

Прототип мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации сибиреязвенного микроба от близкородственных бацилл

И.В.Бахтеева¹, В.В.Каптелова², Г.М.Титарева¹, Т.Б.Кравченко¹, Ю.О.Гончарова¹, К.В.Хлопова¹, В.С.Тимофеев¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

²ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии», Москва, Российская Федерация

Bacillus anthracis – грамположительная спорообразующая бактерия, способная вызывать сибирскую язву, особо опасное заболевание теплокровных животных. Индикация *B. anthracis* и дифференциация этого патогена от близкородственных бацилл зачастую осложняется высокой степенью их родства, что приводит к схожести генетических и фенотипических признаков. В данной работе мы предлагаем набор олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов для детекции трех видоспецифических для *B. anthracis* хромосомных локусов в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Предлагаемый набор олигонуклеотидов позволяет с высокой степенью достоверности идентифицировать *B. anthracis* без оглядки на плазмидный профиль штамма и дифференцировать *B. anthracis* от близкородственных микроорганизмов, даже обладающих атипичными генетическими свойствами.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, ПЦР, видовая диагностика

Для цитирования: Бахтеева И.В., Каптелова В.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Гончарова Ю.О., Хлопова К.В., Тимофеев В.С. Прототип мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации сибиреязвенного микроба от близкородственных бацилл. Бактериология. 2020; 5(3): 14–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-14-24

Prototype of a multiplex PCR test system for differentiation of anthrax microbe from close-kinded bacilles

I.V.Bakhteeva¹, V.V.Kaptelova², G.M.Titareva¹, T.B.Kravchenko¹, Yu.O.Goncharova¹, K.V.Khlopova¹, V.S.Timofeev¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

Bacillus anthracis is a Gram-positive spore-forming bacterium capable of causing anthrax, a particularly dangerous disease of warm-blooded animals. The indication of *B. anthracis* is often complicated by the high genetic similarity between *B. anthracis* and some closely related *Bacillus* species. In present work, we propose a set of oligonucleotide primers and Taq-man probes intended for simultaneous detection of three high-specific for *B. anthracis* chromosomal loci in multiplex PCR. The proposed set of oligonucleotides makes it possible to identify *B. anthracis* with a high degree of certainty without regard to the plasmid profile of the strain and to differentiate *B. anthracis* from closely related microorganisms, even those with atypical genetic properties.

Key words: *Bacillus anthracis*, PCR, species diagnostics

For citation: Bakhteeva I.V., Kaptelova V.V., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Goncharova Yu.O., Khlopova K.V., Timofeev V.S. Prototype of a multiplex PCR test system for differentiation of anthrax microbe from close-kinded bacilles. Bacteriology. 2020; 5(3): 14–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-14-24

Для корреспонденции:

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат медицинских 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

Статья поступила 09.09.2020 г., принята к печати 12.10.2020 г.

For correspondence:

Irina V. Bakhteeva, MD, PhD, senior researcher of the laboratory of anthrax microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: bahtejeva@mail.ru

The article was received 09.09.2020, accepted for publication 12.10.2020

Сибирская язва – особо опасное заболевание животных и человека, вызываемое грамположительной спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Главным образом оно распространено среди копытных млекопитающих, но может поражать и других теплокровных животных, в том числе и человека. В настоящее время сибирская язва редка в большинстве развитых стран [1] и представляет собой проблему преимущественно для субсахарской Африки и некоторых регионов Азии [2–4]. Но еще недавно, вплоть до разработки противосибиреязвенных вакцин, внедрения массовой вакцинации сельскохозяйственных животных и контактирующих с ними людей и санитарно-эпидемиологических правил по предотвращению распространения заболеваний, эта болезнь была широко распространена по всему цивилизованному миру, как минимум в регионах, где практикуют крупностадное скотоводство.

Благодаря высокой сохранности эндоспор *B. anthracis* в почве старые почвенные очаги (места гибели животных от сибирской язвы и места их захоронения) могут представлять эпидемическую опасность даже спустя многие десятилетия. Они могут активизироваться вследствие тех или иных геологических и климатических процессов – локального потепления, движения почвы, подъема грунтовых вод – или же при ошибках санитарного надзора, таких как отмена вакцинации сельскохозяйственных животных. Благодаря этому вспышки сибирской язвы время от времени происходят даже в развитых странах, в регионах, где это заболевание не встречалось десятилетиями [4–6]. Поэтому вопрос быстрой и точной диагностики сибирской язвы и идентификации *B. anthracis* в клинических и полевых образцах остается актуальным и для благополучных по сибирской язве стран. Но идентификация этого микроорганизма во многом затрудняется его таксономическим положением. *B. anthracis* является членом группы *Bacillus cereus sensu lato* или *Bacillus cereus complex*, которая также включает другие виды бацилл: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*. Ключевая особенность этой группы видов – очень высокая степень генетической близости между ними, которая позволяет считать их генетическими вариантами одного вида [7]. Кроме того, высокое генетическое сходство облегчает горизонтальную передачу генов в рамках всей группы, даже через межвидовой барьер. По результатам некоторых исследований [8], более четверти исследованных геномов *B. cereus sensu lato* несут следы межвидового горизонтального переноса генов – фрагменты ДНК близкородственных микроорганизмов. Генетическая схожесть видов *B. cereus sensu lato* и высокий шанс присутствия в геноме тестируемого штамма генов другого вида затрудняет индикацию отдельных видов из этой группы и дифференциацию видов между собой как молекулярно-генетическими, так и традиционными культурально-микробиологическими методами. Но все же, несмотря на указанные сложности, к настоящему моменту разработан ряд методов индикации *B. anthracis*. Из них наибольший интерес для практического применения представляет идентификация методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), так как этот метод высокочувствительный, быстрый и, что немаловажно, не требует работы с живыми культурами возбудителей, что позволяет проводить анализ

даже лабораториям, не оборудованным для работы с патогенными микроорганизмами.

Большинство разработанных, лицензированных и коммерчески доступных ПЦР-тест-систем для идентификации сибиреязвенного микроба используют в качестве геномишеней уникальные маркеры, кодирующие сибиреязвенный токсин и капсулу и локализованные на плаزمиде вирулентности рХО1 и рХО2 соответственно. Эти плазмиды считаются видоспецифичными для *B. anthracis*, именно благодаря им *B. anthracis* способен вызывать сибирскую язву, и их наличие в исследуемом материале однозначно сигнализирует о присутствии эпидемически значимого штамма, без оглядки на особенности его таксономического положения, чего более чем достаточно для нужд клинической диагностики.

Но существуют изоляты *B. anthracis*, утерявшие эти плазмиды [9–14]. В частности, *B. anthracis* теряет плазмиды при развитии в почве [15]. В этом случае потеря плазмид только частью популяции в пределах одного почвенного очага при использовании ПЦР-тестов, нацеленных на выявление плазмидных маркеров, может привести к ложноотрицательным результатам анализа на *B. anthracis*. Но при этом в почвенном очаге, из которого была отобрана анализируемая проба, могут сохраняться клетки, сохранившие исходный плазмидный профиль и, соответственно, вирулентность. И это может привести к вспышке заболевания при вовлечении данного очага, признанного по результатам исследований эпидемиологически безопасным, в сферу хозяйственной деятельности [9, 16].

Кроме того, существуют штаммы *B. cereus*, обладающие рХО-подобными плазмидами, или гомологами генов плазмиды рХО2 в гетерологичных плаزمиде [10]. Очевидно, что такие штаммы по результатам ПЦР-анализа наличия плазмид рХО1 и рХО2 могут быть отнесены к виду *B. anthracis*, несмотря на несопоставимо меньшую эпидемическую опасность, как минимум для людей и сельскохозяйственных животных.

Таким образом, несмотря на всю привлекательность идеи использования в качестве ПЦР-мишеней плазмид рХО1 и рХО2, этот подход может оказаться недостаточным, особенно когда речь идет не о клинической диагностике, а об исследовании почвенных образцов или микроорганизмов с нетипичным плазмидным профилем и/или спорным таксономическим положением. В этих случаях исследователи вынуждены использовать хромосомные ПЦР-маркеры.

