

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-95-102

УДК 616.98:578.824.11

Ю.О. Гончарова, И.В. Бахтеева, Р.И. Миронова, А.Г. Богун, К.В. Хлопова, В.С. Тимофеев

МУЛЬТИЛОКУСНОЕ СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ГОСУДАРСТВ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск, Российская Федерация

Цель – генотипирование методом мультислокусного сиквенс-типирования (MLST) и проведение филогенетического анализа выборки из 40 штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных на территории России и сопредельных государств. **Материалы и методы.** В работе осуществлена сборка последовательностей семи генов домашнего хозяйства штаммов *B. anthracis* на основе данных полногеномного секвенирования нового поколения, после чего описаны выявленные мутации и их координаты. Полученные последовательности использованы для генотипирования исследуемой выборки методом MLST. Результаты сравнены с данными, представленными в базе данных PubMLST. Филогенетический анализ проведен для слитых *in silico* последовательностей семи локусов выявленных сиквенс-типов. Для построения дендрограмм использован программный пакет MEGA 7.0. **Результаты и обсуждение.** В исследованной выборке обнаружено два сиквенс-типа (ST): 35 штаммов относились к ST-1, а пять штаммов, отличающихся одной общей мутацией в локусе *glpF*, – к ST-3 (согласно кодировке PubMLST), что подчеркивает генетическую обособленность данной группы штаммов. У одного штамма обнаружена уникальная мутация в гене *gmk*, находящаяся за пределами участка локуса, используемого для MLST.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, MLST, генотипирование.

Корреспондирующий автор: Гончарова Юлия Олеговна, e-mail: info@obolensk.org.

Для цитирования: Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Богун А.Г., Хлопова К.В., Тимофеев В.С. Мультислокусное сиквенс-типирование штаммов сибиреязвеного микроба, выделенных на территории России и сопредельных государств. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:95–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-95-102

Поступила 29.12.2020. Отправлена на доработку 22.01.2021. Принята к публ. 04.02.2021.

Yu.O. Goncharova, I.V. Bakhteeva, R.I. Mironova, A.G. Bogun, K.V. Khlopova, V.S. Timofeev

Multilocus Sequence-Typing of Anthrax Microbe Strains Isolated in Russia and Neighboring Countries

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. Objective – genotyping by multilocus sequence-typing (MLST) and phylogenetic analysis of 40 *Bacillus anthracis* strains isolated in Russia and neighboring countries. **Materials and methods.** In this study, the sequences of seven housekeeping genes of *B. anthracis* strains were assembled based on the data of a whole genome new generation sequencing, after which the identified mutations and their coordinates were described. The obtained sequences were used for genotyping of the investigated sample using the MLST method. The results are compared with the data presented in PubMLST database. A phylogenetic analysis was performed for the *in silico* fused sequences of the seven loci of the identified sequence types. The MEGA 7.0 software package was used to build the dendrograms. **Results and discussion.** Two sequence types (ST) have been found in the examined sample: 35 strains belong to ST-1, and five strains that differed by one common mutation at the *glpF* locus – to ST-3 (according to PubMLST coding), which emphasizes the genetic separation of this group of strains. One strain has a unique mutation in the *gmk* gene located outside the region used for MLST.

Key words: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, MLST, genotyping.

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

Corresponding author: Yulia O. Goncharova, e-mail: info@obolensk.org.

Citation: Goncharova Yu.O., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Bogun A.G., Khlopova K.V., Timofeev V.S. Multilocus Sequence-Typing of Anthrax Microbe Strains Isolated in Russia and Neighboring Countries. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 1:95–102. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-95-102

Received 29.12.2020. Revised 22.01.2021. Accepted 04.02.2021.

Goncharova Yu.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1682-8788>
Bakhteeva I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6897-3613>
Mironova R.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5710-4746>

Bogun A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5454-2459>
Khlopova K.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7611-3608>
Timofeev V.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9501-1380>

Группа *Bacillus cereus*, также известная как *B. cereus sensu lato* или *B. cereus complex*, состоит из девяти близкородственных видов: собственно *B. cereus* (*B. cereus sensu stricto*), *B. anthracis*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. weihenstephanensis* и *B. wiedmannii* [1]. Большая часть ее представителей патогенна

для тех или иных групп животных, при этом спектр хозяев и тяжесть вызываемых инфекций значительно различаются. Наиболее эпидемически значимым является *B. anthracis*, так как вызывает сибирскую язву – высокотлетальное инфекционное заболевание, поражающее преимущественно полорогих, то есть наиболее значимую для сельского хозяйства группу

животных, а также другие виды млекопитающих, в том числе и человека [2, 3]. В связи с высокой эпидемиологической значимостью сибирской язвы, при обнаружении в исследуемом образце микроорганизмов рода *Bacillus* важно правильно и быстро определить их видовую принадлежность, а также выяснить происхождение штамма.

В то же время виды *B. cereus* complex крайне близки на генетическом уровне, в связи с чем классификация членов этой группы давно является предметом дискуссий [4]. Генетическая близость не только мешает решению теоретических вопросов систематики и эволюции *B. cereus* complex, но и усложняет индикацию патогенов как на видовом уровне, так и на уровне отдельных штаммов. Тем не менее, как минимум для индикации *B. anthracis*, разработаны многочисленные сравнительно простые в применении иммунологические и ПЦР-тесты, позволяющие получать результат «да/нет» [5].

Важно отметить, что при современном уровне развития науки в процессе эпидрасследования представляет интерес не только видовая идентификация патогена, но и дифференцирование его индивидуальных штаммов. Решение этой задачи стало возможным благодаря разработке методов генотипирования, позволяющих составить по уникальным маркерам «генетический портрет» отдельных штаммов или групп штаммов, объединенных общей эволюционной историей, для чего используются методы генотипирования различной степени разрешения.

