	SRR5811176	+
3000015251	Бангладеш	SRR5811188	+
ANSES_052 (CIP 53.169)	Франция	ERR1841046	-
ANSES_054 (CIP 81.89)	Франция	ERR1841047	-
ANSES_058 (CIP A211)	Франция	ERR1841049	-
strain A	Дания	ERR930302	-
strain B (DK8)	Дания	ERR930303	-
2002734373	Гонконг	SRR5811212	-
A0389 (ABLB)	Индонезия	GCA_000219895	-
2000031042	Пакистан	SRR5811167	-

Упомянутые генотипы, объединяющие штаммы нескольких *can*SNP-групп мы должны остановиться наиболее интересном, на наш взгляд, случае. В один *MVLST_{pXO1}-GT5* объединились штаммы группы *V.Br.CNEVA* и два штамма группы *V.Br.001/002*. Остальные штаммы линии *V* из изучаемой выборки не вошли в этот *GT*: три из них были найдены в Сибири, Прибалтике и Корее, и формируют *MVLST_{pXO1}-GT9*, который отличается от *MVLST_{pXO1}-GT5* дополнительной несинонимичной SNP *pagA* 1297A→G [83]. Два штамма, выделенные в Швеции и ЮАР благодаря отсутствию SNP *pagA* 1799C→T формируют *MVLST_{pXO1}-GT10*. SNP *pagA* 1799C→T также отсутствует у штамма *Kruger B*, единственного в нашей выборке представителя группы *V.Br.Kruger* (*MVLST_{pXO1}-GT15*). Вместо этой SNP у него обнаруживается SNP *pagA* 1765C→A.

Но вернемся к штаммам группы V.Br.001/002, вошедшим в один GT со штаммами V.Br.CNEVA. Оба эти штамма выделены в Арктике. Штамм 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. Штамм LP53/5YA извлечен из вечной мерзлоты при палеонтологических раскопках в Якутии. Приблизительная генетическая датировка, осуществленная в [167], позволяет отнести время консервации этих штаммов в мерзлоте к периоду XIII-XVI вв. Эта датировка, вместе с самой историей этих штаммов, а именно выделением их в арктическом регионе, в том числе из вечной мерзлоты, косвенно указывает на то, что их возраст со значительной вероятностью больше, чем у других штаммов группы V.Br.001/002. В таком случае MVLST_{рХО1}-GT5 объединяет с группой V.Br.CNEVA именно архаичные штаммы V.Br.001/002, наиболее генетически близкие с последним общим предком этих групп. Видимо, этот GT сформировался еще до той степени эволюционного расхождения групп V.Br.CNEVA и V.Br.001/002, которую мы наблюдаем сегодня. В пользу этого утверждения говорит и полногеномный SNP-анализ корового генома, проведенный в [167], который показывает, что эти два штамма формируют отдельный филогенетический кластер, наиболее приближенный среди всех штаммов группы V.Br.001/002 к кластеру штаммов группы V.Br.CNEVA. Поэтому, по всей видимости, мы можем говорить о заносе общего предка группы V.Br.CNEVA и MVLST_{рХО1}-GT5 V.Br.001/002-подгруппы в Центральную Европу (Германия, Австрия, Швейцария, Франция) из северной Азии, или наоборот в Азию из Центральной Европы, либо же в о практически одновременном (в историческом смысле) заносе этого предка из неизвестного третьего региона. В любом случае, интересен сам 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 [83].

Однако мы хотели бы заметить, что ареал распространения подгруппы MVLST_{рХО1}-GT5 V.Br.001/002 может не ограничиваться Арктическим регионом и быть гораздо шире. Так недавно в Южной Сибири (северный Казахстан, Павлодарская область) были обнаружены два штамма *V. anthracis* группы V.Br.001/002, названные Kz174 и Kz178 [151]. Мало того, что ранее эта группа не обнаруживалась в данном регионе, MLVA-профиль этих штаммов, опубликованный авторами, крайне схож с профилем штаммов Yamal_2 и LP53/5YA, отличаясь от профилей других известных нам штаммов группы V.Br.001/002. Анализ данных их полногеномного секвенирования показал, что они относятся к MVLST_{рХО1}-GT5.

Напоследок мы хотели бы коснуться нескольких моментов, не касающихся филогеографии *V. anthracis*, но представляющих определенный интерес. Из всех описанных SNP лишь одна позиция – *lef* 895 обладает тремя аллельными состояниями – G, T и A. *Lef* 895G встречается у большинства штаммов, *lef* 895A – маркер, обнаруженный у всех штаммов линии B, а *lef* 895T, как

указано выше – специфический маркер MVLST_{pXO1}-GT7 подгруппы A.Br.001/002. Но кроме этой группы, *lef* 895T неожиданно обнаруживается у штамма *B. cereus* G9241. Такие маркеры, общие для эволюционно отдаленных групп штаммов, особенно интересны, поскольку они с наибольшей вероятностью достались им от общего предка. Именно для штаммов линии В, несмотря на их малочисленность в используемой выборке, мы выявили больше всего таких маркеров. Например, мы обнаружили три маркера, общих для генотипов линии В и других эволюционных линий. Так, SNP *lef* 2126A→G встречается у всех MVLST_{pXO1}-GT линии В и у MVLST_{pXO1}-GT3, то есть штаммов A.Br.008/011, обладающих SNP *pagA* 981A→T. SNP *суа* 953T→С выявлена у всех штаммов линии В, а также у всех трех штаммов *B. cereus* и штамма 2002013094, единственного представителя линии С (С.Br.001) исследуемой выборки. То есть эта SNP связывает линию В со штаммами, наиболее отличающимися от всей остальной выборки. Кроме того, отсутствие SNP *pagA* 1799C→Т объединяет MVLST_{pXO1}-GT10 и MVLST_{pXO1}-GT14, относящиеся к линии В, с MVLST_{pXO1}-GT1, MVLST_{pXO1}-GT 4 и MVLST_{pXO1}-GT7, которые относятся к линии А и включают штаммы *can*SNP-групп А.Br.001/002, А.Br.Aust94 и А.Br.Ames. В итоге именно MVLST_{pXO1}-GT линии В сохранили наибольшее число «архаичных» маркеров, общих с другими, эволюционно отделенными группами штаммов, в том числе *B. cereus*.

Также мы можем обратить внимание на то, что в исследованной выборке присутствуют четыре вакцинных штамма: А16R, полученный в 1950-х годах в Китае [113], Sterne, полученный в ЮАР в 1903 г. и широко используемый как ветеринарная вакцина во всем мире [156], V770-NP-1R, который используется как продуцент для вакцины АВА в США с 1970-х годов, и STI-1 – применяющийся как живая вакцина для людей с 1940-х годов в СССР, а теперь и в России (Таблицы 1 и 2). Таким образом, в выборку включены четыре широко распространенных в мире вакцинных штамма, полученных независимо в различных частях света. Все эти штаммы сохранили плазмиду рXO1, но утратили рXO2. Наш анализ показывает, что ни один из них не приобрел особенностей последовательностей генов токсинообразования, отличающих их от вирулентных штаммов. Более того, штамм А16R не отличается по последовательности этих генов от своего родительского штамма А16. Таким образом, если аттенуирование *B. anthracis* обусловлено какими-либо изменениями генома, помимо утери плазмиды капсулообразования [48], то изменения во всех четырех случаях не затрагивают гены синтеза токсина.

Подводя итог данному параграфу, мы можем сделать ряд важных заключений. Разделение исследованной выборки на MVLST_{pXO1}-генотипы соответствует ее разделению на основные эволюционные линии – А, В и С и *can*SNP-группы в рамках этих линий. В ряде случаев один генотип объединяет несколько *can*SNP-групп и наоборот – *can*SNP-группа делится на несколько генотипов. Наиболее интересными из таких моментов являются: выделение в отдельный MVLST_{pXO1}-генотип штаммов группы А.Br.008/009, преобладающих на территории бывшего СССР; наличие

уникальных MVLST_{pXO1}-GT у штаммов группы A.Br.Aust94 американского происхождения, и ряда штаммов, выделенных на Кавказе; разделение группы A.Br.001/002 на две подгруппы, одна из которых является вероятным переходным звеном к группе A.Br.Ames; объединение в общий MVLST_{pXO1}-GT центрально-европейских изолятов группы B.Br.CNEVA и штаммов группы B.Br.001/002, выделенных в Русской Арктике (в том числе из вечной мерзлоты). Наибольшее число архаичных генетических маркеров выявлено у MVLST_{pXO1}-GT штаммов, принадлежащих к эволюционной линии В. Вакцинные штаммы *B. anthracis* не отличаются по MVLST_{pXO1}-GT от природных вирулентных штаммов.

5.2. Поиск взаимосвязей MVLST_{pXO2}-генотипа с другими генетическими признаками штамма *B. anthracis*

5.2.1. Корреляция MVLST_{pXO2}-генотипа с эволюционной линией штамма *B. anthracis*

Мы обнаружили, что 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.



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

Анализ кластеризации исследуемой выборки на основе $MVLST_{pXO2}$ -GT штаммов 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 (то есть отличаются у *B. anthracis* и *B. cereus*) и принадлежностью к эволюционным линиям в рамках вида *B. anthracis* [84].

5.2.2. eBURST-популяционный анализ и эволюционная и филогеографическая значимость полученных данных $MVLST_{pXO2}$ -генотипирования штаммов *B. anthracis*
 GoeBURST-анализ данных $MVLST_{pXO2}$ -генотипирования приведен на Рисунке 4.

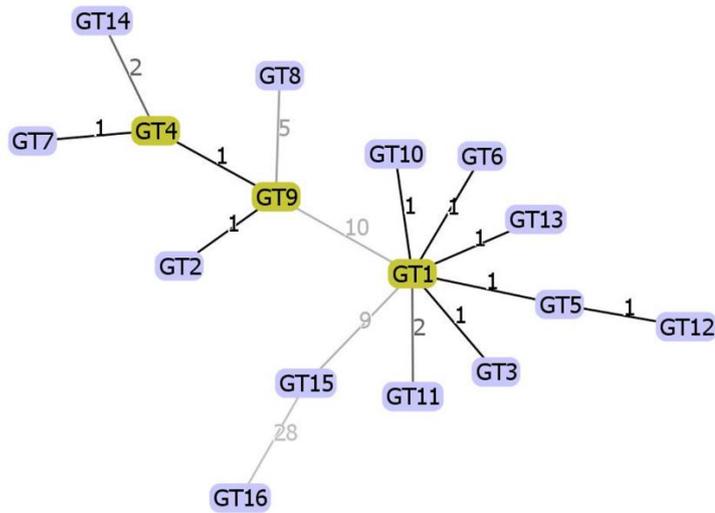


Рисунок 4 – Филогенетические отношения $MVLST_{pXO2}$ -генотипов, реконструированные с помощью *goeBURST*-алгоритма. Цифрами обозначена генетическая дистанция между отдельными генотипами, сцепленными между собой

Центральным GT в исследованной выборке является $MVLST_{pXO2}$ -GT1. Это наиболее распространенный GT линии A, встречающийся среди штаммов практически всех *can*SNP-групп. Большинство других GT линии A отличаются от GT1 одной SNP и являются штаммоспецифичными или объединяют небольшие подгруппы штаммов одной *can*SNP-группы.

Исключением является единственный штамм группы A.Br.005/007 (H9401), принадлежащий $MVLST_{pXO2}$ -GT11, который отличается от GT1 двумя SNP – *capD* 796G→A (266V→I) и *acrB* 495A→G (синонимичная). Однако однозначно считать эти два маркера специфичными для группы A.Br.005/007 не следует, так как они с такой же вероятностью могут оказаться специфичными для штамма H9401. Проверить их наличие у других штаммов группы A.Br.005/007 не представляется возможным, поскольку на момент написания работы в открытом доступе не обнаружено данных их полногеномного секвенирования.

Генотипы линии В связаны с MVLST_{рх02}-GT1 через MVLST_{рх02}-GT9, который для линии В является центральным. С этим же GT связан MVLST_{рх02}-GT8, представляющий линию С. Все эти GT обладают маркерами SNP *acpA* 853G→A и INS *acpA* 1337-ATATAGATA-1345 [6, 7, 84]. Центральный MVLST_{рх02}-GT9 представлен единственным штаммом группы В.Br.CNEVA из нашей коллекции (штамм 44). Остальные штаммы группы В.Br.CNEVA отличаются от штамма 44 дополнительной SNP *capD* 234T→C (MVLST_{рх02}-GT2). Штаммы группы В.Br.001/002 вместо этой SNP обладают SNP *capA* 1033A→G. Только этим маркером обладает MVLST_{рх02}-GT4, объединяющий штаммы, выделенные в Арктике, с двумя штаммами, выделенными в Корее и Сибири. К MVLST_{рх02}-GT4 с большой вероятностью могут быть отнесены штаммы из Южной Сибири группы В.Br.001/002 (Kz174 и Kz178) [151], однако качество сборки не позволяет сделать вывод о наличии в их геномах инсерции *acpA* 1337-ATATAGATA-1345, которая коррелирует с SNP *acpA* 853G→A. Два других GT приобрели либо SNP *capD* 1320T→C (MVLST_{рх02}-GT7, два штамма из ЮАР и Швеции) либо две SNP *capD* 1120T→G и *capD* 1183A→G (MVLST_{рх02}-GT14, один штамм из Эстонии) [84].

Наиболее интересный момент касается центрального для линии В, MVLST_{рх02}-GT9. При MVLST_{рх01}-типировании центральный GT линии В, наиболее близкий к последнему общему предку представляли штаммы группы В.Br.CNEVA и арктические штаммы группы В.Br.001/002.

Но если эту схему дополнить MVLST_{рх02}-анализом и рассмотреть филогенетическое дерево, построенное по слитым последовательностям обоих наборов генов MVLST_{рх01} и MVLST_{рх02}, 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).

К сожалению, информация о месте выделения штамма 44 не сохранилась, но его присутствие в нашей коллекции с большой вероятностью означает, что штамм 44 был выделен на территории СССР. В таком случае два ключевых звена эволюции линии В оказываются географически привязанными к этой территории, что дает некие основания утверждать, что именно в северной Евразии и происходило эволюционное разделение этой линии на группы В.Br.CNEVA и В.Br.001/002.

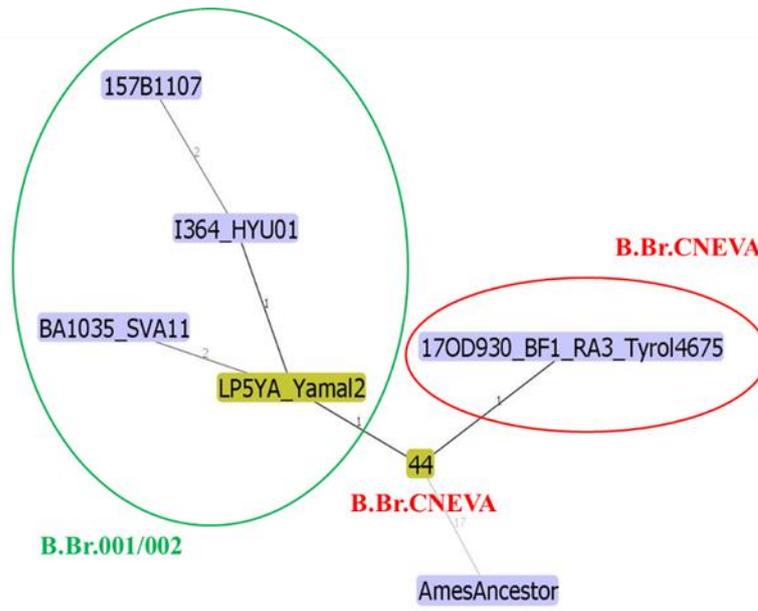


Рисунок 5 – Филогенетические отношения генотипов линии В, полученных путем слияния последовательностей наборов генов $MVLST_{pXO1}$ и $MVLST_{pXO2}$, реконструированные с помощью *gocBURST*-алгоритма. Цифрами обозначена генетическая дистанция между отдельными генотипами, сцепленными между собой

Далее мы хотели бы остановиться на внутригрупповой филогении группы *A.Br.Aust94*, выявленной в результате *MVLST*-анализа. Как отмечено выше в $MVLST_{pXO2}$ -GT3 вошли семь штаммов группы *A.Br.Aust94*, выделенные в Кавказском регионе – Дагестане, Чеченской республике, Грузии, Азербайджане и северо-восточной части Турции. Причем три из них относились к *canSNP*-подгруппе *Kafkas-Geo 3* [137]. Эти штаммы образуют GT3 благодаря наличию уникальной синонимичной *SNP capC 351A→G (capC-ST2)*. Однако данный маркер отсутствует у нескольких штаммов группы *A.Br.Aust94*, выделенных в том же регионе – Кабардино-Балкарии, Турции и Грузии.

Для проверки специфичности *SNP capC 351A→G* для «кавказских» штаммов группы *A.Br.Aust94* была осуществлена дополнительная проверка ее наличия в геномах 23 штаммов этой группы, выделенных в различных регионах за пределами Кавказа (Таблица 14). В результате у штаммов дополнительной выборки искомую *SNP* обнаружить не удалось.

Таблица 14 – Дополнительная выборка штаммов группы *A.Br.Aust94* различного географического происхождения для поиска *SNP capC 351A→G*

Наименование штамма	Место выделения	Номер доступа в GenBank
1	2	3
K2	Намибия	GCA_001677295
K1	Намибия	GCA_001677305
2000031103 (Strain 32)	Великобритания	GCA_003367985

Продолжение таблицы 14

1	2	3
2007740863 (SK57)	Великобритания	GCA_003368005
BA_104	Япония	DRR000184
BA_104	Япония	DRR000186
BA105	Япония	DRR128184
1409	Дания	ERR930300
K2883	Индия	SRR2071849
K4834	Австралия	SRR2071866
2002721539	ЮАР	SRR2339898
2002734039	Великобритания	SRR2340304
A0088	ЮАР	SRR2968133
A0002	Турция	SRR2968144
A0656	КНР	SRR2968145
A0659	КНР	SRR2968146
A0083	Германия	SRR2968155
A0252	Зимбабве	SRR2968160
A0455	Мозамбик	SRR2968165
2000031009	Таиланд	SRR5811187
2000031027	США	SRR1739963
2000032893	США	SRR2339639
2002013170	США	SRR2339643

Учитывая совокупность полученных результатов, можно предположить, что подгруппа A.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, наличие которого свидетельствует о регионе происхождения штамма [84].

Дополнительный анализ с использованием goeBURST-алгоритма, проведенный для слитых последовательностей наборов генов MVLST_{рх01} и MVLST_{рх02}, показал, что MVLST_{рх01}-GT4 MVLST_{рх02}-GT1 является центральным GT для штаммов canSNP-группы A.Br.Aust94 и наиболее близко связан с общим предком генотипов этой группы (Рисунок 6). Другие генотипы этой canSNP-группы приобрели следующие мутации: штамм OhioACB отличается наличием мутации *ragA* 1803T→C (MVLST_{рх01}-GT14, MVLST_{рх02}-GT1), штаммы MVLST_{рх01}-GT4 и MVLST_{рх02}-GT3 приобрели SNP *capC* 351A→G, а штаммы MVLST_{рх01}-GT20 и MVLST_{рх02}-GT1 приобрели дополнительно SNP *суа* 2178C→T.

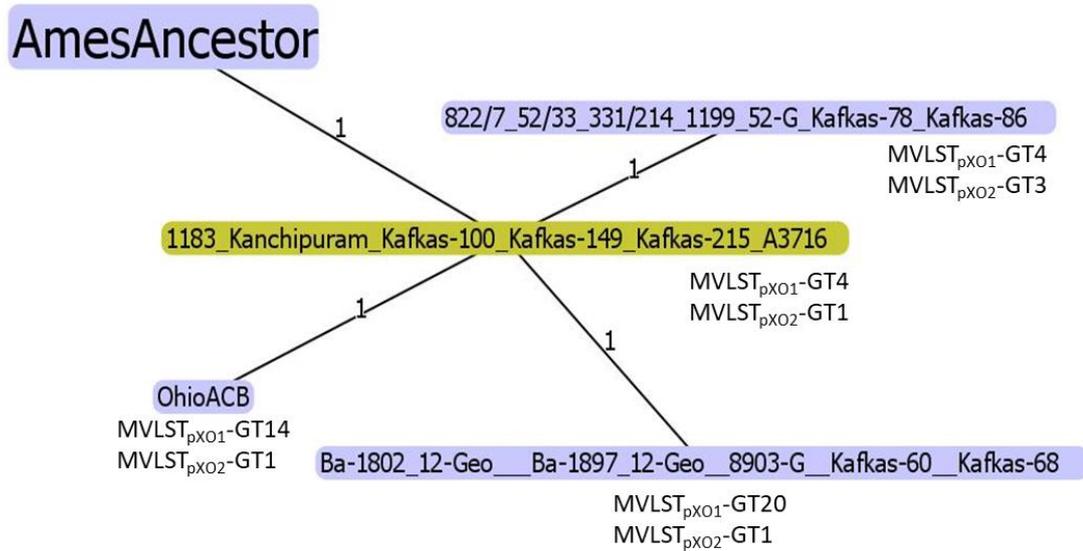


Рисунок 6 – Филогенетические отношения штаммов canSNP-группы A.Br.Aust94, полученных путем слияния последовательностей наборов генов $MVLST_{pXO1}$ и $MVLST_{pXO2}$, реконструированные с помощью goeBURST-алгоритма. Цифрами обозначена генетическая дистанция между отдельными GT, сцепленными между собой

CanSNP-группа A.Br.Vollum в исследованной выборке разделилась на три GT. Два штамма, выделенных в Средней Азии принадлежат $MVLST_{pXO2-GT1}$, общему для линии A. Четыре американских штамма отличаются от $MVLST_{pXO2-GT1}$ наличием уникальной SNP *acpB* 1381 A→G (461I→V) и принадлежат $MVLST_{pXO2-GT5}$ (n = 3). Для GT5 характерно наличие только этой SNP. У $MVLST_{pXO2-GT12}$ (n = 1) помимо нее обнаруживается SNP *acpB* 563C→T (188S→L). При дополнительном поиске этих SNP мы обнаружили девять штаммов дополнительной выборки группы A.Br.Vollum различного географического происхождения, принадлежащих GT1(n=4) и GT5(n=8) (Таблица 15). Таким образом можно как минимум говорить о том, что группа A.Br.Vollum разделилась на две подгруппы, обладающие разными $MVLST_{pXO2-GT}$ – GT1 (сюда входят оба штамма этой группы, выделенные на территории бывшего СССР) и GT5. GT12, видимо, является штаммо-специфичным генотипом [84].

Таблица 15 – Распространение SNP *acpB* 563C→T и SNP *acpB* 1381A→G у дополнительной выборки штаммов группы A.Br.Vollum различного географического происхождения

Номер доступа в GenBank	Наименование штамма	Место выделения	SNP <i>acpB</i> 563C→T	SNP <i>acpB</i> 1381A→G
1	2	3	4	5
GCA_003045745	COVASU	Индия	-	+
SRR1739961	2000031008	США	-	+
SRR2339356	2002734255	США	-	+
SRR2339406	2002734264	США	-	+
SRR2339549	2002734276	США	-	-

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5
SRR2339634	2002013132	Пакистан	-	-
SRR2968161	A0363	Норвегия	-	+
SRR2968162	A0380	Ирландия	-	+
SRR2968173	A0615	КНР	-	-
SRR5811120	2002734049	Великобритания	-	-

Эволюционная линия С (canSNP-группа С.Br.001) в исследованной выборке представлена двумя штаммами (2002013094 и 2000031021), выделенными на территории США. Эти штаммы имеют одинаковые нуклеотидные последовательности по исследуемым генам плазмиды рХО2 и попадают в один GT по результатам филогенетического анализа их слитых последовательностей. Однако штамм 2000031021 утратил плазмиду рХО1, в связи с чем филогенетический анализ может быть осуществлен только на основе последовательностей генов, локализованных на рХО2 или хромосоме. При проведении MVLST_{рХО2}-анализа данные штаммы оказались филогенетически ближе к *B. cereus*, чем другие штаммы исследуемой выборки, с которыми их объединяют SNP *capC* 239C→T (80T→M), *capD* 208C→T (70H→Y), *capD* 667A→G (223K→E), и *capD* 1135T→A (379F→I) [84].

5.2.3. Применение для MLVA-генотипирования нового VNTR-локуса, расположенного на плазмиде рХО2 *B. anthracis*

В данном параграфе мы хотели бы обратить внимание на VNTR-локус, расположенный в гене *acrA* на плазмиде рХО2. Впервые этот локус был описан в работах [6, 7]. Авторы описали повтор размером 9 п.н. (АТАТАGАТА), и установили, что его кратность у штаммов эволюционной линии А равна двум, у штаммов линии В – трем, а у штаммов линии С – трем или одному.

В нашей работе при анализе последовательности гена *acrA* у 51 штамма *B. anthracis* и двух штаммов *B. cereus*, геномы которых депонированы в GenBank (Таблица 2), в процессе MVLST_{рХО2}-генотипирования, нами также выявлен полиморфизм этого VNTR-локуса. Однако при более детальном рассмотрении, на наш взгляд данный локус является несовершенным тандемным повтором АТА**GАТА. Если принять это во внимание, нами обнаружено, что в исследованной выборке штаммов из GenBank, число повторов у штаммов эволюционной линии А равно трем, а у штаммов линии В, принадлежащих группам В.Br.001/002 (n = 3) и В.Br.CNEVA (n = 4) и линии С – четырем [6, 84].

Структура тандемных повторов обуславливает специфический характер наиболее вероятных мутаций этих локусов – инсерций и делеций определенной повторяющейся последовательности. Кроме того, частота таких событий значительно превышает среднюю частоту других мутаций в геноме [29, 73, 111]. Поэтому наличие трех аллелей данного тандемного повтора в гене *acrA*, в совокупности у достаточно представительной выборки филогенетически различных

штаммов, указывает на его небольшую вариабельность. Можно предположить, что четыре повтора этого мотива характерны для «предкового генома» вида *B. anthracis* до разделения на географически и генетически обособленные группы. Возможно, снижение его кратности до трех приводило к экспрессии варианта белка AspA, обеспечивающего штамму селективное преимущество, например, за счет более эффективной регуляции экспрессии факторов патогенности. При этом архаичная форма с четырьмя повторами сохранилась у штаммов линий В и С [6, 84].

Ранее для MLVA-генотипирования возбудителя сибирской язвы было предложено использовать ряд VNTR-локусов, в том числе расположенных на плазмиде pXO2. Однако локусы, расположенные на данной плазмиде, представляют участки повторов длиной 2–3 п.н., для определения длины которых требуется дорогостоящее оборудование [166]. Описываемый локус представляет участок, состоящий из двух, трех или четырех tandemных повторов длиной 9 п.н., что позволяет разделять амплифицированные фрагменты в агарозном геле [6, 84]. Все вышесказанное в совокупности позволяет использовать число повторов в данном локусе как диагностический признак для дифференцирования эволюционных линий вида *B. anthracis*. Мы предлагаем дать ему название VNTRAspA.

К сожалению, используемый нами принцип сборки нуклеотидных последовательностей на основе данных полногеномного секвенирования не позволил однозначно сказать о числе повторов в регионе VNTRAspA у штаммов из «ГКПМ-Оболensk», в том числе относящихся к линии В. Поэтому нами сконструированы ПЦР-праймеры, фланкирующие описанный повтор и протестированы на ДНК коллекции штаммов *B. anthracis* из «ГКПМ-Оболensk», вошедших в исследуемую выборку. Мы применили подход MLVA-генотипирования путем амплификации локуса VNTRAspA и разделения полученных фрагментов в агарозном геле. Последовательности праймеров для амплификации VNTRAspA приведены в Таблице 18 (параграф 5.6. «Создание панели олигонуклеотидов для детекции филогеографически значимых мишеней»).

На Рисунке 6 приведен пример результатов применения локуса VNTRAspA для MLVA-типирования штаммов *B. anthracis* и дифференцирования эволюционных линий А и В. Результаты анализа с уверенностью позволили дифференцировать штаммы эволюционных линий А и В, и подтвердить гипотезу о наличии двух аллелей tandemного повтора, каждая из которых специфична для одной из двух эволюционных линий возбудителя сибирской язвы [6, 84]. Однако в результате проведенного анализа выявлено, что теоретическая длина амплифицированных фрагментов отличается от наблюдаемой. Так, теоретическая длина фрагмента, содержащего три tandemных повтора, составляет 245 п.н., а четыре – 254 п.н. Наблюдаемые длины соответствующих фрагментов составляют 300 и 309 п.н. (Рисунок 6) [84].