В целом ряде исследований в качестве хромосомных мишеней для ПЦР-детекции сибиреязвенного микроба применялись ДНК-маркеры, используемые для генотипирования *B. anthracis*, например тандемный повтор *virA* [17–19], ген *AC-390* [20] и локус SG-850/749 [21], локусы BA813 [22–29], BA5510 [30], гены *bclB* [31], *sap* [32], *saspB* [33, 34] и *sspE* [35, 36], гены спорового белка В-типа (smallacid-soluble spore protein – SASP), белка гликозилтрансферазной группы [37, 38], гомолога абгидролазы [24], профаговые регионы [23] – BA5345 [39], BA5357 [40] и PL3 [41], видоспецифичные однонуклеотидные замены (SNP) в маркерах, общих для всех или нескольких видов из группы *B. cereus sensu lato*, например SNP в генах *rpoB* [22, 42–45], *gyrA* [46–48], *gyrB* [49, 50], *plcR* [51, 52], *purA* [53], а также некоторые регионы рибосомаль-

ной ДНК [21, 54, 55] и другие мишени. Но в этом случае приходится сталкиваться с упомянутыми выше генетической мономорфностью *B. cereus sensu lato* и легкостью горизонтального генетического переноса в рамках этой группы, затрудняющими дифференциацию отдельных видов в рамках всей группы. В этой ситуации для повышения достоверности результатов ПЦР-анализа можно использовать два подхода: 1) использование ПЦР-мишеней с наименьшей вероятностью ложноположительных и ложноотрицательных результатов, то есть наибольшей видоспецифичностью; 2) использование нескольких ПЦР-мишеней для их одновременной детекции в одной мультиплексной реакции. Лучшим решением является объединение этих двух подходов, то есть одновременное детектирование нескольких высокоспецифичных ПЦР-мишеней.

Цель данной работы – представить результаты разработки и испытания мультиплексной ПЦР-тест-системы для выявления сибиреязвенного микроба и его дифференциации от близкородственных бацилл, включающей три хромосомных маркера с высокой специфичностью.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовано 130 штаммов *B. anthracis* и 20 штаммов близкородственных микроорганизмов – 10 штаммов *B. cereus*, 2 штамма *B. cereus* bv. anthracoid, 1 штамм *B. licheniformis*, 1 штамм *B. megaterium*, 3 штамма *B. subtilis*, 3 штамма *B. thuringiensis* (табл. 1).

Среды и условия культивирования. Бациллярные штаммы выращивали при температуре 37°C на плотной питательной среде LB Broth; Miller (Luria-Bertani) (Amresco, США).

Анализ *in silico*. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием баз данных, доступных на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Поиск аналогов целевых генов проводился с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов, расчет их температур плавления, трансляция *in silico*, анализ расположения на хромосоме исследуемых генов и их гомологов, а также их фрагментов проводились с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation). Для анализа *in silico* было использовано 133 аннотированных генома бациллярных штаммов, депонированных в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Выделение нуклеиновых кислот. Препараты тотальной ДНК из бактерий получали с помощью набора реагентов GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, США). Все манипуляции проводились согласно инструкциям производителя.

Полимеразная цепная реакция. ПЦР проводили с помощью амплификатора с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA), с использованием «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя SYBR Green I» и «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ» (Синтол, Россия, Москва).

Состав реакционной смеси: «2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя

SYBR Green I» или «2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ» – 10 мкл, 25мМ раствор MgCl₂ – 2,5 мкл, праймеры – по 10 пкМоль, TaqMan-зонды – по 5 пкМоль, H₂O – до 25 мкл.

Детекцию продуктов амплификации проводили по каналам FAM/SYBR, HEX, ROX. Положительным результатом анализа считали пробы, которые детектировались до 35-го цикла. Оптимизацию температурного профиля реакции проводили с использованием температурного градиента на стадии гибридизации, с шагом 1°C. Оптимальной температурой считали ту, при которой кривые амплификации на стадии экспоненциального нарастания сигнала в большей степени приближались к идеальной кривой, описываемой уравнением $N_n = N_0 2^n$,

где n – номер цикла реакции; N_0 – количество целевых молекул в начале реакции (на первом цикле); N_n – количество продуктов реакции на цикле n ; 2 – коэффициент эффективности идеальной ПЦР, отражающий удвоение количества продуктов реакции в каждом последующем цикле.

Оптимальный режим амплификации для индивидуальных ПЦР: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с, считывание флуоресценции по каналу SYBR.

Оптимальный режим амплификации для мультиплексной ПЦР: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 67°C – 30 с, считывание флуоресценции по каналам FAM, ROX, HEX.

При необходимости продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле («Sigma» США) в 1хTAE-буфере (Трис-ацетат 0,04 М, ЭДТА 0,002 М, pH 8,0), с последующим окрашиванием бромистым этидием (100 мг/л) и детекцией с использованием трансиллюминатора ECX-15.L при длине волны 365 нм (Vilber Lourmat, Франция).

Олигонуклеотидные праймеры и зонды (табл. 2, 3) были синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва, Россия).

Результаты и обсуждение

Подбор ПЦР-мишеней

Первым этапом работы являлся выбор генов-мишеней, наиболее видоспецифичных для *B. anthracis*. Современные аппаратные платформы для ПЦР в реальном времени позволяют проводить учет по нескольким оптическим каналам и тем самым дают возможность детектировать в одной мультиплексной реакции несколько мишеней одновременно. Но при этом, хотя на рынке широко представлены амплификаторы, позволяющие детектировать флуоресценцию по 5 и даже 6 оптическим каналам, для некоторых распространенных амплификаторов (например, «LightCycler 96» производства Roche, Швейцария) количество одновременно считываемых каналов ограничено четырьмя. Кроме того, при разработке прототипа ПЦР-тест-системы один из каналов желательно использовать не для детекции специфической мишени, а для постановки внутреннего контроля (обычно для этого вносят в реакционную смесь ДНК-матрицу, неомологичную целевым мишеням, и комплементарные этой матрице олигонуклеотиды – праймеры и флуоресцентно меченный зонд, наличие сигнала по соответствующему каналу свидетельствует о работоспособности ПЦР-смеси даже при отсутствии амплификации целевых локусов). Поэтому, имея в виду возможность работы на 4-канальных амплифи-