Один из таких подходов – мультилокусное сиквенс-типирование (MLST – Multilocus sequence typing) – основан на определении нуклеотидных последовательностей участков нескольких генов «домашнего хозяйства» (то есть генов, кодирующих белки, необходимые для выполнения базовых метаболических функций клетки), локализованных на бактериальной хромосоме (чтобы избежать влияния плазмидного профиля на результаты генотипирования). Впервые метод был предложен для *Neisseria meningitidis* в 1998 г. [6]. Позднее схемы MLST были разработаны для многих других бактериальных патогенов [7–10]. Для генотипирования группы *B. cereus* также было разработано несколько схем MLST, использующих от пяти до семи локусов [4, 11–13]. Результаты генотипирования этим методом доступны в открытой базе данных – PubMLST [14], что позволяет сравнивать вновь полученные данные с результатами работ других авторов.

Наиболее широко используется схема MLST, предложенная F.G. Priest *et al.* [1, 11, 15, 16]. Она основана на определении последовательностей локусов, являющихся участками семи генов домашнего хозяйства: *glpF* (белок-посредник поглощения глицерина), *gmk* (гуанилаткиназа), *ilvD* (дегидратаза дигидроксиацетата), *pta* (фосфат-ацетилтрансфераза), *pur* (фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамид формилтрансфераза), *pusA* (пируваткарбоксилаза) и *tpi* (триозофосфатизомераза) [11]. Именно эта схема

применена для MLST исследуемой выборки.

Цель работы заключалась в генотипировании методом MLST и проведении филогенетического анализа выборки из 40 штаммов *B. anthracis*, выделенных на территории России и сопредельных государств.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использованы 40 штаммов *B. anthracis*, имеющих различное географическое происхождение (таблица). В исследуемой выборке 39 штаммов природного происхождения являются вирулентными для мышей, штамм STI-1 – авирулентный, лабораторный.

Полногеномное секвенирование. Культуры штаммов *B. anthracis* выращивали на твердой питательной среде Luria Agar (LA, Sigma-Aldrich) в течение 8–12 часов при 37 °С. Геномная ДНК выделена с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, США). Библиотеки подготовлены с помощью набора Nextera DNA Library Preparation Kit (Albiogen, Россия). Полногеномное секвенирование осуществляли с использованием приборов Illumina MiSeq и Ion Torrent PGM и соответствующих наборов реагентов: Ion PGM Reagents 400 Kit, Ion 318 Chip Kit (Life Technologies, Россия) и Miseq Reagent Kit v3 (Albiogen, Россия).

In silico анализ и MLST. Нами использована схема MLST, описанная в работе F.G. Priest *et al.* [11]. Получены сборки и исследованы последовательности следующих локусов: *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pusA*, *tpi*. Для сборки последовательностей использован программный пакет DNASTAR Lasergene (США) (<https://www.dnastar.com/>). В качестве референсного генома использовали геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: GCA_000008445.1), в соответствии с которым описывали выявленные мутации и их координаты. Полученным последовательностям локусов присваивали номера в соответствии с сервисом базы данных PubMLST [14]. На основе комбинации номеров аллелей используемых локусов определяли сиквенс-тип (далее – ST) штаммов в соответствии с работой [11] и сервисом указанной выше базы данных.

Филогенетический анализ. Для филогенетического анализа использовали слитые *in silico* последовательности семи локусов выявленных сиквенс-типов исследуемой выборки, а также тринадцати других известных сиквенс-типов *B. anthracis* и других видов *B. cereus* complex, используемых в работе [11] и загруженных с PubMLST [14]. Множественное выравнивание осуществляли в программе ClustalW. Для построения дендрограмм использовали программный пакет MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>). Дендрограммы построены с использованием метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Достоверность топологии филогенетических древ оценивали методом bootstrap на основании анализа 1000 псевдореплик.

Штаммы *B. anthracis*, использованные в работе*B. anthracis* strains used in the study