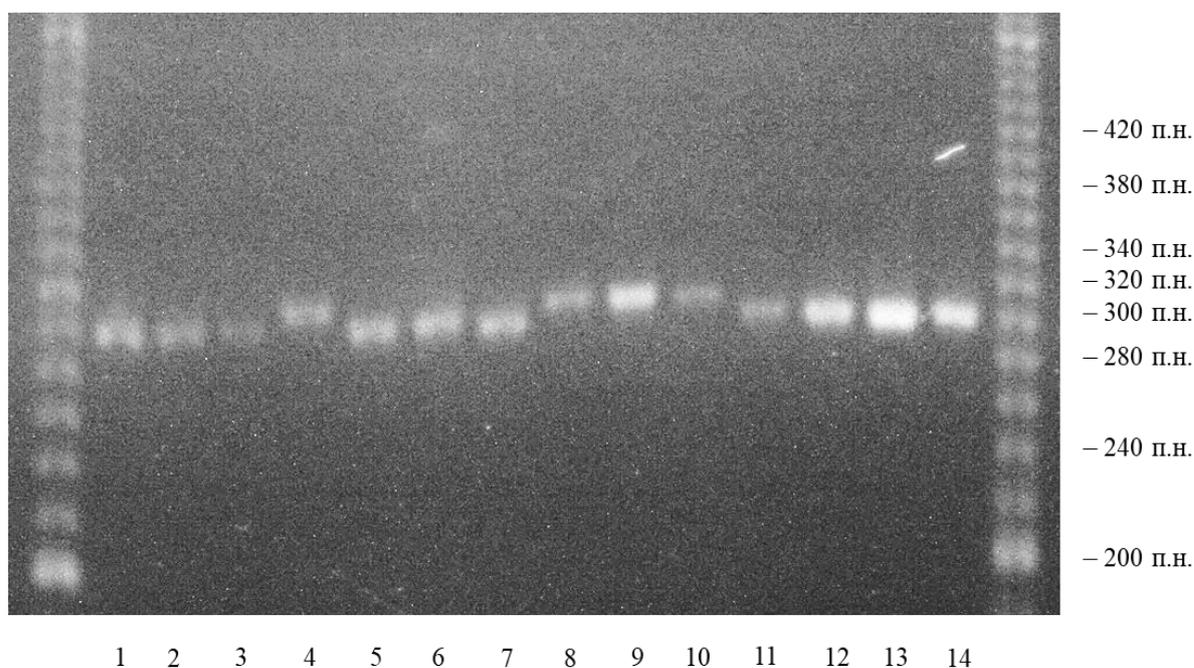


Рисунок 6 – Результат MLVA-генотипирования штаммов *B. anthracis* из коллекции «ГКПМ-Оболенск» с использованием локуса VNTR_{capA}. Номера дорожек соответствуют штаммам: 1 – 555/288; 2 – 7(992); 3 – 1056/51; 4 – 44; 5 – 531/17; 6 – 822/7; 7 – 1173; 8 – Yamal_2; 9 – I-364; 10 – 157(B-1107); 11 – LP50/3YA; 12 – LP51/4YA; 13 – 47/28; 14 – 1183. Дорожки 4, 8, 9 и 10 соответствуют штаммам линии В. Для определения длины фрагмента использован маркер молекулярных масс с шагом 20 п.н. «EZ Load 20 bp Molecular Ruler» (Bio-Rad, США)

Подводя итог данному параграфу, мы можем сделать ряд заключений. Разделение выборки на MVLST_{pXO2}-генотипы соответствует ее разделению на эволюционные линии А, В и С вида *B. anthracis*. Комбинирование результатов MVLST_{pXO1}- и MVLST_{pXO2}-генотипирования выявило, что центральным генотипом линии В является штамм 44, что дает некие основания утверждать, что в северной Евразии происходило эволюционное разделение линии В на группы В.Br.CNEVA и В.Br.001/002. SNP *capC* 351A→G является маркером штаммов группы А.Br.Aust94, циркулирующих в Кавказском регионе. MVLST_{pXO1}-GT4 MVLST_{pXO2}-GT1 представляет центральный генотип для штаммов *canSNP*-группы А.Br.Aust94 и наиболее близко связан с общим предком этой группы. Штаммы группы А.Br.Vollum, согласно результатам MVLST_{pXO2}-генотипирования делятся на две подгруппы, одна из которых выявлена на территории бывшего СССР. MLVA-генотипирование штаммов *B. anthracis* эволюционных линий А и В с использованием локуса VNTR_{capA}, расположенного на плазмиде pXO2, позволяет дифференцировать штаммы этих линий.

5.3. Поиск взаимосвязей *alo*-сиквенс-типа с другими признаками штамма *B. anthracis*

В ходе работы выявлено 7 ST гена *alo*, кодирующего антролизин O, один из основных вторичных факторов патогенности *B. anthracis* [31]. При этом в ряде случаев выявлена корреляцию между принадлежностью штамма к *can*SNP-группе, месту его выделения и SNP, выявленной в гене *alo*. Так SNP 1247T→G выявлена у четырех штаммов группы A.Br.005/006, выделенных в Юго-Восточной Африке (Танзания, Замбия, ЮАР), SNP 1265C→T – у трех из четырех штаммов A.Br.Vollum Северо-Американского происхождения (США), и SNP 1502G→A – у штамма H9401, выделенного в Корее, который относится к группе A.Br.005/007.

Таким образом, в гене *alo* выявлено наибольшее количество мутаций среди всех исследуемых генов, однако большая их часть является синонимичными и обнаружена у штаммов *B. cereus*. Большинство несинонимичных мутаций приводят к аминокислотным заменам на участке 1 – 300 а.о. белка антролизина O. SNP 1247T→G, 1265C→T и 1502G→A характерны для штаммов *B. anthracis* определенных филогеографических групп и могут быть использованы как диагностические.

5.4. Анализ результатов MLVA-генотипирования

5.4.1. Корреляция MLVA-профиля с *can*SNP-группой штамма *B. anthracis*

Как мы упоминали выше, среди перечисленных методов, MLVA-генотипирование является наиболее высокоразрешающим методом. Это подтверждается значением индекса биоразнообразия Симпсона, который для MLVA7 равен 0,9439 [0,9195÷0,9682], а для MLVA17 – 0,9649 [0,9413÷0,9885], даже с учетом того, что в данном случае мы приводим результаты генотипирования только штаммов из коллекции «ГКПМ-Оболенск». Для сравнения: для MVLST_{pXO1} он составляет 0,9038 [0,8793÷0,9284], а для *can*SNP-генотипирования – 0,8596 [0,8176÷0,9016]. Анализ приведенных данных MLVA-генотипирования позволил выявить некоторые закономерности.

Согласно результатам MLVA7, выборка разделяется на 25 MLVA7-GT (Таблица 7). Большая часть аттенуированных штаммов группируются в общие MLVA7-GT, однако, к сожалению, на настоящий момент не установлена их принадлежность к *can*SNP-группе в связи с отсутствием данных секвенирования.

В MLVA7-GT2 входят 8 штаммов, которые, за исключением аттенуированных, принадлежат *can*SNP-группе A.Br.008/011, а также MVLST_{pXO1}-GT3 и MVLST_{pXO2}-GT1. В MLVA7-GT4 входят 5 штаммов, причем штаммы 15(1345) и 11(1940) оба принадлежат *can*SNP-группе A.Br.Vollum, MVLST_{pXO1}-GT6 и MVLST_{pXO2}-GT1. Аналогичная ситуация наблюдается в случае

со штаммами MLVA7-GT8 (68/12 и 367/17), выделенных на весьма отдаленных географических точках (Тульская область и Азербайджан). Данные штаммы принадлежат canSNP-группе A.Br.008/011, MVLST_{pXO1}-GT3 и MVLST_{pXO2}-GT1. А также в случае со штаммами MLVA7-GT9 и MLVA7-GT10. Таким образом, путем иерархического генотипирования, предложенного в работе Keim с соавт. в 2004 г. [93], в следствие более высокого разрешения данный метод позволил выделить несколько MLVA7-GT внутри перечисленных филогенетических групп, в том числе canSNP-групп (приложение В).

Однако в MLVA7-GT3 входят 6 штаммов, принадлежащих к разным canSNP-группам: к A.Br.008/011 принадлежат 4 штамма (914/213, LP51/4YA, 8(2099), 1173), штамм 822/7 принадлежит к A.Br.Aust94, штамм 53169 – к A.Br.001/002. В MLVA7-GT5 также входят штаммы, принадлежащие к разным canSNP-группам. Кроме того, 13 штаммов из 59 имеют индивидуальные MLVA7-GT (GT13-25).

5.4.2. Популяционный анализ, эволюционная и филогеографическая значимость данных MLVA-генотипирования

На Рисунке 7 изображена дендрограмма, отражающая филогенетические отношения выявленных MLVA7-GT.

На Рисунке 8 представлено филогенетическое древо, построенное с использованием алгоритма goeBURST, что позволило выделить основные клональные комплексы исследуемой выборки по результатам MLVA7.

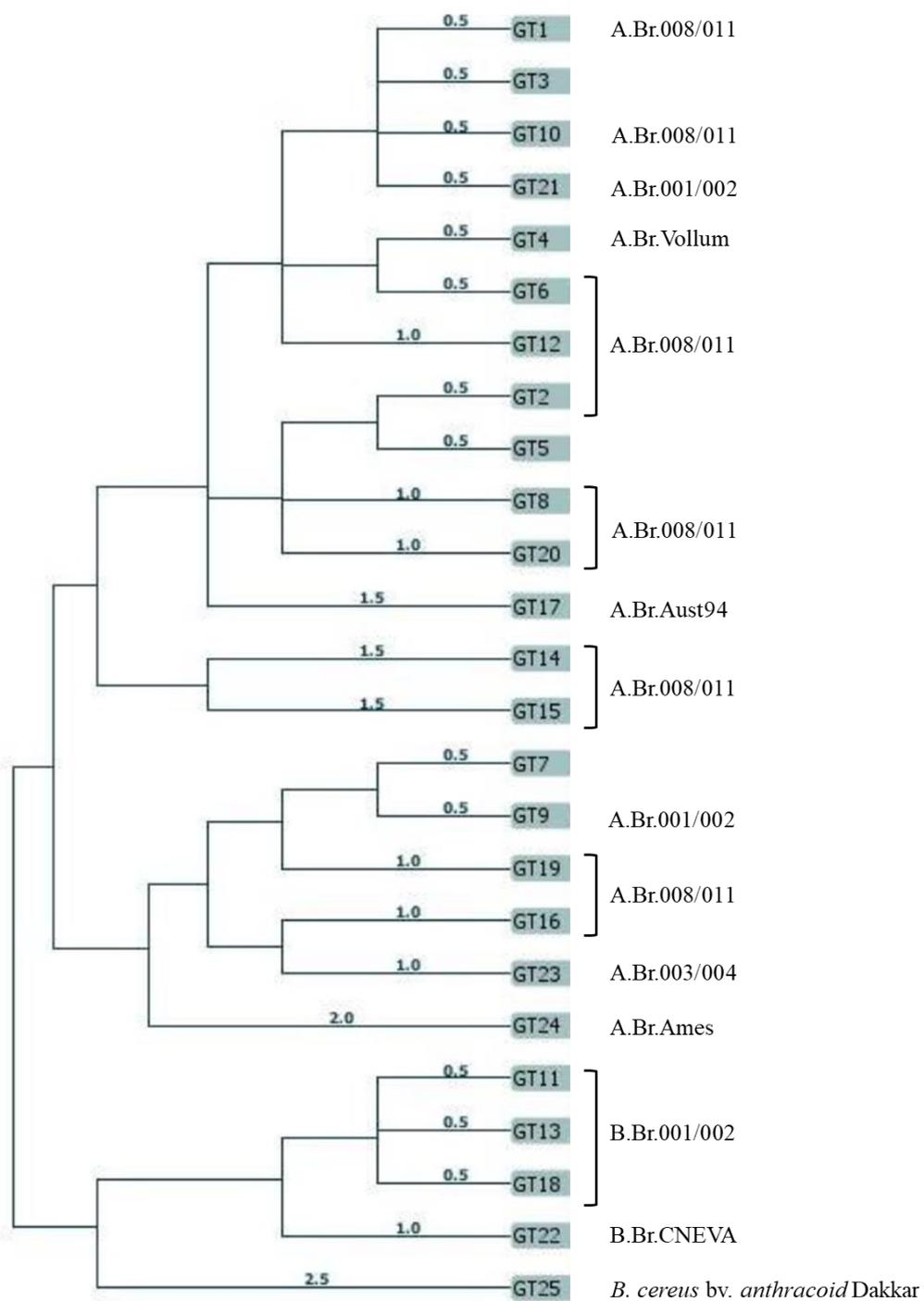


Рисунок 7 – UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая филогенетические отношения выявленных MLVA7-генотипов

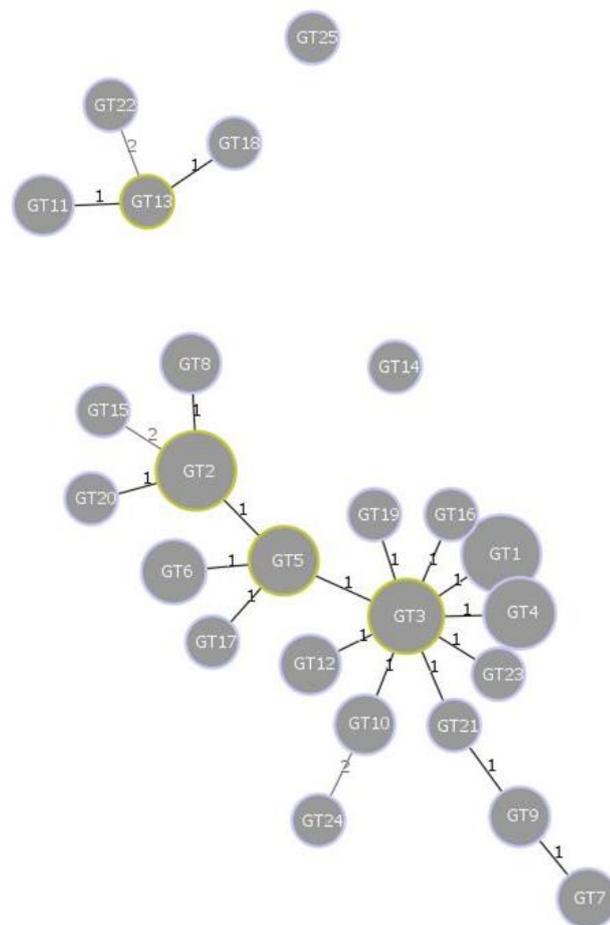


Рисунок 8 – Основные клональные комплексы, сформированные при MLVA7 и реконструированные с помощью goeBURST-алгоритма. Числами обозначена генетическая дистанция между MLVA7-генотипами

Согласно полученным результатам, выборка, состоящая из 59 штаммов из «ГКПМ-Оболенск», разделяется на 2 основных клональных комплекса. В один из которых входит 4 MLVA7-GT (GT11, GT13, GT18, GT22), к которым принадлежат все штаммы эволюционной линии В.

Интересно что GT14 является значительно филогенетически удаленным от выборки, причем в него входит один штамм 1(14) Stavropol, не имеющий выраженных генотипических отличий по результатам других методов. Наиболее филогенетически удаленным является MLVA7-GT25, в который входит один штамм *B. cereus* bv. *anthracoid* Dakkar.

При использовании 17 MLVA-локусов 22 штамма имеют индивидуальный MLVA17-GT. А среди исследуемой выборки, состоящей из 59 штаммов, выявлено 35 MLVA17-GT. Штаммы, попадающие в один MLVA17-GT, объединяет не только территориально близкое место выделения, но и в большинстве случаев общая *can*SNP-группа. Однако, и в случае с применением 17 локусов, один MLVA-профиль имеют некоторые штаммы, принадлежащие к разным *can*SNP-группам (приложение В).

На Рисунке 9 изображено филогенетическое древо, отражающее отношения выявленных MLVA17-GT.

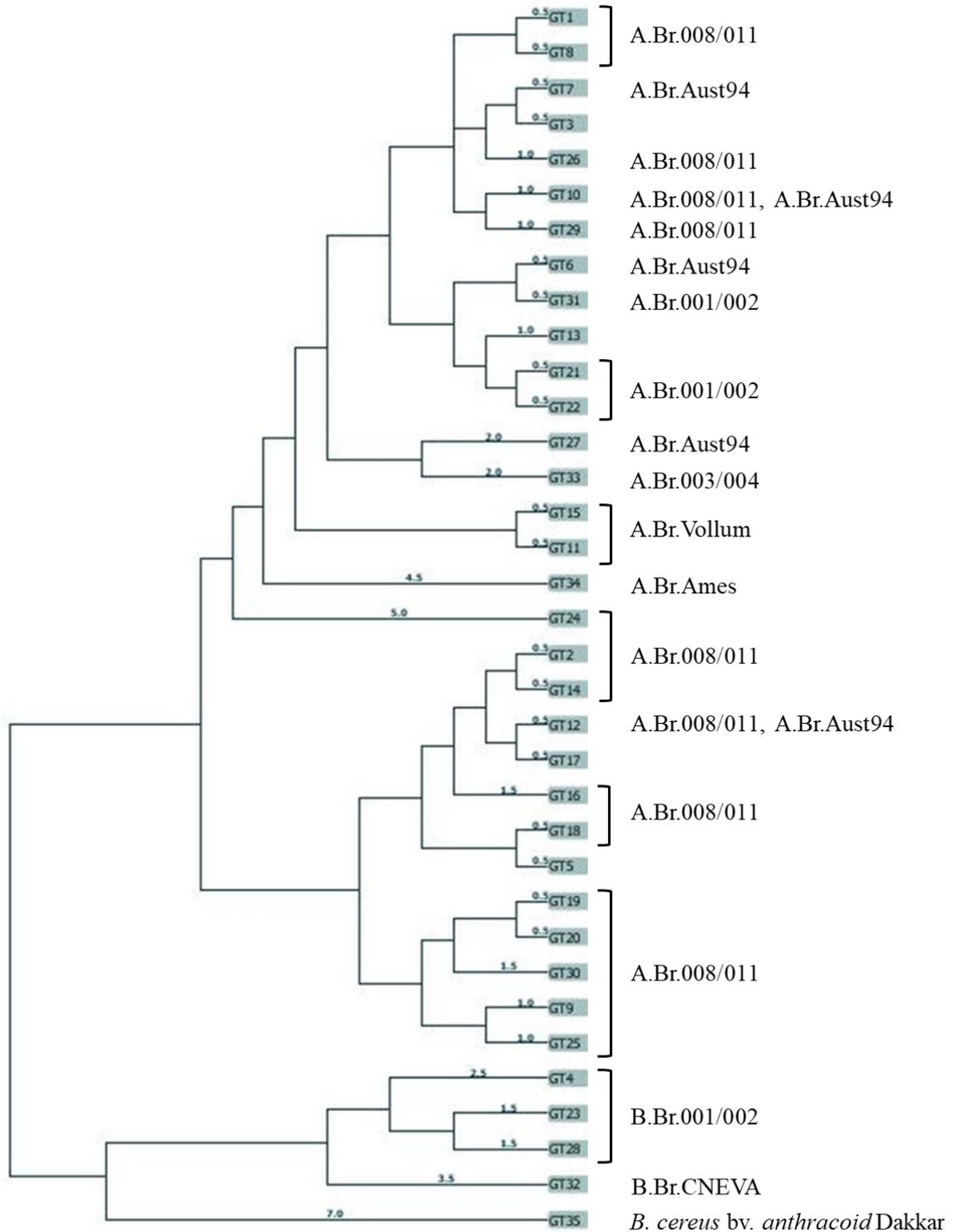


Рисунок 9 – UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая филогенетические отношения выявленных MLVA17-генотипов

Дополнительный анализ с использованием goeBURST-алгоритма позволил выявить клональные комплексы по результатам MLVA17 (Рисунок 10).

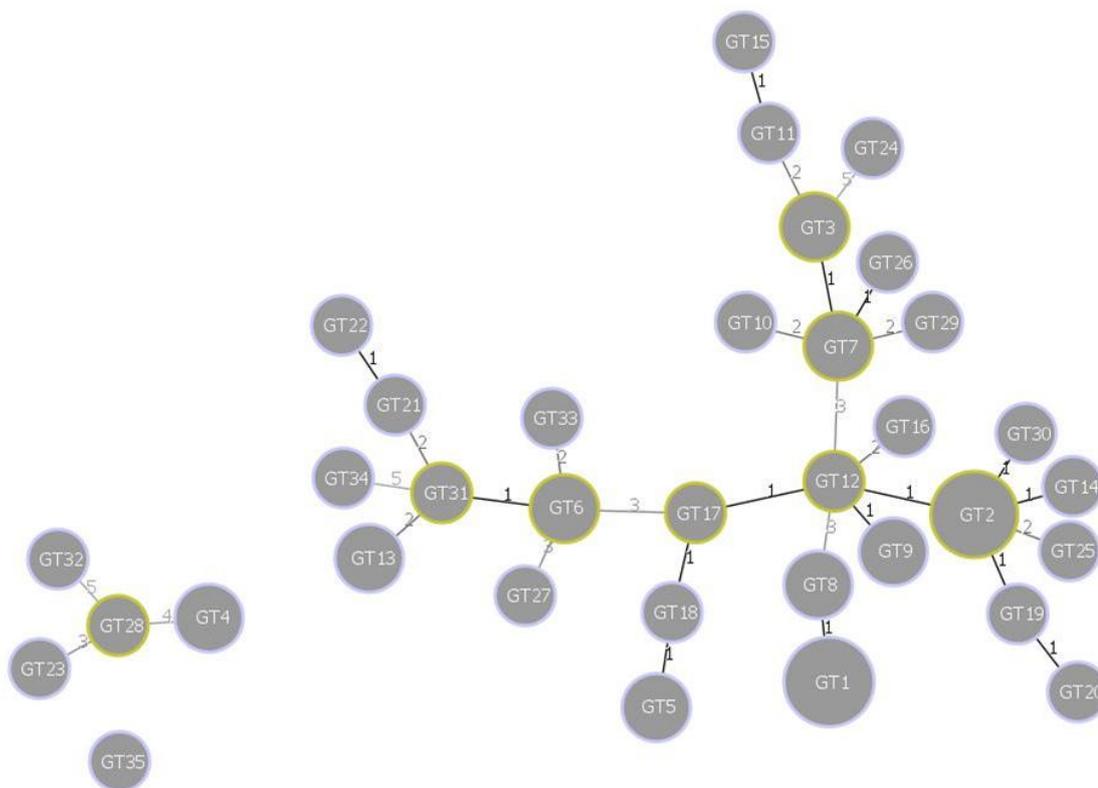


Рисунок 10 – Основные клональные комплексы, сформированные по результатам MLVA17 и реконструированные с помощью goeBURST-алгоритма. Числами обозначена генетическая дистанция между MLVA17-генотипами

По результатам MLVA17 также выделено два клональных комплекса, в один из которых вошли штаммы линии В (GT4, GT23, GT28, GT32), в другой – все остальные штаммы исследуемой выборки. При это штамм Dakkar снова является наиболее филогенетически обособленным (MLVA17-GT35)

Таким образом, при генотипировании исследуемой выборки с использованием схемы MLVA7 было выявлено 25 GT, а при ее дополнении десятью локусами была получена схема MLVA17, позволившая разделить выборку на 35 GT. При условии, что результаты MLVA7 и MLVA17 крайне близки и обе схемы имеют близкую разрешающую способность, использование схемы MLVA7 в качестве анализа первой линии позволило бы генотипировать штаммы с высоким разрешением и за минимальный временной период, а при необходимости схема MLVA7 может быть дополнена другими локусами.

Схема MLVA7 была использована нами при эпидрасследовании вспышки сибирской язвы на Ямале летом 2016 г., где была показана возможность использования этой схемы для экспресс-генотипирования представительной панели изолятов сибирезвездного микроба с достаточной для прикладных целей разрешающей способностью [167].

Из полученных нами данных также следует, что один MLVA-профиль могут иметь штаммы, сильно различающиеся происхождением, например, природные и вакцинные, и принадлежащие разным canSNP-группам. Это может быть следствием конвергенции в связи со сравнительно быстрой эволюцией тандемных повторов относительно всего генома. В работе [152] авторы выявили один и тот же MLVA15-GT для двух китайских штаммов, которые относятся к разным canSNP-группам (A.Br.Ames и A.Br.001/002) [152]. Поскольку маркеры canSNP являются более консервативными в сравнении с VNTR-локусами, авторы нескольких работ предупреждают об осторожности использования метода MLVA в отсутствие исследования по canSNP [21, 152]. Поэтому, в работе Keim с соавт. в 2004 г. [93] предложен подход, называемый PHRANA, который заключается в комбинировании MLVA- и canSNP-генотипирования. Выделенные высокостабильные и филогенетически информативные canSNP могут быть использованы для классификации неизвестного изолята в определенный кластер, в то время как последующее использование MLVA дискриминирует близкородственные изоляты. Иерархическое использование этих систем максимизирует скорость, филогенетическую точность и разрешающую способность при минимизации финансовых затрат [93]. Мы также считаем необходимым при возможности использовать иерархическую систему генотипирования, с использованием, например, canSNP, с последующим применением схемы MLVA7.

Отдельно нам хотелось бы остановиться на нескольких филогенетических группах, выделенных путем MLVA-генотипирования. Группа штаммов 157(B-1107), LP53/5YA, 44, I-364, Yamal_2 имеет обособленность среди исследуемой выборки и по результатам MLVA-генотипирования, несмотря на то что только штаммы LP53/5YA и Yamal_2 попадают вместе в один MLVA7-GT11 и MLVA17-GT4. Как было показано в предыдущих разделах, перечисленные штаммы относятся к MLST-ST3, принадлежат к эволюционной линии В (canSNP-группы B.Br.001/002 и B.Br.CNEVA), а также отличаются рядом маркеров по результатам MVLST_{рх01}- и MVLST_{рх02}-генотипирования. Кроме того, эти штаммы имеют одинаковое число повторов в ряде маркеров MLVA со штаммом *B. cereus* bv. *anthracoid* Dakkar (приложение В). Штаммы 157(B-1107), LP53/5YA, 44, I-364, Yamal_2 имеют одинаковое число повторов в локусах: bams03, bams22, vtrA, bams01, bams23, которое отличает их от исследуемой выборки. По локусам vtrA и bams51 у этой группы и у штамма Dakkar одинаковое число повторов, не встречающееся у других штаммов. По локусу vtrB1 19 повторов среди исследуемой выборки выявлено у штаммов 157(B-1107), LP53/5YA, I-364, Yamal_2 и Dakkar (приложение В).

По локусу *bams34* среди перечисленных штаммов выявлен любопытный полиморфизм. Штамм 44 отличается от 157(B-1107) и LP53/5YA тем, что в локусе *bams34* у него 14 повторов, причем у других штаммов такое число повторов не встречается, хотя надо учесть, что он отличается еще и тем, что относится к группе V.Br.CNEVA. У штаммов Yamal_2 и LP53/5YA локус *bams34* не амплифицируется. Штамм I-364 имеет в локусе *bams34* семь повторов – такое же количество повторов по данному локусу выявлено только у Dakkar (приложение В). В работе Еременко с соавт. [6] описано возможное объяснение такого полиморфизма, связанного с делециями и однонуклеотидными заменами в гене *gerHA* *B. anthracis*, в котором расположен локус *bams34*.

Все это говорит не только об обособленности этой группы штаммов и ее более близком родстве с видом *B. cereus*, но и о вероятно более древнем происхождении чем другие штаммы анализируемой выборки. Стоит учесть, что большинство исследуемых штаммов выделены в районах с развитым животноводством, в условиях, позволяющих возбудителю сибирской язвы чаще становиться участником инфекционного процесса. Большое число циклов деления бактериальных клеток создает условия для изменения числа VNTR-повторов и для эволюции вида в целом. А согласно устоявшейся модели, вид *B. anthracis* произошел от *B. cereus* не только путем приобретения плазмид вирулентности, но и путем эволюции генома в целом [61]. Штаммы 157(B-1107), LP53/5YA, 44, I-364, Yamal_2, напротив, выделены на территории современной Сибири (для штамма 44 место выделения неизвестно), в частности, LP53/5YA и Yamal_2 выделены из вечной мерзлоты. Такие условия значительно снижают вероятность появления новых циклов заражения и, соответственно, замедляют эволюцию генома. Это является аргументом в пользу гипотезы о их более древнем происхождении и выраженном родстве с видом *B. cereus*.

Исходя из полученных результатов штамм *B. cereus* bv. *anthracoid* Dakkar отличается от штаммов *B. anthracis* не только MLVA7-профилем (приложение В). Практически во всех VNTR-локусах у данного штамма выявлено число повторов, значительно отличающееся от тех, которые выявлены у *B. anthracis*. Так как по многим микробиологическим характеристикам штамм был отнесен к роду *B. cereus*, полученные нами результаты вполне ожидаемы. Однако используемые нами VNTR-локусы предназначены для вида *B. anthracis* и не подходят для генотипирования вида *B. cereus* в связи с тем, что зачастую не амплифицируются при использовании генома *B. cereus* в качестве матрицы. Данный штамм, имеющий близкое родство со штаммами *B. anthracis*, может быть исследован в связи с возможностью амплифицировать VNTR-локусы, несмотря на отсутствие у него плазмид *pXO1* и *pXO2*. Он удачно дополнил выборку, аналогично штаммам *B. cereus*, которые были включены в исследования методами MVLST и MLST.

Генотипирование штаммов очень важно, прежде всего, в связи с возможностью обмена и сравнения полученных данных между лабораториями. Несмотря на уже имеющиеся данные

MLVA-анализа по некоторым штаммам из нашей коллекции [1, 119], большое количество пассажей может приводить к дивергенции штаммов, что обуславливает необходимость генотипирования конкретной коллекции. Например, в работе Antwerpen с соавт. в 2011 г. [21] были исследованы 40 штаммов *B. anthracis* из болгарской коллекции (Historical Collection of the Medical Military Academy of Sofia, Bulgaria) путем canSNP-типирования и применения панели MLVA15. 27 из 40 штаммов не имели одной или обеих плазмид. Авторы предполагают, что потеря плазмид могла произойти за годы хранения штаммов, а не имела место быть изначально при выделении культур. Однако, авторы этой работы применяют кластеризацию на основе метода UPGMA, при этом отсутствующие маркеры игнорируются и анализ данных основывается только на хромосомных маркерах. Как следствие, все штаммы с одинаковым количеством повторов по хромосомным маркерам попадают в один кластер.

Как известно, зачастую аттенуация штаммов связана именно с потерей плазмид вирулентности. Несмотря на широкое использование аттенуированных штаммов *B. anthracis* в изготовлении вакцин для человека и животных [9], а также в качестве модельных объектов в различных исследованиях, связанных с сибирской язвой, для многих из них ранее не осуществлялось генотипирование ни одним из используемых нами методов. К сожалению, в связи с отсутствием данных их полногеномного секвенирования, мы не можем сделать однозначный вывод о принадлежности этих штаммов к одной из canSNP-групп только на основании MLVA. Тем не менее в работах [1, 119] для некоторых аттенуированных штаммов получены MLVA-профили, что позволило сравнить их с нашими данными.

В работе Merabishvili с соавт. в 2006 г. [119] была применена схема MLVA8 для генотипирования штаммов, выделенных на территории Грузии, а также штаммов Sterne 34F2, STI-1, 55 VNIIIVViM, 71/12, заложенными в коллекцию еще при СССР. Результаты, полученные по четырем локусам (*vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC2*), также использованными в нашей работе, были соотнесены с полученными нами результатами. В работе Афанасьева с соавт. в 2014 г. [1] была использована схема MLVA15. Среди исследуемых штаммов были STI-1, 55 VNIIIVViM, 34F2 Sterne. Мы сравнивали результаты, полученные авторами по локусам *vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC2* и VNTR23. Результаты, полученные нами при исследовании штаммов STI-1, 55 VNIIIVViM, 34F2 Sterne по локусам *vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC2*, VNTR23 совпадают с результатами работ [1, 119]. Штамм 71/12 по локусам *vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC2* имеет одинаковое число повторов согласно полученным нами результатам и работе [119].