Таблица 1. Штаммы, использованные в работе

№ п/п	Вид	Штамм	№ п/п	Вид	Штамм	№ п/п	Вид	Штамм
1	<i>B. anthracis</i>	24	51	<i>B. anthracis</i>	157(B-1107)	101	<i>B. anthracis</i>	71/12
2	<i>B. anthracis</i>	30	52	<i>B. anthracis</i>	174(3v)	102	<i>B. anthracis</i>	73/42
3	<i>B. anthracis</i>	41	53	<i>B. anthracis</i>	174ст(3-706)	103	<i>B. anthracis</i>	737/10
4	<i>B. anthracis</i>	42	54	<i>B. anthracis</i>	17JB	104	<i>B. anthracis</i>	8(2099)
5	<i>B. anthracis</i>	44	55	<i>B. anthracis</i>	191(11-51)	105	<i>B. anthracis</i>	81(638)
6	<i>B. anthracis</i>	63	56	<i>B. anthracis</i>	193(11-52)	106	<i>B. anthracis</i>	81/1
7	<i>B. anthracis</i>	228	57	<i>B. anthracis</i>	219/6	107	<i>B. anthracis</i>	819/5
8	<i>B. anthracis</i>	357	58	<i>B. anthracis</i>	25/71	108	<i>B. anthracis</i>	820/11
9	<i>B. anthracis</i>	358	59	<i>B. anthracis</i>	272/103-Д	109	<i>B. anthracis</i>	822/7
10	<i>B. anthracis</i>	1173	60	<i>B. anthracis</i>	28/83	110	<i>B. anthracis</i>	827/43
11	<i>B. anthracis</i>	1175	61	<i>B. anthracis</i>	283/3002	111	<i>B. anthracis</i>	837/1922
12	<i>B. anthracis</i>	1177	62	<i>B. anthracis</i>	298/22	112	<i>B. anthracis</i>	888/73
13	<i>B. anthracis</i>	1179	63	<i>B. anthracis</i>	300/31	113	<i>B. anthracis</i>	914/213
14	<i>B. anthracis</i>	1183	64	<i>B. anthracis</i>	331/214	114	<i>B. anthracis</i>	940/16
15	<i>B. anthracis</i>	1184	65	<i>B. anthracis</i>	34(738)	115	<i>B. anthracis</i>	M164
16	<i>B. anthracis</i>	1187	66	<i>B. anthracis</i>	34F2 (Sterne)	116	<i>B. anthracis</i>	A-2/3.54
17	<i>B. anthracis</i>	1189	67	<i>B. anthracis</i>	35(1529)	117	<i>B. anthracis</i>	A-204
18	<i>B. anthracis</i>	1191	68	<i>B. anthracis</i>	367/17	118	<i>B. anthracis</i>	A-205
19	<i>B. anthracis</i>	1198	69	<i>B. anthracis</i>	388/1	119	<i>B. anthracis</i>	A-206
20	<i>B. anthracis</i>	1199	70	<i>B. anthracis</i>	401/109	120	<i>B. anthracis</i>	A-211
21	<i>B. anthracis</i>	1207	71	<i>B. anthracis</i>	427/618	121	<i>B. anthracis</i>	И-271
22	<i>B. anthracis</i>	1214	72	<i>B. anthracis</i>	46/27	122	<i>B. anthracis</i>	И-29
23	<i>B. anthracis</i>	1259	73	<i>B. anthracis</i>	47/28	123	<i>B. anthracis</i>	И-362
24	<i>B. anthracis</i>	1261	74	<i>B. anthracis</i>	48/29	124	<i>B. anthracis</i>	И-363
25	<i>B. anthracis</i>	1264	75	<i>B. anthracis</i>	49/30	125	<i>B. anthracis</i>	И-364
26	<i>B. anthracis</i>	1265	76	<i>B. anthracis</i>	5(Тула)	126	<i>B. anthracis</i>	И-366
27	<i>B. anthracis</i>	1266	77	<i>B. anthracis</i>	50/31	127	<i>B. anthracis</i>	M-29(M-1)
28	<i>B. anthracis</i>	1269	78	<i>B. anthracis</i>	513/1	128	<i>B. anthracis</i>	M-71-R
29	<i>B. anthracis</i>	1273	79	<i>B. anthracis</i>	52/33	129	<i>B. anthracis</i>	M-71-S
30	<i>B. anthracis</i>	1284	80	<i>B. anthracis</i>	531/17	130	<i>B. anthracis</i>	СТИ-1
31	<i>B. anthracis</i>	1286	81	<i>B. anthracis</i>	537/38	131	<i>B. cereus</i>	55
32	<i>B. anthracis</i>	1298	82	<i>B. anthracis</i>	54(Ч-7)	132	<i>B. cereus</i>	56
33	<i>B. anthracis</i>	8189	83	<i>B. anthracis</i>	542/151	133	<i>B. cereus</i>	57
34	<i>B. anthracis</i>	05.январь	84	<i>B. anthracis</i>	546/714	134	<i>B. cereus</i>	164
35	<i>B. anthracis</i>	53169	85	<i>B. anthracis</i>	555/288	135	<i>B. cereus</i>	1070
36	<i>B. anthracis</i>	53170	86	<i>B. anthracis</i>	560/258	136	<i>B. cereus</i>	5832
37	<i>B. anthracis</i>	1(#14)	87	<i>B. anthracis</i>	566/762	137	<i>B. cereus</i>	9634
38	<i>B. anthracis</i>	1(СО)	88	<i>B. anthracis</i>	57/25(СТ-57)	138	<i>B. cereus</i>	10702
39	<i>B. anthracis</i>	10(38 Калыга)	89	<i>B. anthracis</i>	57/38	139	<i>B. cereus</i>	504 (B-1447)
40	<i>B. anthracis</i>	1020/11	90	<i>B. anthracis</i>	582/532	140	<i>B. cereus</i> <i>bv.</i> <i>anthracoid</i>	212
41	<i>B. anthracis</i>	1020/213	91	<i>B. anthracis</i>	589/47	141	<i>B. cereus</i> <i>bv.</i> <i>anthracoid</i>	6691
42	<i>B. anthracis</i>	1038/311	92	<i>B. anthracis</i>	592/10	142	<i>B. cereus</i> <i>bv.</i> <i>anthracoid</i>	Dakkar
43	<i>B. anthracis</i>	1051(35)	93	<i>B. anthracis</i>	596/9	143	<i>B. licheniformis</i>	B-1411
44	<i>B. anthracis</i>	1055/38	94	<i>B. anthracis</i>	61(1017)	144	<i>B. megaterium</i>	B-1435
45	<i>B. anthracis</i>	1056/51	95	<i>B. anthracis</i>	611/76-91	145	<i>B. subtilis</i>	168
46	<i>B. anthracis</i>	11(1940)	96	<i>B. anthracis</i>	614/1	146	<i>B. subtilis</i>	B-1405
47	<i>B. anthracis</i>	1168/6-102	97	<i>B. anthracis</i>	63/112	147	<i>B. subtilis</i>	niger
48	<i>B. anthracis</i>	13/39	98	<i>B. anthracis</i>	644/268	148	<i>B. thuringiensis</i>	214
49	<i>B. anthracis</i>	15(1345)	99	<i>B. anthracis</i>	68/12	149	<i>B. thuringiensis</i>	1373
50	<i>B. anthracis</i>	15/47	100	<i>B. anthracis</i>	7(992)	150	<i>B. thuringiensis</i>	g7566

Таблица 2. Последовательности праймеров

Ген-мишень	Последовательность прямого праймера 5'→3'	Последовательность обратного праймера 5'→3'
γ Phage Receptor	GCGAATACAGTACATATTACGTTTGGCTGAACAAG	ACAAAGCGGAAAACAACAACATCTCCAG
Va 5357	CACCCAGCGGAACATGGG	GTAGTCACGCCATGACTTGATGTGATG
PlcR	GCGCATTATACTTGGACAATCAATACGCAT	CGAAAAAGAAGTAAGCTTTTTTCGTAAGCATC

Таблица 3. Последовательности зондов

Ген-мишень	Последовательность зонда 5'→3'	Флуоресцентная метка
γ Phage Receptor	AGCCCCGGCCATTAAGCCATCAATG	FAM
Va 5357	TGTCATTGACCGAGACGCTGGGCA	ROX
PlcR	TCTGCTCTATCACACTCTAGCTTTTCTAGGCATTCAACT	HEX

каторах и необходимость зарезервировать один канал из четырех для внутреннего контроля амплификации, мы вынуждены ограничиться лишь тремя ПЦР-мишенями. Столь небольшое число мишеней только подчеркивает необходимость выбора в их качестве наиболее видоспецифических для *B. anthracis* локусов.

Мы далеко не первые, кто поставил перед собой подобную задачу, поэтому у нас была возможность учесть результаты, полученные другими исследователями. Например, достаточно полный анализ специфичности хромосомных не-однонуклеотидных маркеров был проведен в работе Agren J. et al. [56], авторами которой было выявлено, что из широкого спектра потенциальных ПЦР-мишеней лишь профаговые локусы VA5345 [39, 57], PL3 [41] и VA5357 [40] обладали необходимой специфичностью. Последовательности праймеров/зондов к указанным локусам показали идеальную гомологию со всеми геномами *B. anthracis* и низкий уровень гомологии с геномами *B. thuringiensis* и *B. cereus*, включая штаммы, филогенетически тесно связанные с *B. anthracis*. Из однонуклеотидных маркеров только нонсенс-мутация (⁶⁴⁰G→T) глобального регулятора транскрипции факторов вирулентности *plcR* оказалась видоспецифичной для *B. anthracis* [51]. Исходя из результатов этих работ, мы выбрали первыми двумя ПЦР-мишенями профаговый регион VA5345 и ген *plcR*. В качестве третьей мишени мы выбрали ген белка-рецептора диагностического фага Gamma, предложенный нами ранее для ПЦР-идентификации сибиреязвенного микроба и показавший достаточно высокую специфичность [58].

