

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

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Летальный фактор является одним из ключевых факторов патогенности сибиреязвенного микроба (*Bacillus anthracis*). В данной работе проанализированы нуклеотидные последовательности гена *lef*, кодирующего летальный фактор у 39 штаммов возбудителя сибирской язвы, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». В результате было выявлено 3 сиквенс-типа, один из которых идентичен последовательности гена *lef* референсного штамма *Ames Ancestor*, а два других содержат одну (2126A→G) и две (895G→A, 2126A→G) однонуклеотидные замены. Выявленные замены несинонимичны и приводят к аминокислотным заменам во II (266A→T) и IV (676 E→G) доменам белка LF соответственно. Они не влияют на функциональную активность летального фактора сибиреязвенного микроба.

Ключевые слова: сибирская язва, *Bacillus anthracis*, аллельный полиморфизм, летальный фактор

Для цитирования: Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Миронова Р.И., Кисличкина А.А., Майская Н.В., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С. Аллельный полиморфизм гена *lef* у штаммов возбудителя сибирской язвы из государственной коллекции патогенных микроорганизмов («ГКПМ-Оболенск»). Бактериология. 2019; 4(2): 7–12. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-7-12

Allelic polymorphism of the *lef* gene in anthrax pathogen strains from the State collection of pathogenic microorganisms («GKPM-Obolensk»)

Yu.O.Goncharova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, R.I.Mironova,
A.A.Kislichkina, N.V.Mayskaya, A.N.Mokrievich, V.S.Timofeev

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

One of the key pathogenicity factors of the anthrax microbe (*Bacillus anthracis*) is the protein called Lethal factor (LF). In this work, we analyzed the allelic polymorphism of the *lef* gene encoding the lethal factor by the example of 39 B. anthracis strains deposited in the State Collection of Pathogenic Microorganisms «SCPM-Obolensk». As a result, 3 sequencetypes were identified, one of which is identical to the reference strain *Ames Ancestor lef* gene sequence, and the other two contain one (2126A → G) and two (895G → A, 2126A → G) point mutations which lead to amino acid substitutions in the II (266A → T) and IV (676 E → G) domains of the LF protein. Due to the high pathogenicity of the strains from the studied set, these substitutions do not seem to affect the functional activity of the B. anthracis lethal factor.

Keywords: anthrax, *Bacillus anthracis*, allelic polymorphism, lethal factor

For citation: Goncharova Yu.O., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Mironova R.I., Kislichkina A.A., Mayskaya N.V., Mokrievich A.N., Timofeev V.S. Allelic polymorphism of the *lef* gene in anthrax pathogen strains from the State collection of pathogenic microorganisms («GKPM-Obolensk»). Bacteriology. 2019; 4(2): 7–12. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-7-12

Сибирская язва – карантинная зоонозная инфекция, возбудителем которой является *Bacillus anthracis*, спорообразующая грамположительная бактерия, относящаяся ко II группе патогенности [1]. Источником инфекции являются

больные животные (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, верблюды, свиньи, олени и др.), их трупы [2, 3] и почвенные очаги, возникающие на месте гибели и/или захоронения погибших от сибирской язвы животных. Споры

Для корреспонденции:

Тимофеев Виталий Сергеевич, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: timofeev_vitalii@mail.ru

Статья поступила 25.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

For correspondence:

Vitaliy S. Timofeev, leading researcher of laboratory of microbiology of anthrax State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: timofeev_vitalii@mail.ru

The article was received 25.03.2019, accepted for publication 27.06.2019

B. anthracis при благоприятных условиях способны сохраняться в почве в жизнеспособном виде в течение сотен лет [4]. При этом ряд факторов может способствовать активизации таких почвенных очагов, ярким примером чего является вспышка сибирской язвы на полуострове Ямал летом 2016 г. [5].

