

DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-90-98

УДК 579.852.11:579.25

Е.И. Еременко, А.В. Никитина, А.Г. Рязанова, Г.А. Печковский

Оптимизация метода мультилокусного сиквенс-типирования генов вирулентности (MVLST) *Bacillus anthracis*

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь, Российская Федерация

В России эпидемическая ситуация по сибирской язве остается нестабильной, несмотря на достигнутые успехи в профилактике и лечении. Независимо от характера вспышки, эпидемиологическое расследование требует установления вероятного происхождения и генетического родства штамма, ее вызвавшего, что достигается при молекулярном типировании. *Bacillus anthracis* отличается высокой генетической мономорфностью, усложняющей молекулярное типирование. Вариант MLST, метод мультилокусного сиквенс-типирования генов вирулентности (MVLST) позволяет эффективно дифференцировать штаммы возбудителя. **Цель работы** – выбор оптимальной схемы MVLST для генетического типирования *B. anthracis*. **Материалы и методы.** Использовали полные геномы 49 штаммов *B. anthracis*. Для построения филограм с алгоритмом UPGMA выявляли SNP в программе PhyloViz. Вирулентность белков оценивали и отбор кодируемых генов проводили с онлайн-ресурсом «VirulentPred: Prediction of prokaryotic virulent protein». Определение индекса дискриминации D Хантера – Гастона проводили онлайн в программе Discriminatory Power Calculator. **Результаты и обсуждение.** MVLST-pXO1 включала пять генов: *lef*, *cyu*, *pagA*, *atxA*, *gerXC*, – локализованных на плазмиде токсинообразования pXO1. Типирование по схеме MVLST-pXO1 49 штаммов позволило разделить их на 21 генотип ($D=0,9209$). Схема MVLST-pXO2 охватывала четыре структурных гена капсульного полипептида: *capA*, *capB*, *capC*, *capD* – и два регуляторных гена: *acpA*, *acpB* – плазмиды капсулообразования pXO2. Типирование по схеме MVLST-pXO2 разделило 49 штаммов на 14 генотипов ($D=0,6675$). Полученная схема MVLST-15 по сравнению с MVLST-19 обеспечивала более высокую дискриминирующую силу, так как разделяла 49 штаммов *B. anthracis* на 40 генотипов ($D=0,9864$), тогда как показатели MVLST-19 составляли соответственно 33 генотипа ($D=0,9633$). Результаты показывают, что оптимальной может быть схема MVLST-15, так как обеспечивает лучшую дискриминацию штаммов *B. anthracis*, используя меньший набор локусов при сохранении классической филогенетической структуры возбудителя сибирской язвы.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, сибирская язва, MVLST, вирулентность.

Корреспондирующий автор: Еременко Евгений Иванович, e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru.

Для цитирования: Еременко Е.И., Никитина А.В., Рязанова А.Г., Печковский Г.А. Оптимизация метода мультилокусного сиквенс-типирования генов вирулентности (MVLST) *Bacillus anthracis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2026; 1:90–98. DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-90-98

Поступила 02.09.2025. Отправлена на доработку 05.11.2025. Принята к публикации 20.11.2025.

E.I. Eremenko, A.V. Nikitina, A.G. Ryazanova, G.A. Pechkovsky

Optimization of the Multilocus Sequence Typing Method for Virulence Genes of *Bacillus anthracis* (MVLST)