Профаговый регион Va5357. Проведенный нами BLAST-анализ показал, что в геномах близкородственных бацилл данный локус или даже сколько-либо протяженные участки с аналогичными последовательностями отсутствуют. Это дало нам возможность сконструировать пару видоспецифичных для *B. anthracis* праймеров и флуоресцентно меченный зонд, комплементарные данному локусу, указанные в табл. 2, 3.

Регулятор транскрипции PlcR. Экспрессия многих генов у *B. cereus* и *B. thuringiensis*, в том числе их факторов патогенности, находится под контролем регулятора транскрипции *PlcR* [59]. У *B. anthracis* *PlcR* инактивирован в результате мутации ⁶⁴⁰G→T гена *plcR*, приводящей к замене триплета GAA на стоп-кодон TAA [60]. Хотя эта мутация и видоспецифична, использование ее в качестве ПЦР-мишени не распространено, в первую очередь из-за технических слож-

ностей, возникающих при детекции однонуклеотидных замен. Действительно, некомплементарность лишь одного нуклеотида обычно недостаточно снижает эффективность гибридизации олигонуклеотида с матрицей и эффективность последующей амплификации. Поэтому зачастую для детекции SNP используют конкурентную ПЦР, при которой за связывание с матрицей, содержащей SNP конкурируют два олигонуклеотида, 3'-концевой нуклеотид которых комплементарен одному из аллельных состояний SNP. Для определения того, с каким из этих олигонуклеотидов более эффективно происходит гибридизация матричной ДНК, то есть какая аллель в ней присутствует, эти олигонуклеотиды метят, например, разными флуоресцентными метками, или один из них метят GC-богатой последовательностью на 5'-конце, и определяют сравнительную эффективность включения этих двух олигонуклеотидов в ПЦР по соответствующему оптическому каналу амплификатора или по кривым плавления продукта амплификации. В любом случае такой подход для детекции однонуклеотидной замены не позволяет использовать ее как мишень для мультиплексной ПЦР. Для того, чтобы обойти это ограничение, мы сконструировали прямой праймер, 3'-концевой нуклеотид которого комплементарен видоспецифичной для *B. anthracis* мутации и в последовательность которого мы дополнительно ввели искусственную замену A→C в -3-положении с 3'-конца, некомплементарную ни одному из аллелей гена *plcR*, доступных в GenBank, в расчете на то, что некомплементарные нуклеотиды в положениях 1 и 3 с 3'-конца праймера помешают Taq-полимеразе эффективно связаться с димером праймер-матрицы и начать элонгацию [61] в случае, когда матрицей выступает ДНК неантрацидных видов бацилл. Для повышения расчетной температуры отжига праймера были заменены два 5'-концевых нуклеотида с AA на GC. В итоге прямой видоспецифический праймер имел последовательность GCGCATTATACTTGGACAATCAATACGCAT. Обратный праймер и зонд не имели в последовательности видоспецифических участков (табл. 2, 3).

Рецептор фага Gamma. Чувствительность к фагу γ (Gamma) является одним из методов дифференциации *B. anthracis* от других близкородственных микроорганизмов. Davison et al. установили, что рецептором для фага Gamma является белок VA3367, содержащий LPXTG-мотив, который с помощью сортазы A (SrtA) ковалентно связан с пептидными компонентами пептидогликанового слоя клеточной стенки [62]. Проведенное нами множественное выравнивание после-

довательностей гена, кодирующего белок ВА3367, и его гомологов выявило у всех штаммов *B. anthracis* трех нуклеотидную инсерцию ⁹⁷ААГ¹⁰¹. Благодаря этой особенности при трансляции *in silico* белок ВА3367 получает в своей последовательности дополнительный остаток глутаминовой кислоты в положении 33, рамка считывания сохраняется [58].

Данная инсерция является удобной ПЦР-мишенью. Нами был сконструирован прямой праймер, три 3'-концевые нуклеотида, которые комплементарны выявленной инсерции. Дополнительно для повышения специфичности была введена искусственная некомплементарная замена G→C в положении 4 с 3'-конца. Таким образом, этот праймер, даже гибридизируясь с ДНК неантрацидных бацилл, не сможет стать точкой начала элонгации для Taq-полимеразы из-за некомплементарности сразу четырех 3'-концевых нуклеотидов [61]. Обратный праймер и зонд были комплементарны региону, не имеющему видоспецифических отличий, специфичность ПЦР-реакции при этом должна достигаться только за счет одного праймера.

Проверка специфичности разработанных олигонуклеотидов

Специфичность сконструированных олигонуклеотидов проверялась двухэтапно. На первом этапе на тестовой панели штаммов (табл. 1) проверялись только праймеры к каждому локусу, попарно, в индивидуальных реакциях с учетом результатов ПЦР по кривой флуоресценции с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green и последующим электрофоретическим разделением продуктов реакции. По результатам этого этапа испытаний: 1) праймеры к Ва5357 абсолютно специфичны, ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЦР не было зарегистрировано; 2) праймеры к *plcR* срабатывают положительно на всех исследованных штаммах *B. anthracis*. Из близкородственных бацилл ПЦР-положительным оказался единственный штамм *B. cereus* 164; 3) праймеры к ВА3367 (рецептор фага Gamma) срабатывают положительно на ДНК всех исследованных штаммах *B. anthracis*, но также и на ДНК трех штаммов *B. thuringiensis*. Таким образом, из 150 тест-штаммов для 4 мы получили ложный результат определения видовой принадлежности, при этом ложноположительный результат наблюдался для каждого такого штамма по результатам лишь одной реакции из трех.

На следующем этапе проверка специфичности проводилась в мультиплексной реакции, когда реакционная смесь содержала праймеры и зонды ко всем трем локусам (табл. 3). Четвертый канал (Cy5) остался неиспользованным, в дальнейшем его можно использовать для детекции результатов амплификации внутреннего контрольного образца.

Все штаммы *B. anthracis* были ПЦР-положительными по всем трем использованным каналам. Количество ложноположительных ответов с ДНК неантрацидных бацилл уменьшилось.

Так, не регистрировались положительные сигналы по каналу FAM, по которому считывался результат амплификации с праймерами и зондами к локусу ВА3367 (рецептор фага Gamma) в реакциях с ДНК *B. thuringiensis*. В то же время мы регистрировали положительный сигнал по каналу HEX (ви-

доспецифическая мутация в гене *plcR*) в реакции с ДНК *B. cereus* 164. По всей видимости, в случае с праймерами к ВА3367 мы имеем дело с неполной комплементарностью 3'-концевого региона праймера матрице ДНК *B. thuringiensis*, которая, даже снижая эффективность индивидуальной ПЦР, не приводит к полной остановке реакции. В условиях мультиплексной ПЦР повышение концентрации олигонуклеотидов (в нашем случае в 3,75 раза) при сохранении концентраций других компонентов реакционной смеси приводит к изменению параметров гибридизации олигонуклеотидов с матричной ДНК и между собой, а также к возникновению конкуренции индивидуальных ПЦР за связывание димеров праймер-матричной ДНК с полимеразой и за доступные dNTP. Эти факторы в совокупности могут снижать эффективность каждой из индивидуальных реакций в мультиплексе и, в результате, приводить к полному ингибированию реакции при неполной комплементарности праймера и матрицы, в нашем случае – видоспецифического праймера к рецептору фага Gamma и ДНК *B. thuringiensis*. Что касается сохранения положительного результата в реакции с праймерами к *plcR* и ДНК *B. cereus* 164 даже в условиях мультиплексной реакции, то это, скорее всего, говорит о наличии у штамма 164 мутации в данном гене, идентичной мутации у *B. anthracis*. Учитывая указанную выше генетическую мноморфность группы видов *B. cereus sensu lato* и распространенность горизонтального генетического переноса в рамках этой группы, этот факт не выглядит невозможным. Более того, положительный результат ПЦР с использованием праймеров к генетической мишени, которая считается высокоспецифичной для *B. anthracis* [20], только подчеркивает важность использования в генодиагностике сибиреязвенного микроба более чем одного локуса-мишени, будь то в индивидуальных или же в мультиплексных ПЦР.