Вирулентность *B. anthracis* обеспечивают две плазмиды – рХО1и рХО2, несущие гены синтеза токсина и поли-γ-глутаминовой капсулы соответственно [6]. Основное патогенное воздействие на организм хозяина осуществляет трехкомпонентный токсин. Его относят к семейству бактериальных бинарных токсинов АВ-типа. Он состоит из рецептор-связывающей В-части (протективный антиген (РА)) и двух эффекторных энзиматических А-частей (летальный фактор (LF) и отечный фактор (EF)). Непосредственно патогенное воздействие на молекулярные мишени клетки хозяина токсин оказывает только в виде комплексов протективного антигена с отечным фактором (РА-EF) и протективного антигена с летальным фактором (РА-LF) [7]. Гены, кодирующие компоненты токсина, локализованы на плазмиде рХО1: *сya* (EF), *lef* (LF), and *pagA* (РА). Контроль их экспрессии осуществляется регуляторными элементами *AtxA* и *PagR*, гены которых (*atxA*, *pagR*) также расположены на данной плазмиде [8, 9].

Функционально летальный фактор представляет собой цинк-металлопротеазу [10, 11], которая отщепляет N-концевой пролин-богатый участок у митоген-зависимых протеинкиназ киназ (МАРКК, или Мек), приводя к ингибированию сигнальных путей в клетке хозяина [12].

В настоящее время активно изучается аллельный полиморфизм факторов патогенности у различных патогенных микроорганизмов, что позволяет не только оценить роль отдельных аминокислотных замен в патогенезе, но и изучить эволюцию этих белков. В частности, такие работы проводятся для возбудителей холеры [13] и чумы [14–16].

Что касается сибиреязвенного микроба, существует ряд работ, изучающих роль различных аминокислот в функциональной активности белка LF [10–12, 17–20]. Но в них исследуются лабораторные мутантные штаммы и рекомбинантные белки, распространенность тех или иных аллелей летального фактора у природных штаммов *B. anthracis* остается неизученной.

В данной работе мы на основе данных полногеномного секвенирования изучили аллельный полиморфизм гена летального фактора на выборке из 38 природных и одного вакцинного штамма сибиреязвенного микроба из нашей коллекции.

Таблица 1. Перечень используемых штаммов

Штамм <i>B. anthracis</i>	Место выделения	Дата выделения	Источник
44	Н/Д	Н/Д	Н/Д
1173	Ставропольский край	19.07.1995	Труп коровы
1183	Кабардино-Балкарская республика	21.07.1998	Почва с места забоя КРС после дезинфекции
1199	Дагестан	30.10.1998	Материал от больного человека
1259	Ставропольский край	27.09.2004	Мясо барана
1273	Волгоградская обл.	19.09.2008	Материал от больного человека
1298	Волгоград	09.08.2010	Сод. везик. больного человека
53169	Н/Д	Н/Д	Н/Д
1(14) Stavropol	Украина	13.11.1957	Шкура козы, завезенная из Эфиопии
1030/213	Карачаево-Черкессия	Н/Д	Н/Д
1055/38	Самарская обл.	15.04.1993	Смыв с одежды в очаге сибирской язвы
1056/51	Ставропольский край	21.07.1993	Труп человека
11(1940)	Туркменистан	24.05.1971	Труп яка
15(1345)	Таджикистан	24.05.1971	Труп коровы
157(B-1107)	Эстония	01.11.1978	Труп коровы
219/6	Узбекистан	29.08.1976	Труп КРС
331/214	Азербайджан	14.09.1979	Почва
34(738)	Казахстан	Май 21972	Труп коровы
367/17	Тульская обл.	14.07.1979	Труп человека
46/27	Чечено-Ингушетия	01.07.1968	Соскоб со стены
47/28	Чечено-Ингушетия	29.07.1968	Н/Д
48/29	Чечено-Ингушетия	13.08.1968	Н/Д
52/33	Чечено-Ингушетия	23.08.1968	Н/Д
531/17	Калмыкия	28.08.1981	Труп человека
546/714	Воронежская обл.	19.06.1982	Материал от больного человека
555/288	Оренбургская обл.	28.07.1982	Материал от больного человека
592/10	Молдавия	20.10.1982	Сточные воды кожевенного завода до очистки
644/268	Украина	Н/Д	Почва скотомогильника
68/12	Азербайджан	12.08.1967	Содержимое карбункула больного человека
7(992)	Новгородская область	01.06.1967	Труп коровы
8(2099)	Татарстан	01.10.1971	Труп коровы
822/7	Чечено-Ингушетия	27.08.1986	Содержимое карбункула больного человека
914/213	Чечено-Ингушетия	05.07.1988	Сушеное мясо
I-271	ЯНАО	Н/Д	Труп оленя
I-364	Бурятия	10.07.2008	Труп овцы
LP50/3YA	Якутия	2016	Глубокие слои почвы
LP51/4YA	Якутия	2017	Глубокие слои почвы
LP53/5YA	Якутия	2018	Глубокие слои почвы
STI-1	Лабораторный штамм	1940	