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. In Russia, the epidemic situation on anthrax remains unstable despite achieved progress in its prevention and treatment. Regardless of the nature of the outbreak, epidemiological investigation requires establishing the probable origin and genetic relatedness of the strain responsible, which is attained through molecular typing. *Bacillus anthracis* is characterized by high genetic monomorphism, complicating molecular typing. The MLST variant, a multilocus sequence typing method for virulence genes (MVLST), allows for effective differentiation of pathogen strains. **The aim** of this study was to select the optimal MVLST scheme for the genetic typing of *B. anthracis*. **Materials and methods.** The study used complete genomes of 49 *B. anthracis* strains. Phylogenetic trees were constructed using UPGMA algorithm through identifying SNPs with PhyloViz software. Protein virulence assessment and gene selection were performed using the online resource “VirulentPred Prediction of Prokaryotic Virulent Proteins”. The Hunter-Gaston discriminatory index (D) was calculated online using the Discriminatory Power Calculator program. **Results and discussion.** The MVLST-pXO1 scheme included 5 genes: *lef*, *cyu*, *pagA*, *atxA*, *gerXC*, located on the pXO1 toxin plasmid. Typing with the MVLST-pXO1 scheme divided 49 strains into 21 genotypes ($D=0.9209$). The MVLST-pXO2 scheme covered 6 genes: 4 structural genes of capsule polypeptide (*capA*, *capB*, *capC*, *capD*), and 2 regulatory genes (*acpA*, *acpB*) on the pXO2 capsule plasmid. Typing with this scheme distinguished 14 genotypes ($D=0.6675$) among 49 strains. The derived MVLST-15 scheme provided higher discriminatory power compared to MVLST-19, dividing 49 *B. anthracis* strains into 40 genotypes ($D=0.9864$), whereas MVLST-19 identified 33 genotypes ($D=0.9633$). These results demonstrate that the MVLST-15 scheme is optimal, as it provides better discrimination of *B. anthracis* strains using a smaller set of loci while maintaining the classical phylogenetic structure of the anthrax pathogen.

Key words: *Bacillus anthracis*, anthrax, MVLST, virulence.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Evgeny I. Eremenko, e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru.

Citation: Eremenko E.I., Nikitina A.V., Ryazanova A.G., Pechkovsky G.A. Optimization of the Multilocus Sequence Typing Method for Virulence Genes of *Bacillus anthracis* (MVLST). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2026; 1:90–98. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-90-98

Received 02.09.2025. Revised 05.11.2025. Accepted 20.11.2025.

Eremenko E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>
Nikitina A.V., ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-4544-7860>

Ryazanova A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>
Pechkovsky G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Сибирская язва, особо опасная зоонозная инфекция с мировым распространением, является проблемой для здравоохранения и ветеринарии многих стран. В России, несмотря на достигнутые успехи в профилактике и лечении, эпидемическая ситуация по сибирской язве остается нестабильной, с ежегодно регистрируемыми случаями заболевания людей и сельскохозяйственных животных. Крупная вспышка сибирской язвы среди оленей в 2016 г. в Ямало-Ненецком автономном округе привела к падежу 2650 голов скота и заболеванию 36 человек с одним летальным исходом. Осложнения возникли на фоне длительного предыдущего периода благополучия, убедительно продемонстрировав малопредсказуемый характер инфекции [1].

Возбудитель *Bacillus anthracis* относится к группе опасности А и признан патогеном с высоким потенциалом использования в качестве агента биологического оружия и биотерроризма [2]. Независимо от характера вспышки сибирской язвы – природного или искусственного, эпидемиологическое расследование требует установления вероятного происхождения и генетического родства штамма, вызвавшего вспышку, что достигается при молекулярном типировании. *B. anthracis* отличается высокой генетической мономорфностью, ограничивающей выбор методов молекулярного типирования. Применимы методы разной, но достаточной дискриминирующей силы, основанные на анализе однонуклеотидных полиморфизмов (canSNP и wgs-SNP), нескольких областей генома с варибельным числом tandemных повторов (MLVA), варибельным числом однонуклеотидных повторов (SNR). По результатам canSNP и wgs-SNP представительной коллекции изолятов *B. anthracis* определена филогенетическая структура глобальной популяции сибиреязвенного микроба, с тремя главными генетическими линиями А, В и С [3].

Метод мультилокусного сиквенс-типирования генов вирулентности (MVLST) *B. anthracis* позволяет эффективно дифференцировать штаммы возбудителя [4].

Патогенность *B. anthracis* связана с основными факторами: двумя бинарными экзотоксинами, летальным и отечным, и d-глутамилполипептидной капсулой, кодируемыми плазмидами pXO1 и pXO2 соответственно [5, 6].

Кроме плазмидных, к генам вирулентности относят ряд хромосомных генов, мутации в которых приводят к снижению вирулентности штаммов.

B. anthracis производит три фосфолипиды С (PLC), которые избыточны в своей способности стимулировать рост клеток, ассоциированных с макрофагами, и вызывают летальность у мышей [7].