В работах, в которых применен метод MLVA-генотипирования, как правило, используются меченные ПЦР-праймеры, секвенаторы и приборы для проведения капиллярного электрофореза, что является довольно дорогостоящим процессом [28, 95, 112, 119, 166, 176]. Мы модифициро-

вали этот метод и использовали немеченые ПЦР-праймеры для агарозо-совместимых VNTR-локусов [164], гель-электрофорез проводили в агарозном геле в TBE-буфере с последующим окрашиванием раствором бромистого этидия и регистрацией результатов при УФ-облучении. Такой подход позволяет определить длину амплифицированного VNTR-локуса и количество повторов в условии длины повтора не менее 9 п.н. и длины локуса в пределах 600 п.н., а при длине повтора не менее 30 п.н. – в пределах 700 п.н. Поэтому в ходе работы выявлено, что в описанных условиях метод MLVA-генотипирования не применим для некоторых локусов в связи с большой длиной (более 600 п.н.) амплифицированных участков [166]. Используемые нами расходные материалы и оборудование доступны с финансовой точки зрения практически любой лаборатории.

5.4.3. Возможная роль VNTR-локусов в открытых рамках считывания

Было показано, что VNTR выполняют различные функции в бактериальных геномах, в том числе играют роль в регуляции экспрессии генов, а также приводят к вариациям среди ряда генов, ассоциированных с вирулентностью [6, 27, 114, 118, 124, 155, 178, 185]. Многие бактериальные гены, содержащие VNTR, имеют высокую частоту мутаций, что может обеспечить быструю адаптацию к изменяющимся условиям окружающей среды [122].

Большинство используемых нами VNTR-локусов расположены внутри последовательностей генов, кодирующих те или иные белки *B. anthracis*, для многих из которых описана роль, которую они играют в бактериальной клетке (Таблица 16). Кроме того, длина всех исследуемых в работе повторов кратна трем, и по крайней мере для некоторых описанных локусов известно, что благодаря этому свойству изменение числа повтора не приводит к сдвигу рамки считывания в гене, в котором расположен VNTR-локус [95].

Таблица 16 – Белки, в генах которых обнаружены VNTR-локусы

VNTR-локус	Идентификационный номер белка в GenBank, в гене которого расположен VNTR-локус
vrrA	Повтор расположен внутри псевдогена <i>vrrA</i>
bams03	AAT29492.1
bams22	AAT32084.1
bams34	AAT34107.1
VNTR23	AAT32957.1
vrrC1, vrrC2, vrrC3, bams24	AAT34061.1
bams01	AAT29983.1
bams15	AAT33887.1
bams21	AAT35377.1
bams23	AAT29649.1
bams25	AAT34564.2
bams05	AAT31464.1
bams28	AAT30670.1
bams44	AAT33781.1
bams51	AAT31268.1
vrrB1, vrrB2	AAT35443.1

Надо сказать, что роль и локализация большей части белков, в которых обнаружены тандемные повторы, так или иначе связана с поверхностью клетки и поверхностно расположенными структурами. Например, четыре VNTR-локуса локализованы в генах, кодирующих основные компоненты экзоспориума *B. anthracis* (bams13, bams15, bams30 и bams31). В работе Lista с соавт. в 2006 г. [112] отмечено, что локусы bams13 и bams30 являются наиболее полиморфными и ассоциированы с генами, кодирующими компоненты экзоспориума. В гене *bclA* расположен VNTR-локус bams13, не используемый в нашей работе [110, 112]. Ген *bclA* кодирует коллаген-подобный белок BclA, который является основным поверхностным белком спор [163] и выявлен у всех членов группы *B. cereus* [41, 110]. Этот гликопротеин является структурной составляющей нитей экзоспориума на поверхности спор. Известно, что полиморфизм длины коллагенподобной области белка BclA приводит к вариациям филаментов экзоспориума. По мере того, как тандемные участки внутри гена становятся длиннее, нити также увеличиваются в длине [163]. Вариация длины коллагеноподобной области гена *bclA* была использована для дифференцировки штаммов *B. anthracis* [41, 96, 110]. Локус bams15 расположен в гене *bclD*, кодирующем, как и *bclA*, коллаген-подобный белок. Повторяющиеся участки этих генов кодируют коллагеноподобную область соответствующих белков – Gly-X-Y (то есть глицина, за которым следуют два дополнительных остатка – GXY) [110]. Авторы работы Lista с соавт. 2006 г. [112] предполагают, что локус bams30 локализован в гене, который является результатом рекомбинации между двумя генами *B. cereus*, которые были гомологичны генам, ответственными за формирование экзоспориума у возбудителя сибирской язвы, еще до появления вида *B. anthracis*. Интересно, что аналогичная перестройка наблюдается независимо у штамма *B. cereus* G9241, который вызвал схожее с сибирской язвой заболевание у человека [89]. В результате этого слияния первая часть тандемного повтора содержит блок повторения 27 п.н., в то время как вторая содержит повтор 9 п.н. [112].

В гене *vrnC* описано три варианта VNTR-повторов. Причем участок VNTR не наблюдается в гомологах *vrnC* у *B. subtilis*. Полный VNTR *vrnC* распределен по трем разделенным повторяющимся участкам: *vrnC1* (36 п.н.), *vrnC2* (18 п.н.) и *vrnC3* (42 п.н.). Выявлена гомология внутри и между разными участками повторов. Повторы несовершенны – высокий уровень полиморфизма наблюдается в последовательностях *vrnC1* и *vrnC2*, но эти повторяющиеся структуры всегда кратны трем. В то время как три соседних VNTR независимо эволюционируют – у них остаются гомологичные последовательности. Предположительно, *vrnC1* и *vrnC2* эволюционировали от первого общего предкового VNTR, после чего произошла дивергенция *vrnC2* и *vrnC3* [96]. Также в гене *vrnC* описан локус bams24.

Белок VrrC предположительно является ДНК-транслоказой. Большая открытая рамка считывания *vrnC* (3651 п.н.) может кодировать 1217 а.к. (геном Ames ancestor). Показана гомология предполагаемого белка VrrC с членами семейства белков FtsK-SpoIII ДНК-транслоказ. SpoIII

– это ДНК-зависимая АТФ-аза, которая необходима для постсептационной транслокации хромосомы во время спорообразования. Белок VtrC содержит консервативный АТФ-связывающий мотив, найденный в FtsK/SpoIIIE ДНК-транслоказах. Этот домен придает функционально важную АТФ-азную активность SpoIIIE *B. subtilis* [25]. Этот консервативный домен находится близко к карбоксильному концу VtrC, вдали от варибельного региона, который находится в центральной части [96]. Предположительно, VNTR в *vrrC* не требуется другим бактериям рода *Bacillus*, а его присутствие в гене *vrrC* *B. anthracis* не играет важной биологической роли, а просто допустимо в последовательности белка [96]. Интересно, что в нашей выборке, за исключением штамма Dakkar, для *vtrC2* характерны только два состояния, различающиеся между собой наличием пяти повторов (17 и 21).

Vams34 расположен в гене, кодирующим синтез белка GerHA. GerHA – одна из трех субъединиц рецептора питательных герминантов, вызывающих внутриклеточное прорастание споры *B. anthracis*. GerHA предположительно является интегральным мембранным белком, локализованным на внутренней мембране споры [6, 24, 184, 185]. Выше описан полиморфизм, обнаруженный по этому локусу в исследуемой нами выборке.

Локусы *vtrB1* и *vtrB2* локализованы в гене, кодирующим белок VtrB. Вероятно, он является трансмембранным белком, не являясь геном домашнего хозяйства и не участвуя в споруляции. Предположительно, белок имеет трансмембранные домены, фланкирующие варибельные области. BLAST-поиск в базе данных GenBank не обнаружил сходства аминокислотной последовательности VtrB ни с одной общедоступной последовательностью белка, включая белки *B. subtilis*, однако в работе [148] описано, что этот ген встречается у некоторых штаммов *B. cereus*. В сочетании с предсказанными трансмембранными доменами, фланкирующими варибельные области, это предполагает мембранно-закрепленное цитозольное или внеклеточное расположение белка [148].

Локус *bams23* локализован в гене, кодирующим белок, предположительно являющийся интерналином. Локус *bams44* – в гене, кодирующим белок SafA, необходимый для сборки споровой оболочки. Известно, что у *B. subtilis* он локализуется в пространстве между кортексом и оболочкой (внутренней мембраной) в зрелых спорах [76]. А *bams5* и *bams28* расположены в генах, кодирующих пенициллин-связывающие белки.

Подводя итог данному параграфу, можно сделать ряд заключений. Разделение исследованной выборки на клональные комплексы по результатам MLVA7 и MLVA17 соответствует ее разделению на основные эволюционные линии – А, В и С и *canSNP*-группы в рамках этих линий, а также результатам MVLST_{рх01} и MVLST_{рх02}. В ряде случаев один MLVA-профиль имеют штаммы, принадлежащие к разным *canSNP*-группам. Это обуславливает необходимость использования этого высокоразрешающего метода генотипирования в иерархичном порядке после

canSNP-генотипирования. Схема MLVA7 показала разрешающую способность, сравнимую с MLVA17, и рекомендуется как метод генетического анализа первой линии. Штаммы линии В имеют одинаковое число повторов в нескольких локусах со штаммом *B. cereus* bv. *anthracoid* Dakkar, что показывает их более близкое филогенетическое родство с видом *B. cereus* и архаичность. Все используемые локусы имеют хромосомную локализацию и могут быть применены для одновременного генотипирования вирулентных и аттенуированных штаммов, лишенных плазмид вирулентности. Большинство VNTR-локусов расположено в открытых рамках считывания, причем из-за кратности повтора, равной трем нуклеотидам, изменение числа повторов не приводит к сдвигу рамки считывания. Большая часть соответствующих открытым рамкам считывания белков, для которых известна функциональная роль, в той или иной степени связана с поверхностными структурами бактериальной клетки.

5.5. MLST-генотипирование

Как известно, степень генетического разнообразия в пределах различных бактериальных видов варьирует в широких пределах. Низкая степень полиморфизма на генетическом уровне [40, 86, 95, 176] у членов группы *B. cereus* затрудняет определение вида изолятов *B. anthracis*.

MLST – один из главных методов генотипирования, применяемых при филогенетических исследованиях и видовом дифференцировании изолятов группы *B. cereus*. Метод основан на определении нуклеотидных последовательностей участков нескольких генов «домашнего хозяйства» (то есть генов, кодирующих белки, необходимые для выполнения главных метаболических функций клетки), локализованных на бактериальной хромосоме. Такой подход позволяет избежать влияния плазмидного профиля на результаты генотипирования. В результате исследуемый штамм может быть отнесен к одному из ST, что позволит дифференцировать его от других видов бацилл и выявить филогенетическое положение в пределах группы *B. cereus*. Поэтому мы решили использовать этот метод в нашей работе.

В результате MLST-генотипирования среди исследуемой выборки нами выявлено небольшое число аллелей, несмотря на различные источники выделения исследуемых штаммов, разделенные как с географической точки зрения, так и временными интервалами выделения, включая вакцинный лабораторный штамм ST1-1. В численном выражении высокую генетическую мономорфность выборки можно проиллюстрировать расчетом индекса биоразнообразия Симпсона, составляющим 0,5134 [0,4159÷0,6109]. Такое распределение по ST в целом отражает частоту встречаемости различных ST в глобальной популяции *B. anthracis*. На момент написания работы из 640 штаммов *B. anthracis*, представленных в PubMLST к ST1 относились 508 штаммов, к ST2 – 19 штаммов и к ST3 – 94 штамма. Остальные 12 ST (ST134, ST135, ST552, ST553, ST933,

ST1659, ST2006, ST2007, ST778, ST1799, ST1887 и ST2005) были представлены преимущественно одним штаммом (в ST778 входили 2 штамма, в ST2005 – 2 штамма и 6 штаммов в ST933). В рамках только вида *B. anthracis* индекс Симпсона в представленной на PubMLST выборке составляет 0,348, что ниже, чем у многих других методов генотипирования [162]. Отсутствие в исследованной нами выборке штаммов из «ГКПМ-Оболенск» третьего по распространенности ST2 можно объяснить его редкой встречаемостью, или отсутствием ST2 на территории России и сопредельных государств, где были выделены описываемые в настоящей работе штаммы [4].

На Рисунке 11 изображена UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая филогенетические отношения выявленных нами MLST-ST.

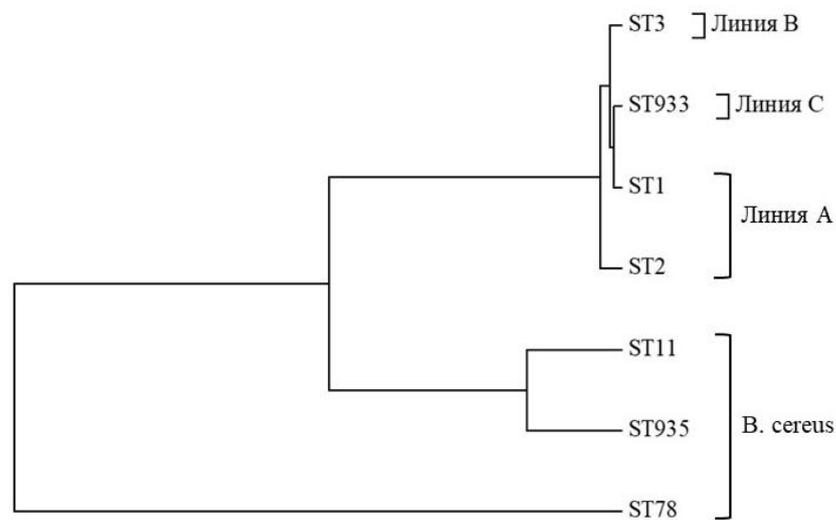


Рисунок 11 – UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая филогенетические отношения выявленных MLST-сиквенс-типов

Как видно из этого рисунка, полученные нами результаты еще раз подтверждают гипотезу о клональной структуре вида *B. anthracis*. Среди штаммов *B. anthracis* из GenBank обнаружено 4 ранее описанных ST (ST1, ST2, ST3, ST933), а среди четырех штаммов *B. cereus* – 3 ST (ST11, ST78, ST935). Причем результаты MLST соответствуют разделению штаммов *B. anthracis* на основные эволюционные линии. Штаммы ST1 и ST2 принадлежат эволюционной линии А, штаммы ST3 – линии В, штаммы ST933 – линии С [4].

Однако здесь мы впервые показали не только разделение штаммов на ST, соответствующие эволюционным линиям, но и филогенетическое положение штаммов, выделенных на территории России и сопредельных государств в общей филогенетической структуре группы *B. cereus* complex. Особый интерес представляют штаммы ST3 из коллекции «ГКПМ-Оболенск», поскольку эта группа выделена в данном случае методом, применяемым скорее для дифференцирования

изолятов близкородственных видов, нежели одного вида. Таким образом результаты нашего исследования подтверждают значительную обособленность этой группы штаммов среди нашей коллекции [4].

MLST-генотипирование в пределах вида *B. anthracis* обладает небольшой разрешающей способностью. Однако, секвенирование нуклеотидных последовательностей, используемое для генотипирования методом MLST, обуславливает ряд преимуществ. Полученные данные хорошо воспроизводимы среди лабораторий, а широкая доступность полных последовательностей геномов различных штаммов позволяет проводить исследования *in silico*. Так, существует база данных PubMLST, в которой представлены MLST-профили большого количества патогенных микроорганизмов, полученные в работах по исследованию методом MLST, в том числе штаммов *B. cereus* complex и *B. anthracis* в частности. Стоимость полногеномного секвенирования штамма вплотную приблизилась к стоимости секвенирования панели локусов, используемых для MLST. При этом использовать прочитанную последовательность генома возможно для *can*SNP-, полногеномного SNP- и MLST-анализа, а при использовании гибридных технологий секвенирования, объединяющих данные, полученные на разных аппаратных платформах, например Illumina и Nanopore, еще и для MLVA-генотипирования. Кроме того, использование в данном подходе только хромосомных локусов позволяет проводить исследования и для аттенуированных штаммов, лишенных одной или обеих плазмид вирулентности.

Также мы обнаружили синонимичную замену 558T→C в гене *gmk* у штамма *B. anthracis* 219/6. Эта мутация расположена за пределами участка гена, который используется для генотипирования по Priest с соавт. [139], поэтому сведения о ее распространенности у *B. anthracis* и группы *B. cereus* complex в PubMLST отсутствуют. Мутация была обнаружена в связи с использованием данных полногеномного секвенирования вместо секвенирования генотипически-значимых участков генов. Для оценки распространенности выявленной мутации в гене *gmk* мы использовали BLAST-анализ. Описанная мутация обнаружена также у 25 штаммов, представленных в GenBank, из которых 14 относятся к виду *B. cereus*, 9 – к *B. thuringiensis*, один штамм с неуточненной видовой принадлежностью, и только один принадлежит к виду *B. anthracis* (штамм MCCC 1A02161). Этот штамм сибиреязвенного микроба с аналогичной мутацией относится к ST778. Более того, этот ST представлен в PubMLST всего двумя штаммами – *B. anthracis* MCCC 1A02161 и *B. anthracis* N1ZF2, выделенными из донных отложений Южно-Китайского моря. Но нетипичное для сибиреязвенного микроба место выделения штаммов и результаты анализа SNP-профиля указывают на то, что эти штаммы были отнесены к виду *B. anthracis* ошибочно [136], и, скорее всего, относятся к неантрацидным видам *B. cereus* complex. Нетипичная для *B. anthracis* замена в гене *gmk*, тем не менее, едва ли может сама по себе указывать на то, что штамм 219/6 не принадлежит виду *B. anthracis*. Тем более, что он абсолютно типичен по своим

культуральным и фаготипическим свойствам, обладает плазмидами вирулентности *B. anthracis* и вирулентен для мышей ($LD_{50} = 10^1$ КОЕ). И, по всей видимости, мы имеем дело с генетическим маркером, уникальным для штамма 219/6 [4].

По данному параграфу, мы можем сделать несколько заключений. Разделение исследованной выборки на сиквенс-типы по результатам MLST-генотипирования соответствует ее разделению на основные эволюционные линии (А, В, С) и позволяет уверенно дифференцировать штаммы *B. anthracis* от штаммов *B. cereus* и даже *B. cereus* bv. *anthracis*. При этом все используемые локусы имеют хромосомную локализацию и могут быть применены для MLST-генотипирования утративших плазмиды штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*.

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

До настоящего времени предпринимались попытки выявления маркеров, указывающих на географическое происхождение штамма *B. anthracis*, однако они были не вполне успешными. Это логично, если учесть, что вид *B. anthracis* генетически высоко мономорфен, что затрудняет дифференцирование любых его внутривидовых групп. При этом сибиреязвенный микроб поражает преимущественно сельскохозяйственных животных и формирует эндоспоры, устойчивые в окружающей среде и легко переносящие транспортировку. Благодаря этому внутривидовые группы легко распространяются антропогенным путем в короткие сроки на огромные расстояния [167, 181]. Это затрудняет привязку того или иного GT к определенному географическому ареалу. Единственной системой типирования, в некоторой степени привязанной к географии распространения филогенетических групп, оставалось *can*SNP-типирование [93, 176].

Однако в предыдущих разделах работы мы выявили ряд мутаций, характерных для определенных филогенетических групп исследуемой выборки, в том числе для подгрупп *can*SNP-групп, циркулирующих в том или ином географическом ареале. Помимо теоретического значения таких маркеров, как свидетельства эволюционных тенденций внутри *can*SNP-групп, их обнаружение обладает и прикладной значимостью. Выявление такого маркера в геноме анализируемого штамма при проведении эпидрасследования может указывать одновременно на его принадлежность к определенной *can*SNP-группе и вероятный ареал происхождения. Даже выявленные нами SNP в отдельных генах, не имеющие корреляции с географическим происхождением штамма, могут быть использованы как мишень определения принадлежности штамма к эволюционной линии и *can*SNP-группе, что может значительно сократить время, затрачиваемое на первичную генетическую характеристику штамма. Перечень выявленных мишеней, обладающих филогеографической значимостью представлен в Таблице 17.

Подход детекции SNP методом ПЦР является одним из самых сложных среди всех вариантов ПЦР-детекции. Нами был сконструирован набор олигонуклеотидов для индикации выявленных мутаций у штаммов *B. anthracis* путем AS-ПЦР (Таблица 18) [30]. Определение наличия каждой мутации производится путем постановки двух ПЦР-реакций, в которых используется один прямой праймер, общий для этих реакций и два обратных праймера, по одному в каждой реакции. Обратные праймеры несут 3'-концевой нуклеотид, комплементарный одному из двух аллельных состояний тестируемой нуклеотидной позиции, и дестабилизирующие нуклеотиды в -3 положении с 3'-концов обратных праймеров, препятствующие прохождению ПЦР в случае некомплементарности концевого нуклеотида. В результате амплификация проходит только в одной из пары реакций, в которую внесен праймер, соответствующий тому или иному аллельному состоянию тестируемой нуклеотидной позиции. Ранее в работе [30] был описан метод AS-ПЦР, однако предложенный авторами подход предполагает детекцию результатов в режиме реального времени, либо добавление GC-последовательности с 5'-конца одного из праймеров. В таком случае эффективность прохождения ПЦР определяется исходя из различия в температуре плавления праймеров. Однако здесь нами была поставлена цель – адаптировать подход AS-ПЦР под более доступное оборудование и сделать его простым и наглядным в исполнении. Поэтому в ходе работы были проведены испытания набора олигонуклеотидов, сконструированных для детекции филогеографически-значимых мутаций в генах факторов патогенности *B. anthracis* методом AS-ПЦР. Праймеры были синтезированы научно-производственной компанией «Синтол» (Россия).

Ряд сконструированных праймеров был испытан на панели из десяти исследуемых в работе штаммов *B. anthracis* (Таблица 1), для которых было осуществлено MVLST-генотипирование. Однако, в ходе испытания уже синтезированных праймеров, обнаружен ряд нюансов, ценных с точки зрения оптимизации AS-ПЦР. Так, для амплификации необходимо использовать набор «SNPdetect полимеразы» («Евроген», Россия), поскольку классическая Taq-полимераза является недостаточно специфичной. SNPdetect-полимераза является модифицированной Taq-полимеразой. Ее особенностями являются специфичная амплификация фрагментов ДНК длиной до 1000 п.н., а также отсутствие 5'→3' и 3'→5' экзонуклеазных активностей. Количество циклов амплификации и оптимальная температура отжига праймеров были подобраны эмпирически и представлены в таблице 20. Детекцию результатов рекомендуется проводить путем электрофореза в 2 % агарозном геле и 0,5 % TBE-буфере с окрашиванием в растворе бромистого этидия для более четкого определения наличия и размера полученных продуктов.

Тем не менее, в ходе работы обнаружено, что сконструированные праймеры для детекции SNP *lef* 895G→A и SNP *acrA* 853G→A, а также праймеры для выявления нуклеотидов *pagA* 981T, *суа* 539A и *capC* 351A не позволяют выявить различий между исследуемыми группами штаммов. Несколько праймеров показали по одному-два ложноположительных или ложноотрицательных

результата: *pagA* 981A (один ложноположительный и один ложноотрицательный), *capC* 351G (один ложноположительный), *capA* 1033A (один ложноположительный), *capA* 1033G (один ложноотрицательный) (Таблица 19). Для таких олигонуклеотидов требуется дополнительная оптимизация условий амплификации.

Таким образом, здесь оптимизирован метод AS-ПЦР и сконструирован набор олигонуклеотидов, позволяющий определить филогенетическую принадлежность штаммов *B. anthracis* эволюционных линий А, В и С, а также филогенетических групп *cap*SNP-групп А.Br.008/011, выделенных на территории бывшего СССР, и А.Br.Aust94, выделенных на территории Кавказа. Предложенный подход может быть использован при исследовании штаммов на предмет принадлежности к интересующей филогеографической группе после проведения *cap*SNP- и MLVA-генотипирования при отсутствии возможности осуществления полногеномного секвенирования.

Таблица 17 – Мутация и филогенетическая группа штаммов *B. anthracis*, для которой она характерна

Мутация	Детектируемая филогенетическая группа
1	2
<i>alo</i> 1247T→G	Мутация выявлена у штаммов группы A.Br.005/006, выделенных в Юго-Восточной Африке (Танзания, Замбия, ЮАР)
<i>alo</i> 1265C→T	Штаммы группы Vollum Северо-Американского происхождения (США)
<i>pagA</i> 981A→T	Подгруппа штаммов <i>can</i> SNP-группы A.Br.008/011, выделенных на территории бывшего СССР (MVLST _{рх01} GT3)
<i>pagA</i> 1803T→C	Подгруппа штаммов <i>B. anthracis can</i> SNP-группы A.Br.Aust94, выделенных в Северной Америке
<i>pagA</i> 1693C→T	Штаммы <i>can</i> SNP-группы A.Br.Vollum, выделенные на территории США, Таджикистана и Туркменистана
<i>pagA</i> 1297A→G	Некоторые штаммы <i>can</i> SNP-группы B.Br.001/002, выделенные на территории Сибири, Эстонии и Кореи
<i>pagA</i> 1765C→A	Штамм Kruger В и другие штаммы <i>can</i> SNP-группы B.Br.Kruger
<i>lef</i> 895G→T	Мутация характерна для штаммов <i>can</i> SNP-группы A.Br.001/002, эволюционно близких к <i>can</i> SNP-группе A.Br.Ames
<i>lef</i> 895G→A, <i>суа</i> 539A→G, <i>суа</i> 953T→C	Штаммы эволюционной линии В
<i>lef</i> 1036C→G, <i>суа</i> 1140C→T, <i>alo</i> 1502G→A, <i>capD</i> 796G→A, <i>асрВ</i> 495A→G	Мутации характерны для штамма H9401, и, вероятно, <i>can</i> SNP-группы A.Br.005/007
<i>суа</i> 2129A→C	Мутация характерна некоторых штаммов, принадлежащих <i>can</i> SNP-группе A.Br.005/006
<i>суа</i> 1329A→T, <i>суа</i> 1400A→G	Мутации выявлены у штамма <i>B. anthracis</i> Canadian bison <i>can</i> SNP-группы A.Br.WNA, выделенного в Канаде
<i>суа</i> 2178C→T	Штаммы <i>B. anthracis can</i> SNP-группы A.Br.Aust94 подгруппы Kafkas-Geo 2, выявленные на территории Кавказа
<i>capA</i> 1033A→G	Штаммы <i>can</i> SNP-группы B.Br.001/002
<i>capB</i> 230T→C	Мутация выявлена у штамма <i>B. anthracis</i> Tangail-1 <i>can</i> SNP-группы A.Br.001/002, выделенного на территории Бангладеш
<i>capC</i> 351A→G	Характерна для штаммов <i>can</i> SNP-группы A.Br.Aust94 подгруппы Kafkas-Geo 3, выделенных на территории Кавказа
<i>capC</i> 147T→C	Характерна для штамма Pollino, принадлежащего <i>can</i> SNP-группе A.Br.011/009 и выделенного в Италии.
<i>capD</i> 234T→C	Характерна для некоторых штаммов, принадлежащих <i>can</i> SNP-группе B.Br.CNEVA, отсутствие этой SNP у штаммов B.Br.CNEVA, вероятно, является маркером, указывающим на происхождение штамма на территории бывшего СССР
<i>capD</i> 12C→G	Характерна для штаммов <i>can</i> SNP-группы A.Br.008/011, выделенных на территории Украины и Оренбургской области
<i>capD</i> 1320T→C	Характерна для двух штаммов (BA1035, SVA11) <i>can</i> SNP-группы B.Br.001/002, которые формируют MVLST _{рх01} -GT10, MVLST _{рх02} -GT7. Они также отличаются тем, что несут в гене <i>pagA</i> только SNP <i>pagA</i> 195C→T
<i>capD</i> 1120T→G, <i>capD</i> 1183A→G	Характерны для штамма 157(B-1107), принадлежащего <i>can</i> SNP-группе B.Br.001/002

Продолжение таблицы 17

1	2
<i>acrA</i> 853G→A, 4 тандемных повтора АТА**GАТА в гене <i>acrA</i>	Штаммы эволюционных линий В и С.
<i>acrB</i> 1381A→G	Штаммы группы А.Br.Vollum, выделенных на территории США
<i>acrB</i> 563C→T	Штамм SK-102, принадлежащий к canSNP-группе А.Br.Vollum.