*Н/Д – нет данных.

Материалы и методы

Штаммы

В работе были исследованы 39 штаммов *B. anthracis* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (табл. 1).

Среды и условия культивирования

Культуры исследуемых штаммов выращивали на твердой среде Luria Agar (Sigma-Aldrich) в течение 8–12 часов при 37°C.

Выделение ДНК и секвенирование

Выделение ДНК осуществляли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Полногеномное секвенирование проводилось на платформе Illumina MiSeq (США).

Сборка геномов и *in silico* анализ

Сборки последовательностей плазмиды pXO1 осуществляли на матрицу референсного генома *B. anthracis* Ames Ancestor (plasmid pXO1, GenBank: AE017336.2) с помощью программного пакета программы DNASTAR Lasergene (США), <https://www.dnastar.com/software/lasergene/>

Множественное выравнивание, трансляция *in silico* и филогенетический анализ проводились с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation, США), и MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>) [21].

Индексы разнообразия Симпсона рассчитывали по следующей формуле:

$$D = 1 - n(n-1)/N(N-1),$$

где N – число исследуемых штаммов в выборке; n – число штаммов, относящихся к J-генотипу (число штаммов в генотипе) [22].

Результаты и обсуждение

В исследованной выборке, состоящей из последовательностей геномов 39 штаммов *B. anthracis* из «ГКПМ-Оболенск» и депонированного в GenBank генома референсного штамма Ames Ancestor (GenBank: AE017336.2), было выявлено три сиквенс-типа гена летального фактора *lef*, включая исходный, аналогичный сиквенс-типу референсного штамма (сиквенс-тип №1), и два измененных. В двух «мутантных» сиквенс-типах была выявлена общая для них однонуклеотидная замена 2126A→G. Отличие сиквенс-типа №2 от исходного ограничивается только ею, а у сиквенс-типа №3 была обнаружена дополнительная замена 895G→A (табл. 2). Учитывая относительно большую длину гена *lef* (2430 п.о.) и достаточный размер исследованной выборки ($n = 40$), обнаружение всего двух мутаций (одна из которых встречается всего у четырех штаммов) говорит об относительно высоком консерватизме последовательности гена *lef*. В численном выражении это подтверждается значением индекса биоразнообразия Симпсона $D = 0,598718$.

Факторы патогенности других микроорганизмов проявляют более выраженный аллельный полиморфизм. Так, Анисимов А.П. и соавт. [14] при анализе 19 последовательностей гена V-антигена (*LcrV*) *Yersinia pestis* длиной 981 п.о. смогли идентифицировать пять сиквенс-типов. Следует отметить, что при анализе данных полногеномного секвенирования *B. anthracis* мы обнаруживали одну одно-

нуклеотидную замену на 2,8–3,2. т.п.о. (данные не приводятся), что также указывает на консерватизм генома сибиреязвенного микроба. Этот консерватизм, скорее всего, является отражением короткой эволюционной истории данного патогена и особенностями его жизненного цикла.