Результаты исследования показали, что патогенные бактерии используют собственный оксид азота в качестве ключевой защиты от иммунного окислительного взрыва, тем самым определяя синтазу оксида азота Nos как важнейший фактор вирулентности *B. anthracis* [8].

Еще одним фактором вирулентности считают бифункциональную лизилфосфатидилглицерол флиппазу/синтазу MprF *B. anthracis*, способствующую устойчивости к катионным пептидам [9].

B. anthracis содержит ген металлопротеазы семейства энхансина (локус GBAA_RS16775), гомолог которого впервые описан у бакуловирусов, поражающих непарного шелкопряда. Энхансин повышает инфекционность вируса, разрушая муциновый слой, окружающий кишечник насекомых [10]. Можно предположить, что энхансин может подобным образом влиять на вирулентность *B. anthracis*, тем более что гомолог энхансина *B. anthracis* также обнаружен в геноме другого патогена, *Yersinia pestis* [11].

B. anthracis также содержит два гомолога иммунного ингибитора (ген *inhA*) *Bacillus thuringiensis*, металлопротеазы (BA0672 и BA1295), которые увеличивают вирулентность у насекомых за счет расщепления бактерицидных лектинов [11].

Чувство кворума (Quorum sensing) – это регуляция экспрессии бактериальных генов, критически важной для патогенеза клинически значимых инфекций, в ответ на изменение плотности клеток посредством синтеза сигнальных молекул аутоиндукторов. Показано, что *B. anthracis* имеет ген *luxS*, синтезирует функциональный аутоиндуктор чувства кворума LuxS, и мутация в гене *luxS* приводит к замедлению роста мутантного штамма по сравнению со штаммом дикого типа. Это позволяет отнести *luxS* к генам вирулентности возбудителя сибирской язвы [12].

Разрушение гена *alo* антролизина О, холестерин-зависимого цитолизина *B. anthracis* ALO, приводит к практическому отсутствию гемолитической активности. Учитывая это обстоятельство, а также роль подобных цитолизин в вирулентности других грамположительных бактерий, предполагается, что ALO играет роль в вирулентности *B. anthracis* [13].

Энтеротоксин *Bacillus cereus* вовлечен в вирулентность и регулируется плейотропным регулятором *plcR* [14]. В геноме штамма *B. anthracis* Ames также имеется белок, обозначенный как энтеротоксин (ID AAP25786.1) или как субъединица негемолитического энтеротоксина NHE (MULTISPECIES: non-hemolytic enterotoxin NHE subunit B [Bacillus]) у других штаммов *B. anthracis* (ID WP_000162971.1). Хотя функция этого белка у *B. anthracis* не установлена, можно предположить его участие в вирулентности.

К генам вирулентности можно отнести также ген компонента II аминоксидозоксиоризмат/антранилат синтазы TrpG триптофанового оперона [4, 15] и гены компонентов системы усвоения железа *B. anthracis* [16].

Первая попытка использовать анализ последовательностей генов вирулентности для молекулярного типирования *B. anthracis* предпринята в 2016 г. при расследовании вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе. Исследовали плазмидные структурные и регуляторные гены. В совокупности удалось идентифицировать от 4 до 7 типов генов *lef*, *суа*, *асрА*, *саpА* и *асрВ* и 3 типа генов *атхА*. У генов *pagR*, *саpВ*, *саpС*, *саpD* и *саpЕ* варибельности не отмечено. Использование анализа генов вирулентности позволило выявить отличия между изолятами от человека и оленя, что было достижимо только при wgsSNP-анализе [17]. Расследование другой вспышки показало идентичность MVLST-15 генотипов двух штаммов, выделенных из материала от больного и из мяса крупного рогатого скота.

Позднее подтвержден аллельный полиморфизм плазмидных генов вирулентности и проведен MVLST-анализ на основе генов вирулентности одной плазмиды рХО1 [18] и обеих плазмид рХО1, рХО2 штаммов *B. anthracis* [19, 20]. Вариант MVLST с анализом 19 генов вирулентности (9 плазмидных и 10 хромосомных) обладал высокой дискриминирующей силой, сопоставимой с таковой для wgs-SNP [4].

Таким образом, существуют несколько вариантов MVLST *B. anthracis*, отличающихся количеством анализируемых генов вирулентности и дискриминирующей способностью.