Не получив на исследуемой выборке из 150 штаммов (табл. 1) ложноотрицательных результатов и получив ложноположительный результат лишь для одного штамма по одному из трех оптических каналов, мы можем сделать вывод, что положительный результат, фиксируемый в предлагаемой нами мультиплексной ПЦР по всем трем оптическим каналам, говорит о принадлежности исследуемого штамма к *B. anthracis*, а положительный результат по одному каналу говорит о принадлежности штамма к неантрацидным бациллам. В то же время мы не можем четко регламентировать интерпретацию результатов в гипотетических спорных случаях, таких как положительный результат по двум каналам из трех. Но, пусть даже несколько спекулятивно экстраполируя наши результаты, мы можем утверждать, что исследуемый штамм в такой ситуации можно если и не отнести безоговорочно к *B. anthracis*, то счесть атипичным штаммом группы видов *B. cereus sensu lato*, который требует более полного изучения с использованием широкого спектра генетических и фенотипических методов определения его видовой принадлежности и эпидемической опасности.

Заключение

Таким образом, нами был разработан набор олигонуклеотидов, являющийся прототипом мультиплексной ПЦР-тест-системы для дифференциации сибиреязвенного микроба от

близкородственных бацилл. Использование в качестве ПЦР-мишеней только хромосомных маркеров позволяет достоверно идентифицировать бесплазмидные изоляты *B. anthracis*, что достаточно важно при анализе штаммов, выделяемых из старых почвенных очагов, либо штаммов, утерявших плазмиды в процессе культивирования и множественных пересевов на питательных средах в лабораторных условиях, а также нетипичных штаммов *B. anthracis*, обладающих РХО-подобными плазмидами. Использование сразу трех ПЦР-мишеней, две из которых на данный момент признаны наиболее видоспецифичными для *B. anthracis*, позволяет снизить риск ложноположительных и ложноотрицательных результатов до минимума даже в гипотетическом случае определения видовой принадлежности атипичных штаммов *B. cereus sensu lato*. Несмотря на некоторую избыточность предлагаемого нами набора олигонуклеотидов для нужд клинической диагностики и невозможность определения с его помощью плазмидного профиля штамма, важного для медицины и ветеринарии, он может оказаться небесполезным для лабораторий, занимающихся коллекционной деятельностью и изучающих экологию и эпидемиологию патогенных бацилл, в том числе и *B. anthracis*, в полевых условиях.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Turnbull PC. World Health Organization. Anthrax in humans and animals. In: (Editor) PT, editor. Geneva (CH): WHO Press; 2008.
- Ardi P, Emanuele C, Luigina S, Leonardo M, et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains circulating in Albania. Journal of Bioterrorism & Biodefense. 2015;7:1-6.
- Okello A, Welburn S, Smith J. Crossing institutional boundaries: mapping the policy process for improved control of endemic and neglected zoonoses in sub-Saharan Africa. Health Policy Plan. 2015 Jul;30(6):804-12. DOI: 10.1093/heapol/czu059
- Попова АЮ, Демина ЮВ, Куличенко АН, Рязанова АН, и др. Эпидемиологические особенности вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году. Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. 2017, с. 81-84.
- Gierczyński R, Zasada AA, Raddadi N, Merabishvili M, Daffonchio D, Rastawicki W, Jagielski M. Specific *Bacillus anthracis* identification by a *plcR*-targeted restriction site insertion-PCR (RSI-PCR) assay. FEMS Microbiol Lett. 2007 Jul;272(1):55-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00741.x
- Gobeli Brawand S, Kittl S, Dettwiler M, Thomann A, Feyer S, Cachim J, et al. An unusual case of bovine anthrax in the canton of Jura, Switzerland in 2017. BMC Vet Res. 2019 Jul 29;15(1):265. DOI: 10.1186/s12917-019-1996-4
- Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. Genome Res. 2012 Aug;22(8):1512-24. DOI: 10.1101/gr.134437.111
- Cardazzo B, Negrisola E, Carraro L, Alberghini L, Patarnello T, Giaccone V. Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. Appl Environ Microbiol. 2008 Feb;74(3):850-60. DOI: 10.1128/AEM.01495-07
- Turnbull PC, Hutson MJ, Ward, Jones MN et al. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. J Appl Bacteriol. 1992;72:21-28. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04876.x
- Pannucci J, Okinaka RT, Williams E, Sabin R, Ticknor LO, Kuske CR. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. BMC Genomics. 2002 Dec 9;3(1):34. DOI: 10.1186/1471-2164-3-34
- Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. J Bacteriol. 2002 Jan;184(1):134-41. DOI: 10.1128/jb.184.1.134-141.2002
- Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
- Klee SR, Brzuszkiewicz EB, Nattermann H, Brüggemann H, Dupke S, Wollherr A, et al. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. PLoS One. 2010 Jul 9;5(7):e10986. DOI: 10.1371/journal.pone.0010986
- Klee SR, Ozel M, Appel B, Boesch C, Ellerbrok H, Jacob D, Holland G, Leendertz FH, Pauli G, Grunow R, Nattermann H. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. J Bacteriol. 2006 Aug;188(15):5333-44. DOI: 10.1128/JB.00303-06
- Carlson CJ, Getz WM, Kausrud KL, Cizauskas CA, Blackburn JK, Bustos Carrillo FA, et al. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). Biol Rev Camb Philos Soc. 2018 Nov;93(4):1813-1831. DOI: 10.1111/brv.12420
- Braun P, Grass G, Aceti A, Serrecchia L, Affuso A, Marino L, et al. Microevolution of Anthrax from a Young Ancestor (M.A.Y.A.) Suggests a Soil-Borne Life Cycle of *Bacillus anthracis*. PLoS One. 2015 Aug 12;10(8):e0135346. DOI: 10.1371/journal.pone.0135346
- Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. J Bacteriol. 1996 Jan;178(2):377-84. DOI: 10.1128/jb.178.2.377-384.1996
- Jackson PJ, Hugh-Jones ME, Adair DM, Green G, Hill KK, Kuske CR, et al. PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: the presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 3;95(3):1224-9. DOI: 10.1073/pnas.95.3.1224
- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2000 May;182(10):2928-36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000
- Cherif A, Borin S, Rizzi A, Ouzari H, Boudabous A, Daffonchio D. Characterization of a repetitive element polymorphism-polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. J Appl Microbiol. 2002;93(3):456-62. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01712.x
- Daffonchio D, Raddadi N, Merabishvili M, Cherif A, Carmagnola L, Brusetti L, Rizzi A, Chanishvili N, Visca P, Sharp R, Borin S. Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. Appl Environ Microbiol. 2006 Feb;72(2):1295-301. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1295-1301.2006
- Qi Y, Patra G, Liang X, Williams LE, Rose S, Redkar RJ, DelVecchio VG. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. Appl Environ Microbiol. 2001 Aug;67(8):3720-7. DOI: 10.1128/AEM.67.8.3720-3727.2001
- Radnedge L, Agron PG, Hill KK, Jackson PJ, Ticknor LO, Keim P, Andersen GL. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and

- Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol. 2003 May;69(5):2755-64. DOI: 10.1128/aem.69.5.2755-2764.2003
24. Bode E, Hurtle W, Norwood D. Real-time PCR assay for a unique chromosomal sequence of *Bacillus anthracis*. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5825-31. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5825-5831.2004
 25. Coker PR, Smith KL, Fellows PF, Rybachuck G, Kousoulas KG, Hugh-Jones ME. *Bacillus anthracis* virulence in Guinea pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plasmid quantities and clonality. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):1212-8. DOI: 10.1128/jcm.41.3.1212-1218.2003
 26. Cheun HI, Makino SI, Watarai M, Shirahata T, Uchida I, Takeshi K. A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. J Appl Microbiol. 2001 Sep;91(3):421-6. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01395.x
 27. Luna VA, King D, Davis C, Rycerz T, Ewert M, Cannons A, Amuso P, Cattani J. Novel sample preparation method for safe and rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in environmental powders and nasal swabs. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):1252-5. DOI: 10.1128/jcm.41.3.1252-1255.2003
 28. Vahedi F, Moazeni Julia G, Kianizadeh M, Mahmoudi M. Characterization of *Bacillus anthracis* spores isolates from soil by biochemical and multiplex PCR analysis. East Mediterr Health J. 2009 Jan-Feb;15(1):149-56.
 29. Wang SH, Wen JK, Zhou YF, Zhang ZP, Yang RF, Zhang JB, et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR on DNA chip. Biosens Bioelectron. 2004 Nov 1;20(4):807-13. DOI: 10.1016/j.bios.2004.03.019
 30. Olsen JS, Skogan G, Fykse EM, Rawlinson EL, Tomaso H, Granum PE, Blatny JM. Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on adk-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. J Microbiol Methods. 2007 Dec;71(3):265-74. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.10.001
 31. Leski TA, Caswell CC, Pawlowski M, Klinke DJ, Bujnicki JM, Hart SJ, Lukomski S. Identification and classification of *bcl* genes and proteins of *Bacillus cereus* group organisms and their application in *Bacillus anthracis* detection and fingerprinting. Appl Environ Microbiol. 2009 Nov;75(22):7163-72. DOI: 10.1128/AEM.01069-09
 32. Ryu C, Lee K, Yoo C, Seong WK, Oh HB. Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. Microbiol Immunol. 2003;47(10):693-9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03434.x
 33. Hoffmaster AR, Meyer RF, Bowen MD, Marston CK, Weyant RS, Thurman K, et al. Evaluation and validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. Emerg Infect Dis. 2002 Oct;8(10):1178-82. DOI: 10.3201/eid0810.020393
 34. Marston CK, Gee JE, Popovic T, Hoffmaster AR. Molecular approaches to identify and differentiate *Bacillus anthracis* from phenotypically similar *Bacillus species* isolates. BMC Microbiol. 2006 Mar 3;6:22. DOI: 10.1186/1471-2180-6-22
 35. Janse I, Hamidjaja RA, Bok JM, van Rotterdam BJ. Reliable detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. BMC Microbiol. 2010 Dec 8;10:314. DOI: 10.1186/1471-2180-10-314
 36. Kim K, Seo J, Wheeler K, Park C, Kim D, Park S, et al. Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 Feb 1;43(2):301-10. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.10.005
 37. Бургасов ПН, Рожков ГИ. Сибиреязвенная инфекция. М., 1984, 208 с.
 38. Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al; Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. JAMA. 2002 May 1;287(17):2236-52. DOI: 10.1001/jama.287.17.2236
 39. Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. Mol Cell Probes. 2008 Oct-Dec;22(5-6):313-5. DOI: 10.1016/j.mcp.2008.06.001
 40. Létant SE, Murphy GA, Alfaro TM, Avila JR, Kane SR, Raber E, et al. Rapid-viability PCR method for detection of live, virulent *Bacillus anthracis* in environmental samples. Appl Environ Microbiol. 2011 Sep;77(18):6570-8. DOI: 10.1128/AEM.00623-11
 41. Wielinga PR, Hamidjaja RA, Agren J, Knutsson R, Segerman B, Fricker M, et al. A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating *B. anthracis* virulent types. Int J Food Microbiol. 2011 Mar 1;145 Suppl 1:S137-44. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.039
 42. Oggioni MR, Meacci F, Carattoli A, Ciervo A, Orru G, Cassone A, Pozzi G. Protocol for real-time PCR identification of anthrax spores from nasal swabs after broth enrichment. J Clin Microbiol. 2002 Nov;40(11):3956-63. DOI: 10.1128/jcm.40.11.3956-3963.2002
 43. Ellerbrok H, Nattermann H, Ozel M, Beutin L, Appel B, Pauli G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. FEMS Microbiol Lett. 2002 Aug 27;214(1):51-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11324.x
 44. Ko KS, Kim JM, Kim JW, Jung BY, Kim W, Kim IJ, Kook YH. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):2908-14. DOI: 10.1128/jcm.41.7.2908-2914.2003
 45. Drago L, Lombardi A, Vecchi ED, Gismondo MR. Real-time PCR assay for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in clinical samples. J Clin Microbiol. 2002 Nov;40(11):4399. DOI: 10.1128/jcm.40.11.4399.2002
 46. Satterfield BC, Kulesh DA, Norwood DA, Wasielewski LP Jr, Caplan MR, West JA. Tentacle Probes: differentiation of difficult single-nucleotide polymorphisms and deletions by presence or absence of a signal in real-time PCR. Clin Chem. 2007 Dec;53(12):2042-50. DOI: 10.1373/clinchem.2007.091488
 47. Hurtle W, Bode E, Kulesh DA, Kaplan RS, Garrison J, Bridge D, et al. Detection of the *Bacillus anthracis gyrA* gene by using a minor groove binder probe. J Clin Microbiol. 2004 Jan;42(1):179-85. DOI: 10.1128/jcm.42.1.179-185.2004
 48. Derzelle S, Mendy C, Laroche S, Madani N. Use of high-resolution melting and melting temperature-shift assays for specific detection and identification of *Bacillus anthracis* based on single nucleotide discrimination. J Microbiol Methods. 2011 Nov;87(2):195-201. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.08.005
 49. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. Appl Environ Microbiol. 1999 Apr;65(4):1483-90. DOI: 10.1128/AEM.65.4.1483-1490.1999
 50. Park SH, Oh HB, Seong WK, Kim CW, Cho SY, Yoo CK. Differential analysis of *Bacillus anthracis* after pX01 plasmid curing and comprehensive data on *Bacillus anthracis* infection in macrophages and glial cells. Proteomics. 2007 Oct;7(20):3743-58. DOI: 10.1002/pmic.200700338
 51. Easterday WR, Van Ert MN, Simonson TS, Wagner DM, Kenefic LJ, Allender CJ, Keim P. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. J Clin Microbiol. 2005 Apr;43(4):1995-7. DOI: 10.1128/JCM.43.4.1995-1997.2005
 52. Easterday WR, Van Ert MN, Zanecki S, Keim P. Specific detection of *Bacillus anthracis* using a TaqMan mismatch amplification mutation assay. Biotechniques. 2005 May;38(5):731-5. DOI: 10.2144/05385ST03
 53. Ireng LM, Durant JF, Tomaso H, Pilo P, Olsen JS, Ramisse V, Mahillon J, Gala JL. Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* in environmental samples. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Nov;88(5):1179-92. DOI: 10.1007/s00253-010-2848-0
 54. Nübel U, Schmidt PM, Reiss E, Bier F, Beyer W, Naumann D. Oligonucleotide microarray for identification of *Bacillus anthracis* based on intergenic transcribed spacers in ribosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 2004 Nov 15;240(2):215-23. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.09.042
 55. Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Hezka J, Beyer W, Hadfield TL, Kostrikis LG. Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus isolates*. J Microbiol Methods. 2009 Jul;78(1):45-53. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.04.005

56. Ågren J, Hamidjaja RA, Hansen T, Ruuls R, Thierry S, Vigre H, et al. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *Virulence*. 2013 Nov 15;4(8):671-85. DOI: 10.4161/viru.26288
57. Lewerin SS, Elvander M, Westermark T, Hartzell LN, Norström AK, Ehres S, et al. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd – 1st case in 27 years: Case report. *Acta Vet Scand*. 2010 Feb 1;52(1):7. DOI: 10.1186/1751-0147-52-7
58. Тимофеев ВС, Каптелова ВВ, Бахтеева ИВ, Миронова РИ, Титарева ГМ, Гончарова ЮО, и др. Использование гена, кодирующего белок GamR, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов. *Бактериология*. 2018;3(3):22-27. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-22-27
59. Mignot T, Mock M, Robichon D, Landier A, Lereclus D, Fouet A. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*. 2001 Dec;42(5):1189-98. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02692.x
60. Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB, Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*. 1999 Jun;32(5):1043-53. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x
61. Birdsell DN, Pearson T, Price EP, Hornstra HM, Nera RD, Stone N, et al. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS One*. 2012;7(3):e32866. DOI: 10.1371/journal.pone.0032866
62. Davison S, Couture-Tosi E, Candela T, Mock M, Fouet A. Identification of the *Bacillus anthracis* (gamma) phage receptor. *J Bacteriol*. 2005 Oct;187(19):6742-9. DOI: 10.1128/JB.187.19.6742-6749.2005