№	Штамм Strain	Место выделения Site of isolation	Дата выделения Date of isolation	Источник Source
1	44	Н/Д N/D	Н/Д N/D	Н/Д N/D
2	1173	Ставропольский край Stavropol Territory	19.07.1995	Труп коровы Corpse of a cow
3	1183	Кабардино-Балкарская Республика Kabardino-Balkar Republic	21.07.1998	Почва Soil
4	1199	Дагестан Dagestan	30.10.1998	Материал от больного человека Material from a sick person
5	1259	Ставропольский край Stavropol Territory	27.09.2004	Мясо барана Mutton
6	1273	Волгоградская область Volgograd Region	19.09.2008	Материал от больного человека Material from a sick person
7	1298	Волгоград Volgograd	09.08.2010	Материал от больного человека Material from a sick person
8	53169	Н/Д N/D	Н/Д N/D	Н/Д N/D
9	1(14) Stavropol	Украина Ukraine	13.11.1957	Шкура козы, завезенная из Эфиопии Goat skin imported from Ethiopia
10	1030/213	Карачаево-Черкессия Karachay-Cherkess Republic	Н/Д N/D	Н/Д N/D
11	1055/38	Самарская область Samara Region	15.04.1993	Очаг сибирской язвы Anthrax outbreak
12	1056/51	Ставропольский край Stavropol Territory	21.07.1993	Труп человека Body of a human
13	11(1940)	Туркменистан Turkmenistan	24.05.1971	Труп яка Corpse of a yak
14	15(1345)	Таджикистан Tajikistan	24.05.1971	Труп коровы Corpse of a cow
15	157(B-1107)	Эстония Estonia	01.11.1978	Труп коровы Corpse of a cow
16	219/6	Узбекистан Uzbekistan	29.08.1976	Труп коровы Corpse of a cow
17	331/214	Азербайджан Azerbaijan	14.09.1979	Почва Soil
18	34(738)	Казахстан Kazakhstan	05.1972	Труп коровы Corpse of a cow
19	367/17	Тульская область Tula Region	14.07.1979	Труп человека Body of a human
20	46/27	Чечено-Ингушетия Chechen-Ingush Republic	01.07.1968	Соскоб со стены Swab from the wall
21	47/28	Чечено-Ингушетия Chechen-Ingush Republic	29.07.1968	Н/Д N/D
22	48/29	Чечено-Ингушетия Chechen-Ingush Republic	13.08.1968	Н/Д N/D
23	52/33	Чечено-Ингушетия Chechen-Ingush Republic	23.08.1968	Н/Д N/D
24	531/17	Калмыкия Kalmyk Republic	28.08.1981	Труп человека Body of a human
25	546/714	Воронежская область Voronezh Region	19.06.1982	Материал от больного человека Material from a sick person
26	555/288	Оренбургская область Orenburg Region	28.07.1982	Материал от больного человека Material from a sick person
27	592/10	Молдавия Moldavia	20.10.1982	Сточные воды кожевенного завода до очистки Tannery waste water before treatment
28	644/268	Украина Ukraine	Н/Д N/D	Почва Soil
29	68/12	Азербайджан Azerbaijan	12.08.1967	Содержимое карбункула больного человека Contents of a sick person's carbuncle
30	7(992)	Новгородская область Novgorod Region	01.06.1967	Труп коровы Corpse of a cow
31	8(2099)	Татарстан Tatarstan	01.10.1971	Труп коровы Corpse of a cow
32	822/7	Чечено-Ингушетия Chechen-Ingush Republic	27.08.1986	Содержимое карбункула больного человека Contents of a sick person's carbuncle
33	914/213	Чечено-Ингушетия Chechen-Ingush Republic	05.07.1988	Мясо Meat

Окончание таблицы / Ending of the table

№	Штамм Strain	Место выделения Site of isolation	Дата выделения Date of isolation	Источник Source
34	I-271	Полуостров Ямал Yamal Peninsula	Н/Д N/D	Труп оленя Corpse of a deer
35	I-364	Бурятия Buryatia	10.07.2008	Труп овцы Corpse of a sheep
36	3YA	Якутия Yakutia	2016	Глубокие слои почвы Deep soil layers
37	4YA	Якутия Yakutia	2017	Глубокие слои почвы Deep soil layers
38	5YA	Якутия Yakutia	2018	Глубокие слои почвы Deep soil layers
39	STI-1	Лабораторный штамм Laboratory strain	1940	Н/Д N/D
40	Yamal 2	Полуостров Ямал Yamal Peninsula	20.10.2017	Шейный лимфатический узел мертвого оленя Cervical lymph node of dead deer

Примечание: Н/Д – нет данных.

Note: N/D – no data.

Результаты и обсуждение

После сборки последовательностей локусов, используемых для MLST по [11] с помощью программного пакета DNASTAR Lasergene, выявленным аллелям локусов каждого штамма присвоены номера в соответствии с сервисом PubMLST [14], а на основе комбинации аллелей штамм относили к тому или иному сиквенс-типу в соответствии с тем же сервисом.

В исследованной выборке обнаружены два ранее описанных сиквенс-типа: ST-1 и ST-3. Большинство исследованных штаммов *B. anthracis* относятся к ST-1 (аллельный профиль: *glpF* – 1; *gmk* – 1; *ilvD* – 1; *pta* – 1; *pur* – 1; *pysA* – 1; *tpi* – 1). Пять штаммов: 44, 157(B-1107), I-364, 5YA, Yamal 2 – относятся к ST-3 (аллельный профиль: *glpF* – 2; *gmk* – 1; *ilvD* – 1; *pta* – 1; *pur* – 1; *pysA* – 1; *tpi* – 1). Выборка оказалась высокомономорфной: по 6 локусам выявлено по одному аллелю (1), и только локус *glpF* представлен двумя аллелями (1 и 2). Причем представленность этих аллелей не одинакова – аллель 2 обнаружен лишь у 5 штаммов из 40. Таким образом, из исследованной выборки выделяются 5 штаммов наличием одной однонуклеотидной замены 386 А→С в гене *glpF*. Эта нуклеотидная замена несинонимична и приводит к аминокислотной замене 129 N→T.

В численном выражении столь высокую генетическую мономорфность можно проиллюстрировать расчетом индекса биоразнообразия Симпсона (D), составляющим для данной выборки 0,224 [17]. Такое распределение по сиквенс-типам в целом отражает частоту встречаемости различных сиквенс-типов в глобальной популяции *B. anthracis*. К настоящему моменту из 640 штаммов *B. anthracis*, представленных в PubMLST [14], к ST-1 относятся 508 штаммов, к ST-2 – 19 штаммов и к ST-3 – 94 штамма. Остальные 12 сиквенс-типов (ST-134, ST-135, ST-552, ST-553, ST-933, ST-1659, ST-2006, ST-2007, ST-778, ST-1799, ST-1887 и ST-2005) представлены преимущественно одним штаммом (лишь в ST-778 входят 2 штамма, в ST-2005 – 2 штамма и 6 штаммов в ST-933). За счет

наличия «слабораспространенных» сиквенс-типов индекс Симпсона в представленной на PubMLST выборке увеличивается до 0,348, что тем не менее ниже, чем у других методов генотипирования [18]. Отсутствие в исследованной нами выборке третьего по распространенности ST-2 можно объяснить небольшим размером выборки, низкой распространенностью ST-2 или его отсутствием на территории России и сопредельных государств, где были выделены все описываемые в настоящей работе штаммы.