Для определения влияния обнаруженных однонуклеотидных замен на аминокислотную последовательность белка LF была проведена трансляция *in silico* трех выявленных сиквенс-типов гена *lef*. При этом оказалось, что обе выявленные нуклеотидные замены 895G→A и 2126A→G не являются синонимичными и приводят к заменам в аминокислотной последовательности транслированного белка – аланина на треонин в 299 положении и глутаминовой кислоты на глицин в 709 положении соответственно. Однако проведенная *in silico* трансляция не учитывает того, что белок LF подвергается посттрансляционной модификации – отщеплению N-концевой сигнальной последовательности размером 33 аминокислоты. Эта модификация не является необходимой для каталитической активности летального фактора,

Таблица 2. Распределение штаммов *B. anthracis* по сиквенс-типам гена *lef*

№ сиквенс-типа	Описание мутации	Количество мутаций	Штаммы <i>B. anthracis</i>	Количество штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа
1	нет	0	Ames Ancestor 1199 53169 LP51/4YA 1-271 34(738) 15(1345) 1259 644/268 1273 52/33 1055/38 331/214 592/10 822/7 8(2099) 11(1940) 1173 STI-1	19	0,475
2	2126A→G	1	1(14)Stavropol LP50/3YA 68/12 367/17 531/17 7(992) 914/213 1298 1020/213 1183 219/6 1056/51 46/27 546/714 555/288 47/28 48/29	17	0,425
3	895G→A 2126A→G	2	LP53/5YA 1-364 44 157(B-1107)	4	0,1

Таблица 3. Аминокислотные замены в летальном факторе, обнаруженные при трансляции *in silico* исследуемой выборки штаммов

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непроцессированном белке	Домен белка LF	Число штаммов
895G→A	A→T	299	II	4
2126A→G	E→G	709	IV	21

но она обеспечивает возможность секреции этого белка из клетки патогена во внешнюю среду, то есть в организм хозяина [23]. После этой модификации размер летального фактора сокращается с 809 до 776 аминокислот, и координаты выявленных аминокислотных замен в процессированном белке оказываются сдвинутыми на 33 позиции (табл. 3).

Истинное положение выявленных замен важно для определения их локализации в том или ином домене белка LF. В структуре летального фактора выделяют 4 домена:

(1) N-концевой домен I 1 – 263 а. к., обеспечивает связывание LF с протективным антигеном; (2) домен II состоит из двух участков: 263–297 и 385–550 а. к., он имеет структурное сходство с ADP-рибозилирующим токсином VIP2 *B. cereus*, но потерял последовательность, необходимую для связывания NAD и катализа, и кроме того, приобрел замену глутаминовой кислоты в 518 положении, необходимой для активности ADP-рибозилирующих токсинов на лизин. Этот домен может играть роль в распознавании C-концевой части субстрата; (3) домен III расположен на участке 303–382 а. к., внутри домена II, между его второй и третьей α-спиралями, включает 282–382 а.к., представлен пятикратным тандемным повтором. Домен III необходим для распознавания субстрата; (4) C-концевой домен IV расположен на участке 552–776 а.к., внутри него находится цинк-связывающий сайт каталитический центр (686–690 а.к.) с классическим мотивом His686–Glu687–X–X–His690 [12, 24].

Картируя выявленные нами мутации на координаты расположения доменов в летальном факторе, мы можем заключить, что:

- 1) уникальная для сиквенс-типа №3 замена 266A→T затрагивает третью аминокислоту II домена с N-конца;
- 2) общая для сиквенс-типов №№1 и 2 замена 676 E→G расположена в IV домене за пределами каталитического центра (686–690 а.к.).

Учитывая, что все сиквенс-типы представлены вирулентными штаммами, за исключением вакцинного штамма СТИ-1 (СТИ-1), можно утверждать, что выявленные мутации не снижают функциональной роли белка LF. Если они и влияют на каталитическую активность летального фактора, эти изменения слишком незначительны и не приводят к утере вирулентности штаммов.

Замена 676 E→G достаточно широко распространена, встречаясь более чем у половины исследованной выборки, что позволяет предположить ее широкое распространение в глобальной популяции сибиреязвенного микроба.