References

1. Turnbull PC. World Health Organization. Anthrax in humans and animals. In: (Editor) PT, editor. Geneva (CH): WHO Press; 2008.
2. Ardi P, Emanuele C, Luigina S, Leonardo M, et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains circulating in Albania. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*. 2015;7:1-6.
3. Okello A, Welburn S, Smith J. Crossing institutional boundaries: mapping the policy process for improved control of endemic and neglected zoonoses in sub-Saharan Africa. *Health Policy Plan*. 2015 Jul;30(6):804-12. DOI: 10.1093/heapol/czu059
4. Popova AYu, Demina YuV, Kulichenko AN, Ryazanova AN, et al. Epidemiological features of the anthrax outbreak in the Yamalo-Nenets Autonomous district in 2016. *Current problems of diseases*. 2017, pp. 81-84. (In Russian).
5. Gierczyński R, Zasada AA, Raddadi N, Merabishvili M, Daffonchio D, Rastawicki W, Jagielski M. Specific *Bacillus anthracis* identification by a *plcR*-targeted restriction site insertion-PCR (RSI-PCR) assay. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Jul;272(1):55-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00741.x
6. Gobeli Brawand S, Kittl S, Dettwiler M, Thomann A, Feyer S, Cachim J, et al. An unusual case of bovine anthrax in the canton of Jura, Switzerland in 2017. *BMC Vet Res*. 2019 Jul 29;15(1):265. DOI: 10.1186/s12917-019-1996-4
7. Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res*. 2012 Aug;22(8):1512-24. DOI: 10.1101/gr.134437.111
8. Cardazzo B, Negrisolo E, Carraro L, Alberghini L, Patarnello T, Giaccone V. Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Feb;74(3):850-60. DOI: 10.1128/AEM.01495-07
9. Turnbull PC, Hutson MJ, Ward, Jones MN et al. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J Appl Bacteriol*. 1992;72:21-28. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04876.x
10. Pannucci J, Okinaka RT, Williams E, Sabin R, Ticknor LO, Kuske CR. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics*. 2002 Dec 9;3(1):34. DOI: 10.1186/1471-2164-3-34
11. Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacteriol*. 2002 Jan;184(1):134-41. DOI: 10.1128/jb.184.1.134-141.2002
12. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
13. Klee SR, Brzuszkiewicz EB, Nattermann H, Brüggemann H, Dupke S, Wollherr A, et al. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One*. 2010 Jul 9;5(7):e10986. DOI: 10.1371/journal.pone.0010986
14. Klee SR, Ozel M, Appel B, Boesch C, Ellerbrok H, Jacob D, Holland G, Leendertz FH, Pauli G, Grunow R, Nattermann H. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J Bacteriol*. 2006 Aug;188(15):5333-44. DOI: 10.1128/JB.00303-06
15. Carlson CJ, Getz WM, Kausrud KL, Cizauskas CA, Blackburn JK, Bustos Carrillo FA, et al. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (*Bacillus anthracis*). *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2018 Nov;93(4):1813-1831. DOI: 10.1111/brv.12420
16. Braun P, Grass G, Aceti A, Serrecchia L, Affuso A, Marino L, et al. Microevolution of Anthrax from a Young Ancestor (M.A.Y.A.) Suggests a Soil-Borne Life Cycle of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2015 Aug 12;10(8):e0135346. DOI: 10.1371/journal.pone.0135346
17. Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol*. 1996 Jan;178(2):377-84. DOI: 10.1128/jb.178.2.377-384.1996
18. Jackson PJ, Hugh-Jones ME, Adair DM, Green G, Hill KK, Kuske CR, et al. PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: the presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 3;95(3):1224-9. DOI: 10.1073/pnas.95.3.1224
19. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 2000 May;182(10):2928-36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000
20. Cherif A, Borin S, Rizzi A, Ouzari H, Boudabous A, Daffonchio D. Characterization of a repetitive element polymorphism-polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. *J Appl Microbiol*. 2002;93(3):456-62. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01712.x
21. Daffonchio D, Raddadi N, Merabishvili M, Cherif A, Carmagnola L, Brusetti L, Rizzi A, Chanishvili N, Visca P, Sharp R, Borin S. Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Feb;72(2):1295-301. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1295-1301.2006
22. Qi Y, Patra G, Liang X, Williams LE, Rose S, Redkar RJ, DelVecchio VG. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Aug;67(8):3720-7. DOI: 10.1128/AEM.67.8.3720-3727.2001
23. Radnedge L, Agron PG, Hill KK, Jackson PJ, Ticknor LO, Keim P, Andersen GL. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*. 2003 May;69(5):2755-64. DOI: 10.1128/aem.69.5.2755-2764.2003
24. Bode E, Hurtle W, Norwood D. Real-time PCR assay for a unique chromosomal sequence of *Bacillus anthracis*. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5825-31. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5825-5831.2004