Таблица 18 – Праймеры для ПЦР-индикации филогеографически-значимых мутаций

Мишень	Прямой праймер	Обратный праймер	Аллельное состояние	Размер фрагмента, п.о
1	2	3	4	5
<i>alo</i> 1247T→G	AGATGCGAAAGAGCATAACAAGG	CCCAAGATACATCAAATTGAGGAA	T	257
		CCCAAGATACATCAAATTGAGGAC	G	
<i>alo</i> 1265C→T		TGATCAAATGTAAATTCATCCCTAG	C	275
TGATCAAATGTAAATTCATCCCTAA		T		
<i>alo</i> 1502G→A	AGATGCGAAAGAGCATAACAAGG	ACTAATAGTAGCAGTTGGATATAATGTTGCTC	G	520
		ACTAATAGTAGCAGTTGGATATAATGTTGCTT	A	
<i>pagA</i> 981A→T	GCAAGTATTTGACTTAATTGGTT	TAAAAATACTTCTACAAGTAGGTCA	A	348
		TAAAAATACTTCTACAAGTAGGTCT	T	
<i>pagA</i> 1803T→C	AACTAGAAATATTCAACATATCAT	TTAGCGGAATTAACGCATCT	T	307
		TTAGCGGAATTAACGCATCC	C	
<i>pagA</i> 1693C→T	AACTAGAAATATTCAACATATCAT	AATAGCATTTGGATTTAACGTAC	C	419
		AATAGCATTTGGATTTAACGTAT	T	
<i>pagA</i> 1297A→G	CGTTTCTAATGGATCACTAGGAT	TAAGGAAAACCAATTAAGTCTAA	A	361
		TAAGGAAAACCAATTAAGTCTAG	G	
<i>pagA</i> 1765C→A	AACTAGAAATATTCAACATATCAT	TAATTTTCGATCAACAAACATTC	C	347
		TAATTTTCGATCAACAAACATTTA	A	
<i>lef</i> 895G→A/T	TTACTACTATCCACCTGTATTCTA	ACTTAAAGATCAACGGATGCAGG	G	324
		ACTTAAAGATCAACGGATGCAGA	A	
		ACTTAAAGATCAACGGATGCAGT	T	

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	
<i>lef</i> 1036C→G	AATGGATTGATGTAATAAAGCA	TGACATAATTCATTCTTTATATC	C	367	
		TGACATAATTCATTCTTTATATG	G		
<i>cya</i> 539A→G	CTTTTTCTCCTTTCAGCACATCA	ATTGGAAAGGGGATTTCTCTAGA	A	385	
		ATTGGAAAGGGGATTTCTCTAGG	G		
<i>cya</i> 953T→C	CCCATTTTCCTTTAACTCTTCTA	CATGCAGATGCTTTTAAAAACAT	T	321	
		CATGCAGATGCTTTTAAAAACAC	C		
<i>cya</i> 1140C→T	GTGCAAATAAATCATAGTCAGCT	AGCATGGTCAACAATTAGCTATC	C	372	
		AGCATGGTCAACAATTAGCTATT	T		
<i>cya</i> 1329A→T	TTCCCTTAGTTGAATCCGGTT	AATCGAATAATCAGGTATATCAA	A	336	
		AATCGAATAATCAGGTATATCAT	T		
<i>cya</i> 1400A→G			GGTAAAATTACTGTTTTAGGTGA	A	265
			GGTAAAATTACTGTTTTAGGTGG	G	
<i>cya</i> 2129A→C	CATCAATAATTTTTTGGAAAGACCT	GACTATTACAATTCAGCAAAGCA	A	289	
		GACTATTACAATTCAGCAAAGCC	C		
<i>capA</i> 1033A→G	TCAAGTTGTTGTCTCCACTGATAC	AAGAGGGATCACCAAACCAGATA	A	227	
		AAGAGGGATCACCAAACCAGATG	G		
<i>capB</i> 230T→C	GATAATTTGATAATCGGGTTGAA	TTCATAATAGGTATATGTA CTGT	T	363	
		TTCATAATAGGTATATGTA CTGC	C		
<i>capC</i> 147T→C	GCAAATGTTGCACCACTTAACAA	ATCAGCCCGTATTTATGTTGATT	T	298	
		ATCAGCCCGTATTTATGTTGATC	C		
<i>capC</i> 351A→G	TTAGGAGTTACTGAGCCTTAT	ACCCTTGTCTTTGAATTGTAATT	A	340	
		ACCCTTGTCTTTGAATTGTAATC	G		
<i>capD</i> 12C→G	CGGGTACTCCAATATGTGGCTT	TAGTCAGCTTAATGGGGGGTTTC	C	345	
		TAGTCAGCTTAATGGGGGGTTTG	G		
<i>capD</i> 234T→C	TTGCCCTAGCGACTCCTCCTTCATA	CCTCAGGAATAGGTGGGGGCAGT	T	420	
		CCTCAGGAATAGGTGGGGGCAGC	C		
<i>capD</i> 796G→A	CAAAGTTCTGCAATTGATTATTTA	GAAATTAGCTGAAAAGAAAGTAG	G	350	
		GAAATTAGCTGAAAAGAAAGTAA	A		

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	
<i>capD</i> 1120T→G	СТАТТТАТТТГАТТТССААГТТССА	СТТАААТААТСААТТГСАГАГСТ	Т	433	
		СТТАААТААТСААТТГСАГАГСГ	Г		
<i>capD</i> 1183А→G			САСАААСТТТТАТГСССТСА	А	368
			САСАААСТТТТАТГСССТСГ	Г	
<i>capD</i> 1320Т→С			САААСАТТАТСААТГААТАСАГТ	Т	234
			САААСАТТАТСААТГААТАСАГС	С	
<i>асрА</i> 853G→А	ССТАТТГСТАСААТГСГСАТА	АТТАГТАСТТТАСААААГААГТГГ	Г	333	
		АТТАГТАСТТТТАСААААГААГТГА	А		
число повторов АТА**GАТА в гене <i>асрА</i>	АТАГГГАААСААСАТААТАААА	ТАТТТГСТТГСАААГАТТССТА	число повторов	245/254	
<i>асрВ</i> 495А→G	СТТСАТСАСТТАТТАГАТСТАСТ	СТТАААТГАТАСАГААТГГТСА	А	462	
		СТТАААТГАТАСАГААТГГТСГ	Г		
<i>асрВ</i> 563С→Т			СТТГААГААТСАТТАГГААТТТС	С	394
			СТТГААГААТСАТТАГГААТТТТ	Т	
<i>асрВ</i> 1381А→G	ГГСССГАААААСАААСТАТАСА	СГТТСТГТАГГГАТАГААТТТТАТ	А	397	
		СГТТСТГТАГГГАТАГААТТТТАС	Г		

Таблица 19 – Условия выявления филогеографически-значимых мутаций в геноме *B. anthracis* методом AS-ПЦР

Мишень	Наименование праймера	Температура отжига (° С)	Рекомендуемое количество циклов
<i>pagA</i> 981А→Т	<i>pagA</i> 981А	48	30x
<i>суа</i> 539А→G	<i>суа</i> 539G	49	34x
<i>суа</i> 953Т→С	<i>суа</i> 953Т	47	34x
	<i>суа</i> 953С	47	30x
<i>capC</i> 351А→G	<i>capC</i> C351G	47	34x
<i>capA</i> 1033А→G	<i>capA</i> 1033А	51	30x
	<i>capA</i> 033G	51	30x

5.7. Заключение по главе 5

В главе 5 проведен анализ филогенетического исследования используемой выборки штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* различными методами генотипирования.

Согласно схеме MVLST_{pXO1}-генотипирования, разделение выборки на MVLST_{pXO1}-генотипы соответствует ее разделению на основные эволюционные линии – А, В и С и canSNP-группы в рамках этих линий. В ряде случаев один генотип объединяет несколько canSNP-групп и наоборот – canSNP-группа делится на несколько генотипов. Несколько выявленных мутаций и генотипов имеют важное значение для изучения филогеографии сибирезвенного микроба. В MVLST_{pXO1}-GT3 выделены штаммы группы A.Br.008/009, для которых характерно наличие мутации *pagA* 981A→Т. Штаммы этого генотипа преобладают на территории бывшего СССР. Этот результат подтверждает гипотезу о распространении *B. anthracis* при монгольских завоеваниях в Евразии [83, 167]. Уникальные генотипы характерны для штаммов группы A.Br.Aust94 американского происхождения, имеющих мутацию *pagA* 1803T→С (MVLST_{pXO1}-GT14), и штаммов группы A.Br.Aust94 подгруппы Kafkas-Geo 2, выделенных на территории Кавказа, имеющих мутацию *суа* 2178C→Т (MVLST_{pXO1}-GT20). CanSNP-группа A.Br.001/002 делится на три подгруппы, одна из которых является вероятным переходным звеном к группе A.Br.Ames. В генотип MVLST_{pXO1}-GT5 объединяются центрально-европейские штаммы группы V.Br.CNEVA и штаммы группы V.Br.001/002, выделенные в Русской Арктике (в том числе из вечной мерзлоты). MVLST_{pXO1}-GT5 объединяет с группой V.Br.CNEVA архаичные штаммы V.Br.001/002, наиболее генетически близкие с последним общим предком этих групп. Наибольшее число архаичных генетических маркеров выявлено у MVLST_{pXO1}-генотипов штаммов, принадлежащих эволюционной линии В. Вакцинные штаммы *B. anthracis* A16R, Sterne, V770-NP-1R и STI-1 не приобрели особенностей последовательностей генов токсинообразования, отличающих их от природных вирулентных штаммов.

Согласно результатам анализа, разделение выборки на MVLST_{pXO2}-генотипы соответствует ее разделению на основные эволюционные линии вида *B. anthracis*. При комбинировании результатов MVLST_{pXO1}- и MVLST_{pXO2}-анализа обнаружено, что центральным генотипом линии В обладает штамм 44, что дает некоторые основания утверждать, что в северной Евразии происходило эволюционное разделение линии В на canSNP-группы V.Br.CNEVA и V.Br.001/002. Мутация *сарС* 351A→G является маркером штаммов canSNP-группы A.Br.Aust94, выделенных на территории Кавказа. Штаммы генотипов MVLST_{pXO1}-GT4 MVLST_{pXO2}-GT1 представляют центральный генотип для штаммов canSNP-группы A.Br.Aust94, наиболее близко связанный с общим предком этой группы. Штаммы *B. anthracis* canSNP-группы A.Br.Vollum, согласно результатам

MVLST_{pXO2}-генотипирования, делятся на две подгруппы, одна из которых выявлена на территории бывшего СССР (Средняя Азия). Проведено MLVA-генотипирование штаммов *B. anthracis* по локусу VNTR_{capA}, расположенному на плазмиде pXO2, что показало возможность дифференцирования эволюционных линий А и В [6, 84].

Согласно результатам генотипирования по схемам MLVA7 и MLVA17, разделение исследованной выборки на клональные комплексы соответствует ее разделению на основные эволюционные линии – А, В и С и canSNP-группы в рамках этих линий, а также результатам генотипирования по схемам MVLST_{pXO1} и MVLST_{pXO2}. В ряде случаев один MLVA-профиль имеют штаммы, принадлежащие к разным canSNP-группам. Это обуславливает необходимость использования этого высокоразрешающего метода генотипирования в иерархичном порядке после canSNP-генотипирования. Схема MLVA7 показала разрешающую способность, сравнимую с MLVA17, и рекомендуется нами как метод генетического анализа первой линии. Штаммы линии В имеют одинаковое число повторов в нескольких локусах со штаммом *B. cereus* bv. *anthracoid* Dakkar, что еще раз показывает их более близкое филогенетическое родство с видом *B. cereus* и архаичность. Все используемые локусы имеют хромосомную локализацию и могут быть применены для одновременного генотипирования вирулентных и аттенуированных штаммов, лишенных плазмид вирулентности. Большинство VNTR-локусов расположено в открытых рамках считывания, причем большая часть соответствующих открытым рамкам считывания белков, для которых известна функциональная роль, в той или иной степени связана с поверхностными структурами бактериальной клетки.

Разделение выборки на сиквенс-типы по результатам MLST-генотипирования соответствует ее разделению на основные эволюционные линии (А, В, С) и позволяет уверенно дифференцировать штаммы *B. anthracis* от штаммов *B. cereus* и даже *B. cereus* bv. *anthracis*. Все используемые MLST-локусы имеют хромосомную локализацию и могут быть применены для MLST-генотипирования утративших плазмиды штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*.

По результатам главы 5 создана панель олигонуклеотидов, которая позволяет методом аллель-специфичной ПЦР определить филогенетическую принадлежность штаммов возбудителя сибирской язвы эволюционных линий А, В и С, а также подгрупп штаммов canSNP-групп А.Br.008/011, выделенных на территории бывшего СССР, и А.Br.Aust94, выделенных на территории Кавказа.

**Глава 6. ПОИСК СВЯЗИ МЕЖДУ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬЮ ШТАММА
В. ANTHRACIS К ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГРУППЕ И ЕГО ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ**

Помимо описания распространения маркеров филогеографических групп *B. anthracis*, представляет интерес поиск взаимосвязи между MVLST_{рХО1}-GT этих групп и его фенотипическим проявлением. Так как функция генов, используемых в данной схеме генотипирования – синтез токсинов, поражающих организм хозяина, таким фенотипическим проявлением могут быть различия в патогенности штаммов с разным MVLST_{рХО1}-GT. Но если такой подход в той или иной мере оправдан для других патогенов [140, 154, 187], то для сибиреязвенного микроба он весьма затруднен. Дело даже не в мономорфности и недавнем происхождении вида *B. anthracis*, а его специализации. Сибирская язва в природе поражает преимущественно крупных копытных млекопитающих. Следовательно, учитывая стоимость этих животных и их содержания, экспериментально определять вирулентность или изучать патогенные свойства штаммов для них не представляется возможным. Наблюдение же за особенностями вспышек сибирской язвы, вызванных конкретным штаммом, также практически невозможно. При возникновении такой вспышки среди одомашненных животных первоочередной задачей является ее подавление в кратчайшие сроки, а не изучение особенностей эпидемического процесса и клинического проявления болезни. Что касается сибирской язвы среди диких копытных, то из-за того, что крупные популяции этих животных в настоящее время обитают в регионах, слабо охваченных хозяйственной деятельностью и обладающих неразвитой инфраструктурой, наблюдение за развитием вспышек зачастую затруднено. Однако, мы обнаружили в литературе результаты эпиданализа вспышек сибирской язвы среди копытных, которые могут быть интерпретированы как косвенное доказательство предположения о связи MVLST_{рХО1}-GT и вирулентности. При сравнении двух эндемичных по сибирской язве близкорасположенных южноафриканских экосистем – национальных парков Этоша (Намибия) и Крюгер (ЮАР), в которых живут крупные поголовья зебр и куду, было отмечено, что в парке Этоша почти половина всех зарегистрированных случаев сибирской язвы выпадает на долю зебр, а на долю куду – менее 1 %, в то время, как в парке Крюгер наблюдалась противоположная картина – больше половины случаев регистрируется у куду, а зебры болеют довольно редко [28, 55, 188]. Примечательно, что эти два региона различаются разнообразием циркулирующих штаммов сибиреязвенного микроба. В парке Этоша преобладают штаммы canSNP-группы A.Br.Aust94 [28], а штаммы линии В в регионе не встречаются. Популяция сибиреязвенного микроба в ЮАР более разнообразна: в нем циркулируют штаммы *B. anthracis* не только эволюционной линии А, но и В (canSNP-группы A.Br.003/004, A.Br.005/006, A.Br.Aust94, B.Br.Kruger и B.Br.001/002) [181]. Отсюда можно предположить, что

штаммы линии В способны с большей эффективностью, чем штаммы линии А, заражать парнокопытных жвачных полорогих (куду), чем непарнокопытных моногастричных (зебры). В пользу этого предположения можно привести ряд описанных в литературе наблюдений, согласно которым штаммы линии В чаще вызывают сибирскую язву у крупного рогатого скота [60], а штаммы линии А *canSNP*-группы A.Br.Aust94 чаще ассоциированы с заболеванием человека, лошадиных, свиней и мелкого рогатого скота [144]. Наиболее вероятной причиной этого феномена можно считать исторически сложившееся совпадение ареала распространения штаммов той или иной филогенетической группы с сельскохозяйственной специализацией региона, то есть преваляцией в нем той или иной группы восприимчивых животных. Но, кроме этого, в качестве одной из причин такой потенциальной разницы в вирулентности можно предположить различия последовательностей факторов патогенности, в том числе и сибиреязвенного токсина, то есть различия *MVLST*_{рХО1}-GT штаммов линий А и В.

К сожалению, подобные предположения крайне сложно проверить, поскольку эксперименты на восприимчивых животных едва ли возможны. Поэтому для моделирования сибирской язвы приходится использовать доступных животных – мелких грызунов и кроликов. Но эти животные отличаются от копытных и человека по восприимчивости к сибиреязвенной инфекции и сибиреязвенному токсину, поэтому моделирование имеет ряд особенностей и ограничений [186]. В опытах штаммы *B. anthracis* обычно не отличаются по вирулентности для модельных животных. В опубликованных источниках мы нашли лишь одно упоминание о выявленных отличиях по способности разных штаммов с разной эффективностью преодолевать поствакцинальный иммунитет у морских свинок [75, 186]. Кроме того, мы обратили внимание, что согласно паспортным данным штаммов *B. anthracis* из нашей рабочей коллекции, среди них присутствовало несколько штаммов, которые, хоть и обладают полным набором факторов патогенности, характеризовались значительно сниженной вирулентностью. Если для остальных штаммов значение LD_{50} для беспородных мышей составляет 10^1 , то для слабовирулентных штаммов – от 10^2 до 10^7 КОЕ/мышь при внутрибрюшинном заражении.

Это натолкнуло нас на мысль связать низкую вирулентность штамма с особенностями его *MVLST*-генотипа, то есть выявить аллели генов факторов патогенности, приводящие к снижению вирулентности. Поиск таких закономерностей и был отправной точкой данной работы. В данной главе мы попытались выявить взаимосвязь между *MVLST*-генотипом штамма и его вирулентностью для лабораторных животных.

6.1. Поиск причин качественных различий значения вирулентности штаммов *B. anthracis* для лабораторных животных

В ходе подготовки слабовирулентных штаммов к определению их MVLST-GT мы обнаружили ряд других причин, приводящих к критическому снижению вирулентности.

Первой причиной являлась утеря плазмид вирулентности всеми клетками штамма или некоторой частью клеток. К сожалению, из-за частых пересевов и большого числа генераций в лабораторных условиях может происходить потеря одной или обеих плазмид у вакцинных и вирулентных штаммов. Наиболее критична потеря именно плазмиды pXO2, так как особенностью мышинной модели сибирской язвы является устойчивость мышей к заражению pXO1+ pXO2-штаммами и чувствительность к заражению штаммами pXO1- pXO2+ [91, 184].

Мы обнаружили, что два наименее вирулентных штамма 1055/38 и 592/10 полностью утратили pXO2. Следовательно, данные штаммы не способны синтезировать капсулы, и большая часть введенных мыши клеток гибнет из-за сниженной способности противодействовать иммунному ответу.

У четырех штаммов *B. anthracis* – М-71, 25/71, 658/543 и 474/635 из рабочей коллекции была обнаружена диссоциация на S- и R-формы. При высеве на плотную среду в условиях капсулообразования эти штаммы образуют колонии двух типов: гладкие, представленные клетками, имеющими капсулу (S-форма), и шероховатые, представленные бескапсульными клетками (R-форма). Шероховатых колоний было примерно 25-30 % во всех четырех случаях. При пассажах на плотной среде способность к диссоциации не восстанавливалась – S-варианты давали в 100 % случаев гладкие колонии, R-варианты – 100 % шероховатых колоний. Для того, чтобы убедиться, что это именно S- и R-формы одного штамма, а не примеси другого бесплазмидного штамма, мы провели MLVA7-анализ отдельных S- и R-колоний каждого из четырех штаммов. В результате выявлено, что у всех штаммов S- и R-варианты обладают идентичным MLVA-профилем – то есть речь идет именно о диссоциации на капсульную и бескапсульную формы. Анализ плазмидного профиля показал, что у R-вариантов штаммов М-71, 658/543 и 474/635 была утрачена плаزمида pXO2. Для штамма 25/71 были получены неожиданные результаты – его R-вариант оказался лишен плазмиды токсикогенности pXO1, но обладал плазмидой капсулообразования pXO2. Эксперименты с пассированием через животных показали, что способность к капсулообразованию восстанавливается *in vivo* только у штамма 25/71R (на отпечатках селезенки мышей с помощью микроскопии обнаруживаются инкапсулированные клетки), а при пересеве на питательную среду способность вырабатывать капсулу исчезает. Степень восстановления капсулообразования *in vivo* зависит от количества пассажей – после первого пассажа видны еди-

ничные инкапсулированные клетки, а после третьего их становится большинство. Очистка штаммов от бескапсульных вариантов путем посева единичных S-колоний приводила к восстановлению его вирулентности для мышей.

Второй выявленной причиной сниженной вирулентности штамма *B. anthracis* являлось попадание в культуры бесплазмидных штаммов. В ходе MLVA-типирования мы обнаружили три штамма – 7(992), 1199 и 228/8, для которых при амплификации некоторых VNTR-локусов нарабатывалось два или три ПЦР-продукта различного размера. Следовательно, каждый из этих штаммов представляет собой смесь двух или трех штаммов, соответственно. Для очистки, штаммы были рассеяны до единичных колоний, после чего было отобрано и генотипировано методом MLVA по 25 колоний. Основным был признан генотип, встречающийся у большинства отдельных колоний. Один из минорных генотипов, встречающийся у всех четырех штаммов на основе MLVA-профиля, идентифицирован как вакцинный штамм STI-1, лишенный плазмиды pXO2 и слабовирулентный для лабораторных животных. Очищенные штаммы восстановили высокие показатели вирулентности для мышей (10–100 КОЕ/мышь).

Кроме снижения вирулентности в связи с утратой плазмид и/или контаминаций слабовирулентными штаммами, влияние на кажущуюся вирулентность штамма может оказывать снижение жизнеспособности спор *B. anthracis* при их хранении. Дело в том, что способность прорасти на питательных средах и в организме хозяина, может теряться штаммом с разной скоростью. В результате заражение двумя взвешями одного штамма, в которых содержится одинаковый титр спор, определенный путем посева на плотные питательные среды, может приводить к показателям LD₅₀, отличающимся более, чем на два порядка. Чтобы избежать этого феномена, проводится так называемая анимализация штамма – заражение лабораторных животных споровой суспензией, находящейся на хранении, посев на селективные питательные среды *B. anthracis* из трупов умерших животных, спорование полученных культур, определение титра свежеприготовленных спор, а после этого использование их для определения вирулентности штамма.

В качестве иллюстрации изменения вирулентности культуры, находящейся на хранении после анимализации, можно привести результаты модельного эксперимента по анимализации вакцинных штаммов *B. anthracis* STI-1 и 34F2 Sterne. Оба штамма лишены плазмиды pXO2, следовательно – слабовирулентны для мышей. Для анимализации были использованы споровые культуры, находящиеся на хранении не менее года. Заражение нелинейных белых мышей и мышей линии DBA этими культурами проводилось подкожно в дозе 5×10^7 спор/мышь. Через двое суток животных вскрывали, делали высевы из селезенки, а полученную после посева культуру использовали для второго цикла заражения. Высеянные после двух пассажей культуры переводили в споровую форму и использовали для определения LD₅₀ вместе с исходными культурами. Результаты представлены в Таблице 20.

Таблица 20 – Определение LD₅₀ вакцинных штаммов *B. anthracis* STI-1 и 34F2 Sterne для беспородных мышей и мышей линии DBA

Штамм	Линия мышей	LD ₅₀ , не анимализированный	LD ₅₀ , анимализированный
STI-1	Беспородные	$2,0 \times 10^6 - 1,3 \times 10^7$	84,8 [21,3 ÷ 337,7]
	DBA	$1,5 \times 10^6$	12,6 [3,2 ÷ 50,1]
34F2 Sterne	Беспородные	$8,0 \times 10^6 - 1,6 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$
	DBA	$> 10^8$	$1,3 \times 10^3$

Из Таблицы 20 видно, что значение LD₅₀ после анимализации может меняться на 5–7 порядков. Для двухплазмидных природных штаммов изменение вирулентности после анимализации выглядит менее наглядно из-за изначально больших значений LD₅₀. Однако, штаммы со сниженной вирулентностью с LD₅₀ 10^2 – 10^3 КОЕ/мышь после анимализации значительно увеличивают свою вирулентность. Описываемый модельный эксперимент примечателен следующим: после двух пассажей на мышах штамм STI-1 изменил свои морфологические свойства. При микрокопировании все его клетки были покрыты капсулой, а при высеве на плотные питательные среды формируются S-колонии, характерные для штаммов, несущих плазмиду pXO2. Определение плазмидного профиля показало присутствие обеих плазмид вирулентности. Результаты MLVA-типирования этого штамма позволили идентифицировать его как *B. anthracis* Pasteur II – лабораторный двухплазмидный штамм, высоковирулентный для лабораторных животных. При этом титр Pasteur II был слишком низок для того, чтобы выделить его посевами на питательные среды. Именно примесью Pasteur II, который в итоге вытеснил за два пассажа исходный штамм STI-1, объясняются столь высокие показатели вирулентности, практически не отличающиеся от вирулентности природных штаммов *B. anthracis*.

Таким образом, в ряде случаев различия в вирулентности штаммов для мышей оказались следствием утери штаммами плазмид, контаминации слабовирулентными штаммами или снижением вирулентности в процессе хранения спор. Чтобы избежать указанных проблем, целесообразно до опыта по определению вирулентности штамма провести его анимализацию, рассеять до единичных колоний, и убедиться в том, что колонии идентичны по плазмидному составу и MLVA-профилю.

6.2. Оценка количественных различий вирулентности штаммов *B. anthracis*, принадлежащих к разным MVLST_{pXO1}-генотипам и canSNP-группам, на модели беспородных белых мышей

Учитывая, что именно токсин опосредует основное воздействие на организм хозяина, мы задались вопросом, могут ли штаммы разных canSNP-групп и обладающие разным

MVLST_{рХО1}-GT различаться по вирулентности. В литературе описано одно исключение касательно ситуации с моделированием сибирской язвы на грызунах. Так, при вакцинировании морских свинок субъединичной вакциной AVA обнаружено, что разные штаммы *B. anthracis* при последующем заражении преодолевают поствакцинальный иммунитет с разной эффективностью – процент выживаемости животных варьировал от 6 % до 100 % [75]. Авторы не выявили корреляции этой способности штамма с его другими характеристиками, в том числе с географическим происхождением. Но здесь стоит обратить внимание на то, что AVA – это преципитат культуральной жидкости бескапсульного штамма V770-NP1-R (canSNP-группа A.Br.003/004), то есть в качестве иммуногенных детерминант выступают PA, LF, и EF штамма, относящегося к MVLST_{рХО1}-GT2 [172]. Если у заражающего штамма последовательности LF, EF и PA отличаются от последовательностей штамма V770-NP1-R, то выработавшиеся после вакцинации антитела могут хуже распознавать токсины заражающего штамма, что приведет к гибели части зараженных животных. В этом случае способность штамма преодолевать поствакцинальный иммунитет может зависеть от последовательности генов синтеза токсина, то есть MVLST_{рХО1}-GT, а также canSNP-группы, поскольку зачастую она коррелирует с MVLST_{рХО1}-GT. К сожалению, в работе [75] использовались штаммы, для большинства из которых canSNP-группу и/или последовательность генома нам не удалось обнаружить в доступных источниках. Поэтому, чтобы ответить на вопрос о различиях по вирулентности у штаммов *B. anthracis* разных canSNP-групп и MVLST_{рХО1}-генотипов, мы провели два эксперимента с использованием двух биологических моделей.

В первом эксперименте была определена вирулентность для беспородных мышей 20 штаммов *B. anthracis*, относящихся к пяти MVLST_{рХО1}-GT (Таблица 21). Заражение проводили дозами 100 и 1000 спор/животное подкожно (n = 400, по 20 мышей на штамм).

Таблица 21 – Штаммы *B. anthracis*, исследуемые на значение вирулентности

№	Штамм <i>B. anthracis</i>	canSNP-группа	MVLST _{рХО1} -генотип
1	2	3	4
1	1273	A.Br.008/011	GT2
2	8(2099)	A.Br.008/011	GT2
3	644/268	A.Br.008/011	GT2
4	LP51/4YA	A.Br.008/011	GT2
5	531/17	A.Br.008/011	GT3
6	1(14) Stavropol	A.Br.008/011	GT3
7	219/6	A.Br.008/011	GT3
8	7(992)	A.Br.008/011	GT3
9	46/27	A.Br.008/011	GT3
10	LP50/3YA	A.Br.008/011	GT3
11	1173	A.Br.008/011	GT3
12	331/214	A.Br.Aust94	GT4
13	1199	A.Br.Aust94	GT4
14	52/33	A.Br.Aust94	GT4

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4
15	822/7	A.Br.Aust94	GT4
16	Yamal_2	B.Br.001/002	GT5
17	LP53/5YA	B.Br.001/002	GT5
18	44	B.Br.CNEVA	GT5
19	157(B-1107)	B.Br.001/002	GT9
20	I-364	B.Br.001/002	GT9

По результатам падежа были построены кривые гибели и рассчитана статистическая достоверность полученных данных. Результаты приведены на Рисунке 12.

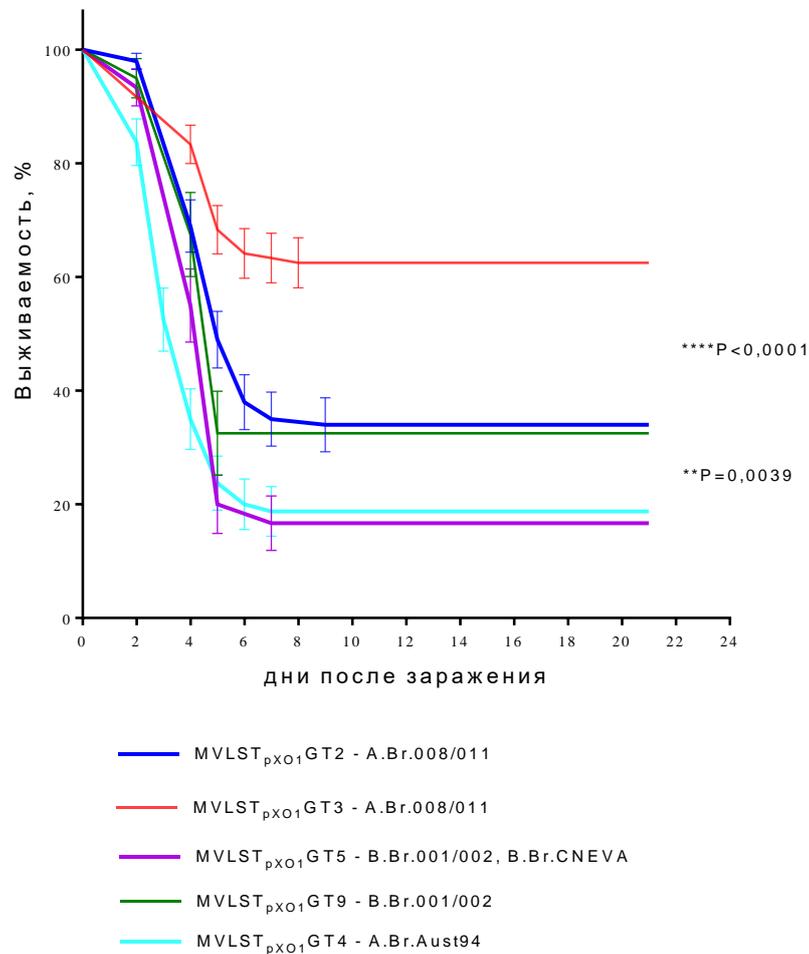


Рисунок 12 – Кривые выживаемости белых мышей после заражения штаммами *B. anthracis*, принадлежащих разным MVLST_{pXO1}-генотипам и canSNP-группам, построенные с помощью GraphPad Prism 7. Отмечены средние значения с верхним и нижним пределами

Как видно из приведенного рисунка, штаммы, принадлежащие MVLST_{pXO1}-GT3, достоверно менее вирулентны для мышей по сравнению с остальными генотипами. 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).

Важно отметить, что столь наглядные данные нам удалось получить, исследуя вирулентность не отдельных штаммов, а групп штаммов, относящихся к одной филогенетической группе. Такой подход позволяет нивелировать вариабельность индивидуальной реакции животных на заражение и статистические флуктуации, возникающие иногда при оценке вирулентности индивидуального штамма, например, при методических ошибках эксперимента.

6.3. Оценка сравнительной способности штаммов *B. anthracis*, обладающих разным MVLST_{pXO1}-генотипом, преодолевать поствакцинальный иммунитет на модели морских свинок

Во втором эксперименте мы исследовали 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 [75, 186]. 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. В качестве контроля использовали неиммунных морских свинок. На Рисунке 13 приведены данные по выживаемости и продолжительности жизни свинок, иммунизированных белком PA63, после заражения их штаммами *B. anthracis* LP51/4YA и LP53/5YA.