Вторая выявленная нами мутация 266A→T, напротив, обнаружена только у сиквенс-типа №3, представленного всего лишь четырьмя штаммами. Интересно, что несмотря на малочисленность данной группы, ранее было показано, что все штаммы этого сиквенс-типа являются филогенетически близкими между собой как по MLVA-, так и по SNP-профилю, входя в отдельный «сибирский» кластер в рамках эволюционной линии «В» вместе со штаммами, выделенными на Ямале в ходе вспышки сибирской язвы в 2016 г. (не вошли в данное исследование) [4]. Следовательно, можно предположить, что она является характерной для штаммов *B. anthracis*, эндемичных для Сибири, и является значимой с точки зрения эволюции и филогеографии сибиреязвенного микроба (рисунок).

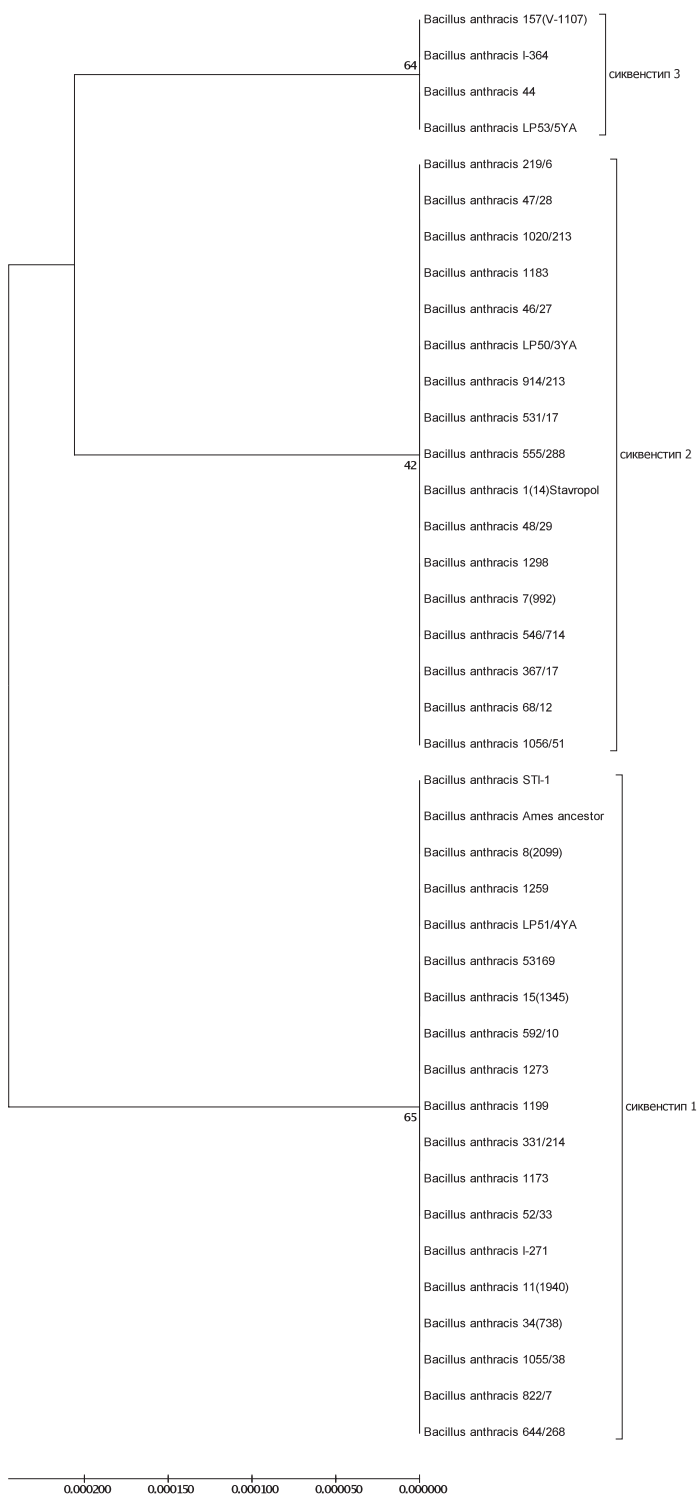


Рисунок. Филогенетическое дерево, построенное по алгоритму UPGMA, для последовательностей гена *lef* штаммов исследуемой выборки и референсного штамма *Ames Ancestor*.