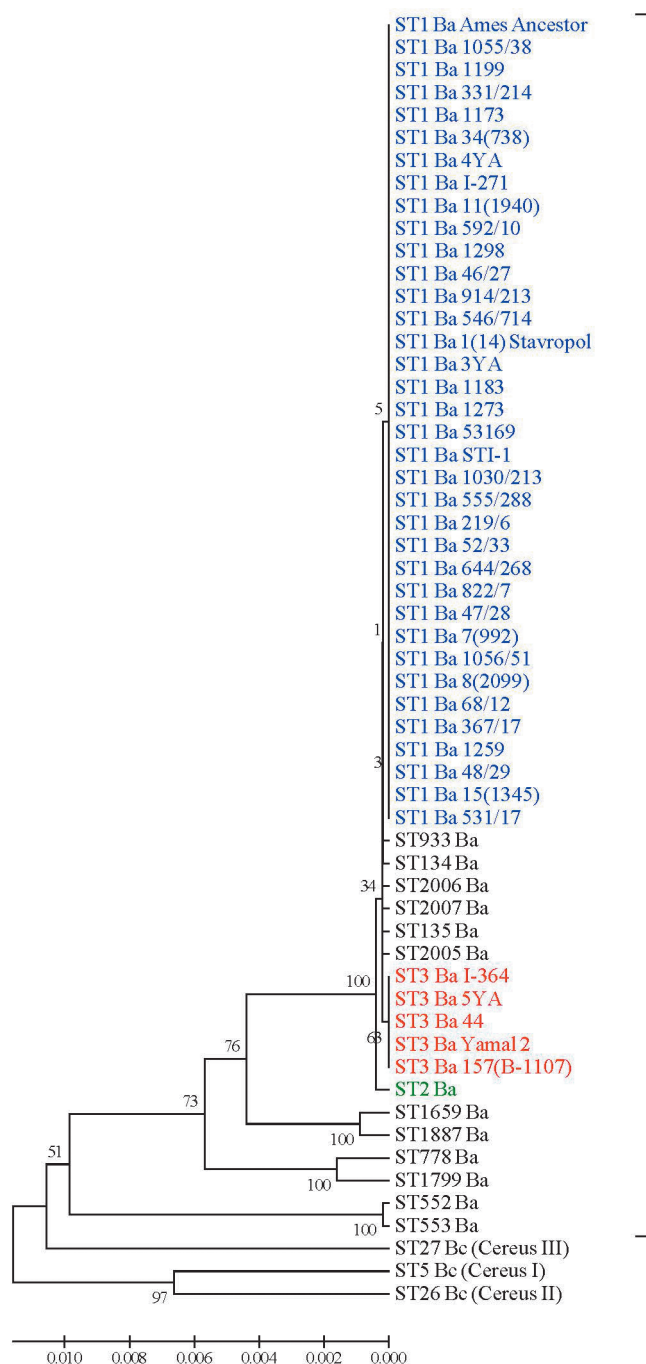
Интересно, что штаммы, отнесенные к ST-3 – 44, 157(B-1107), I-364, 5YA и Yamal 2, – оказываются сгруппированными в один кластер и при использовании других широко распространенных методов генотипирования – canSNP-типирования (Canonical Single Nucleotide Polymorphism) и MLVA (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis). В частности, они относятся к одной эволюционной линии В, обладают сходным MLVA-генотипом и крайне близкородственны по результатам полногеномного SNP-анализа, что вместе с приуроченностью мест их выделения к одному, пусть и достаточно протяженному, региону – северу Евразии – дало основания объединить их в северо-евразийский филогеографический кластер и предложить историческую модель их распространения в указанном регионе [19]. Кроме того, при исследовании аллельного полиморфизма гена одного из факторов вирулентности сибиреязвенного микроба – летального фактора – мы обнаружили, что именно у штаммов 44, 157(B-1107), I-364 и 5YA выявляется уникальная мутация (2126 А→G), приводящая к аминокислотной замене глутаминовой кислоты на глицин в положении 709 соответствующего белка [20].

Основываясь на результатах MLST-генотипирования, мы провели кластерный анализ исследуемой выборки. На рисунке изображена UPGMA-дендрограмма, построенная для слитых *in silico* последовательностей семи локусов общим размером 2829 п.н. Оба сиквенс-типа (ST-1 и ST-3), к которым отнесены исследуемые штаммы, относятся к линии сибирской язвы, принадлежащей к кладе 1, описан-

ной в работе [11]. К этой же линии принадлежат штаммы *B. anthracis*, относящиеся к тринадцати другим описанным ранее сиквенс-типам.

Также обнаружена синонимичная замена 558 T→C в гене *gmk* у штамма 219/6. Эта мутация расположена за пределами участка гена, который используется для генотипирования по [11], поэтому сведения о ее распространенности у *B. anthracis* и группы *B. cereus* complex в PubMLST [14] отсутствуют. Удалось ее обнаружить потому, что вместо секвенирования только генотипически значимых участков генов мы оперировали несравнимо более информативными данными полногеномного секвенирования. Для того чтобы оценить распространенность выявленной мутации гена *gmk*, использовали BLAST-анализ [21], который показал, что она не