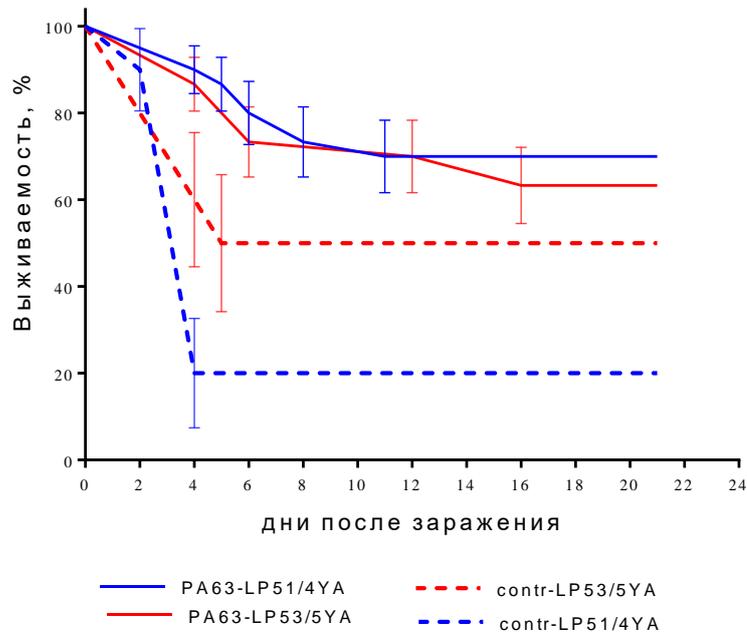


Рисунок 13 – Выживаемость морских свинок, иммунизированных белком РА63, после заражения штаммами *B. anthracis* LP51/4YA и LP53/5YA

Анализируя данные по смертности, 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). Однако следует отметить – несмотря на то, что интактные морские свинки устойчивы к LP53/5YA по сравнению с LP51/4YA, иммунизированные животные защищены препаратом РА63 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 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 РА63, 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 РА63 вакцинного препарата и заражающего штамма оказывает влияние на протективность противосибирязвенной вакцины, по крайней мере для морских свинок.

6.4. Заключение по главе 6

Выявлено, что причинами значительного снижения вирулентности для мышей штаммов *B. anthracis* из рабочей коллекции являются: утеря плазмид вирулентности всеми клетками

штамма или его частью – к потере капсулы может привести утеря как плазмиды рХО2 или рХО1, в последнем случае способность к синтезу капсулы восстанавливается путем анимализации штамма; загрязнение культуры *B. anthracis* бесплазмидными штаммами, такими, как вакцинный и слабовирулентный для лабораторных животных штамм STI-1, лишенный плазмиды рХО2; снижение жизнеспособности спор культуры штамма *B. anthracis* при хранении – анимализация таких штаммов приводит к восстановлению вирулентности.

На двух биологических моделях показано, что различия последовательности основных факторов патогенности *B. anthracis* могут влиять на его вирулентные свойства.

На модели беспородных белых мышей выявлены отличия штаммов по вирулентности, обладающих разным MVLST-генотипам и относящихся к разным canSNP-группам. Штаммы, принадлежащие MVLST_{рХО1}-GT3 (A.Br.008/011), достоверно менее вирулентны для мышей по сравнению с остальными генотипами рабочей коллекции. А штаммы MVLST_{рХО1}-GT4 (A.Br.Aust94) и MVLST_{рХО1}-GT5 (B.Br.001/002 и B.Br.CNEVA) более вирулентны для мышей по сравнению с MVLST_{рХО1}-GT2 и MVLST_{рХО1}-GT9 ($P \leq 0,0001$ и $P = 0,0039$, соответственно).

На модели морских свинок, предварительно иммунизированных препаратом рекомбинантного протективного антигена РА63, исследована вирулентность штаммов *B. anthracis*, обладающих разными MVLST_{рХО1}-генотипами: LP51/4YA (A.Br.008/011, MVLST_{рХО1}-GT2) и LP53/5YA (B.Br.001/002, MVLST_{рХО1}-GT5). Достоверная разница между вакцинированными и интактными животными наблюдается у морских свинок, зараженных штаммом LP51/4YA, но не штаммом LP53/5YA. Однако, иммунизированные животные защищены препаратом РА63 одинаково как при заражении штаммом LP53/5YA, так и LP51/4YA – кривые выживаемости иммунных свинок, зараженных разными штаммами, практически совпадают. Таким образом, иммунизация защищала морских свинок больше от заражения штаммом LP51/4YA и меньше – от LP53/5YA. Поэтому, возможно, последовательность РА63 вакцинного препарата и заражающего штамма оказывают влияние на протективность для морских свинок.

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, полученные здесь данные могут послужить лучшему пониманию биологии сибиреязвенного микроба.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возбудитель сибирской язвы – спорообразующая грамположительная бактерия *B. anthracis*. Реализация патогенных свойств сибиреязвенного микроба в организме восприимчивого хозяина возможна благодаря экспрессии локализованных на плаزمиде вирулентности генов, кодирующих синтез факторов патогенности – трехкомпонентного токсина и капсулы, а также генов, кодирующих транскрипционные регуляторы экспрессии генов патогенности.

Приобретение этих плазмид, а следовательно, и возникновение вида *B. anthracis* произошло в недавнем прошлом, около 10–20 тыс. лет назад [103]. За этот период *B. anthracis* успел распространиться практически по всему земному шару, причем, по всей видимости, преимущественно антропогенным путем. Но в то же время этот период был недостаточным для разделения вида на фенотипически различающиеся внутривидовые группы. Поэтому, для выделения внутривидовых групп и отдельных штаммов, а также для описания структуры глобальной популяции *B. anthracis* и реконструкции закономерностей его эволюции и распространения по планете, используются молекулярно-биологические методы, а именно – различные схемы генотипирования [28, 93, 139, 159]. Наиболее широко используются методы *can*SNP- и MLVA-типирования. Гораздо более редко к *B. anthracis* применяют метод MLST, широко используемый для генотипирования других бацилл. При этом метод MVLST, основанный на анализе полиморфизма генов факторов патогенности, для генотипирования сибиреязвенного микроба к настоящему времени системно не применялся, хотя он используется для других патогенов и позволяет не только описать их внутривидовую структуру, но и выявить маркеры, свидетельствующие о географическом происхождении штамма.

В данной работе мы поставили своей целью описать аллельный полиморфизм генов факторов патогенности и провести MVLST-генотипирование выборки штаммов *B. anthracis*, выделенных в различных регионах мира и относящихся к различным эволюционным линиям и *can*SNP-группам.

Проведя такую работу, мы, по сути, если не впервые применили MVLST-генотипирование для возбудителя сибирской язвы, то первыми детально описали результаты, полученные с помощью этого подхода. Мы показали, что MVLST-профиль генов, локализованных на плазмиде *pXO1*, в целом коррелирует с принадлежностью штамма к *can*SNP-группе, за рядом весьма интересных с филогенетической точки зрения исключений. MVLST-профиль генов, локализованных на плазмиде *pXO2*, при этом коррелирует в большинстве случаев лишь с принадлежностью к эволюционной линии, а не к внутривидовым группам более низкого ранга, однако в ряде случаев обладает штаммо-специфичными чертами. Мы показали, что MVLST-генотипирование может

быть использовано для описания филогенетической структуры глобальной популяции *B. anthracis*.

Также мы сопоставили результаты MVLST с данными, полученными при применении других схем генотипирования. Наиболее интересные результаты мы получили при одновременном анализе MVLST- и canSNP-профиля штамма и его географического происхождения. Мы показали, что такой подход позволяет не только получить данные, дополняющие представления о внутривидовой структуре *B. anthracis*, эволюции и закономерностях распространения этого патогена, но и выявить ряд генетических маркеров, указывающих на географическое происхождение штамма. Эти данные могут быть использованы при проведении эпидемиологических исследований. Также в ходе работы мы оптимизировали методики SNP- и MLVA-генотипирования.

Представленные в настоящем исследовании данные имеют общебиологическое значение и направлены на получение новых сведений о факторах патогенности *B. anthracis*, их аллельном полиморфизме и перспективности их использования в качестве молекулярных мишеней для генотипирования сибиреязвенного микроба, а также о структуре глобальной популяции *B. anthracis* и основных тенденциях ее эволюции и распространения по земному шару.

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 преобладают 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 *can*SNP- 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.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

а.о.	– аминокислотный остаток
«ГКПМ-Оболенск»	– Государственная коллекция патогенных микроорганизмов – Оболенск
ГРМ	– гидролизат рыбной муки, питательная среда для роста бактерий
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
кДа	– килодальтон
КОЕ	– колониобразующая единица
ПГА	– поли-γ-глутамат
п.н.	– пара нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	– полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
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
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
AS-ПЦР	– allele specific (аллель-специфичная) ПЦР
canSNP	– канонические SNP
CaM	– кальмодулин
EF	– edema factor, отечный фактор
GT	– genotype, генотип
LA	– L-агар – плотная питательная среда для роста бактерий
LB	– L-бульон – жидкая питательная среда для роста бактерий
LD ₅₀	– Dosis Letalis 50, доза, при которой гибнет 50 % экспериментальных животных
LF	– lethal factor, летальный фактор

MAPKK	– Mitogen-activated protein kinase kinase, митогензависимая протеинкиназа киназа
MEGA7	– программа филогенетического анализа
MLVA	– Multi Locus VNTR Analysis, мультилокусный анализ числа переменных нуклеотидных тандемных повторов
MLVA17	– схема мультилокусного анализа числа переменных нуклеотидных тандемных повторов с использованием 17 VNTR-локусов
MLVA7	– схема мультилокусного анализа числа переменных нуклеотидных тандемных повторов с использованием 7 VNTR-локусов
MLVAbank	– <i>online</i> -база данных
MLST	– Multilocus Sequence Typing, мультилокусное секвенс-типирование
MVLST	– Multilocus Virulence Sequence Typing, мультилокусное секвенс-типирование по генам вирулентности
PA	– protective antigens, протективный антиген
PCVR	– PRD – phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) regulation domain, фосфоенолпируват-зависимые регуляторы вирулентности, содержащие домен регуляции фосфотрансферазы фосфоенолпируват: углевод фосфотрансферазной системы
PHRANA	– Progressive Hierarchical Resolving Assays using Nucleic Acids, прогрессивный анализ иерархического разрешения с использованием нуклеиновых кислот
PHYLOVIZ2.0	– программа филогенетического анализа
R- и S-варианты	– фенотипические варианты бактериальных клеток, формирующие шероховатые и гладкие колонии (соответственно)
SNP	– Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм
SNR	– Single Nucleotide Repeat, однонуклеотидный повтор
ST	– sequence type, секвенс-тип
TEA	– Trans-Eurasian, трансевразийская canSNP-группа A.Br.008/009
TAE-буфер	– Tris-acetate-EDTA буфер
TBE-буфер	– Tris-borate-EDTA буфер

- UPGMA – Unweighted pair group method with arithmetic, метод невзвешенного попарного среднего
- WGS – Whole genome sequencing, полногеномное секвенирование
- VNTR-локусы – Variable Number Tandem Repeat, переменные тандемные нуклеотидные повторы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев, М.В. Сравнительный мультилокусный VNTR- и SNP-анализ вакцинных штаммов *Bacillus anthracis* / М.В. Афанасьев, Е.В. Кравец, З.Ф. Дугаржапова, В.Е. Такайшвили, В.С. Половинкина, С.В. Балахонов // Мол. Генет., Микробиол. и вирусол. – 2014. – № 2. – С. 36–40.
2. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Ленинград: Государственное издательство медицинской литературы, 1962. – С. 85–104.
3. Бахтеева, И.В. Прототип мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации сибиреязвенного 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.
4. Гончарова, Ю.О. Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов сибиреязвенного 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.
5. Еременко, Е.И. Генотипическое разнообразие штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных в регионе Кавказа / Е.И. Еременко, А.Г. Рязанова, О.И. Цыганкова, Е.А. Цыганкова, Н.П. Буравцева, А.Н. Куличенко// Мол. Генет., Микробиол. и вирусол. – 2012. – № 2. – С. 26–29.
6. Еременко, Е.И. Новые генетические маркеры для молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis* / 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. // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2019. – №3. – С. 43 – 50.
7. Куличенко А.Н. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. / А.Н. Куличенко, Е.И. Еременко, А.Г. Рязанова, Л.Ю. Аксенова, Д.А. Ковалев, С.В. Писаренко, Н.Г. Варфоломеева, А.М. Жиров, А.С. Волынкина, Н.П. Буравцева, Т.М. Головинская, Е.А. Котенева, О.И. Цыганкова, И.А. Дятлов, В.С. Тимофеев, А.Г. Богун, И.В. Бахтеева, А.А. Кисличкина, Р.И. Миронова, Г.М. Титарева, Ю.П. Скрябин, Ю.О. Селянинов, И.Ю. Егорова, Д.В. Колбасов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2017. – № 1. – С. 94–99.

8. Лившиц, Ю.И. Требования к качеству лабораторных грызунов и условия их содержания // Руководство по вакцинному и сывороточному делу. – Москва: Медицина, 1978. – С. 24–36.
9. Маринин, Л.И. Сибирезвенные скотомогильники: проблемы и решения / Л. И. Маринин, И. А. Дятлов, Н. А. Шишкова, В. Н. Герасимов. – Москва: Династия, 2017. – 215 с.
10. Маринин, Л.И. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение / Л.И. Маринин, Г.Г. Онищенко, Т.Б. Кравченко, И.А. Дятлов, Е.А. Тюрин, А.В. Степанов, В.В. Никифоров. – Москва: Гигиена, 2008 – 416 с.
11. Покровский, В.И. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник / В.И. Покровский, С.Г. Пак, Н.И. Брико, Б.К. Данилкин. – 2-е изд. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 816 с.: ил.
12. Рязанова, А.Г. Использование методов молекулярного типирования *Bacillus anthracis* в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы / А.Г. Рязанова, Е.И. Еременко, О.И. Цыганкова, Е.А. Цыганкова, А.Н. Куличенко // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2011. – № 4. – С. 68–70.
13. 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 // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – №3. – С. 23–32.
14. Шишкова, Н.А. Идентификация возбудителя сибирской язвы, выделенного из почвы скотомогильника / Н.А. Шишкова, Т.Б. Кравченко, Л.И. Маринин, А.Н. Мокриевич // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 4. – С. 53–56.
15. Agaisse, H. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis* / H. Agaisse, M. Gominet, O.A. Økstad, A. Kolstø, D. Lereclus // Mol. Microbiol. – 1999. – Vol. 32. – P. 1043–1053.
16. Agren, J. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences / J. Agren, R.A. Hamidjaja, T. Hansen, R. Ruuls, S. Thierry, H. Vigre, I. Janse, A. Sundstrom, B. Segerman, M. Koene, C. Löfström, B. Van Rotterdam, S. Derzelle // Virulence. – 2013. – Vol. 4, N 8. – P. 671–685.
17. Aikembayev, A.M. Historical distribution and molecular diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan / A.M. Aikembayev, L. Lukhnova, G. Temiraliyeva, T. Meka-Mechenko, Y. Pazylov, S. Zakaryan, G. Denissov, W.R. Easterday, M.N. Van Ert, P. Keim, S.C. Francesconi, J.K. Blackburn, M. Hugh-Jones, T. Hadfield // Emerg. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 16. – P. 789–796.
18. Andersen, G.L. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species / G.L. Andersen, J.M. Simchock, K.H. Wilson // J. Bacteriol. – 1996. – Vol. 178, N 2. – P. 377–384.

19. Anisimov, A.P. Amino acid and structural variability of *Yersinia pestis* LcrV protein / A.P. Anisimov, S.V. Dentovskaya, E.A. Panfertsev, T.E. Svetoch, P.Kh. Kopylov, B.W. Segelke, A. Zemla, M.V. Telepnev, V.L. Motin // *Infect. Genet. Evol.* – 2010. – Vol. 10, N 1. – P. 137–145.
20. Antonation, K.S. *Bacillus cereus* biovar anthracis causing anthrax in sub-saharan Africa – chromosomal monophyly and broad geographic distribution / K.S. Antonation, K. Grützmacher, S. Dupke, P. Mabon, F. Zimmermann, F. Lankester, T. Peller, A. Feistner, A. Todd, I. Herbinger, H.M. de Nys, J.J. Muyembe-Tamfun, S. Karhemere, R.M. Wittig, E. Couacy-Hymann, R. Grunow, S. Calvignac-Spencer, C.R. Corbett, S.R. Klee, F.H. Leendertz // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2016. – Vol. 10, N 9. – P. e0004923.
21. Antwerpen, M. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains / M. Antwerpen, D. Ilin, E. Georgieva, H. Meyer, E. Savov, D. Frangoulidis // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 30, N 7. – P. 923–930.
22. Ashiuchi, M. Physiological and biochemical characteristics of poly gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis* / M. Ashiuchi, C. Nawa, T. Kamei, J.J. Song, S.P. Hong, M.H. Sung, K. Soda, H. Misono // *Eur J Biochem.* – 2001. – Vol. 268, N 20. – P. 5321-5328. Erratum in: *Eur. J. Biochem.* – 2001. – Vol. 268, N 22. – P. 6003.
23. Barker, M. Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins / M. Barker, B. Thakker, F.G. Priest // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – Vol. 245, N 1. – P.179–184.
24. Barua, S. The mechanism of *Bacillus anthracis* intracellular germination requires multiple and highly diverse genetic loci / S. Barua, M. McKeivitt, K. DeGiusti, E.E. Hamm, J. Larabee, S. Shakir, K. Bryant, T.M. Koehler, S.R. Blanke, D. Dyer, A. Gillaspay, J.D. Ballard // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 77, N 1. – P. 23–31.
25. Bath, J. Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-pre-spore division septum / J. Bath, L.J. Wu, J. Errington, J.C. Wang // *Science.* – 2000. – Vol. 290. – P. 995–997.
26. Becker, L. Whole genome sequence analysis of CTX-M-15 producing *Klebsiella* isolates allowed dissecting a polyclonal outbreak scenario / L. Becker, S. Fuchs, Y. Pfeifer, T. Semmler, T. Eckmanns, G. Korr, D. Sissolak, M. Friedrichs, E. Zill, M.L. Tung, C. Dohle, M. Kaase, S. Gatermann, H. Rüssmann, M. Steglich, S. Haller, G. Werner // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 322.
27. Bessen, D. Evidence for two distinct classes of streptococcal M proteins and their relationship to rheumatic fever / D. Bessen, K.F. Jones, V.A. Fischetti // *J. Exp. Med.* – 1989. – Vol. 169. – P. 269–283.

28. Beyer, W. Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia / W. Beyer, S. Bellan, G. Eberle, H.H. Ganz, W.M. Getz, R. Haumacher, K.A. Hilss, W. Kilian, J. Lazak, W.C. Turner, P.C. Turnbull // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2012. – Vol. 6, N 3. – P. e1534.
29. Bichara, M. Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria / M. Bichara, J. Wagner, I.B. Lambert // Mutat. Res. – 2006. – Vol. 598, N 1–2. – P. 144–163.
30. Birdsell, D.N. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays Melt-MAMA: a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models / D.N. Birdsell, T. Pearson, E.P. Price, H.M. Hornstra, R.D. Nera, N. Stone, J. Gruendike, E.L. Kaufman, A.H. Pettus, A.N. Hurbon, J.L. Buchhagen, N.J. Harms, G. Chanturia, M. Gyuranecz, D.M. Wagner, P.S. Keim // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – P. e32866.
31. Bishop, B.L. The role of anthrolysin O in gut epithelial barrier disruption during *Bacillus anthracis* infection / B.L. Bishop, J.P. Lodolce, L.E. Kolodziej, D.L. Boone, W.J. Tang // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – Vol. 394, N 2. – P. 254–259.
32. Blackburn, J.K. *Bacillus anthracis* diversity and geographic potential across Nigeria, Cameroon and Chad: further support of a novel West African lineage / J.K. Blackburn, M.O. Odugbo, M. Van Ert, B. O'Shea, J. Mullins, V. Perreten, A. Maho, M. Hugh-Jones, T Hadfield // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2015. – Vol. 9, N 8. – P. e0003931. Erratum in: PLoS Negl. Trop. Dis. – 2015. – Vol. 9, N 9. – P. e0004089.
33. Bourgogne, A. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids / A. Bourgogne, M. Drysdale, S.G. Hilsenbeck, S.N. Peterson, T.M. Koehler // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71, N 5. – P. 2736–2743.
34. Braun, P. Microevolution of anthrax from a young ancestor (M.A.Y.A.) suggests a soil-borne life cycle of *Bacillus anthracis* / P. Braun, G. Grass, A. Aceti, L. Serrecchia, A. Affuso, L. Marino, S. Grimaldi, S. Pagano, M. Hanczaruk, E. Georgi, B. Northoff, A. Schöler, M. Schloter, M. Antwerpen, A Fasanella // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 8. – P. e0135346.
35. Cachat, E. A *Bacillus thuringiensis* strain producing a polyglutamate capsule resembling that of *Bacillus anthracis* / E. Cachat, M. Barker, T.D. Read, F.G. Priest // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – Vol. 285, N 2. – P. 220–226.
36. Candela, T. *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan / T. Candela, A. Fouet // Mol. Microbiol. – 2005. – Vol. 57, N 3. – P. 717–726.
37. Candela, T. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis / T. Candela, M. Mock, A. Fouet // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, N 22. – P. 7765–7772.

38. Candela, T. Poly-gamma-glutamate in bacteria / T. Candela, A. Fouet // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 60, N 5. – P. 1091–1098.
39. Carlson, C.J. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife / C.J. Carlson, I.T. Kracalik, N. Ross, K.A. Alexander, M.E. Hugh-Jones, M. Fegan, B.T. Elkin, T. Epp, T.K. Shury, W. Zhang, M. Bagirova, W.M. Getz, J.K. Blackburn // *Nat. Microbiol.* – 2019. – Vol. 4, N 8. – P. 1337–1343.
40. Carroll, L.M. Rapid, high-throughput identification of anthrax-causing and emetic *Bacillus cereus* group genome assemblies via BTyper, a computational tool for virulence-based classification of *Bacillus cereus* Group isolates by using nucleotide sequencing data / L.M. Carroll, J. Kovac, R.A. Miller, M. Wiedmann // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2017. – Vol. 83, N 17. – P. e01096–17.
41. Castanha, E.R. Strain discrimination among *B. anthracis* and related organisms by characterization of *bclA* polymorphisms using PCR coupled with agarose gel or microchannel fluidics electrophoresis / E.R. Castanha, R.R. Swiger, B. Senior, A. Fox, L.N. Waller, K.F. Fox // *J. Microbiol. Methods.* – 2006. – Vol. 64. – P. 27–45.
42. Chang, C.H. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database / C.H. Chang, Y.C. Chang, A. Underwood // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35 – P. 416–421.
43. Chauhan, V. Identification of amino acid residues of anthrax protective antigen involved in binding with lethal factor / V. Chauhan, R. Bhatnagar // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70, N 8. – P. 4477–4484.
44. Chen, Y. β -Lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain / Y. Chen, J. Succi, F.C. Tenover, T.M. Koehler // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – P. 823–830.
45. Chiaverini, A. Whole genome sequencing for studying *Bacillus anthracis* from an outbreak in the Abruzzo region of Italy / A. Chiaverini, M.Y. Abdel-Glil, J. Linde, D. Galante, V. Rondinone, A. Fasanella, C. Cammà, N. D'Alterio, G. Garofolo, H. Tomaso // *Microorganisms.* – 2020. – Vol. 8, N 1. – P. 87.
46. Ciammaruconi, A. Fieldable genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* based on 25-loci Multi Locus VNTR Analysis / A. Ciammaruconi, S. Grassi, R. De Santis, G. Faggioni, V. Pittiglio, R. D'Amelio, A. Carattoli, A. Cassone, G. Vergnaud, F. Lista // *BMC Microbiol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 21.
47. Cieslak, T.J. Clinical and epidemiologic principles of anthrax / T.J. Cieslak, E.M. Eitzen // *J. Emerg. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 5, N 4. – P. 552–555.
48. Cohen-Gihon, I. Whole-genome sequencing of the nonproteolytic *Bacillus anthracis* V770-NP1-R strain reveals multiple mutations in peptidase loci / I. Cohen-Gihon, O. Israeli, A. Beth-Din, H. Levy, O. Cohen, A. Shafferman, A. Zvi, T. Chitlaru // *Genome Announc.* – 2014. – Vol. 2, N 1. – P. e00075–14.

49. Collier, R.J. Membrane translocation by anthrax toxin / R.J. Collier // *Mol. Aspects Med.* – 2009. – Vol.30, N 6. – P. 413–422.
50. Cunnion, K. M. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus* / K.M. Cunnion, J.C. Lee, M.M. Frank // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. – P. 6796–6803.
51. Cywes, C. CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A *Streptococcus* / C. Cywes, I. Stamenkovic, M.R. Wessels // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 106. – P. 995–1002.
52. Daffonchio, D. Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis* / D. Daffonchio, N. Raddadi, M. Merabishvili, A. Cherif, L. Carmagnola, L. Brusetti, A. Rizzi, N. Chanishvili, P. Visca, R. Sharp, S. Borin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol.72, N 2. – P. 1295–301.
53. Dai, Z. Regulation of anthrax toxin activator gene (*atxA*) expression in *Bacillus anthracis*: Temperature, not CO₂/bicarbonate, affects *atxA* synthesis / Z. Dai, T.M. Koehler // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65. – P. 2576–2582.
54. Daligault, H.E. Twenty whole-genome *Bacillus* sp. Assemblies / H.E. Daligault, K.W. Davenport, T.D. Minogue, K.A. Bishop-Lilly, S.M. Broomall, D.C. Bruce, P.S. Chain, S.R. Coyne, K.G. Frey, H.S. Gibbons, J. Jaissle, G.I. Koroleva, J.T. Ladner, C.C. Lo, C. Munk, G.F. Palacios, C.L. Redden, C.N. Rosenzweig, M.B. Scholz, S.L. Johnson // *Genome Announc.* – 2014. – Vol. 2, N 5. – P. e00958–14.
55. De Vos, V. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa // *Salisbury Medical Bulletin.* – 1990. – Vol. 68S. – P. 19–23.
56. Deng, X. Comparative analysis of subtyping methods against a whole-genome-sequencing standard for *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*. / X. Deng, N. Shariat, E.M. Driebe, C.C. Roe, B. Tolar, E. Trees, P. Keim, W. Zhang, E.G. Dudley, P.I. Fields, D.M. Engelthaler // *J. Clin. Microbiol.* – 2015. – Vol. 53, N 1. – P. 212–218.
57. Dentovskaya, S.V. Two isoforms of *Yersinia pestis* plasminogen activator Pla: intraspecies distribution, intrinsic disorder propensity, and contribution to virulence / S.V. Dentovskaya, M.E. Platonov, T.E. Svetoch, P.K. Kopylov, T.I. Kombarova, S.A. Ivanov, R.Z. Shaikhutdinova, L.V. Kolombet, S. Chauhan, V.G. Ablamunits, V.L. Motin, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, N 12. – P. e0168089.
58. Derzelle, S. Comparative genomics of *Bacillus anthracis* from the wool industry highlights polymorphisms of lineage A.Br.Vollum / S. Derzelle, L. Aguilar-Bultet, J. Frey // *Infect. Genet. Evol.* – 2016. – Vol.46. – P. 50–58.

59. Derzelle, S. Genetic diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: genotyping methods in forensic and epidemiologic investigations / S. Derzelle, S. Thierry // *Biosecur Bioterror.* – 2013. – Vol.11 N S1. – P. S166–S176.
60. Derzelle, S. Whole genome SNP analysis of bovine *B. anthracis* strains from Switzerland reflects strict regional separation of Simmental and Swiss Brown breeds in the past / S. Derzelle, L. Aguilar-Bultet, J. Frey // *Vet. Microbiol.* – 2016. – N. 196. – P. 1–8.
61. Diard, M. Evolution of bacterial virulence / M. Diard, W.D. Hardt // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2017. – Vol. 41. – P. 679–697.
62. Doijad, S. Multi-virulence-locus sequence typing of 4b *Listeria monocytogenes* isolates obtained from different sources in India over a 10-year period / S. Doijad, S. Lomonaco, K. Poharkar, S. Garg, S. Knabel, S. Barbuddhe, B. Jayarao // *Foodborne Pathog. Dis.* – 2014. – Vol. 11. N 7. – P. 511–516.
63. Dragon, D. C. The ecology of anthrax spores: tough but not invincible / D.C. Dragon, R.P. Rennie // *Can. Vet. J.* – 1995. – Vol. 36, N 5. – P. 295–301.
64. Drum, C.L. Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin / C.L. Drum, S.Z. Yan, J. Bard, Y.Q. Shen, D. Lu, S. Soelaiman, Z. Grabarek, A. Bohm, W.J. Tang // *Nature.* – 2002. – Vol. 415, N 6870. – P. 396–402.
65. Drysdale, M. *atxA* controls *Bacillus anthracis* capsule synthesis via *acpA* and a newly discovered regulator, *acpB* / M. Drysdale, A. Bourgoigne, S.G. Hilsenbeck, T.M. Koehler // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186, N 2. – P. 307–315.
66. Drysdale, M. Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax / M. Drysdale, S. Heninger, J. Hutt, Y. Chen, C.R. Lyons, T.M. Koehler // *EMBO J.* – 2005. – Vol. 24, N 1. – P. 221–227.
67. Drysdale, M. Transcriptional analysis of the *Bacillus anthracis* capsule regulators / M. Drysdale, A. Bourgoigne, T.M. Koehler // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 5108–5114.
68. Ehling-Schulz, M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential / M. Ehling-Schulz, D. Lereclus, T.M. Koehler // *Microbiol Spectr.* – 2019. – Vol. 7, N 3. – P. 10.
69. Enright, M.C. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease / M.C. Enright, B.G. Spratt. // *Microbiology.* – 1998. – Vol. 144. – P. 3049–3060.
70. Enright, M.C. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* / M.C. Enright, N.P. Day, C.E. Davies, S.J. Peacock, B.G. Spratt // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38. – P. 1008–1015.