Таким образом, аллельный полиморфизм гена *lef* в изученной выборке штаммов *B. anthracis* не влияет на функцию белка и достаточно ограниченно отражает филогенетическую структуру глобальной популяции сибиреязвенного микроба. Хотя, тем не менее, нуклеотидная замена 895G→A позволила нам дифференцировать сибирский кластер штаммов в пределах эволюционной линии B.

Литература

1. Маринин ЛИ, Онищенко ГГ, Кравченко ТБ, Дятлов ИА, и др. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: Гигиена; 2008, 416 с.
2. Симонова ЕГ, Картавая СА, Титков АВ, Локтионова МН, Раичич СР, Толпин ВА, и др. Сибирская язва на Ямале: оценка эпизоотологических и эпидемиологических рисков. Проблемы особо опасных инфекций. 2017;1:89-93. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-89-93
3. Покровский ВИ, Пак СГ, Брико НИ, Данилкин БК. Инфекционные болезни и эпидемиология. Учебник. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007, 816 с.
4. Timofeev V, Bahtejeva I, Mironova R, Titareva G, Lev I, Christiany D, et al. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. PLoS One. 2019 May 22;14(5):e0209140. DOI: 10.1371/journal.pone.0209140
5. Куличенко АН, Еременко ИГ, Рязанова АГ, Аксенова ЛЮ, Ковалев ДА, Писаренко СВ, и др. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-ненецком автономном округе в 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2017;1:94-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99
6. Xu Q, Zeng M. Detoxified lethal toxin as a potential mucosal vaccine against anthrax. Clin Vaccine Immunol. 2008 Apr;15(4):612-6. DOI: 10.1128/CVI.00402-07
7. Wu G, Feng C, Cao S, Guo A, Liu Z. Identification of new dominant-negative mutants of anthrax protective antigen using directed evolution. Appl Biochem Biotechnol. 2012 Nov;168(5):1302-10. DOI: 10.1007/s12010-012-9858-6.
8. Bourgogne A, Drysdale M, Hilsenbeck SG, Peterson SN, Koehler TM. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids. Infect Immun. 2003 May;71(5):2736-43.
9. Bergman NH. (ed). *Bacillus anthracis* and anthrax. Wiley-Blackwell; 2011. ISBN 978-0-470-41011-0
10. Cao S, Guo A, Wu G, Liu Z, Chen W, Feng C, Zhang CC, Chen H. Residue histidine 669 is essential for the catalytic activity of *Bacillus anthracis* lethal factor. J Bacteriol. 2010 Nov;192(21):5799-805. DOI: 10.1128/JB.00485-10
11. Klimpel KR, Arora N, Leppla SH. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. Mol Microbiol. 1994 Sep;13(6):1093-100. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00500.x
12. Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renucci M, Petosa C, Bienkowska J, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. Nature. 2001 Nov 8;414(6860):229-33. DOI: 10.1038/n35101998
13. Teh CS, Chua KH, Thong KL. Genetic variation analysis of *Vibrio cholerae* using multilocus sequencing typing and multi-virulence locus sequencing typing. Infect Genet Evol. 2011 Jul;11(5):1121-8. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.04.005
14. Anisimov AP, Dentovskaya SV, Panfertsev EA, Svetoch TE, Kopylov PKh, Segelke BW, et al. Amino acid and structural variability of *Yersinia pestis* LcrV protein. Infect Genet Evol. 2010 Jan;10(1):137-45. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.10.003
15. Dentovskaya SV, Platonov ME, Svetoch TE, Kopylov PK, Kombarova TI, Ivanov SA, et al. Two isoforms of *Yersinia pestis* plasminogen activator pla: intraspecies distribution, intrinsic disorder propensity, and contribution to virulence. PLoS One. 2016 Dec 9;11(12):e0168089. DOI: 10.1371/journal.pone.0168089.
16. Kopylov PK, Platonov ME, Ablamunits VG, Kombarova TI, Ivanov SA, Kadnikova LA, et al. *Yersinia pestis* Caf1 protein: effect of sequence polymorphism on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms. PLoS One. 2016 Sep 8;11(9):e0162308. DOI: 10.1371/journal.pone.0162308
17. Tonello F, Naletto L, Romanello V, Dal Molin F, Montecucco C. Tyrosine-728 and glutamic acid-735 are essential for the metalloproteolytic activity of the lethal factor of *Bacillus anthracis*. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 16; 313(3):496-502.
18. Cao S, Liu Z, Guo A, Li Y, Zhang C, Gaobing W, et al. Efficient production and characterization of *Bacillus anthracis* lethal factor and a novel inactive mutant rLFm-Y236F. Protein Expr Purif. 2008 May;59(1):25-30. DOI: 10.1016/j.pep.2007.12.013
19. Gupta M, Alam S, Bhatnagar R. Catalytically inactive anthrax toxin(s) are potential prophylactic agents. Vaccine. 2007 Dec 5;25(50):8410-9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.063
20. Lacy DB, Mourez M, Fouassier A, Collier RJ. Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. J Biol Chem. 2002 Jan 25; 277(4):3006-10.
21. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016 Jul;33(7):1870-4. DOI: 10.1093/molbev/msw054
22. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988 Nov;26(11):2465-6.
23. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. Gene. 1989 Sep 1;81(1):45-54. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90335-1
24. Frankel AE, Kuo SR, Dostal D, Watson L, Duesbery NS, Cheng CP, et al. Pathophysiology of anthrax. Front Biosci (Landmark Ed). 2009 Jan 1;14:4516-24. DOI: 10.2741/3544