уникальна для штамма 219/6. Идентичная нуклеотидная замена обнаруживается еще у 25 штаммов, представленных в GenBank, из которых 14 относятся к *B. cereus*, 9 – к *B. thuringiensis*, один штамм с неуточненной видовой принадлежностью и только один принадлежит к *B. anthracis* (штамм MCCC 1A02161). Этот единственный штамм сибирезавенного микроба с аналогичной мутацией относится к ST-778 по MLST. Более того, этот сиквенс-тип представлен в PubMLST [14] всего двумя штаммами – *B. anthracis* MCCC 1A02161 и *B. anthracis* N1ZF2, выделенными из донных отложений Южно-Китайского моря. Но нетипичное для сибирезавенного микроба место выделения штаммов и результаты анализа SNP-профиля указывают на то, что эти штаммы были отнесены к виду *B. anthracis* ошибочно [22] и, скорее



UPGMA-дендрограмма исследуемой выборки штаммов *B. anthracis*, иллюстрирующая их филогенетическое положение

Примечание: Линия сибирской язвы [11]; Ba – *B. anthracis*; Bc – *B. cereus*; ST – сиквенс-тип

UPGMA-dendrogram of the investigated sample of *B. anthracis* strains, illustrating their phylogenetic position

Note: Anthrax lineage [11]; Ba – *B. anthracis*; Bc – *B. cereus*; ST – sequence type

всего, относятся к видам *B. cereus* complex. Такая нетипичная для *B. anthracis* замена в гене *gmk* тем не менее едва ли может сама по себе указывать на принадлежность штамма 219/6 не к виду *B. anthracis*. Тем более что этот штамм абсолютно типичен по своим культуральным и фаготипическим свойствам, обладает плазмидами вирулентности *B. anthracis* и вирулентен для мышей ($LD_{50} = 10^1$ КОЕ). По всей видимости, мы имеем дело с генетическим маркером, уникальным для штамма 219/6.

B. anthracis – относительно молодой патоген, эволюционная история которого насчитывает, по общепринятым представлениям, не более нескольких десятков тысяч лет. При этом особенность его жизненного цикла – заражение животного, быстрое наращивание в нем численности за 20–40 генераций, гибель хозяина и длительное нахождение в споровой форме в почве годами, десятилетиями и даже столетиями до нового цикла заражения – привели к тому, что за свой эволюционный путь *B. anthracis* прошел относительно небольшое число циклов клеточного деления и не успел накопить большое число мутаций, которые обеспечили бы заметное генетическое разнообразие [23]. К тому же специфичность сибиреязвенного микроба в отношении преимущественно копытных травоядных, то есть наиболее используемых человеком животных, привела к тому, что *B. anthracis* мог распространяться на значительные расстояния синантропно, вместе с перегоняемым скотом и/или перевозимыми товарами животного происхождения (кожа, шерсть, упряжь и т.д.) во время массовых переселений, колонизаций, военных мероприятий и торговых операций. В результате в один регион могли быть занесены штаммы различного географического происхождения, при этом не вытесняя ранее занесенные штаммы, а наравне с ними консервируясь в почве в споровой форме.

Поэтому генетическое разнообразие *B. anthracis* в пределах одного эпидемического очага или одного географического региона может отражать не столько эволюцию патогена, сколько историю хозяйственного использования этого региона [24]. Таким образом, с одной стороны, генетическое разнообразие внутри вида *B. anthracis* оказывается сравнительно небольшим, с другой стороны, географическое распределение успевших сформироваться филогенетических групп *B. anthracis* оказывается мозаичным. В качестве яркого примера можно привести штаммы 3Ya, 4Ya, 5Ya, которые были выделены из разных слоев почвы в одном раскопе в Якутии. При этом штамм 5Ya отличается от двух остальных по *can*SNP-, MLVA- и полногеномному SNP-профилю [19] и, как показано в данной работе, по MLST-сиквенс-типу, но близкородственен штамму Yamal 2.

Реконструкция истории географического распространения филогенетических групп *B. anthracis* оказывается крайне непростой задачей. Тем не менее в некотором приближении она решается с использованием ряда широко используемых методов генотипирования *B. anthracis*. Более того, суще-

ствуют алгоритмы последовательного применения этих методов по мере увеличения их разрешающей способности. Например, PHRANA (Progressive Hierarchical Resolving Assays using Nucleic Acids) [23, 25], предполагающий последовательное определение *can*SNP-группы, MLVA-профиля и SNR-профиля (Single Nucleotide Repeat), что позволяет увеличить значение индекса Симпсона до 0,98 [25]. Последовательное использование *can*SNP-, MLVA- и SNR-типирования в PHRANA позволяет достичь большей разрешающей способности и более точного определения филогенетических паттернов в рамках вида *B. anthracis*, чем любой из этих трех видов анализов, используемых независимо [25].

MLST в пределах вида *B. anthracis* обладает не-большой разрешающей способностью. Поэтому он не используется в алгоритмах типирования, таких как PHRANA. Однако секвенирование нуклеотидных последовательностей, используемое для генотипирования методом MLST, обуславливает его преимущества по сравнению с перечисленными методами. Полученные данные хорошо воспроизводимы среди лабораторий, а широкая доступность полных последовательностей геномов различных штаммов позволяет проводить исследования *in silico*. Так, существует база данных PubMLST [14], в которой представлены MLST-профили большого количества патогенных микроорганизмов, полученные в работах по исследованию методом MLST, в том числе штаммов *B. cereus* complex и *B. anthracis* в частности.

Стоимость полногеномного секвенирования штамма вплотную приблизилась к стоимости секвенирования панели локусов, используемых для MLST. При этом использовать прочитанную последовательность генома возможно для *can*SNP-, полногеномного SNP- и MLST-анализа, а при использовании гибридных технологий секвенирования, объединяющих данные, полученные на разных аппаратных платформах, например Illumina и Nanopore, – еще и для MLVA. При этом набор локусов для MLST и их размер исследователь может подбирать исходя из своих задач. Такое расширение панели используемых последовательностей может увеличить разрешающую способность MLST и выявить если не новые крупные филогенетически значимые группы, то уникальные для отдельных штаммов маркеры, такие как замена 558 T→C в гене *gmk* у штамма 219/6 из исследованной нами выборки.