71. Enright, M.C. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone / M.C. Enright, B.G. Spratt, A. Kalia, J.H. Cross, D.E. Bessen // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69, N 4. – P. 2416–2427.
72. Eremenko, E.I. Comparative analysis of genetic typing methods for *Bacillus anthracis* / E.I. Eremenko, A.G. Ryazanovaa, S.V. Pisarenkoa, L.Yu. Aksenova // *Russ. J. of Genetics.* – 2019. – Vol. 55, N 1. – P. 35–44.
73. Fan, H. A brief review of short tandem repeat mutation / H. Fan & J.Y. Chu // *Genomics, proteomics bioinformatics.* – 2007. – Vol. 5, N 1. – P. 7–14.
74. Feil, E.J. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. / E.J. Feil, B.C. Li, D.M. Aanensen, W.P. Hanage, B.G. Spratt. // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186. – N. 5. – P. 1518–1530.
75. Fellows, P.F. Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geo-graphical origin. / P.F.Fellows, M.K. Linscott, B.E. Ivins, M.L. Pitt, C.A. Rossi, P.H. Gibbs, A.M. Friedlander. // *Vaccine.* – 2001. – Vol.19. – P. 3241–3247.
76. Fernandes, C.G. Autoregulation of SafA assembly through recruitment of a protein cross-linking enzyme / C.G. Fernandes, C.P.Jr. Moran, A.O. Henriques // *J. Bacteriol.* – 2018. – Vol. 200, N 14. – P. e00066–18.
77. Finke, E.J. Review: The risk of contracting anthrax from spore-contaminated soil – A military medical perspective / E.J. Finke, W. Beyer, U. Loderstädt, H. Frickmann // *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp).* – 2020. – Vol. 10, N 2. – P. 29–63.
78. Francisco, A.P. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach / A.P. Francisco, M. Bugalho, M. Ramirez, J.A. Carriço // *BMC Bioinformatics.* – 2009. – Vol.10. – P. 152.
79. Frankel, A.E. Pathophysiology of anthrax / A.E. Frankel, S.R. Kuo, D. Dostal, L. Watson, N.S. Duesbery, C.P. Cheng, H.J. Cheng, S.H. Leppla // *Front. Biosci (Landmark Ed).* – 2009. – Vol. 14. – P. 4516–4524.
80. Furuta, Y. Direct regulons of AtxA, the master virulence regulator of *Bacillus anthracis*. / Y. Furuta, C. Cheng, T. Zorigt, A. Paudel, S. Izumi, M. Tsujinouchi, T. Shimizu, W.G. Meijer, H. Higashi // *mSystems.00291-21.* – 2021. – Vol. 6, N 4 – P. e0029121.
81. Gierczyński, R. Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland--the molecular echoes of the past outbreaks / R. Gierczyński, S. Kałuzewski, A. Rakin, M. Jagielski, A. Zasada, A. Jakubczak, B. Borkowska-Opacka, W. Rastawicki // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – Vol. 239, N 2. – P. 235–240.

82. Gobeli Brawand, S. An unusual case of bovine anthrax in the canton of Jura, Switzerland in 2017 / S. Gobeli Brawand, S. Kittl, M. Dettwiler, A. Thomann, S. Feyer, J. Cachim, G. Theubet, N. Liechti, M. Wittwer, N. Schürch, S. Oberhänsli, A. Heinimann, J. Jores // *BMC Vet. Res.* – 2019. – Vol. 15, N 1. – P. 265.
83. 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.
84. Goncharova, Y.O. Allelic Polymorphism of Anthrax Pathogenicity Factor Genes as a Means of Estimating Microbiological Risks Associated with Climate Change. / Y.O. Goncharova, A.G. Bogun, I.V. Bahtejeva, G.M. Titareva, R.I. Mironova, T.B. Kravchenko, N.A. Ostarkov, A.V. Brushkov, V.S. Timofeev, S.G. Ignatov. // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2022. Vol.58, N.4. – P. 338–351.
85. Hammerstrom, T.G. *Bacillus anthracis* virulence regulator AtxA: oligomeric state, function and CO₂-signalling / T.G. Hammerstrom, J.H. Roh, E.P. Nikonowicz, T.M. Koehler // *Mol. Microbiol.* – 2011. – Vol. 82, N 3. – P. 634–647.
86. Helgason, E. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence / E. Helgason, O.A. Okstad, D.A. Caugant, H.A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna, A.B. Kolstø // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol.66. – P. 2627–2630.
87. Helgason, E. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group / E. Helgason, Ni.J. Tourasse, R. Meisal, D.A. Caugant., A.B. Kolstø // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, N 1 – P. 191–201.
88. Hoffmann, C. Persistent anthrax as a major driver of wildlife mortality in a tropical rain-forest / C. Hoffmann, F. Zimmermann, R. Biek, H. Kuehl, K. Nowak [et al.] // *Nature.* – 2017. – Vol. 548. – P. 82–86.
89. Hoffmaster, A.R. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes / A.R. Hoffmaster, K.K. Hill, J.E. Gee, C.K. Marston, B.K. De, T. Popovic, D. Sue, P.P. Wilkins, S.B. Avashia, R. Drumgoole, C.H. Helma, L.O. Ticknor, R.T. Okinaka, P.J. Jackson // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44, N 9. – P. 3352–3360.
90. Hoffmaster, A.R. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax / A.R. Hoffmaster, J. Ravel, D.A. Rasko, G.D. Chapman, M.D. Chute, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 8449–8454.
91. Hunter, P.R Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity / P.R. Hunter, M.A. Gaston // *J. Clin. Microbiol.* – 1988. – Vol. 26. – P. 2465–2466.

92. Ivins, BE. Immunization studies with attenuated strains of *Bacillus anthracis* / B.E. Ivins, J.W.Jr. Ezzell, J. Jemski, K.W. Hedlund, J.D. Ristroph, S.H. Leppla // *Infect. Immun.* – 1986. – Vol. 52. – P. 454–458.
93. Keim, P. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales / P. Keim, M.N. Van Ert, T. Pearson, A.J. Vogler, L.Y. Huynh, D.M. Wagner // *Infect. Genet. Evol.* – 2004. – Vol. 4, N 3. – P. 205–213.
94. Keim, P. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers / P. Keim, A. Kalif, J. Schupp, K. Hill, S.E. Travis, K. Richmond, D.M. Adair, M. Hugh-Jones, C.R. Kuske, P. Jackson // *J. Bacteriol.* – 1997. – Vol. 179, N 3. – P. 818–824.
95. Keim, P. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis* / P. Keim, L.B. Price, A.M. Klevytska, K.L. Smith, J.M. Schupp, R. Okinaka, P.J. Jackson, M.E. Hugh-Jones // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – P. 2928–2936.
96. Keim, P. The genome and variation of *Bacillus anthracis* / P. Keim, J.M. Gruendike, A.M. Klevytska, J.M. Schupp, J. Challacombe, R. Okinaka // *Mol. Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30, N 6. – P. 397–405.
97. Kenefic, L.J. A high resolution four-locus multiplex single nucleotide repeat (SNR) genotyping system in *Bacillus anthracis* / L.J. Kenefic, J. Beaudry, C. Trim, L. Huynh, S. Zanecki, M. Matthews, J. Schupp, M. Van Ert, P. Keim // *J. Microbiol. Methods.* – 2008. – Vol. 73. – P. 269–272.
98. Khavrutskii, I.V. A reaction path study of the catalysis and inhibition of the *Bacillus anthracis* CapD γ -glutamyl transpeptidase / I.V. Khavrutskii, P.M. Legler, A.M. Friedlander, A. Wallqvist // *Biochemistry.* – 2014. – Vol. 53, N 44. – P. 6954–6967.
99. Klimpel, K.R. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity / K.R. Klimpel, N. Arora, S.H. Leppla // *Mol. Microbiol.* – 1994. – Vol. 13, N 6. – P. 1093–1100.
100. Ko, K.S. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene / K.S. Ko, J.W. Kim, J.M. Kim, W. Kim, S.I. Chung, I.J. Kim, Y.H. Kook // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72. – P. e5253-5261.
101. Koehler, T.M. *Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation / T.M. Koehler // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2002. – Vol. 271. – P.143–164.
102. Koehler, T.M. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO2 and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters / T.M. Koehler, Z. Dai, M. Kaufman-Yarbray // *J. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176. – P. 586–595.

103. Kolstø, A.B. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? / A.B. Kolstø, N.J. Tourasse, O.A. Økstad // *Annu Rev. Microbiol.* – 2009. – Vol. 63. – P. 451–476.
104. Kopylov, P.Kh. *Yersinia pestis* CafI protein: effect of sequence polymorphism on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms / P. Kh. Kopylov, M.E. Platonov, V.G. Ablamunits, T.I. Kombarova, S.A. Ivanov, L.A. Kadnikova, A.N. Somov, Dentovskaya, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // *PLoS One.* – 2016. – Vol.11, N 9. – P. e0162308.
105. Kotetishvili, M. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains / M. Kotetishvili, O.C. Stine, A. Kreger, J.G. Morris, A. Sulakvelidze // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 40. – P. 1626–1635.
106. Kumar, P. Purification of anthrax edema factor from *Escherichia coli* and identification of residues required for binding to anthrax protective antigen / P. Kumar, N. Ahuja, R. Bhatnagar // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69, N 10. – P. 6532–6536.
107. Le Flèche, P. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* / P. Le Flèche, Y. Hauck, L. Onteniente, A. Prieur, F. Denoeud, V. Ramière, P. Sylvestre, G. Benson, F. Ramière, G. Vergnaud // *BMC Microbiol.* – 2001. – Vol. 1. – P. 2.
108. Le Fleche, P. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay / P. Le Fleche, I. Jacques, M. Grayon, S. Al Dahouk, P. Bouchon, F. Denoeud, K. Nockler, H. Neubauer, L.A. Guilloteau, G. Vergnaud // *BMC Microbiol.* – 2006. – Vol.6. – P. 9.
109. Le Flèche, P. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing / P. Le Flèche, M. Fabre, F. Denoeud, J.L. Koeck, G. Vergnaud // *BMC Microbiol.* – 2002. – Vol. 2. – P. 37.
110. Leski, T.A. Identification and classification of *bcl* genes and proteins of *Bacillus cereus* group organisms and their application in *Bacillus anthracis* detection and fingerprinting / T.A. Leski, C.C. Caswell, M. Pawlowski, D.J. Klinke, J.M. Bujnicki, S.J. Hart, S. Lukomski. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75, N 22. – P. 7163–7172.
111. Levinson, G. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution / G. Levinson, G.A. Gutman // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – Vol. 4. – P. 203–221.
112. Lista, F. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis / F. Lista, G. Faggioni, S. Valjevac, A. Ciammaruconi, J. Vaissaire, C. le Doujet, O. Gorgé, R. De Santis, A. Carattoli, A. Ciervo, A. Fasanella, F. Orsini, R. D'Amelio, C. Pourcel, A. Cassone, G. Vergnaud / *BMC Microbiol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 33.
113. Liu, X. Genome sequence of *Bacillus anthracis* attenuated vaccine strain A16R used for human in China / X. Liu, X. Qi, L. Zhu, D. Wang, Z. [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 210. – P. 15–16.

114. Madoff, L.C. Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein / L.C. Madoff, J.L. Michel, E.W. Gong, D.E. Kling, D.L. Kasper // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93. – P. 4131–4136.
115. Maiden, M.C.J. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. / M.C.J. Maiden, J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman, B.G. Spratt // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, N 6. – P. 3140–3145.
116. Makino, S. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax / S. Makino, M. Watarai, H.I. Cheun, T. Shirahata, I. Uchida // J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 186. – P. 227–233.
117. Makino, S. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis* / S. Makino, I. Uchida, N. Terakado, C. Sasakawa, M. Yoshikawa // J. Bacteriol. – 1989. – Vol. 171, N 2. – P. 722–730.
118. Makino, S. Phase variation of the opacity outer membrane protein controls invasion by *N. gonorrhoeae* into human epithelial cells. / S. Makino, J.P.M. Van Putten, T.F. Meyer // EMBO J. – 1991. – Vol. 10. – P. 1307–1315.
119. Merabishvili, M. Diversity of *Bacillus anthracis* strains in Georgia and of vaccine strains from the former Soviet Union / M. Merabishvili, M. Natidze, S. Rigvava, L. Brusetti, N. Raddadi, S. Borin, N. Chanishvili, M. Tediashvili, R. Sharp, M. Barbeschi, P. Visca, D. Daffonchio // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72, N 8. – P. 5631–5636.
120. Michalek, M.T. Inhibition of the alternative pathway of human complement by structural analogues of sialic acid. / M.T. Michalek, C. Mold, E.G. Bremer // J. Immunol. – 1988. – Vol. 140, N 5. – P. 1588–1594.
121. Mourez, M. Mapping dominant-negative mutations of anthrax protective antigen by scanning mutagenesis / M. Mourez, M. Yan, D.B. Lacy, L. Dillon, L. Bentsen, A. Marpoe, C. Maurin, E. Hotze, D. Wigelsworth, R-A. Pimental, J.D. Ballard, R.J. Collier, R.K. Tweten // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100, N 24. – P. 13803–13808.
122. Moxon, E.R. Pathogenic bacteria: the wisdom of their genes / E.R. Moxon, P.B. Rainey // Ecology of pathogenic bacteria. Amsterdam, The Netherlands: Royal Dutch Academy of Sciences – 1995. – P. 255–268.
123. Munyua, P. Prioritization of zoonotic diseases in Kenya / P. Munyua, A. Bitek, E. Osoro, E.G. Pieracci, J. Muema, A. Mwatondo, M. Kungu, M. Nanyingi, R. Gharpure, K. Njenga, S.M. Thumbi // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 8. – P. e0161576.

124. Murphy, G.L. Phase variation of gonococcal protein. II. Regulation of gene expression by slipped strand mispairing of a repetitive DNA sequence / G.L. Murphy, T.D. Connell, D.S. Barritt, M. Koomeyh, J.G. Cannon // *Cell*. – 1989. – Vol. 56. – P. 539–547.
125. Nascimento, M. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods / M. Nascimento, A. Sousa, M. Ramirez, A.P. Francisco, J.A. Carriço, C. Vaz // *Bioinformatics*. – 2017. – Vol. 33, N 1. – P. 128–129.
126. Newton, C.R. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system ARMS / C.R. Newton, A. Graham, L.E. Heptinstall, S.J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J.C. Smith, A.F. Markham. // *Nucleic. Acids. Res.* – 1989. – Vol. 17. – P. 2503–2516.
127. Ngetich, W. Review of anthrax: a disease of animals and humans / W. Ngetich // *Int. J. Agric. Environ. Biores.* – 2019. – Vol. 4. – P. 123–134.
128. Noller, A.C. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis / A.C. Noller, M.C. McElistrem, O.C. Stine, J.G. Morris, D.J. Jr. Boxrud, B. Dixon, L.H. Harrison // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41. – P. 675–679.
129. Okinaka, R. Sequence, assembly and analysis of pX01 and pX02 / R. Okinaka, K. Cloud, O. Hampton, A. Hoffmaster, K. Hill, P. Keim, T. Koehler, G. Lamke, S. Kumano, D. Manter, Y. Martinez, D. Ricke, R. Svensson, P. Jackson // *J. Appl. Microbiol.* – 1999. – Vol. 87, N 2. – P. 261–262.
130. Okinaka, R.T. Single nucleotide polymorphism typing of *Bacillus anthracis* from Sverdlovsk tissue / R.T. Okinaka, M. Henrie, K.K. Hill, K.S. Lowery, M. Van Ert, T. Pearson, J. Schupp, L. Kenefic, J. Beaudry, S.A. Hofstadler, P.J. Jackson, P. Keim // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 14, N 4. – P.653–656.
131. Pannifer, A.D. Crystal structure of the anthrax lethal factor / A.D. Pannifer, T.Y. Wong, R. Schwarzenbacher, M. Renatus, C. Petosa, J. Bienkowska, D.B. Lacyk, R.J. Collier, S. Park, S.H. Leppla, P. Hanna, R.C. Liddington // *Nature*. – 2001. – Vol. 414, N 6860. – P. 229–233.
132. Park, J.M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition / J.M. Park, F.R. Greten, Z.W. Li, M. Karin // *Science*. – 2002. – Vol. 297, N 5589. – P. 2048–2051.
133. Pearson, T. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing / T. Pearson, J.D. Busch, J. Ravel, T.D. Read, S.D. Rhoton, J.M. U'Ren, T.S. Simonson, S.M. Kachur, R.R. Leadem, M.L. Cardon, M.N. Van Ert, L.Y. Huynh, C.M. Fraser, P. Keim // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101, N 37. – P. 13536–135341.
134. Petosa, C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen / C. Petosa, R.J. Collier, K.R. Klimpel, S.H. Leppla, R.C. Liddington // *Nature*. – 1997. – Vol. 385, N 6619. – P. 833–838.

135. Pilo, P. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis* / P. Pilo, J. Frey // *Infect. Genet. Evol.* – 2018. – Vol. 64. – P. 115–125.
136. Pisarenko, S.V. Genotyping and phylogenetic location of one clinical isolate of *Bacillus anthracis* isolated from a human in Russia / S.V. Pisarenko, E.I. Eremenko, A.G. Ryazanova, D.A. Kovalev, N.P. Buravtseva, L.Y. Aksenova, A.Y. Evchenko, O.V. Semenova, O.V. Bobrisheva, I.V. Kuznetsova, T.M. Golovinskaya, D.K. Tchmerenko, A.N. Kulichenko, V.Y. Morozov // *BMC Microbiol.* – 2019. – Vol. 19, N 1. – P. 165.
137. Pourcel, C. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* / C. Pourcel, F. Andre-Mazeaud, H. Neubauer, F. Ramisse, G. Vergnaud // *BMC Microbiol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 22.
138. Price, L.B. Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis* / L.B. Price, M. Hugh-Jones, P.J. Jackson, P. Keim // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181, N 8. – P. 2358–2362.
139. Priest, F.G. Population Structure and Evolution of the *Bacillus cereus* Group / F.G. Priest, M. Barker, L.W. Baillie, E.C. Holmeset, M.C. Maiden // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186, N 23. – P. 7959–7970.
140. Rakov, A.V. Association of *Salmonella* virulence factor alleles with intestinal and invasive serovars / A.V. Rakov, E. Mastriani, S.L. Liu, D.M. Schifferli // *BMC Genomics.* – 2019. – Vol. 20, N 1. – P. 429.
141. Rasko, D.A. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms / D.A. Rasko, M.R. Altherr, C.S. Han, J. Ravel // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 29, N 2. – P. 303–329.
142. Raynor, M.J. Regulons and protein-protein interactions of PRD-containing *Bacillus anthracis* virulence regulators reveal overlapping but distinct functions / M.J. Raynor, J.H. Roh, S.G. Widen, T.G. Wood, T.M. Koehler // *Mol. Microbiol.* – 2018. – N 109. – P. 1–22.
143. Rondinone, V. Genetic characterization of *Bacillus anthracis* strains circulating in Italy from 1972 to 2018 / V. Rondinone, L. Serrecchia, A. Parisi, A. Fasanella, V. Manzulli, D. Cipolletta, D. Galante // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, N 1. – P. e0227875.
144. Rooney, A. Molecular characterization of *B. anthracis* isolates from the anthrax outbreak among cattle in Karnataka, India / A. Rooney, S. Majumder, J.J. Kingston, M. Parida // *BMC Microbiol.* – 2020. – Vol. 20. – N 1. – P. 232.
145. Ross, J.I. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact / J.I. Ross, E.A. Eady, J.H. Cove, S. Baumberg // *Gene.* – 1995. – Vol. 153. – P. 93–98.
146. Sahin, M. The identification of novel single nucleotide polymorphisms to assist in mapping the spread of *Bacillus anthracis* across the Southern Caucasus / M. Sahin, F. Buyuk, L. Baillie, R. Wölfel, A. Kotorashvili, A. Rehn, M. Antwerpen, G. Grass // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 11254.

147. Savransky, V. Current status and trends in prophylaxis and management of anthrax disease / V. Savransky, B. Ionin, J. Reece // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, N 5. – P. 370.
148. Schupp, J.M. *vrB*, a hypervariable open reading frame in *Bacillus anthracis* / J.M. Schupp, A.M. Klevytska, G. Zinser, L.B. Price, P. Keim // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182, N 14. – P. 3989–3997.
149. Scorpio, A. Capsule depolymerase overexpression reduces *Bacillus anthracis* virulence / A. Scorpio, D.J. Chabot, W.A. Day, T.A. Hoover, A.M. Friedlander // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 156, N 5. – P. 1459–1467.
150. Seyed Majidi, A. Comparison of *hspX* gene sequence in the Beijing and non-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* / A. Seyed Majidi, H. Bazzazi, S. Zamani, E.A. Ghaemi // *J. Clin. Tuberc. Other. Mycobact. Dis.* – 2020. – Vol. 21. – P. 100187.
151. Shevtsov A. *Bacillus anthracis* Phylogeography: new clues from Kazakhstan, Central Asia. / A. Shevtsov, L. Lukhnova, U. Izbanova, J.P. Vernadet, M. Kuibagarov, A. Amirgazin, Y. Ramankulov, G. Vergnaud. // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 778225.
152. Simonson, T.S. *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages / T.S. Simonson, R.T. Okinaka, B. Wang, W.R. Easterday, L. Huynh, J.M. U'Ren, M. Dukerich, S.R. Zanecki, L.J. Kenefic, J. Beaudry, J.M. Schupp, T. Pearson, D.M. Wagner, A. Hoffmaster, J. Ravel, P. Keim // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol. 9, N 1. – P. 71.
153. Sorokin, A. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains / A. Sorokin, B. Candelon, K. Guilloux, N. Galleron, N. Wackerow-Kouzova, S.D. Ehrlich, D. Bourguet, V. Sanchis // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. – P. e1569–1578.
154. Springman, A.C. Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes / A.C. Springman, D.W. Lacher, G. Wu, N. Milton, T.S. Whittam, H.D. Davies, S.D. Manning // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191, N 17. – P. 5419–5427.
155. Stern, A. Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic neisseriae / A. Stern, T.F. Meyer // *Mol. Microbiol.* – 1987. – Vol. 1. – P. 5–12.
156. Sterne, M. The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis* // *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind.* – 1939. – Vol. 13. – P. 307–312.
157. Stiles, L. Molecular dynamics simulations of complexes between wild-type and mutant anthrax protective antigen variants and a model anthrax toxin receptor / L. Stiles, D.J. Nelson // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2005. – Vol. 22, N 5. – P. 503–519.
158. Stratilo, C.W. Genetic diversity among *Bacillus anthracis* soil isolates at fine geographic scales / C.W. Stratilo, D.E. Bader // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – Vol. 78, N 18. – P. 6433–6437.

159. Stratilo, C.W. Single-nucleotide repeat analysis for subtyping *Bacillus anthracis* isolates / C.W. Stratilo, C.T. Lewis, L. Bryden, M.R. Mulvey, D. Bader // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44, N 3. – P. 777–782.
160. Stülke, J. Regulation of virulence in *Bacillus anthracis*: the phosphotransferase system transmits the signals // *Mol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 63, N 3. – P. 626–628.
161. Su, J. Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants / J. Su, J. Yang, D. Zhao, T.H. Kawula, J.A. Banas, J.R. Zhang // *Infect. Immun.* – 2007. – Vol. 75, N 6. – P. 3089–3101.
162. Sue, D. Genetic Diversity in a *Bacillus anthracis* Historical Collection (1954 to 1988) / D. Sue, C.K. Marston, A.R. Hoffmaster, P.P. Wilkins // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45, N 6. – P. 1777–1782.
163. Swick, M.C. Surviving between hosts: sporulation and transmission / M.C. Swick, T.M. Koehler, A. Driks // *Microbiol. Spectr.* – 2016. – Vol. 4, N 4.
164. Sylvestre, P. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium / P. Sylvestre, E. Couture-Tosi, M. Mock // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 45. – P. 169–178.
165. Teh, C. S. Genetic variation analysis of *Vibrio cholerae* using multilocus sequencing typing and multi-virulence locus sequencing typing / C.S. Teh, K.H. Chua, K.L. Thong // *Infect. Genet. Evol.* – 2011. – Vol. 11, N 5. – P. 1121–1128.
166. Thierry, S. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database / S. Thierry, C. Tourterel, P. Le Flèche, S. Derzelle, N. Dekhil, C. Mendy, C. Colaneri, G. Vergnaud, N. Madani // *PLoS One.* – 2014. – Vol.9, N 6. – P. e95131.
167. Timofeev, V. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia / V. Timofeev, I. Bahtejeva, R. Mironova, G. Titareva, I. Lev, D. Christiany, A. Borzilov, A. Bogun, G. Vergnaud // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14, N 5. – P. e0209140.
168. Tonello, F. Tyrosine-728 and glutamic acid-735 are essential for the metalloproteolytic activity of the lethal factor of *Bacillus anthracis* / F. Tonello, L. Naletto, V. Romanello, F. Dal Molin, C. Montecucco // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 313, N 3. – P. 496–502.
169. Tourasse, N.J. SuperCAT: a supertree database for combined and integrative multilocus sequence typing analysis of the *Bacillus cereus* group of bacteria (including *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*) / N. J. Tourasse, A.B. Kolsto // *Nucleic. Acids Res.*, 36 (Database). – 2007. – P. 461–468.

170. Tourasse, N.J. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics / N.J. Tourasse, E. Helgason, O.A. Okstad, I.K. Hegna, A.B. Kolsto // J. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 101. – P. 579–593.
171. Tsvetanova, B. Opposing effects of histidine phosphorylation regulate the AtxA virulence transcription factor in *Bacillus anthracis* / B. Tsvetanova, A.C. Wilson, C. Bongiorno, C. Chiang, J.A. Hoch, M. Perego / Mol. Microbiol. – 2007. – Vol. 63, N 3. – P. 644–655.
172. Turnbull, P.C. Anthrax vaccines: past, present and future / P.C. Turnbull // Vaccine. – 1991. – Vol. 9, N 8. – P. 533–539.
173. Uchida, I. Cross-talk to the genes for *Bacillus anthracis* capsule synthesis by *atxA*, the gene encoding the trans-activator of anthrax toxin synthesis / I. Uchida, S.I. Makino, T. Sekizaki, N. Terakado // Mol. Microbiol. – 1997. – Vol. 23. – P. 1229–1240.
174. Uchida, I. Identification of a novel gene, *dep*, associated with depolymerization of the capsular polymer in *Bacillus anthracis* / I. Uchida, S. Makino, C. Sasakawa, M. Yoshikawa, C. Sugimoto, N. Terakado // Mol. Microbiol. – 1993. – Vol. 9. – P. 487–496.
175. Urushibata, Y. Characterization of the *Bacillus subtilis ywsC* gene, involved in γ -polyglutamic acid production / Y. Urushibata, S. Tokuyama, Y. Tahara // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184. – P. 337–343.
176. Van Ert, M.N. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis* / M.N. Van Ert, W.R. Easterday, L.Y. Huynh, R.T. Okinaka, M.E. Hugh-Jones, J. Ravel, S.R. Zanecki, T. Pearson, T.S. Simonson, J.M. U'Ren, S.M. Kachur, R.R. Leadem-Dougherty, S.D. Rhoton, G. Zinser, J. Farlow, P.R. Coker, K.L. Smith, B. Wang, L.J. Kenefic, C.M. Fraser-Liggett, D.M. Wagner, P. Keim // PLoS One. – 2007. – Vol. 2. – P. e461.
177. Van Loo, I.H. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes / I.H. Van Loo, K.J. Heuvelman, A.J. King, F.R. Mooi // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40. – P. 1994–2001.
178. Van Putten, J.P. Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *N. gonorrhoeae* // EMBO J. – 1993. – Vol. 12. – P. 4043–4051.
179. Vassileva, M. Phylogenetic analysis of *Bacillus cereus* isolates from severe systemic infections using multilocus sequence typing scheme / M. Vassileva, K. Torii, M. Oshimoto, A. Okamoto, N. Agata, K. Yamada, T. Hasegawa, M. Ohta // Microbiol. Immunol. – 2006. – Vol. 50, N 9. – P. 743–749.
180. Verghese, B. A combined multi-virulence-locus sequence typing and Staphylococcal Cassette Chromosome mec typing scheme possesses enhanced discriminatory power for genotyping MRSA / B. Verghese, N.D. Schwalm 3rd, E.G. Dudley, S.J. Knabel // Infect. Genet. Evol. – 2012. – Vol. 12, N 8. – P. 1816–1821.

181. Vergnaud, G. *Bacillus anthracis* Evolution: Taking Advantage of the Topology of the Phylogenetic Tree and Human History to Propose Dating Points / Vergnaud G // *Erciyes Med. J.* – 2020. – Vol. 42, N 4. – P. 362–369.
182. Wang, D. Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis / D. Wang, B. Wang, L. Zhu, S. Wu, Y. Lyu, E. Feng, C. Pan, L. Jiao, Y. Cui, X. Liu, H. Wang // *Microbiol. Res.* – 2020. – Vol. 233. – P. 126414.
183. Webb, G.F. A silent bomb: The risk of anthrax as a weapon of mass destruction // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 2003. – Vol. 100, N 8. – P. 4355–4356.
184. Weiner, M.A. Identification and characterization of the gerH operon of *Bacillus anthracis* endospores: a differential role for purine nucleosides in germination / M.A. Weiner, T.D. Read, P.C. Hanna // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – P. 1462–1464.
185. Weiser, J.N. Characterization of repetitive sequences controlling phase variation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide / J.N. Weiser, D.J. Maskell, P.D. Butler, A.A. Lindberg, E.R. Moxon // *J. Bacteriol.* – 1990. – Vol. 172. – P. 3304–3309.
186. Welkos, S. Animal Models for the Pathogenesis, Treatment, and Prevention of Infection by *Bacillus anthracis* / S. Welkos, J. Bozue, N. Twenhafel, C. Cote // *Microbiol. Spectr.* – 2015. – Vol. 3, N 1. – P. TBS-0001-2012.
187. Wiedmann, M. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential / M. Wiedmann, J.L. Bruce, C. Keating, A.E. Johnson, P.L. McDonough, C.A. Batt // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65, N 7. – P. 2707–2716.
188. World Health Organization, 2008. Anthrax in humans and animals. – 4th ed.
189. Wu, D.Y. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia / D.Y. Wu, L. Ugozzoli, B.K. Pal, R.B. Wallace // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86. – P. 2757–2760.
190. Wu, G. Identification of new dominant-negative mutants of anthrax protective antigen using directed evolution / G. Wu, C. Feng, S. Cao, A. Guo, Z. Liu // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 168, N 5. – P. 1302–1310.
191. Wu, R. Crystal structure of *Bacillus anthracis* transpeptidase enzyme CapD / R. Wu, S. Richter, R.G. Zhang, V.J. Anderson, D. Missiakas, A. Joachimiak // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, N 3. – P. 24406–24414.
192. Zasada, A.A. Injectional anthrax in human: A new face of the old disease / A.A. Zasada // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2018. – Vol. 27, N 4. – P. 553–558.

193. Zhang, H. Genetic characteristics of *Bacillus anthracis* isolated from northwestern China from 1990 to 2016. / H. Zhang, E. Zhang, J. He, W. Li, J. Wei // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2018. – Vol. 12, N 11. – P. e0006908.

194. Zhao, T. Diminished but not abolished effect of two His351 mutants of anthrax edema factor in a murine model / T. Zhao, X. Zhao, J. Liu, Y. Meng, Y. Feng, T. Fang, J. Zhang, X. Yang, J. Li, J. Xu, W. Chen // Toxins (Basel). – 2016. – Vol. 8, N 2. – P. 35.