References

1. Marinin LI, Onishchenko GG, Kravchenko TB, Dyatlov IA, et al. Sibirskaya yazva cheloveka: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika, lechenie [Human anthrax: epidemiology, prevention, diagnosis, treatment]. Moscow: "Gigiena" Publ.; 2008, 416 p. (In Russian).
2. Simonova EG, Kartavaya SA, Titkov AV, Loktionova MN, Raichich SR, Tolpin VA, et al. Anthrax in the territory of Yamal: assessment of epizootiological and epidemiological risks. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2017;1:89-93. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-89-93(In Russian).
3. Pokrovskii VI, Pak SG, Briko NI, Danilkin BK. Infektsionnye bolezni i epidemiologiya [Infectious diseases and epidemiology]. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ.; 2007, 816 p. (In Russian).
4. Timofeev V, Bahtejeva I, Mironova R, Titareva G, Lev I, Christiany D, et al. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. PLoS One. 2019 May 22;14(5):e0209140. DOI: 10.1371/journal.pone.0209140
5. Kulichenko AN, Eremenko EI, Ryazanova AG, Aksanova LYu, Kovalev DA, Pisarenko SV, et al. Biological properties and molecular-genetic characteristics of *Bacillus anthracis* strains, isolated during the outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2017;1:94-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99 (In Russian).
6. Xu Q, Zeng M. Detoxified lethal toxin as a potential mucosal vaccine against anthrax. Clin Vaccine Immunol. 2008 Apr;15(4):612-6. DOI: 10.1128/CVI.00402-07
7. Wu G, Feng C, Cao S, Guo A, Liu Z. Identification of new dominant-negative mutants of anthrax protective antigen using directed evolution. Appl Biochem Biotechnol. 2012 Nov;168(5):1302-10. DOI: 10.1007/s12010-012-9858-6.
8. Bourgogne A, Drysdale M, Hilsenbeck SG, Peterson SN, Koehler TM. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids. Infect Immun. 2003 May;71(5):2736-43.
9. Bergman NH. (ed). *Bacillus anthracis* and anthrax. Wiley-Blackwell; 2011. ISBN 978-0-470-41011-0