Цель работы – выбор оптимальной схемы MVLST для генетического типирования *B. anthracis*.

Материалы и методы

В работе использовали полные геномы 49 штаммов *B. anthracis*, включая 20 образцов из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и 29 штаммов из базы данных Genbank NCBI, относящихся ко всем 14 canSNP-группам. Исследовали 11 плазмидных (*lef*, *суа*, *pagA*, *атхА*, *герХС*, *саpА*, *саpВ*, *саpС*, *саpD*, *асрА*, *асрВ*) и 10 хромосомных (*ало*, *мпрF*, *GBAA_RS16775*, *plC*, *нос*, *люxS*, *трpА*, *трpD*, *трpG*, *ент*) генов. Анализ *in silico* проводили, выравнивая последовательности генов всех штаммов с последовательностями референсного штамма Ames Ancestor (адреса доступа Genbank: AE017334.2, AE017336.2, AE017335.3) в программе MEGA X. Выявленные аллели SNP всех генов штамма записывали в виде одной последовательности с обозначениями нуклеотидов и совокупность таких последовательностей всех штаммов вносили в таблицу MS Excel. Данный шаблон сохраняли в текстовом формате в MS Note и использовали в программе PhyloViz для построения

филограмм с алгоритмом UPGMA. Вирулентность белков оценивали и отбор кодируемых генов проводили с онлайн-ресурсом «VirulentPred: Prediction of prokariotic virulent protein» (<https://bioinfo.icgeb.res.in/virulent/submit.html>) [21]. Определение индекса дискриминации D Хантера – Гастона проводили онлайн в программе Discriminatory Power Calculator (http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php) [22].

Результаты и обсуждение

Оценка известных вариантов MVLST.

Сравнили описанные схемы MVLST. В схеме MVLST-рХО1 анализировали только гены вирулентности плазмиды рХО1 (*lef*, *суа*, *pagA*, *атхА*); в MVLST-рХО2 – только гены вирулентности плазмиды рХО2 (*саpА*, *саpВ*, *саpС*, *саpD*, *саpЕ*, *асрА*, *асрВ*). При анализе выборки из 99 штаммов *B. anthracis* с панелью MVLST-рХО1 выявили 20 генотипов с индексом дискриминации D=0,9038, при анализе выборки из 88 штаммов с MVLST-рХО2 индекс D составил 0,5885 [19]. Схема MVLST-19 включала 9 плазмидных (*асрА*, *атхА*, *суа*, *lef*, *pagA*, *герХС*, *саpА*, *саpС*, *саpD*) и 10 хромосомных (*мпрF*, *ентFM*, *GBAA_RS16775*, *plC*, *ало*, *нос*, *люxS*, *трpА*, *трpD*, *трpG*) генов вирулентности, при анализе 49 штаммов выделяла 33 генотипа с индексом D=0,9633 [4].

Оценка предсказуемой вирулентности белков, гены которых предполагается использовать в MVLST. Белки генов плазмидной и хромосомной локализации оценили по вирулентности, пользуясь ресурсом «VirulentPred: Prediction of prokariotic virulent protein» [20] (таблица).

Для дальнейшей работы отобрали 15 белков, оцененных как вирулентные по результатам из VirulentPred и варибельные по нашим и литературным данным.

Возможности схем MVLST с разным набором генов вирулентности. Мы оценили возможности схем MVLST, в которых анализировали гены вирулентности обеих плазмид.

1. MVLST-рХО1 включала гены летального фактора *lef*, отечного фактора *суа*, протективного антигена *pagA*, транскрипционного транс-активирующего регулятора сибирезвонного токсина *атхА*, рецептора герминации спор *герХС*, локализованные на плазмиде токсинообразования рХО1. В последовательностях этих генов выявлено 34 SNP. Типирование по схеме MVLST-рХО1 49 штаммов позволило разделить их на 21 генотип с индексом дискриминирующей силы D=0,9209. Дендрограмма филогенетической реконструкции имела прикорневое деление на ветви С и общую ветвь АВ с дальнейшим подразделением на главные линии А и В, но распределение штаммов по MVLST-рХО1-генотипам не соответствовало их распределению по canSNP-группам (рис. 1).