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, N 12. – 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. и 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 (ГКПИМ-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 *capA* и *capB* у штаммов сибиреязвенного 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 *pXO1* / **Ю.О. Гончарова, Т.Б. Кравченко, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, К.В. Хлопова,**

В.В. Евсева, 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Результаты генотипирования исследуемой выборки штаммов

Таблица А – Распределение изучаемой выборки штаммов по MVLST_{pXO1}-генотипам, MVLST_{pXO2}-генотипам, MVLST_{alo}-сиквенс-типам, MLST-сиквенс-типам и MLVA7-профилям

Штамм*	canSNP-группа	Происхождение	Коллекция	<i>pagA</i> -ST	<i>lef</i> -ST	<i>cyo</i> -ST	<i>atxA</i> -ST	MVLST _{pXO1} -GT
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>B. cereus</i> 03BB102	-	США	GenBank	11	7	10	1	18
<i>B. cereus</i> G9241	-	США	GenBank	10	9	9	1	19
<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	-	Кот-д'Ивуар	GenBank	10	8	9	2	17
<i>B. cereus</i> BC-AK	-	Китай	GenBank	НД **	НД	НД	НД	НД
I-271	A.Br.001/002	ЯНАО	ГКПМ-Оболенск	1	1	1	1	1
14RA5914	A.Br.001/002	Германия	GenBank	1	1	1	1	1
A16	A.Br.001/002	Китай	GenBank	1	1	1	1	1
Stendal	A.Br.001/002	Германия	GenBank	1	1	1	1	1
A16R	A.Br.001/002	Китай	GenBank	1	1	1	1	1
BFV	A.Br.001/002	Ямайка	GenBank	1	4	1	1	7
Tangail-1	A.Br.001/002	Бангладеш	GenBank	1	4	1	1	7
FDAARGOS 341	A.Br.001/002	США	GenBank	1	4	1	1	7
SPV842 15	A.Br.001/002	Бразилия	GenBank	1	4	1	1	7
Sterne	A.Br.001/002	США	GenBank	1	4	1	1	7
53169	A.Br.001/002	НД	ГКПМ-Оболенск	1	1	1	1	1
34(738)	A.Br.001/002	Казахстан	ГКПМ-Оболенск	1	1	1	1	1
BA1015	A.Br.003/004	США	GenBank	2	1	2	1	2
V-770 NP1R	A.Br.003/004	США	GenBank, ГКПМ-Оболенск	2	1	2	1	2
A0135	A.Br.005/006	Танзания	GenBank	2	1	2	1	2
A2075	A.Br.005/006	Танзания	GenBank	2	1	5	1	8
CZC5	A.Br.005/006	Замбия	GenBank	2	1	5	1	8
K3	A.Br.005/006	ЮАР	GenBank	2	1	5	1	8
A2079	A.Br.005/006	Танзания	GenBank	2	1	1	1	11
H9401	A.Br.005/007	Корея	GenBank	2	5	6	1	12
8(2099)	A.Br.008/011	Татарстан	ГКПМ-Оболенск	2	1	2	1	2
LP51/4YA	A.Br.008/011	Якутия	ГКПМ-Оболенск	2	1	2	1	2
1259	A.Br.008/011	Ставропольский край	ГКПМ-Оболенск	2	1	2	1	2
1273	A.Br.008/011	Волгоградская обл.	ГКПМ-Оболенск	2	1	2	1	2
K1285	A.Br.008/011	Намибия	GenBank	2	1	2	1	2

Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Larissa	A.Br.008/011	Греция	GenBank	2	1	2	1	2
Turkey32	A.Br.008/011	Турция	GenBank	2	1	2	1	2
644/268	A.Br.008/011	Украина	ГКПМ-Оболенск	2	1	2	1	2
PAK-1	A.Br.008/011	Пакистан	GenBank	2	1	2	1	2
STI-1	A.Br.008/011	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	2	1	2	1	2
592/10	A.Br.008/011	Молдавия	ГКПМ-Оболенск	2	1	2	1	2
1055/38	A.Br.008/011	Самарская обл.	ГКПМ-Оболенск	2	1	2	1	2
1030/213	A.Br.008/011	Карачаево-Черкессия	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
1056/51	A.Br.008/011	Ставропольский край	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
47/28	A.Br.008/011	Чечено-Ингушетия	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
48/29	A.Br.008/011	Чечено-Ингушетия	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
531/17	A.Br.008/011	Калмыкия	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
LP50/3YA	A.Br.008/011	Якутия	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
1173	A.Br.008/011	Ставропольский край	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
914/213	A.Br.008/011	Чечено-Ингушетия	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
1298	A.Br.008/011	Волгоград	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
546/714	A.Br.008/011	Воронежская обл.	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
219/6	A.Br.008/011	Узбекистан	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
367/17	A.Br.008/011	Тульская обл.	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
68/12	A.Br.008/011	Азербайджан	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
7(992)	A.Br.008/011	Новгородская область	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
46/27	A.Br.008/011	Чечено-Ингушетия	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
555/288	A.Br.008/011	Оренбургская обл.	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
1(14) Stavropol	A.Br.008/011	Украина	ГКПМ-Оболенск	3	2	2	1	3
A1144	A.Br.011/009	Аргентина	GenBank	2	1	2	1	2
London 499	A.Br.011/009	Великобритания	GenBank	2	1	2	1	2
Pollino	A.Br.011/009	Италия	GenBank	2	1	2	1	2
Pasteur	A.Br.011/009	США	GenBank	НП ***	НП	НП	НП	НП
A0248	A.Br.Ames	США	GenBank	1	1	1	1	1
Ames Ancestor	A.Br.Ames	США	GenBank	1	1	1	1	1
Shikan-NIID	A.Br.Ames	Япония	GenBank	1	1	1	1	1
A2012	A.Br.Ames	НД	GenBank	1	1	1	1	1
1183	A.Br.Aust94	Кабардино-Балкарская республика	ГКПМ-Оболенск	1	1	2	1	4
A3716	A.Br.Aust94	Намибия	GenBank	1	1	2	1	4
Kanchipuram	A.Br.Aust94	Индия	GenBank	1	1	2	1	4
Kafkas-100	A.Br.Aust94	Турция	GenBank	1	1	2	1	4
Kafkas-149	A.Br.Aust94	Турция	GenBank	1	1	2	1	4

Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kafkas-215	A.Br.Aust94	Турция	GenBank	1	1	2	1	4
822/7	A.Br.Aust94	Чечено-Ингушетия	ГКПМ-Оболенск	1	1	2	1	4
52/33	A.Br.Aust94	Чечено-Ингушетия	ГКПМ-Оболенск	1	1	2	1	4
331/214	A.Br.Aust94	Азербайджан	ГКПМ-Оболенск	1	1	2	1	4
1199	A.Br.Aust94	Дагестан	ГКПМ-Оболенск	1	1	2	1	4
52-G	A.Br.Aust94	Грузия	GenBank	1	1	2	1	4
Kafkas-78	A.Br.Aust94	Турция	GenBank	1	1	2	1	4
Kafkas-86	A.Br.Aust94	Турция	GenBank	1	1	2	1	4
Ohio ACB	A.Br.Aust94	США	GenBank	7	1	2	1	14
Va-1802_12-Geo	A.Br.Aust94	Грузия	GenBank	1	1	3	1	20
Va-1897_12-Geo	A.Br.Aust94	Грузия	GenBank	1	1	3	1	20
8903-G	A.Br.Aust94	Грузия	GenBank	1	1	3	1	20
Kafkas-60	A.Br.Aust94	Турция	GenBank	1	1	3	1	20
Kafkas-68	A.Br.Aust94	Турция	GenBank	1	1	3	1	20
11(1940)	A.Br.Vollum	Туркменистан	ГКПМ-Оболенск	4	1	2	1	6
15(1345)	A.Br.Vollum	Таджикистан	ГКПМ-Оболенск	4	1	2	1	6
CDC 684	A.Br.Vollum	США	GenBank	4	1	2	1	6
Vollum	A.Br.Vollum	США	GenBank	4	1	2	1	6
Vollum 1B	A.Br.Vollum	США	GenBank	4	1	2	1	6
SK-102	A.Br.Vollum	США	GenBank	4	1	2	1	6
Canadian bison	A.Br.WNA	Канада	GenBank	2	1	7	1	13
LP53/5YA	B.Br.001/002	Якутия	ГКПМ-Оболенск	2	3	4	1	5
Yamal_2	B.Br.001/002	Ямал	ГКПМ-Оболенск	2	3	4	1	5
I-364	B.Br.001/002	Сибирь	ГКПМ-Оболенск	5	3	4	1	9
HYU01	B.Br.001/002	Корея	GenBank	5	3	4	1	9
157(B-1107)	B.Br.001/002	Эстония	ГКПМ-Оболенск	5	3	4	1	9
BA1035	B.Br.001/002	ЮАР	GenBank	6	3	4	1	10
SVA11	B.Br.001/002	Швеция	GenBank	6	3	4	1	10
17OD930	B.Br.CNEVA	Швейцария	GenBank	2	3	4	1	5
BF1	B.Br.CNEVA	Германия	GenBank	2	3	4	1	5
RA3	B.Br.CNEVA	Франция	GenBank	2	3	4	1	5
Tyrol 4675	B.Br.CNEVA	Австрия	GenBank	2	3	4	1	5
44	B.Br.CNEVA	Н/Д	ГКПМ-Оболенск	2	3	4	1	5
Kruger B	B.Br.Kruger	ЮАР	GenBank	9	3	4	1	15
2002013094	C.Br.001	США	GenBank	8	6	8	1	16
2000031021	C.Br.001	США	GenBank	НД	НД	НД	НД	НД
Partec	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
STI-5	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД

Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9
M-71R	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
228/8	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
55 VNIIVViM	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
STI-3 (401 SU)	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
Ihtiman	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
Lange-1	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
Lange-2	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
Pasteur II	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
STI-1-Rif4	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
M-71S	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
71/12	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
220 (Malachite)	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
34F2 Sterne	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
Ames-delta	A.Br.Ames	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracoid</i> Dakkar	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД
STI PR-3	НД	Лабораторный штамм	ГКПМ-Оболенск	НД	НД	НД	НД	НД

Продолжение таблицы А

Штамм*	capA-ST	capB-ST	capC-ST	capD-ST	capE-ST	acpA-ST	acpB-ST	MVLST _{pXO2-} GT	MVLST _{alo-} ST	MLST-ST	MLVA7- профиль
1	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>B. cereus</i> 03BB102	НП	6	11	НД							
<i>B. cereus</i> G9241	НП	5	78	НД							
<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	4	1	4	8	1	3	1	15	7	935	НД
<i>B. cereus</i> BC-AK	5	3	4	9	2	4	5	16	5	78	НД
I-271	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
14RA5914	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
A16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Stendal	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
A16R	НП	1	1	НД							
BFV	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Tangail-1	1	2	1	1	1	1	1	10	1	1	НД
FDAARGOS 341	НД	1	1	НД							
SPV842 15	НД	1	1	НД							
Sterne	НП	1	1	НД							
53169	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
34(738)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
BA1015	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	НД
V-770 NP1R	НП	1	2	23							
A0135	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
A2075	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	НД
CZC5	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	НД
K3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	НД
A2079	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	НД
H9401	1	1	1	6	1	1	3	11	4	1	НД
8(2099)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
LP51/4YA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
1259	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16
1273	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21
K1285	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Larissa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Turkey32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
644/268	1	1	1	3	1	1	1	6	1	1	10
PAK-1	НД	1	1	НД							
STI-1	НП	1	1	1							
592/10	НП	1	1	1							
1055/38	НП	1	1	10							

Продолжение таблицы А

1	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1030/213	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
1056/51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
47/28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
48/29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
531/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
LP50/3YA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
1173	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
914/213	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
1298	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
546/714	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
219/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6
367/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
68/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
7(992)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
46/27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20
555/288	1	1	1	3	1	1	1	6	1	1	12
1(14) Stavropol	1	1	1	3	1	1	1	6	1	1	14
A1144	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
London 499	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Pollino	1	1	3	1	1	1	1	13	1	1	НД
Pasteur	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
A0248	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Ames Ancestor	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Shikan-NIID	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
A2012	1	1	1	1	1	1	1	1	НД	1	НД
1183	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
A3716	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Kanchipuram	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Kafkas-100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Kafkas-149	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
Kafkas-215	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	НД
822/7	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	3
52/33	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	15
331/214	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	17
1199	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	19
52-G	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	НД
Kafkas-78	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	НД
Kafkas-86	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	НД

Продолжение таблицы А

1	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
STI-1-Rif4	НД	5									
M-71S	НД	6									
71/12	НД	6									
220 (Malachite)	НД	7									
34F2 Sterne	НД	7									
Ames-delta	НД	24									
<i>Bacillus cereus</i> bv. <i>anthracoid</i> Dakkar	НД	25									
STI PR-3	НД	1									
<p>П р и м е ч а н и я</p> <p>1 * Перечислены штаммы <i>B. anthracis</i>, если не указан другой вид.</p> <p>2 ** НД – нет данных.</p> <p>3.*** НП – нет плазмиды.</p>											

Приложение Б

Выявленные у исследуемой выборки штаммов сиквенс-типы и мутации генов *pagA*, *lef*, *суа*, *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *асрА* и *асрВ*, а также изоформы кодируемых перечисленными генами белков

Таблица Б1 – Выявленные сиквенс-типы гена *pagA*

№ сиквенс-типа	Описание мутаций	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
1	2	3	4	5	6
ST1	нет	0	14RA5914, A16, Tangail-1, Stendal, Shikan-NIID, Ames Ancestor, BFV, A0248, A2012, I-271, 34(738), 1199, 1183, 53169, 331/214, 52/33, 822/7, FDAARGOS 341, SPV842_15, A16R, Sterne, Kanchipuram, A3716, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	34	0,343
ST2	195C→T, 1799C→T	2	Tyrol 4675, Larissa, A1144, Canadian bison, BA1015, RA3, K3, Turkey32, Pollino, H9401, London 499, CZC5, 17OD930, BF1, LP51/4YA, LP53/5YA, 1273, 1259, 44, 8(2099), V770-NP-1R, PAK-1, 644/268, 1055/38, STI-1, 592/10, Yamal_2, K1285, A0135, A2075, A2079	31	0,313
ST3	195C→T, 981A→T, 1799C→T	3	1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, 367/17, 531/17, 7(992), 1056/51, 46/27, 1030/213, 1173, 219/6, 47/28, 48/29, 914/213, 1298, 546/714, 555/288	17	0,172
ST4	195C→T, 1693C→T, 1799C→T	3	SK-102, Vollum 1B, Vollum, CDC_684, 15(1345), 11(1940)	6	0,061
ST5	195C→T, 1297A→G, 1799C→T	3	HYU01, I-364, 157(B-1107)	3	0,03
ST6	195C→T	1	BA1035, SVA11	2	0,02
ST7	1803T→C	1	Ohio ACB	1	0,01
ST8	195C→T, 196T→C, 1799C→T	3	2002013094	1	0,01

Продолжение таблицы Б1

1	2	3	4	5	6
ST9	195C→T, 1765C→A	2	Kruger_B	1	0,01
ST10	195C→T, 196T→C, 869T→G, 1799C→T	4	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI, <i>B. cereus</i> G9241	2	0,02
ST11	17T→C, 59G→A, 95A→C, 195C→T, 196T→C, 869T→G, 1799C→T	7	<i>B. cereus</i> 03BB102	1	0,01

Таблица Б2 – Выявленные сиквенс-типы гена *lef*

№ сиквенс-типа	Описание мутаций	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
1	2	3	4	5	6
ST1	нет	0	14RA5914, A16, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian bison, Ames Ancestor, BA1015, SK 102, Ohio ACB, Vollum1B, K3, Turkey32, Pollino, Vollum, A0248, CDC684, A2012, London 499, Kanchipuram, CZC5, 1183, 1273, LP51/4YA, I-271, 34(738), 15(1345), 1199, 1259, 53169, 331/214, 822/7, 8(2099), 11(1940), 53/33, A16R, V770-NP-1R, PAK 1, 644/268, 1055/38, 592/10, STI-1, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	59	0,596
ST2	2126A→G	1	1(14) Stavropol, LP50/3YA, 68/12, 367/17, 531/17, 7(992), 914/213, 1298, 1030/213, 1173, 219/6, 1056/51, 46/27, 546/714, 555/288, 47/28, 48/29	17	0,172
ST3	895G→A, 2126A→G	2	Tyrol4675, BA1035, RA3, HYU01, SVA11, 17OD930, BF1, Kruger_B, LP53/5YA, I-364, 44, 157(B-1107), Yamal 2	13	0,131

Продолжение таблицы Б2

1	2	3	4	5	6
ST4	895G→T	1	Tangail-1, FDAARGOS 341, SPV842 15, Sterne, BFV	5	0,051
ST5	1036C→G	1	H9401	1	0,01
ST6	747A→C, 892C→A, 1628G→A, 2041G→A	4	2002013094	1	0,01
ST7	196G→A, 736G→A, 892C→A, 1046A→C, 1175G→A, 1216A→G, 1218A→G, 1628G→A, 1788G→A, 2041G→A	10	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1	0,01
ST8	892C→A, 1046A→C, 1216A→G, 1218A→G, 1628G→A, 2041G→A	6	<i>B. cereus</i> 03BB102	1	0,01
ST9	892C→A, 895G→T, 1046A→C, 1216A→G, 1218A→G, 1291T→G, 1292T→C, 1294A→G, 1305G→A, 1314T→C, 1316T→C, 1318G→A, 1336A→G, 1341G→T, 1385G→A, 1408T→G, 1628G→A, 1688A→C, 1689G→A, 1695A→G, 1840A→G, 1854C→G, 1897T→C, 1901T→C, 1904T→C, 1916G→T, 2030C→A, 2035C→G, 2041G→A, 2054A→T, 2064A→G, 2079T→C, 2084A→C, 2101C→T, 2104C→T, 2113T→C, 2128T→A, 2180A→C, 2385T→C	39	<i>B. cereus</i> G9241	1	0,01

Таблица Б3 – Выявленные сиквенс-типы гена *суа*

№ сиквенс-типа	Описание мутаций	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
ST1	нет	0	14RA5914, A16, Tangail-1, Stendal, Shikan-NIID, Ames Ancestor, BFV, A0248, A2012, I-271, 34(738), 53169, SPV842 15, Sterne, A16R, FDAARGOS 341, A2079	17	0,172
ST2	600C→T	1	Larissa, A1144, BA1015, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, Turkey32, Pollino, Vollum, CDC 684, London 499, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1183, 1273, 1056/51, 15(1345), 1199, 1259, 46/27, 331/214, 546/714, 555/288, 822/7, 1030/213, 1173, 219/6, 8(2099), 11(1940), 47/28, 48/29, 52/33, 914/213, 1298, V770-NP-1R, PAK-1, 644/268, 1055/38, 592/10, ST11, Kanchipuram, K1285, A3716, A0135, 52-G, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	55	0,556
ST3	600C→T, 2178C→T		Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68	5	0,051
ST4	539A→G, 600C→T, 953T→C	3	Tyrol 4675, BA1035, RA3, HYU01, SVA11, 17OD930, BF1, Kruger_B, 44, 157(B-1107), I-364, LP53/5YA, Yamal 2	13	0,131
ST5	600C→T, 2129A→C	2	K3, CZC5, A2075	3	0,03
ST6	600C→T, 1140C→T	2	H9401	1	0,01
ST7	600C→T, 1329A→T, 1400A→G	3	Canadian bison	1	0,01
ST8	600C→T, 832A→G, 876G→A, 953T→C, 1971C→T, 2367T→A	6	2002013094	1	0,01
ST9	600C→T, 832A→G, 953T→C, 2081T→C, 2367T→A	5	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI, <i>B. cereus</i> G9241	2	0,02
ST10	600C→T, 832A→G, 953T→C, 2081T→C, 2264 G→T, 2367T→A	6	<i>B. cereus</i> 03BB102	1	0,01

Таблица Б4 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *pagA*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непроцессированном белке	Домен белка РА	Кол-во штаммов
17T→C	V→A	6	СП*	1
59G→A	S→N	20	СП	1
95A→C	K→T	32	I	1
195C→T	Синонимичная			64
196T→C	S→P	66	I, 1β2	4
869T→G	I→S	290	II	3
981A→T	Синонимичная			17
1297A→G	I→V	433	II	3
1693C→T	P→S	565	III	6
1765C→A	Q→K	589	III	1
1799C→T	A→V	600	III	61
1803T→C	Синонимичная			1
Примечание – СП* – сигнальная последовательность				

Таблица Б5 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *lef*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непроцессированном белке	Домен белка LF	Кол-во штаммов
1	2	3	4	5
196G→A	E→K	66	I, 1α1	1
736G→A	V→I	246	I, 1α9	1
747A→C	Синонимичная			1
892C→A	L→M	298	II, 2α1	4
895G→A	A→T	299	II, 2α1	13
895G→T	A→S	299	II, 2α1	6
1036C→G	Q→E	346	III, 3α1', R2	1
1046A→C	K→T	349	III, 3α1', R2	3
1175G→A	R→K	392	III, 3α3, R4	1
1216A→G	K→E	406	III, 3α4, R5	3
1218A→G	Синонимичная			3
1291T→G	L→A	431	II	1
1292T→C	Синонимичная			1
1294A→G	I→V	432	II	1
1305G→A	Синонимичная			1
1314T→C	Синонимичная			1
1316T→C	L→P	439	II, 2α4	1
1318G→A	D→N	440	II, 2α4	1
1336A→G	K→E	446	II, 2α4	1
1341G→T	R→S	447	II, 2α4	1
1385G→A	S→N	462	II	1
1408T→G	L→V	470	II, 2β1	1
1628G→A	R→Q	543	II, 2β5	4

Продолжение таблицы Б5

1	2	3	4	5
1688A→C	K→T	563	II, 2β7	1
1689G→A	K→T	564	II, 2β8	1
1695A→G	Синонимичная			1
1788G→A	Синонимичная			1
1840A→G	K→E	614	IV	1
1854C→G	F→L	618	IV, 4β1	1
1897T→C	Y→H	633	IV, 4α2	1
1901T→C	L→S	634	IV, 4α2	1
1904T→C	I→T	635	IV, 4α2	1
1916G→T	W→L	639	IV, 4α2	1
2030C→A	T→K	677	IV, L2	1
2035C→G	Q→E	679	IV, L2	1
2041G→A	E→K	681	IV, L2	4
2054A→T	Q→L	685	IV, L2	1
2064A→G	Синонимичная			1
2079T→C	Синонимичная			1
2084A→C	E→A	695	IV	1
2101C→T	L→F	701	IV, 4β4	1
2104C→T	H→Y	702	IV, 4β4	1
2113T→C	S→P	705	IV, 4β4	1
2126A→G	E→G	709	IV	30
2128T→A	L→I	710	IV	1
2180A→C	D→A	727	IV, 4α4	1
2385T→C	Синонимичная			1

Таблица Б6 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *суа*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непротессированном белке	Домен белка EF	Число штаммов
539A→G	D→G	180	РА-связывающий	13
600C→T	Синонимичная			82
832A→G	K→E	278	РА-связывающий	4
876G→A	Синонимичная			1
953T→C	I→T	318	СА	17
1140C→T	Синонимичная			1
1329A→T	E→D	443	СВ	1
1400A→G	E→G	467	СВ	1
1971C→T	Синонимичная			1
2081T→C	V→A	694	Спиральный	3
2129A→C	H→P	710	Спиральный	3
2178C→T	Синонимичная			5
2264G→T	R→M	755	Спиральный	1
2367T→A	N→K	789	Спиральный	4

Таблица Б7 – Выявленные изоформы белка РА

№ изоформы	Описание аминокислотных замен	Кол-во аминокислотных замен	Перечень штаммов	Кол-во штаммов
1	нет	0	14RA5914, A16, Tangail-1, Stendal, Shikan-NIID, Ames Ancestor, BFV, A0248, A2012, I-271, 34(738), 1199, 1183, 53169, 331/214, 52/33, 822/7, FDAARGOS 341, SPV842_15, A16R, Sterne, Kanchipuram, A3716, BA1035, SVA11, Ohio ACB, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	37
2	600A→V	1	Tyrol 4675, Larissa, A1144, Canadian bison, BA1015, RA3, K3, Turkey32, Pollino, H9401, London 499, CZC5, 17OD930, BF1, LP51/4YA, LP53/5YA, 1273, 1259, 44, 8(2099), V770-NP-1R, PAK-1, 644/268, 1055/38, STI-1, 592/10, Yamal-2, K1285, A0135, A2075, A2079, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, 367/17, 531/17, 7(992), 1056/51, 46/27, 1030/213, 1173, 219/6, 47/28, 48/29, 914/213, 1298, 546/714, 555/288	48
3	565P→S, 600A→V	2	SK-102, Vollum 1B, Vollum, CDC_684, 15(1345), 11(1940)	6
4	433I→V, 600A→V	2	HYU01, I-364, 157(B-1107)	3
5	66S→P, 600A→V	2	2002013094	1
6	589Q→K	1	Kruger_B	1
7	66S→P, 290I→S, 600A→V	3	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI, <i>B. cereus</i> G9241	2
8	6V→A, 20S→N, 32K→T, 66S→P, 290I→S, 600A→V	6	<i>B. cereus</i> 03BB102	1

Таблица Б8 – Выявленные изоформы белка LF

№ изоформы	Описание аминокислотных замен	Кол-во аминокислотных замен	Штаммы	Кол-во штаммов
1	2	3	4	5
1	нет	0	14RA5914, A16, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian bison, Ames Ancestor, BA1015, SK 102, Ohio ACB, Vollum1B, K3, Turkey32, Pollino, Vollum, A0248, CDC684, A2012, London 499, Kanchipuram, CZC5, 1183, 1273, LP51/4YA, I-271, 34(738), 15(1345), 1199, 1259, 53169, 331/214, 822/7, 8(2099), 11(1940), 52/33, A16R, V770-NP-1R, PAK 1, 644/268, 1055/38, 592/10, STI-1, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	59
2	709E→G	1	1(14) Stavropol, LP50/3YA, 68/12, 367/17, 531/17, 7(992), 914/213, 1298, 1030/213, 1173, 219/6, 1056/51, 46/27, 546/714, 555/288, 47/28, 48/29	17
3	299A→T, 709E→G	2	Tyrol4675, BA1035, RA3, HYU01, SVA11, 17OD930, BF1, Kruger_B, LP53/5YA, I-364, 44, 157(B-1107), Yamal 2	13
4	299A→S	1	Tangail-1, FDAARGOS 341, SPV842 15, Sterne, BFV	5
5	346Q→E	1	H9401	1
6	298L→M, 543R→Q, 681E→K	3	2002013094	1
7	66E→K, 246V→I, 298L→M, 349K→T, 392R→K, 406K→E, 543R→Q, 681E→K	8	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1
8	298L→M, 349K→T, 406K→E, 543R→Q, 681E→K	5	<i>B. cereus</i> 03BB102	1

Продолжение таблицы Б8

1	2	3	4	5
9	298L→M, 299A→S, 349K→T, 406K→E, 431L→A, 432I→V, 439L→P, 440D→N, 446K→E, 447R→S, 462S→N, 470L→V, 543R→Q, 563K→T, 614K→E, 618F→L, 633Y→H, 634L→S, 635I→T, 639W→L, 677T→K, 679Q→E, 681E→K, 685Q→L, 695E→A, 701L→F, 702H→Y, 705S→F, 710L→I, 727D→A	30	<i>B. cereus</i> G9241	1

Таблица Б9 – Выявленные изоформы белка EF

№ изоформы	Описание аминокислотных замен	Кол-во аминокислотных замен	Штаммы	Кол-во штаммов
1	2	3	4	5
1	нет	0	14RA5914, A16, Tangail-1, Stendal, Shikan-NIID, Ames Ancestor, BFV, A0248, A2012, I-271, 34(738), 52/33, SPV842 15, Sterne, A16R, FDAARGOS 341, A2079, Larissa, A1144, BA1015, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, Turkey32, Pollino, Vollum, CDC 684, London 499, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, 1056/51, 15(1345), 1259, 1273, 46/27, 331/214, 546/714, 555/288, 822/7, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 47/28, 48/29, 1173, 914/213, 1298, V770-NP-1R, PAK-1, 644/268, 1055/38, 592/10, STII, Kanchipuram, K1285, A3716, A0135, H9401, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	78

Продолжение таблицы Б9

1	2	3	4	5
2	180D→N, 318I→T	2	Tyrol 4675, BA1035, RA3, HYU01, SVA11, 17OD930, BF1, Kruger_B, 44, 157(B-1107), I-364, LP53/5YA, Yamal 2	13
3	710H→P	1	K3, CZC5, A2075	3
4	443E→D, 467E→G	2	Canadian bison	1
5	278K→E, 318I→T, 789N→K	3	2002013094	1
6	278K→E, 318I→T, 694V→A, 789N→K	4	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI, <i>B. cereus</i> G9241	2
7	278K→E, 318I→T, 694V→A, 755R→M, 789N→K	5	<i>B. cereus</i> 03BB102	1

Таблица Б10 – Выявленные сиквенс-типы гена *capB*

№ сиквенс-типа	Описание мутации	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
1	2	3	4	5	6
ST1	нет	0	Ames Ancestor, A2012, Shikan-NIID, CZC5, CDC 684, A0248, A16, H9401, SVA11, Vollum, BFV, HYU01, Turkey32, Vollum 1B, BF1, K3, Ohio ACB, SK-102, Pasteur, BA1015, RA3, BA1035, Canadian_bison, Pollino, A1144, Stendal, Larissa, 14RA5914, Tyrol 4675, 17OD930, London_499, Kanchipuram, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 1(14)Stavropol, LP50/3ya, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 1273, 46/27, 52/33, 331/214, 546/714, 555/288, 822/7, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 1173, 914/213, 1298, 644/268, LP53/5YA, I-364, 157(B-1107), Yamal_2, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215, 2000031021, 2002013094, <i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	88	0,978
ST2	230T→C	1	Tangail-1	1	0,011