10. Cao S, Guo A, Wu G, Liu Z, Chen W, Feng C, Zhang CC, Chen H. Residue histidine 669 is essential for the catalytic activity of *Bacillus anthracis* lethal factor. *J Bacteriol.* 2010 Nov;192(21):5799-805. DOI: 10.1128/JB.00485-10
11. Klimpel KR, Arora N, Leppla SH. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol Microbiol.* 1994 Sep;13(6):1093-100. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00500.x
12. Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renucci M, Petosa C, Bienkowska J, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature.* 2001 Nov 8;414(6860):229-33. DOI: 10.1038/n35101998
13. Teh CS, Chua KH, Thong KL. Genetic variation analysis of *Vibrio cholerae* using multilocus sequencing typing and multi-virulence locus sequencing typing. *Infect Genet Evol.* 2011 Jul;11(5):1121-8. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.04.005
14. Anisimov AP, Dentovskaya SV, Panfertsev EA, Svetoch TE, Kopylov PK, Segelke BW, et al. Amino acid and structural variability of *Yersinia pestis* LcrV protein. *Infect Genet Evol.* 2010 Jan;10(1):137-45. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.10.003
15. Dentovskaya SV, Platonov ME, Svetoch TE, Kopylov PK, Kombarova TI, Ivanov SA, et al. Two isoforms of *Yersinia pestis* plasminogen activator pla: intraspecies distribution, intrinsic disorder propensity, and contribution to virulence. *PLoS One.* 2016 Dec 9;11(12):e0168089. DOI: 10.1371/journal.pone.0168089.
16. Kopylov PK, Platonov ME, Ablamunits VG, Kombarova TI, Ivanov SA, Kadnikova LA, et al. *Yersinia pestis* Caf1 protein: effect of sequence polymorphism on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms. *PLoS One.* 2016 Sep 8;11(9):e0162308. DOI: 10.1371/journal.pone.0162308
17. Tonello F, Naletto L, Romanello V, Dal Molin F, Montecucco C. Tyrosine-728 and glutamic acid-735 are essential for the metalloproteolytic activity of the lethal factor of *Bacillus anthracis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 16;313(3):496-502.
18. Cao S, Liu Z, Guo A, Li Y, Zhang C, Gaobing W, et al. Efficient production and characterization of *Bacillus anthracis* lethal factor and a novel inactive mutant rLFm-Y236F. *Protein Expr Purif.* 2008 May;59(1):25-30. DOI: 10.1016/j.pep.2007.12.013
19. Gupta M, Alam S, Bhatnagar R. Catalytically inactive anthrax toxin(s) are potential prophylactic agents. *Vaccine.* 2007 Dec 5;25(50):8410-9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.063
20. Lacy DB, Mourez M, Fouassier A, Collier RJ. Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. *J Biol Chem.* 2002 Jan 25;277(4):3006-10.
21. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016 Jul;33(7):1870-4. DOI: 10.1093/molbev/msw054
22. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988 Nov;26(11):2465-6.
23. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. *Gene.* 1989 Sep 1;81(1):45-54. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90335-1
24. Frankel AE, Kuo SR, Dostal D, Watson L, Duesbery NS, Cheng CP, et al. Pathophysiology of anthrax. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009 Jan 1;14:4516-24. DOI: 10.2741/3544

Информация об авторах:

Гончарова Юлия Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: iulia.belay@yandex.ru

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: bahtejeva@mail.ru

Титарева Галина Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: titarevag@mail.ru

Миронова Раиса Ивановна, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: kislichkina@obolensk.org

Майская Надежда Васильевна, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: mayskaya_nv@mail.ru

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: mokrievich@obolensk.org

Information about authors:

Julia O. Goncharova, junior researcher, laboratory of microbiology of anthrax, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: iulia.belay@yandex.ru

Irina V. Bakhteeva, PhD (in Biology), senior researcher, laboratory of microbiology of anthrax, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: bahtejeva@mail.ru

Galina M. Titareva, PhD (in Biology), senior researcher, laboratory of microbiology of anthrax, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: titarevag@mail.ru

Raisa I. Mironova, Researcher, senior researcher, laboratory of microbiology of anthrax, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003

Angelina A. Kislichkina, PhD (in Biology), senior researcher of microbial collection department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: kislichkina@obolensk.org

Nadezhda V. Mayskaya, researcher of microbial collection department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: mayskaya_nv@mail.ru

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, head of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: mokrievich@obolensk.org