Разрешающая сила того или иного метода генотипирования напрямую связана с вариабельностью используемых маркеров, которая зависит не только от частоты возникновения мутаций, но и от влияния этих мутаций на жизнеспособность клетки. Если одонуклеотидная замена (SNP) или увеличение кратности tandemного повтора в некодирующем регионе (MLVA), скорее всего, не снизят жизнеспособность и закрепятся в популяции, то несинонимичная мутация в гене домашнего хозяйства имеет шанс повлиять на уровень экспрессии или конформацию белка, обеспечивающего основные метаболические пути клетки,

что может снизить скорость размножения бактериальных клеток и привести к элиминации мутантного генотипа. То есть генетические локусы, на которых основан метод MLST, находятся под действием стабилизирующего отбора, что, с одной стороны, снижает их вариабельность, но с другой – значительно уменьшает вероятность независимого возникновения аналогичных мутаций в филогенетически удаленных группах и увеличивает эволюционную значимость каждой мутации в них и, соответственно, филогенетическую значимость каждого MLST-сиквенс-типа. То есть MLST-сиквенс-типы можно, пусть и несколько спекулятивно, считать филогенетическими группами более высокого порядка, чем даже *can*SNP-группы, не говоря уже об MLVA-генотипах. Таким образом, методы с низким разрешением, такие как *can*SNP-типирование и MLST-генотипирование, мало значимые для санитарной эпидемиологии, тем не менее выявляют филогенетические группы более высокого порядка, что важно для реконструкции эволюционной истории вида *B. anthracis* и *B. cereus* complex в целом. Кроме того, поэтапное генотипирование разного уровня разрешения, а именно: MLST, MLVA и SNP-типирование – является одной из основных точек паспортизации штаммов.

Молекулярные методы обнаружения *B. anthracis* в образцах, основанные на ПЦР, нацелены на гены вирулентности, локализованные на плазмидах [5]. Они позволяют различать вакцинные и вирулентные штаммы, но имеют ограничения для лишенных плазмид штаммов *B. anthracis* или близкородственных видов бацилл, содержащих трансформированные плазмиды *pXO* или гены вирулентности *B. anthracis*. Например, известны изоляты *B. cereus*, способные вызвать схожие с сибирской язвой симптомы из-за наличия в их геноме плазмид вирулентности [3]. Поскольку все используемые для MLST локусы находятся на хромосоме, метод не имеет ограничений для штаммов, лишенных плазмид вирулентности, например вакцинных штаммов *B. anthracis* или штаммов *B. cereus*, содержащих в геноме эти плазмиды.

Таким образом, результаты генотипирования с использованием подходов MLST, SNP-типирования и MLVA, полученные нами и рядом авторов [19, 20], коррелируют. А результаты, полученные в этой работе, подчеркивают генетическую обособленность штаммов *B. anthracis*, выделенных нами в ST-3, поскольку ранее уже предложено отнести эти штаммы в отдельный филогенетический кластер, что особенно интересно с учетом того, что MLST используется как метод дифференцирования видов *B. cereus* complex или крупных групп штаммов [19].

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

Список литературы

1. Carroll L.M., Kovac J., Miller R.A., Wiedmann M. Rapid, high-throughput identification of anthrax-causing and emetic *Bacillus cereus* group genome assemblies via BTyper, a computational tool for virulence-based classification of *Bacillus cereus* group isolates

by using nucleotide sequencing data. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(17):e01096-17. DOI: 10.1128/AEM.01096-17.

2. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Герасимов В.Н. Сибирезвонные скотомогильники: проблемы и решения. М.: Династия; 2017. 215 с.

3. Hoffmann C., Zimmermann F., Biek R., Kuehl H., Nowak K., Mundry R., Agbor A., Angedakin S., Arandjelovic M., Blankenburg A., Brazolla G., Corogenes K., Couacy-Hymann E., Deschner T., Dieguez P., Dierks K., Dux A., Dupke S., Eshuis H., Formenty P., Yuh Y.G., Goedmakers A., Gogarten J.F., Granjon A.C., McGraw S., Grunow R., Hart J., Jones S., Junker J., Kiang J., Langergraber K., Lapuente J., Lee K., Leendertz S.A., Léguillon F., Leinert V., Lohrich T., Marrocoli S., Mätz-Rensing K., Meier A., Merkel K., Metzger S., Murai M., Niedorf S., De Nys H., Sachse A., van Schijndel J., Thiesen U., Ton E., Wu D., Wieler L.H., Boesch C., Klee S.R., Wittig R.M., Calvignac-Spencer S., Leendertz F.H. Persistent anthrax as a major driver of wildlife mortality in a tropical rainforest. *Nature.* 2017; 548(7665):82–6. DOI: 10.1038/nature23309.

4. Helgason E., Tourasse N.J., Meisal R., Caugant D.A., Kolsto A.B. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(1):191–201. DOI: 10.1128/aem.70.1.191-201.2004.

5. Agren J., Hamidjaja R.A., Hansen T., Ruuls R., Thierry S., Vigre H., Janse I., Sundstrom A., Segerman B., Koene M., Löfström C., Van Rotterdam B., Derzelle S. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *Virulence.* 2013; 4(8):671–85. DOI: 10.4161/viru.26288.

6. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(6):3140–5. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3140.

7. Enright M.C., Spratt B.G., Kalia A., Cross J.H., Bessen D.E. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. *Infect. Immun.* 2001; 69(4):2416–27. DOI: 10.1128/iai.69.4.2416-2427.2001.