2. Схема MVLST-рХО2 охватывала четыре структурных гена капсульного полипептида: *саpА*,

Оценка вирулентности белков, гены которых предполагается использовать в MVLST

Virulence assessment in the proteins, the genes of which are to be used in MVLST

Обозначение и название белка Designation and name of protein	Прогнозируемые результаты Predicted results	Прогнозируемая оценка Predicted scores
Суа, отечный фактор Edema factor, Суа	Вирулентный Virulent	1,0096
PagA, протективный антиген Protective antigen, PagA	Вирулентный Virulent	1,0566
Lef, летальный фактор Lethal factor, Lef	Вирулентный Virulent	1,0252
Alo, антролизин O Anthrolysin O, Alo	Вирулентный Virulent	1,0941
АсрА, транскрипционный регулятор синтеза капсулы Capsule synthesis transcriptional regulator, АсрА	Вирулентный Virulent	1,0105
АсрВ, транскрипционный регулятор синтеза капсулы Capsule synthesis transcriptional regulator, АсрВ	Вирулентный Virulent	1,0013
АtxА, транскрипционный транс-активирующий регулятор экспрессии сибирязвенного токсина Anthrax toxin expression trans-acting transcriptional regulator, АtxА	Вирулентный Virulent	1,0955
GerХС, белок прорастания спор Spore germination protein, GerХС	Вирулентный Virulent	0,7721
СаpА, синтетаза капсульного полиглутамата Capsule polyglutamate synthase, СаpА	Вирулентный Virulent	1,0205
СаpВ, белок биосинтеза капсулы Capsule biosynthesis protein, СаpВ	Вирулентный Virulent	0,8643
СаpС, лигаза/транслоказа капсульного полиглутамат амида Capsule polyglutamate amid ligase/translocase, СаpС	Вирулентный Virulent	0,9531
СаpD, гамма-глутамилтрансфераза биосинтеза капсулы Capsule biosynthesis gamma glutamyltransferase, СаpD	Вирулентный Virulent	0,7905
TrpG, компонент II аминокислотсинтетазы/антранилат синтазы Aminodeoxychorismate-anthranilate synthase component II, TrpG	Вирулентный Virulent	1,1267
IsdX2, секретлируемый гемофор Secreted hemophor, IsdX2	Вирулентный Virulent	0,9999
SrtB, сортаза класса B Class B sortase, SrtB	Вирулентный Virulent	1,0008

capB, *capC*, *capD* – и два регуляторных гена: *асрА*, *асрВ* – плазмиды капсулообразования рХО2. В последовательностях этих генов идентифицирован 31 SNP и 1 индел в гене *асрА* из-за VNTR с единицей повтора в 9 п.н. GATAATATA с вариантами с двумя повторами, как в референсном штамме, и с тремя единицами у штаммов линий В и С. Типирование по схеме MVLST-рХО2 разделяло 49 штаммов на 14 генотипов с индексом D=0,6675. В дендрограмме филогенетической реконструкции не было четкого подразделения на главные линии А и В. Распределение штаммов по MVLST-рХО2-генотипам не соответствовало их *can*SNP-группам (рис. 2).

3. MVLST-рХО1рХО2 охватывала 11 вышеописанных плазмидных генов с 65 SNP. Типирование по этой схеме 49 штаммов позволяло разделить их на 28 генотипов с индексом D=0,9481. Дендрограмма разделялась на классические ветви А, В и С главных генетических линий, но распределение штаммов по MVLST-рХО1рХО2-генотипам не соответствовало их распределению по *can*SNP-группам (рис. 3).

4. Панель MVLST-15 объединяла 11 плазмидных и 4 хромосомных гена с 85 SNP. В MVLST-15

все гены кодировали белки, оцененные как вирулентные с прогнозируемой оценкой от 0,7721 до 1,1267. Это были гены, расположенные на токсинной плазмиде рХО1 (*lef*, *суа*, *pagA*, *atxA*, *gerXC*), капсульной плазмиде рХО2 (*capA*, *capB*, *capC*, *capD*, *асрА*, *асрВ*), и хромосомные гены (компонента II аминокислотсинтетазы/антранилат синтазы *trpG*, холестеринзависимого цитолизина антролизина O *alo*, сортазы В *srtB*, секретлируемого гемофора *isdX2*).