Продолжение таблицы Б10

1	2	3	4	5	6
ST3	23G→A, 34C→A, 1218A→G, 1388T→C	4	<i>B. cereus</i> BC-AK	1	0,011

Таблица Б11 – Выявленные сиквенс-типы гена *capC*

№ сиквенс-типа	Описание мутации	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
ST1	нет	0	Ames Ancestor, BF1, 17OD930, CZC5, London_499, 14RA5914, Tyrol 4675, A16, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1035, BA1015, RA3, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, K3, Turkey32, Vollum, BFV, HYU01, SVA11, H9401, Kanchipuram, A0248, CDC 684, A2012, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, LP53/5YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1183, 1273, I-364, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 46/27, 53169, 546/714, 555/288, 1030/213, 1173, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 914/213, 157(B-1107), 1298, 644/268, Yamal-2, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	78	0,867
ST2	351A→G	1	52/33, 822/7, 331/214, 1199, 52-G, Kafkas-78, Kafkas-86	7	0,078
ST3	147T→C	1	Pollino	1	0,011
ST4	239C→T	1	2002013094, 2000031021, <i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI, <i>B. cereus</i> BC-AK	4	0,044

Таблица Б12 – Выявленные сиквенс-типы гена *capA*

№ сиквенс-типа	Описание мутации	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
ST1	нет	0	Ames Ancestor, BF1, 17OD930, CZC5, London_499, 14RA5914, Tyrol 4675, A16, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, RA3, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, K3, Turkey32, Pollino, Vollum, BFV, H9401, Kanchipuram, A0248, CDC 684, A2012, Pasteur, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 1273, 46/27, 52/33, 331/214, 546/714, 555/288, 822/7, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 1173, 914/213, 1298, 644/268, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	79	0,878
ST2	1033A→G	1	LP53/5YA, I-364, 157(B-1107), Yamal_2, BA1035, HYU01, SVA11	7	0,078
ST3	556G→T,	1	2002013094, 2000031021	2	0,022
ST4	903C→T	1	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1	0,011
ST5	618A→T	1	<i>B. cereus</i> BC-AK	1	0,011

Таблица Б13 – Выявленные сиквенс-типы гена *capD*

№ сиквенс-типа	Описание мутации	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
ST1	нет	0	Ames Ancestor, CZC5, London_499, 14RA5914, A16, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, K3, Turkey32, Vollum, BFV, HYU01, Kanchipuram, A0248, CDC 684, A2012, Pasteur, Pollino, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, LP53/5YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-364, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 1273, 46/27, 52/33, 331/214, 546/714, 822/7, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 1173, 914/213, 1298, Yamal_2, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	75	0,833
ST2	234T→C	1	BF1, 17OD930, Tyrol 4675, RA3	4	0,044
ST3	12C→G	1	1(14)Stavropol, 555/288, 644/268	3	0,033
ST4	1320T→C	1	BA1035, SVA11	2	0,022
ST5	208C→T, 667A→G, 1135T→A	3	2002013094, 2000031021	2	0,022
ST6	796G→A	1	H9401	1	0,011
ST7	1120T→G, 1183A→G	2	157(B-1107)	1	0,011
ST8	208C→T, 667A→G, 1135T→A, 1496G→A	4	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1	0,011
ST9	9T→G, 30C→T, 208C→T, 453A→G, 667A→G, 1135T→A, 1422C→T, 1496G→A	8	<i>B. cereus</i> BC-AK	1	0,011

Таблица Б14 – Выявленные сиквенс-типы гена *acrA*

№ сиквенс-типа	Описание мутации	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
ST1	нет	0	Ames Ancestor, CZC5, London_499, 14RA5914, A16, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, K3, Turkey32, Vollum, Pollino, BFV, H9401, Kanchipuram, A0248, CDC 684, A2012, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1273, 46/27, 52/33, 546/714, 555/288, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 47/28, 48/29, 914/213, 1298, 1173, 822/7, 331/214, 1259, 644/268, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	74	0,822
ST2	853G→A, INS 1337-ATATAGATA-1345	2	SVA11, HYU01, BA1035, RA3, Tyrol 4675, 17OD930, BF1, 44, 157(B-1107), LP53/5YA, I-364, Yamal_2, 2000031021, 2002013094	14	0,156
ST3	853G→A, 1060T→C, 1197G→A	3	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1	0,011
ST4	849G→A, 852G→A, 853G→A, 1060T→C, 1111G→A, 1197G→A, 1209T→A	7	<i>B. cereus</i> BC-AK	1	0,011

Таблица Б15 – Выявленные сиквенс-типы гена *acrB*

№ сиквенс-типа	Описание мутации	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
ST1	нет	0	Ames Ancestor, BF1, 17OD930, CZC5, London_499, 14RA5914, A16, Tyrol 4675, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, BA1035, RA3, Ohio ACB, K3, Turkey32, Pollino, BFV, HYU01, SVA11, Kanchipuram, A0248, A2012, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 1273, 46/27, 52/33, 331/214, 546/714, 555/288, 822/7, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 1173, 914/213, 1298, 644/268, LP53/5YA, I-364, 157(B-1107), Yamal_2, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215, 2000031021, 2002013094, <i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	84	0,933
ST2	1381A→G,	1	Vollum, Vollum 1B, CDC 684	3	0,033
ST3	495A→G	1	H9401	1	0,011
ST4	563C→T, 1381A→G	2	SK-102	1	0,011
ST5	558A→G, 567A→G, 650A→G, 704G→A, 705A→G, 712G→A, 717G→A, 725G→A, 861G→A, 1011G→A, 1158G→A, 1296T→G	12	<i>B. cereus</i> BC-AK	1	0,011

Таблица Б16 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *capB*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непроцессированном белке	Кол-во штаммов
23G→A	R→K	8	1
34C→A	H→N	12	1
230T→C	V→A	77	1
1218A→G	Синонимичная		1
1388T→C	V→A	463	1

Таблица Б17 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *capC*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непроцессированном белке	Кол-во штаммов
147T→C	Синонимичная		1
239C→T	T→M	80	4
351A→G	Синонимичная		7

Таблица Б18 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *capA*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непроцессированном белке	Кол-во штаммов
556G→T	V→L	186	2
618A→T	Синонимичная	нет	1
903C→T	Синонимичная	нет	1
1033A→G	T→A	345	7

Таблица Б19 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *capD*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непроцессированном белке	Кол-во штаммов
9T→G	Синонимичная		1
12C→G	I→M	4	3
30C→T	Синонимичная		1
208C→T	H→Y	70	4
234T→C	Синонимичная		4
453A→G	Синонимичная		1
667A→G	K→E	223	4
796G→A	V→I	266	1
1120T→G	F→V	374	1
1135T→A	F→I	379	4
1183A→G	T→A	395	1
1320T→C	Синонимичная		2
1422C→T	Синонимичная		1
1496G→A	G→D	499	2

Таблица Б20 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *acpA*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непротессированном белке	Кол-во штаммов
849G→A	Синонимичная		1
852G→A	Синонимичная		1
853G→A	E→K	285	16
1060T→C	Y→H	354	2
1111G→A	D→N	371	1
1197G→A	Синонимичная		2
1209T→A	Синонимичная		1
INS 1337-ATA-TAGATA-1345	INS NID	445-NID-449	14

Таблица Б21 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *acpB*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непротессированном белке	Кол-во штаммов
495 A→G	Синонимичная		1
558A→G	Синонимичная		1
563C→T	S→L	188	1
567A→G	Синонимичная		1
650A→G	N→S	217	1
704G→A	R→K	235	1
705A→G			
712G→A	E→K	238	1
717G→A	Синонимичная		1
725G→A	R→H	242	1
861G→A	Синонимичная		1
1011G→A	Синонимичная		1
1158G→A	Синонимичная		1
1296T→G	F→L	432	1
1381A→G	I→V	461	4

Таблица Б22 – Выявленные изоформы белка СаpB

№ изо-формы	Описание аминокислотных замен	Кол-во аминокислотных замен	Штаммы	Кол-во штаммов
1	нет	0	Ames Ancestor, A2012, Shikan-NIID, CZC5, CDC 684, A0248, A16, H9401, SVA11 , Vollum, BFV, HYU01, Turkey32, Vollum 1B , BF1, K3, Ohio ACB, SK-102, Pasteur, BA1015, RA3, BA1035, Canadian_bison, Pollino, A1144, Stendal, Larissa, 14RA5914, Tyrol 4675, 17OD930, London_499, Kanchipuram, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 1273, 46/27, 52/33, 331/214, 546/714, 555/288, 822/7, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 1173, 914/213, 1298, 644/268, LP53/5YA, I-364, 157(B-1107), Yamal_2, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215, 2000031021 , 2002013094, <i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	88
2	77V→A	1	Tangail-1	1
3	8R→K, 12H→N, 463V→A	3	<i>B. cereus</i> BC-AK	1

Таблица Б23 – Выявленные изоформы белка СаpC

№ изо-формы	Описание аминокислотных замен	Кол-во аминокислотных замен	Штаммы	Кол-во штаммов
1	нет	0	Ames Ancestor, BF1, 17OD930, CZC5, London_499, 14RA5914, Tyrol 4675, A16, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1035, BA1015, RA3, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, K3, Turkey32, Vollum, BFV, HYU01, SVA11 , H9401, Kanchipuram, A0248, CDC 684, A2012, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, LP53/5YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-364, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1273, 46/27, 52/33, 546/714, 555/288, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 914/213, 157(B-1107), 1298, 644/268, Yamal_2, Pollino, 1173, 822/7, 331/214, 1259, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	86
2	80T→M	1	2002013094, 2000031021, <i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI, <i>B. cereus</i> BC-AK	4

Таблица Б24 – Выявленные изоформы белка CapA

№ изо-формы	Описание аминокислотных замен	Кол-во аминокислотных замен	Штаммы	Кол-во штаммов
1	нет	0	Ames Ancestor, BF1, 17OD930, CZC5, London_499, 14RA5914, Tyrol 4675, A16, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, RA3, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, K3, Turkey32, Pollino, Vollum, BFV, H9401, Kanchipuram, A0248, CDC 684, A2012, Pasteur, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 1273, 46/27, 52/33, 331/214, 546/714, 555/288, 822/7, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 1173, 914/213, 1298, 644/268, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215, <i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI, <i>B. cereus</i> BC-AK	81
2	345T→A	1	LP53/5YA, I-364, 157(B-1107), Yamal_2, BA1035, HYU01, SVA11	7
3	186V→L	1	2002013094, 2000031021	2

Таблица Б25 – Выявленные изоформы белка CapD

№ изо-формы	Описание аминокислотных замен	Кол-во аминокислотных замен	Штаммы	Кол-во штаммов
1	2	3	4	5
1	нет	0	Ames Ancestor, CZC5, London_499, 14RA5914, A16, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, K3, Turkey32, Vollum, BFV, HYU01, Kanchipuram, A0248, CDC 684, A2012, Pasteur, Pollino, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, LP53/5YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-364, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 1273, 46/27, 52/33, 331/214, 546/714, 822/7, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 1173, 914/213, 1298, Yamal_2, BF1, 17OD930, Tyrol 4675, RA3, BA1035, SVA11, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	81
2	4I→M	1	1(14) Stavropol, 555/288, 644/268	3

Продолжение таблицы Б25

1	2	3	4	5
3	70H→Y, 223K→E, 379F→I	3	2002013094, 2000031021	2
4	266V→I	1	H9401	1
5	374F→V, 395T→A	2	157(B-1107)	1
6	70H→Y, 223K→E, 379F→I, 499G→D	4	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI, <i>B. cereus</i> BC-AK,	2

Таблица Б26 – Выявленные изоформы белка АсрА

№ изо- формы	Описание аминокис- лотных замен	Кол-во аминокис- лотных замен	Штаммы	Кол-во штаммов
1	нет	0	Ames Ancestor, CZC5, London_499, 14RA5914, A16, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, SK-102, Ohio ACB, Vollum 1B, K3, Turkey32, Vollum, Pollino, BFV, H9401, Kanchipuram, A0248, CDC 684, A2012, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1273, 46/27, 52/33, 546/714, 555/288, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 47/28, 48/29, 914/213, 1298, 1173, 822/7, 331/214, 1259, 644/268, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	74
2	285E→K, INS 445NID	2	SVA11, HYU01, BA1035, RA3, Tyrol 4675, 17OD930, BF1, 44, 157(B-1107), LP53/5YA, I-364, Yamal-2, 2000031021, 2002013094	14
3	285E→K, 354Y→H	2	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1
4	285E→K, 354Y→H, 371D→N	3	<i>B. cereus</i> BC-AK	1

Таблица Б27 – Выявленные изоформы белка АсрВ

№ изо-формы	Описание аминокислотных замен	Кол-во аминокислотных замен	Штаммы	Кол-во штаммов
1	нет	0	Ames Ancestor, BF1, 17OD930, CZC5, London_499, 14RA5914, A16, Tyrol 4675, Tangail-1, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, BA1035, RA3, Ohio ACB, K3, Turkey32, Pollino, BFV, HYU01, SVA11, H9401, Kanchipuram, A0248, A2012, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, 1(14)Stavropol, LP50/3YA, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1259, 1273, 46/27, 52/33, 331/214, 546/714, 555/288, 822/7, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 44, 47/28, 48/29, 1173, 914/213, 1298, 644/268, LP53/5YA, I-364, 157(B-1107), Yamal_2, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215, 2000031021, 2002013094, <i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	85
2	461I→V	1	Vollum, Vollum 1B, CDC 684	3
3	188S→L, 461I→V	2	SK-102	1
4	217N→S, 235R→K, 238E→K, 242R→H, 432F→L	5	<i>B. cereus</i> BC-AK	1

Таблица Б28 – Выявленные сиквенс-типы гена *alo*

№ сиквенс-типа	Описание мутации	Кол-во мутаций	Перечень штаммов	Кол-во штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа в выборке
1	2	3	4	5	6
ST1	нет	0	Ames Ancestor, 44, 1173, 1183, 1199, 1259, 1273, 1298, 53169, 1(14) Stavropol, 1030/213, 1055/38, 1056/51, 11(1940), 15(1345), 157(B-1107), 219/6, 331/214, 34(738), 367/17, 46/27, 47/28, 48/29, 52/33, 531/17, 546/714, 555/288, 592/10, 644/268, 68/12, 7(992), 8(2099), 822/7, 914/213, I-271, I-364, LP50/3YA, LP51/4YA, LP53/5YA, STI-1, Yamal 2, 14RA5914, A16, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian bison, BA1015, SK-102, Ohio ACB, Turkey32, Pollino, A0248, London 499, Tangail-1, Tyrol 4675, BA1035, RA3, HYU01, SVA11, BFV, FDAARGOS 341, SPV842 15, A16R, Sterne, V770-NP-1R, PAK-1, BF1, 17OD930, Kanchipuram, K1285, A3716, A0135, Kruger_B, 2000031021, 2002013094, Pasteur, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	89	0,881
ST2	1247T→G	1	A2075, A2079, K3, CZC5	4	0,04
ST3	1265C→T	1	Vollum 1B, Vollum, CDC 684	3	0,03
ST4	1502G→A	1	H9401	1	0,01

Продолжение таблицы Б28

1	2	3	4	5	6
ST5	17T→A, 27C→T, 30T→C, 33A→G, 35G→A, 49G→A, 72T→C, 75C→G, 102A→T, 112G→A, 113C→T, 118A→C, 125C→A, 128G→A, 130 G→A, 131C→T, 134T→A, 135A→T, 148G→A, 149A→G, 153T→C, 154A→G, 174A→T, 176A→C, 177G→A, 181G→A, 185G→A, 187A→C, 188 G→A, 192T→G, 193A→G, 201A→T, 229A→G, 236A→G, 240G→A, 255C→T, 279C→T, 282G→A, 317T→C, 335T→C, 342T→C, 378A→T, 408A→G, 441C→T, 501G→A, 550A→G, 639T→G, 660A→G, 663T→C, 669C→T, 693A→G, 696G→A, 720A→G, 729T→C, 735T→C, 756T→C, 799T→C, 825G→A, 837T→C, 888A→C, 918A→T, 928C→T, 996T→G, 1002A→C, 1023A→G, 1068T→C, 1071T→C, 1095C→T, 1134G→T, 1155T→A, 1227C→T, 1278T→C, 1347A→G, 1350C→T, 1404T→A, 1446T→A, 1449C→T, 1470A→G	78	<i>B. cereus</i> G9241, <i>B. cereus</i> BC-AK	2	0,02
ST6	27C→T, 29C→T, 128G→A, 129T→C, 229A→G, 273G→A, 309C→T, 317T→C, 335T→C, 336G→A, 342T→C, 345G→A, 378A→T, 480A→G, 516T→C, 549C→T, 567T→G, 615C→T, 636T→C, 645T→C, 678A→G, 708G→A, 729T→C, 744T→G, 756T→C, 765T→C, 771C→T, 1067A→C, 1071T→C, 1096T→C, 1104T→C, 1134G→T, 1173T→C, 1227C→T, 1245C→T, 1278T→C, 1335C→A, 1347A→C, 1350C→T, 1365T→A, 1401C→T, 1404T→A, 1434A→G	43	<i>B. cereus</i> 03BB102	1	0,01

Продолжение таблицы Б28

1	2	3	4	5	6
ST7	15T→C, 27C→T, 29C→A, 30T→C, 33A→G, 49G→A, 55T→G, 72T→C, 75C→T, 76A→C, 79C→A, 87G→A, 99T→C, 118A→C, 128G→A, 130 G→A, 131C→T, 134T→C, 135A→T, 148G→A, 149A→G, 150T→C, 154A→G, 167C→G, 174A→T, 176A→C, 177G→A, 181G→A, 185G→A, 187A→C, 188 G→A, 192T→G, 193A→G, 201A→T, 229A→G, 240G→A, 255C→T, 279 C→T, 317T→C, 335T→C, 378A→T, 408A→G, 450C→T, 501G→A, 516T→C, 550A→G, 551C→A, 708G→A, 729T→C, 744T→G, 756T→C, 765T→C, 771C→T, 787A→T, 1095C→T, 1251T→G, 1278T→C, 1368C→T, 1446T→A, 1449C→T	60	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1	0,01

Таблица Б29 – Результаты трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные *in silico* для гена *alo*

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непроцессированном белке	Число штаммов
1	2	3	4
15Т→С	Синонимичная		1
17Т→А	І→N	6	2
27С→Т	Синонимичная		4
29С→А	Т→N	10	2
30Т→С	Синонимичная		3
33А→G	Синонимичная		3
35G→А	R→K	12	2
49G→А	А→Т	17	3
55Т→G	L→V	19	1
72Т→С	Синонимичная		3
75С→Т	Синонимичная		3
76А→С	І→L	26	1
79С→А	H→N	27	1
87G→А	Синонимичная		1
99Т→С	Синонимичная		1
102А→Т	Синонимичная		2
112G→А	А→І	38	2
113С→Т			
118А→С	N→H	40	3
125С→А	Т→N	42	2
128G→А	G→D	43	4
129Т→С	Синонимичная		1
130 G→А	А→І	44	3
131С→Т			
134Т→А	І→N	45	3
135А→Т			
148G→А	D→S	50	3
149А→G			
153Т→С	Синонимичная		2
154А→G	N→D	52	3
167С→G	А→G	56	1
174А→Т	Синонимичная		3
176А→С	K→T	59	3
177G→А			
181G→А	D→N	61	3
185G→А	S→N	62	3
187А→С, 188G→А	R→Q	63	3
192Т→G	D→E	64	3
193А→G	І→V	65	3
201А→Т	Синонимичная		3
229А→G	І→V	77	4
236А→G	K→R	79	2
240G→А	Синонимичная		3
255С→Т	Синонимичная		3

Продолжение таблицы Б29

1	2	3	4
273G→A	Синонимичная		1
279C→T	Синонимичная		3
282G→A	Синонимичная		2
309C→T	Синонимичная		1
317T→C	L→S	106	4
335T→C	V→A	112	4
342T→C	Синонимичная		3
345G→A	Синонимичная		1
378A→T	Синонимичная		4
408A→G	Синонимичная		4
441C→T	Синонимичная		2
450C→T	Синонимичная		1
480A→G	Синонимичная		1
501G→A	Синонимичная		3
516T→C	Синонимичная		2
550A→G	T→A	184	3
551C→A	T→E	184	1
567T→G	Синонимичная		1
615C→T	Синонимичная		1
636T→C	Синонимичная		1
639T→G	Синонимичная		2
645T→C	Синонимичная		1
660A→G	Синонимичная		2
663T→C	Синонимичная		2
669C→T	Синонимичная		2
678A→G	Синонимичная		1
693A→G	Синонимичная		2
696G→A	Синонимичная		2
708G→A	Синонимичная		2
720A→G	Синонимичная		2
729T→C	Синонимичная		4
735T→C	Синонимичная		2
744T→G	Синонимичная		2
756T→C	Синонимичная		4
765T→C	Синонимичная		2
771C→T	Синонимичная		2
787A→T	T→S	263	1
799T→C	Синонимичная		2
825G→A	Синонимичная		2
837T→C	Синонимичная		2
888A→C	Синонимичная		2
918A→T	Синонимичная		2
928C→T	Синонимичная		2
996T→G	Синонимичная		2
1002A→C	Синонимичная		2
1023A→G	Синонимичная		2
1067A→C	N→T	356	1
1068T→C	Синонимичная		2

Продолжение таблицы Б29

1	2	3	4
1071Т→С	Синонимичная		3
1095С→Т	Синонимичная		3
1096Т→С	F→L	366	1
1104Т→С	Синонимичная		1
1134G→Т	Синонимичная		3
1155Т→А	Синонимичная		2
1173Т→С	Синонимичная		1
1227С→Т	Синонимичная		3
1245С→Т	Синонимичная		1
1247Т→G	V→G	416	4
1251Т→G	Синонимичная		1
1265С→Т	S→F	422	3
1278Т→С	Синонимичная		4
1335С→А	Синонимичная		1
1347А→G	Синонимичная		3
1350С→Т	Синонимичная		3
1365Т→А	Синонимичная		1
1368С→Т	Синонимичная		1
1401С→Т	Синонимичная		1
1404Т→А	Синонимичная		3
1434А→G	Синонимичная		1
1446Т→А	Синонимичная		3
1449С→Т	Синонимичная		3
1470А→G	Синонимичная		2
1502G→А	G→E	501	1

Таблица Б30 – Выявленные изоформы белка Аю

№ изо- формы	Описание аминокислотных замен	Кол-во амино- кислотных замен	Перечень штаммов	Кол-во штаммов
1	2	3	4	5
1	нет	0	Ames Ancestor, 44, 1173, 1183, 1199, 1259, 1273, 1298, 53169, 1(14) Stavropol, 1030/213, 1055/38, 1056/51, 11(1940), 15(1345), 157(B-1107), 219/6, 331/214, 34(738), 367/17, 46/27, 47/28, 48/29, 52/33, 531/17, 546/714, 555/288, 592/10, 644/268, 68/12, 7(992), 8(2099), 822/7, 914/213, I-271, I-364, LP50/3YA, LP51/4YA, LP53/5YA, STI-1, Yamal 2, 14RA5914, A16, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian bison, BA1015, SK-102, Ohio ACB, Turkey32, Pollino, A0248, London 499, Tangail-1, Tyrol 4675, BA1035, RA3, HYU01, SVA11, BFV, FDAARGOS 341, SPV842 15, A16R, Sterne, V770-NP-1R, PAK-1, BF1, 17OD930, Kanchipuram, K1285, A3716, A0135, Kruger_B, 2000031021, 2002013094, Pasteur, 52-G, Ba-1802_12-Geo, Ba-1897_12-Geo, 8903-G, Kafkas-60, Kafkas-68, Kafkas-78, Kafkas-86, Kafkas-100, Kafkas-149, Kafkas-215	89
2	416V→G	1	A2075, A2079, K3, CZC5	4
3	422S→F	1	Vollum 1B, Vollum, CDC 684	3
4	501G→E	1	H9401	1
5	6I→N, 12R→K, 17A→T, 38A→I, 40N→H, 42T→N, 43G→D, 44A→I, 45I→N, 50D→S, 52N→D, 59K→T, 61D→N, 62S→N, 63R→Q, 64D→E, 65I→V, 77I→V, 79K→R, 106L→S, 112V→A, 184T→A	22	<i>B. cereus</i> G9241, <i>B. cereus</i> BC-AK	2
6	10T→N, 43G→D, 77I→V, 106L→S, 112V→A, 356N→T, 366F→L	7	<i>B. cereus</i> 03BB102	1

Продолжение таблицы Б30

1	2	3	4	5
7	10T→N, 17A→T, 19L→V, 26I→L, 27H→N, 40N→H, 43G→D, 44A→I, 45I→N, 50D→S, 52N→D, 56A→G, 59K→T, 61D→N, 62S→N, 63R→Q, 64D→E, 65I→V, 77I→V, 184T→A, 263T→S	21	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1

Приложение В

Результаты MLVA-генотипирования штаммов из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы

Таблица В – MLVA-профили штаммов из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы

Штамм*	MLVA-локус																			
	canSNP- группа	virA	bams03	bams05	bams22	bams34	bams44	VNTR23	virC2	bams01	bams21	bams23	bams24	bams25	bams28	bams51	virB1	virB2	MLVA7-GT	MLVA17-GT
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
228/8	HA	10	24	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	1	1
55 VNIIVVIM	HA	10	24	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	1	1
592/10	A.Br.008/011	10	24	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	1	1
Partec	HA	10	24	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	1	1
STI PR-3	HA	10	24	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	1	1
STI-1	A.Br.008/011	10	24	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	1	1
STI-5	HA	10	24	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	1	1
M-71R	HA	10	24	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	1	1
1030/213	A.Br.008/011	11	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	2	2
1056/51	A.Br.008/011	11	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	2	2
47/28	A.Br.008/011	11	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	2	2
48/29	A.Br.008/011	11	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	2	2
Ihtiman	HA	11	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	2	2
LP50/3YA	A.Br.008/011	11	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	2	2
STI-3 (401 SU)	HA	11	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	2	2
531/17	A.Br.008/011	11	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	9	13	15	9	16	7	2	14
1183	A.Br.Aust94	10	30	7	16	10	8	4	17	16	10	11	11	13	15	9	16	7	3	6
52/33	A.Br.Aust94	10	30	7	16	10	8	4	17	16	10	11	11	13	15	9	16	7	3	6
8(2099)	A.Br.008/011	10	30	7	16	10	8	4	21	13	10	11	11	13	14	9	16	7	3	7
LP51/4YA	A.Br.008/011	10	30	7	16	10	8	4	21	13	10	11	11	13	14	9	16	7	3	7
822/7	A.Br.Aust94	10	30	7	16	10	8	4	21	13	10	11	11	13	15	9	16	7	3	10
914/213	A.Br.008/011	10	30	7	16	10	8	4	21	13	10	11	11	13	15	9	16	7	3	10
Lange-1	HA	10	30	6	16	10	8	4	21	13	10	11	11	13	14	9	16	7	4	3
Lange-2	HA	10	30	6	16	10	8	4	21	13	10	11	11	13	14	9	16	7	4	3
15(1345)	A.Br.Vollum	10	30	6	16	10	8	4	21	13	10	11	11	13	15	9	16	7	4	11
Pasteur II	HA	10	30	6	16	10	8	4	21	13	10	11	11	13	15	9	16	7	4	11

Продолжение таблицы В

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
11(1940)	A.Br.Vollum	10	30	6	16	10	8	4	21	13	10	11	11	13	15	9	НЛ	7	4	15
1199	A.Br.Aust94	10	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	5	12
1298	A.Br.008/011	10	30	7	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	5	12
546/714	A.Br.008/011	10	30	7	14	10	8	4	21	13	9	9	9	13	15	9	16	7	5	16
STI-1-Rif4	HA	10	30	7	14	10	8	4	17	13	10	9	11	13	15	9	16	7	5	17
71/12	HA	10	30	6	14	10	8	4	17	13	10	9	10	13	15	9	16	7	6	5
M-71S	HA	10	30	6	14	10	8	4	17	13	10	9	10	13	15	9	16	7	6	5
219/6	A.Br.008/011	10	30	6	14	10	8	4	17	13	10	9	11	13	15	9	16	7	6	18
220 (Malachite)	HA	10	28	7	16	12	8	3	17	16	10	11	11	13	15	9	16	7	7	13
34F2 Sterne	HA	10	28	7	16	12	8	3	17	16	10	11	11	13	15	9	16	7	7	13
367/17	A.Br.008/011	11	30	7	14	10	8	3	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	8	19
68/12	A.Br.008/011	11	30	7	14	10	8	3	21	13	10	9	11	13	15	9	16	6	8	20
34(738)	A.Br.001/002	10	28	7	16	12	8	4	17	16	10	11	11	13	10	9	16	7	9	21
I-271	A.Br.001/002	10	28	7	16	12	8	4	17	16	10	11	11	13	6	9	16	7	9	22
1055/38	A.Br.008/011	10	26	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	10	8
644/268	A.Br.008/011	10	26	7	16	10	8	4	21	13	10	12	11	13	15	9	16	7	10	8
LP53/5YA	B.Br.001/002	9	27	7	15	НЛ**	8	3	17	14	10	10	11	13	12	6	19	7	11	4
Yamal_2	B.Br.001/002	9	27	7	15	НЛ	8	3	17	14	10	10	11	13	12	6	19	7	11	4
555/288	A.Br.008/011	10	30	7	11	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	12	9
7(992)	A.Br.008/011	10	30	7	11	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	12	9
157(B-1107)	B.Br.001/002	9	27	7	15	10	8	3	21	14	10	10	11	12	14	6	19	9	13	23
1(14) Stavropol	A.Br.008/011	11	30	6	16	12	6	4	21	11	10	11	11	13	14	9	16	8	14	24
1173	A.Br.008/011	11	30	6	11	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	15	25
1273	A.Br.008/011	10	30	7	16	10	8	5	21	13	10	11	11	13	14	9	16	7	16	26
331/214	A.Br.Aust94	10	30	7	14	10	3	4	17	16	10	11	11	13	15	9	16	7	17	27
I-364	B.Br.001/002	9	27	7	15	7	8	3	17	14	10	10	11	12	15	6	19	9	18	28
1259	A.Br.008/011	10	30	7	16	12	8	4	21	13	10	11	11	13	15	9	16	7	19	29
46/27	A.Br.008/011	11	30	5	14	10	8	4	21	13	10	9	11	13	15	9	16	7	20	30
53169	A.Br.001/002	10	28	7	16	10	8	4	17	16	10	11	11	13	15	9	16	7	21	31
44	B.Br.CNEVA	9	27	6	15	14	8	3	17	14	10	10	11	12	15	6	15	5	22	32
V-770 NP1R	A.Br.003/004	10	30	7	16	10	6	4	17	12	10	11	11	13	15	9	16	7	23	33
Ames-delta	A.Br.Ames	10	26	5	16	12	8	4	17	16	10	11	11	13	15	9	16	6	24	34
<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracoid</i> Dakkar	HA	9	35	6	21	7	8	2	13	8	9	12	8	14	15	6	19	НЛ	25	35

Примечания

1 * Перечислены штаммы *B. anthracis*, если не указан другой вид

2 ** НЛ – нет локуса (локус не амплифицируется)