8. Van Loo I.H.M., Heuvelman K.J., King A.J., Mooi F.R. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(6):1994–2001. DOI: 10.1128/jcm.40.6.1994-2001.2002.

9. Noller A.C., McEllistrem M.C., Stine O.C., Morris J.G., Jr., Boxrud D.J., Dixon B., Harrison L.H. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(2):675–9. DOI: 10.1128/jcm.41.2.675-679.2003.

10. Kotetishvili M., Stine O.C., Kreger A., Morris J.G., Sulakvelidze A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(5):1626–35. DOI: 10.1128/jcm.40.5.1626-1635.2002.

11. Priest F.G., Barker M., Baillie L.W.J., Holmes E.C., Maiden M.C.J. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 2004; 186(23):7959–70. DOI: 10.1128/jb.186.23.7959-7970.2004.

12. Sorokin A., Candelon B., Guilloux K., Galleron N., Wackrow-Kouzova N., Ehrlich S.D., Bourguet D., Sanchis V. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1569–78. DOI: 10.1128/aem.72.2.1569-1578.2006.

13. Tourasse N.J., Helgason E., Okstad O.A., Hegna I.K., Kolsto A.B. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 101(3):579–93. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03087.x.

14. PubMLST – Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. [Электронный ресурс]. URL: <https://pubmlst.org/bcereus/> (дата обращения 20.11.2020).

15. Ogawa H., Fujikura D., Ohnuma M., Ohnishi N., Hang'ombe B.M., Mimuro H., Ezaki T., Mweene A.S., Higashi H. A novel multiplex PCR discriminates *Bacillus anthracis* and its genetically related strains from other *Bacillus cereus* group species. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0122004. DOI: 10.1371/journal.pone.0122004.

16. Venkateswaran K., Singh N.K., Checinska Sielaff A., Pope R.K., Bergman N.H., van Tongeren S.P., Patel N.B., Lawson P.A., Satomi M., Williamson C., Sahl J.W., Keim P., Pierson D., Perry J. Non-toxin-producing *Bacillus cereus* strains belonging to the *B. anthracis* clade isolated from the international space station. *mSystems.* 2017; 2(3):e00021-17. DOI: 10.1128/mSystems.00021-17.

17. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/JCM.26.11.2465-2466.1988.

18. Sue D., Marston C.K., Hoffmaster A.R., Wilkins P.P. Genetic diversity in a *Bacillus anthracis* historical collection (1954 to 1988). *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(6):1777–82. DOI: 10.1128/JCM.02488-06.

19. Timofeev V., Bahtejeva I., Mironova R., Titareva G., Lev I., Christyany D., Borzilov A., Bogun A., Vergnaud G. Insights from

Bacillus anthracis strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. *PLoS One*. 2019; 4(5):e0209140. DOI: 10.1371/journal.pone.0209140.

20. 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-Оболensk»). *Бактериология*. 2019; 4(2):7–12. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-7-12.

21. BLAST. [Электронный ресурс]. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения 01.11.2020).

22. Pisarenko S.V., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Kovalev D.A., Buravtseva N.P., Aksenova L.Y., Evchenko A.Y., Semenova O.V., Bobrisheva O.V., Kuznetsova I.V., Golovinskaya T.M., Tchmerenko D.K., Kulichenko A.N., Morozov V.Y. Genotyping and phylogenetic location of one clinical isolate of *Bacillus anthracis* isolated from a human in Russia. *BMC Microbiol*. 2019; 19(1):165. DOI: 10.1186/s12866-019-1542-3.

23. Braun P., Grass G., Aceti A., Serrecchia L., Affuso A., Marino L., Grimaldi S., Pagano S., Hanczaruk M., Georgi E., Northoff B., Schöler A., Schlöter M., Antwerpen M., Fasanella A. Microevolution of anthrax from a young ancestor (M.A.Y.A.) suggests a soil-borne life cycle of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0135346. DOI: 10.1371/journal.pone.0135346.

24. Vergnaud G. *Bacillus anthracis* evolution: taking advantage of the topology of the phylogenetic tree and human history to propose dating points. *Erciyes Med. J.* 2020; 42(4):362–9. DOI: 10.14744/etd.2020.64920.

25. Keim P., Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Huynh L.Y., Wagner D.M. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect. Genet. Evol.* 2004; 4(3):205–13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005.

References

1. Carroll L.M., Kovac J., Miller R.A., Wiedmann M. Rapid, high-throughput identification of anthrax-causing and emetic *Bacillus cereus* group genome assemblies via BType, a computational tool for virulence-based classification of *Bacillus cereus* group isolates by using nucleotide sequencing data. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(17):e01096-17. DOI: 10.1128/AEM.01096-17.

2. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Shishkova N.A., Gerasimov V.N. [Anthrax Cattle Burial Grounds: Problems and Solutions]. Moscow: "Dynasty"; 2017. 215 p.

3. Hoffmann C., Zimmermann F., Biek R., Kuehl H., Nowak K., Mundry R., Agbor A., Anedakin S., Arandjelovic M., Blankenburg A., Brazzola G., Corogenes K., Couacy-Hymann E., Deschner T., Dieguez P., Dierks K., Dux A., Dupke S., Eshuis H., Formenty P., Yuh Y.G., Goedmakers A., Gogarten J.F., Granjon A.C., McGraw S., Grunow R., Hart J., Jones S., Junker J., Kiang J., Langergraber K., Lapuente J., Lee K., Leendertz S.A., Léguillon F., Leinert V., Löhrich T., Marrocoli S., Mätz-Rensing K., Meier A., Merkel K., Metzger S., Murai M., Niedorf S., De Nys H., Sachse A., van Schijndel J., Thiesen U., Ton E., Wu D., Wieler L.H., Boesch C., Klee S.R., Wittig R.M., Calvignac-Spencer S., Leendertz F.H. Persistent anthrax as a major driver of wildlife mortality in a tropical rainforest. *Nature*. 2017; 548(7665):82–6. DOI: 10.1038/nature23309.