25. Coker PR, Smith KL, Fellows PF, Rybachuck G, Kousoulas KG, Hugh-Jones ME. *Bacillus anthracis* virulence in Guinea pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plasmid quantities and clonality. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3):1212-8. DOI: 10.1128/jcm.41.3.1212-1218.2003
26. Cheun HI, Makino SI, Watarai M, Shirahata T, Uchida I, Takeshi K. A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. *J Appl Microbiol.* 2001 Sep;91(3):421-6. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01395.x
27. Luna VA, King D, Davis C, Rycerz T, Ewert M, Cannons A, Amuso P, Cattani J. Novel sample preparation method for safe and rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in environmental powders and nasal swabs. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3):1252-5. DOI: 10.1128/jcm.41.3.1252-1255.2003
28. Vahedi F, Moazeni Jula G, Kianizadeh M, Mahmoudi M. Characterization of *Bacillus anthracis* spores isolates from soil by biochemical and multiplex PCR analysis. *East Mediterr Health J.* 2009 Jan-Feb;15(1):149-56.
29. Wang SH, Wen JK, Zhou YF, Zhang ZP, Yang RF, Zhang JB, et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR on DNA chip. *Biosens Bioelectron.* 2004 Nov 1;20(4):807-13. DOI: 10.1016/j.bios.2004.03.019
30. Olsen JS, Skogan G, Fykse EM, Rawlinson EL, Tomaso H, Granum PE, Blatny JM. Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on adk-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. *J Microbiol Methods.* 2007 Dec;71(3):265-74. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.10.001
31. Leski TA, Caswell CC, Pawlowski M, Klinke DJ, Bujnicki JM, Hart SJ, Lukomski S. Identification and classification of *bcl* genes and proteins of *Bacillus cereus* group organisms and their application in *Bacillus anthracis* detection and fingerprinting. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Nov;75(22):7163-72. DOI: 10.1128/AEM.01069-09
32. Ryu C, Lee K, Yoo C, Seong WK, Oh HB. Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. *Microbiol Immunol.* 2003;47(10):693-9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03434.x
33. Hoffmaster AR, Meyer RF, Bowen MD, Marston CK, Weyant RS, Thurman K, et al. Evaluation and validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis.* 2002 Oct;8(10):1178-82. DOI: 10.3201/eid0810.020393
34. Marston CK, Gee JE, Popovic T, Hoffmaster AR. Molecular approaches to identify and differentiate *Bacillus anthracis* from phenotypically similar *Bacillus species* isolates. *BMC Microbiol.* 2006 Mar 3;6:22. DOI: 10.1186/1471-2180-6-22.
35. Janse I, Hamidjaja RA, Bok JM, van Rotterdam BJ. Reliable detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. *BMC Microbiol.* 2010 Dec 8;10:314. DOI: 10.1186/1471-2180-10-314
36. Kim K, Seo J, Wheeler K, Park C, Kim D, Park S, et al. Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005 Feb 1;43(2):301-10. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.10.005
37. Burgasov PN, Rozhkov GI. Anthrax infection. Moscow, 1984, 208 p. (In Russian).
38. Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al; Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA.* 2002 May 1;287(17):2236-52. DOI: 10.1001/jama.287.17.2236
39. Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. *Mol Cell Probes.* 2008 Oct-Dec;22(5-6):313-5. DOI: 10.1016/j.mcp.2008.06.001
40. Létant SE, Murphy GA, Alfaro TM, Avila JR, Kane SR, Raber E, et al. Rapid-viability PCR method for detection of live, virulent *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Sep;77(18):6570-8. DOI: 10.1128/AEM.00623-11
41. Wielinga PR, Hamidjaja RA, Agren J, Knutsson R, Segerman B, Fricker M, et al. A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating *B. anthracis* virulent types. *Int J Food Microbiol.* 2011 Mar 1;145 Suppl 1:S137-44. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.039
42. Oggioni MR, Meacci F, Carattoli A, Ciervo A, Orru G, Cassone A, Pozzi G. Protocol for real-time PCR identification of anthrax spores from nasal swabs after broth enrichment. *J Clin Microbiol.* 2002 Nov;40(11):3956-63. DOI: 10.1128/jcm.40.11.3956-3963.2002
43. Ellerbrok H, Nattermann H, Ozel M, Beutin L, Appel B, Pauli G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Aug 27;214(1):51-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11324.x
44. Ko KS, Kim JM, Kim JW, Jung BY, Kim W, Kim IJ, Kook YH. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2003 Jul;41(7):2908-14. DOI: 10.1128/jcm.41.7.2908-2914.2003
45. Drago L, Lombardi A, Vecchi ED, Gismondo MR. Real-time PCR assay for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2002 Nov;40(11):4399. DOI: 10.1128/jcm.40.11.4399.2002
46. Satterfield BC, Kulesh DA, Norwood DA, Wasieloski LP Jr, Caplan MR, West JA. Tentacle Probes: differentiation of difficult single-nucleotide polymorphisms and deletions by presence or absence of a signal in real-time PCR. *Clin Chem.* 2007 Dec;53(12):2042-50. DOI: 10.1373/clinchem.2007.091488
47. Hurtle W, Bode E, Kulesh DA, Kaplan RS, Garrison J, Bridge D, et al. Detection of the *Bacillus anthracis gyrA* gene by using a minor groove binder probe. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):179-85. DOI: 10.1128/jcm.42.1.179-185.2004
48. Derzelle S, Mendy C, Laroche S, Madani N. Use of high-resolution melting and melting temperature-shift assays for specific detection and identification of *Bacillus anthracis* based on single nucleotide discrimination. *J Microbiol Methods.* 2011 Nov;87(2):195-201. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.08.005
49. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Apr;65(4):1483-90. DOI: 10.1128/AEM.65.4.1483-1490.1999
50. Park SH, Oh HB, Seong WK, Kim CW, Cho SY, Yoo CK. Differential analysis of *Bacillus anthracis* after pX01 plasmid curing and comprehensive data on *Bacillus anthracis* infection in macrophages and glial cells. *Proteomics.* 2007 Oct;7(20):3743-58. DOI: 10.1002/pmic.200700338
51. Easterday WR, Van Ert MN, Simonson TS, Wagner DM, Kenefic LJ, Allender CJ, Keim P. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. *J Clin Microbiol.* 2005 Apr;43(4):1995-7. DOI: 10.1128/JCM.43.4.1995-1997.2005
52. Easterday WR, Van Ert MN, Zanecki S, Keim P. Specific detection of *Bacillus anthracis* using a TaqMan mismatch amplification mutation assay. *Biotechniques.* 2005 May;38(5):731-5. DOI: 10.2144/05385ST03
53. Ireng LM, Durant JF, Tomaso H, Pilo P, Olsen JS, Ramisse V, Mahillon J, Gala JL. Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 Nov;88(5):1179-92. DOI: 10.1007/s00253-010-2848-0
54. Nübel U, Schmidt PM, Reiss E, Bier F, Beyer W, Naumann D. Oligonucleotide microarray for identification of *Bacillus anthracis* based on intergenic transcribed spacers in ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Nov 15;240(2):215-23. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.09.042
55. Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Hezka J, Beyer W, Hadfield TL, Kostrikis LG. Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* isolates. *J Microbiol Methods.* 2009 Jul;78(1):45-53. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.04.005
56. Ågren J, Hamidjaja RA, Hansen T, Ruuls R, Thierry S, Vigre H, et al. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *Virulence.* 2013 Nov 15;4(8):671-85. DOI: 10.4161/viru.26288
57. Lewerin SS, Elvander M, Westermark T, Hartzell LN, Norström AK, Ehns S, et al. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd--1st case in 27 years: Case report. *Acta Vet Scand.* 2010 Feb 1;52(1):7. DOI: 10.1186/1751-0147-52-7

58. Timofeev VS, Kaptelova VV, Bakhteeva IV, Mironova RI, Titareva GM, Goncharova YuO, et al. Using the gen encoding GamR protein as a species-specific chromosomal marker to differentiate *B. anthracis* from closely related species. *Bacteriology*. 2018;3(3):22-27. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-22-27
59. Mignot T, Mock M, Robichon D, Landier A, Lereclus D, Fouet A. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*. 2001 Dec;42(5):1189-98. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02692.x
60. Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB, Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*. 1999 Jun;32(5):1043-53. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x
61. Birdsell DN, Pearson T, Price EP, Hornstra HM, Nera RD, Stone N, et al. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS One*. 2012;7(3):e32866. DOI: 10.1371/journal.pone.0032866
62. Davison S, Couture-Tosi E, Candela T, Mock M, Fouet A. Identification of the *Bacillus anthracis* (gamma) phage receptor. *J Bacteriol*. 2005 Oct;187(19):6742-9. DOI: 10.1128/JB.187.19.6742-6749.2005

Информация об авторах:

Каптелова Валерия Владимировна, младший научный сотрудник ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
Телефон: (495) 974-9646
E-mail: lero4ka-92@inbox.ru

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских 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. Оболensk
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: titareva@mail.ru

Кравченко Татьяна Борисовна, 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. Оболensk
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: tbkrav@mail.ru

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. Оболensk
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: iulia.belay@yandex.ru

Хлопова Ксения Валерьевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: xlopova.12@yandex.ru

Тимофеев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: timofeev@obolensk.org

Information about authors:

Valeria V. Kaptelova, junior researcher, Central Research Institute of Epidemiology
Address: 3a Novogireevskaya str., Moscow, 111123, Russian Federation
Phone: (495) 974-9646
E-mail: lero4ka-92@inbox.ru

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

Tatiana B. Kravchenko, PhD (Biology), leading researcher of the laboratory of anthrax microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: tbkrav@mail.ru

Julia O. Goncharova, junior researcher of the laboratory of anthrax microbiology, State Research 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

Ksenia V. Khlopova, junior researcher of the laboratory of anthrax microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: xlopova.12@yandex.ru

Vitaliy S. Timofeev, PhD (Biology), leading researcher of the laboratory of anthrax microbiology, 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@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии и человеческая ДНК на рисунках Леонардо да Винчи

Команда ученых из Австрии и Италии посредством геномного подхода Naporogе обнаружила, что на работах художника преобладают сообщества бактерий *Gamma*proteobacteria отряда Pseudomonadales. По-видимому, часть микроорганизмов была занесена реставраторами, а часть – очень давно мухами. Обнаружено также большое количество человеческой ДНК.

Обнаруженные микроорганизмы не связаны с их географическим происхождением (Корсинская библиотека Рима).

Полагают, что новый подход будет перспективен для создания аналога отпечатка пальца для каждого рисунка.

Piñar G. et al. *The Microbiome of Leonardo da Vinci's Drawings: A Bio-Archive of Their History*. *Front Microbiol*. 2020;11:593401.