4. Helgason E., Tourasse N.J., Meisal R., Caugant D.A., Kolsto A.B. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(1):191–201. DOI: 10.1128/aem.70.1.191-201.2004.

5. Agren J., Hamidjaja R.A., Hansen T., Ruuls R., Thierry S., Vigre H., Janse I., Sundstrom A., Segerman B., Koene M., Löfström C., Van Rotterdam B., Derzelle S. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *Virulence*. 2013; 4(8):671–85. DOI: 10.4161/viru.26288.

6. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95(6):3140–5. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3140.

7. Enright M.C., Spratt B.G., Kalish A., Cross J.H., Bessen D.E. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. *Infect. Immun.* 2001; 69(4):2416–27. DOI: 10.1128/iai.69.4.2416-2427.2001.

8. Van Loo I.H.M., Heuvelman K.J., King A.J., Mooi F.R. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(6):1994–2001. DOI: 10.1128/jcm.40.6.1994-2001.2002.

9. Noller A.C., McEllistrem M.C., Stine O.C., Morris J.G.Jr., Boxrud D.J., Dixon B., Harrison L.H. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(2):675–9. DOI: 10.1128/jcm.41.2.675-679.2003.

10. Kotetishvili M., Stine O.C., Kreger A., Morris J.G., Sulakvelidze A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(5):1626–35. DOI: 10.1128/jcm.40.5.1626-1635.2002.

11. Priest F.G., Barker M., Baillie L.W.J., Holmes E.C., Maiden M.C.J. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 2004; 186(23):7959–70. DOI: 10.1128/jb.186.23.7959-7970.2004.

12. Sorokin A., Candelon B., Guilloux K., Galleron N., Wackerow-Kouzova N., Ehrlich S.D., Bourguet D., Sanchis V. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1569–78. DOI: 10.1128/aem.72.2.1569-1578.2006.

13. Tourasse N.J., Helgason E., Okstad O.A., Hegna I.K., Kolsto A.B. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 101(3):579–93. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03087.x.

14. PubMLST – Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. (Cited: November 20, 2020). [Internet]. Available from: <https://pubmlst.org/bcereus/>.

15. Ogawa H., Fujikura D., Ohnuma M., Ohnishi N., Hang'ombe B.M., Mimuro H., Ezaki T., Mweene A.S., Higashi H. A novel multiplex PCR discriminates *Bacillus anthracis* and its genetically related strains from other *Bacillus cereus* group species. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0122004. DOI: 10.1371/journal.pone.0122004.

16. Venkateswaran K., Singh N.K., Checinska Sielaff A., Pope R.K., Bergman N.H., van Tongeren S.P., Patel N.B., Lawson P.A., Satomi M., Williamson C., Sahl J.W., Keim P., Pierson D., Perry J. Non-toxin-producing *Bacillus cereus* strains belonging to the *B. anthracis* clade isolated from the international space station. *mSystems*. 2017; 2(3):e00021-17. DOI: 10.1128/mSystems.00021-17.

17. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(11):2465–6. DOI: 10.1128/JCM.26.11.2465-2466.1988.

18. Sue D., Marston C.K., Hoffmaster A.R., Wilkins P.P. Genetic diversity in a *Bacillus anthracis* historical collection (1954 to 1988). *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(6):1777–82. DOI: 10.1128/JCM.02488-06.

19. Timofeev V., Bahtejeva I., Mironova R., Titareva G., Lev I., Christiany D., Borzilov A., Bogun A., Vergnaud G. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. *PLoS One*. 2019; 4(5):e0209140. DOI: 10.1371/journal.pone.0209140.

20. Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Миронова Р.И., Кисличкина А.А., Майская Н.В., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С. [Allelic polymorphism of the *lef* gene in anthrax pathogen strains from the State collection of pathogenic microorganisms ("GKPM-Obolensk")]. *Бактериология [Bacteriology]*. 2019; 4(2):7–12. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-7-12.

21. BLAST. (Cited: November 01, 2020). [Internet]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

22. Pisarenko S.V., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Kovalev D.A., Buravtseva N.P., Aksenova L.Y., Evchenko A.Y., Semenova O.V., Bobrisheva O.V., Kuznetsova I.V., Golovinskaya T.M., Tchmerenko D.K., Kulichenko A.N., Morozov V.Y. Genotyping and phylogenetic location of one clinical isolate of *Bacillus anthracis* isolated from a human in Russia. *BMC Microbiol*. 2019; 19(1):165. DOI: 10.1186/s12866-019-1542-3.

23. Braun P., Grass G., Aceti A., Serrecchia L., Affuso A., Marino L., Grimaldi S., Pagano S., Hanczaruk M., Georgi E., Northoff B., Schöler A., Schlöter M., Antwerpen M., Fasanella A. Microevolution of anthrax from a young ancestor (M.A.Y.A.) suggests a soil-borne life cycle of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0135346. DOI: 10.1371/journal.pone.0135346.

24. Vergnaud G. *Bacillus anthracis* evolution: taking advantage of the topology of the phylogenetic tree and human history to propose dating points. *Erciyes Med. J.* 2020; 42(4):362–9. DOI: 10.14744/etd.2020.64920.

25. Keim P., Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Huynh L.Y., Wagner D.M. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect. Genet. Evol.* 2004; 4(3):205–13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005.

Authors:

Goncharova Yu.O., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Bogun A.G., Khlopova K.V., Timofeev V.S. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Богун А.Г., Хлопова К.В., Тимофеев В.С. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org.