Типирование по этой схеме 49 штаммов позволяло разделить их на 40 генотипов с индексом D=0,9864. Дендрограмма представлена главными генетическими линиями А, В и С, но штаммы распределялись по MVLST-15-генотипам без соответствия *can*SNP-группам (рис. 4).

Для сравнения, *can*SNP-типирование с дискриминирующим индексом D=0,9107 дифференцировало эти штаммы на 14 *can*SNP-генотипов.

При конструировании схемы MVLST-15 из схемы MVLST-19 [5] были исключены хромосомные гены *mprF* (бифункциональной лизилфосфатидил-глицерол флипазы/синтетазы), *entFM* (энтеротоксина), *GBA_RS16775* (металлопротеазы семейства

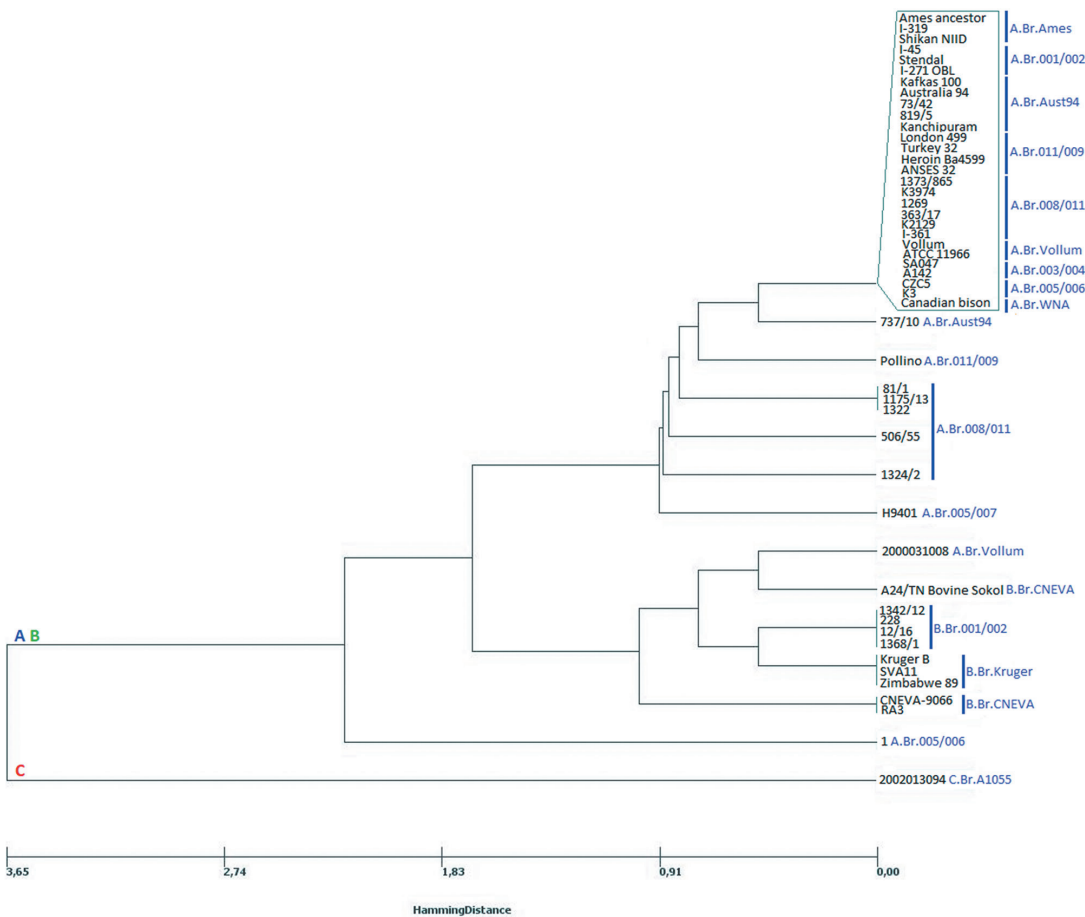


Рис. 1. Дендрограмма филогенетической реконструкции результатов молекулярного типирования 49 штаммов *B. anthracis* по схеме MVLST-pXO1

Fig. 1. Dendrogram visualizing phylogenetic reconstruction of molecular typing results for 49 *B. anthracis* strains, using the MVLST-pXO1 scheme

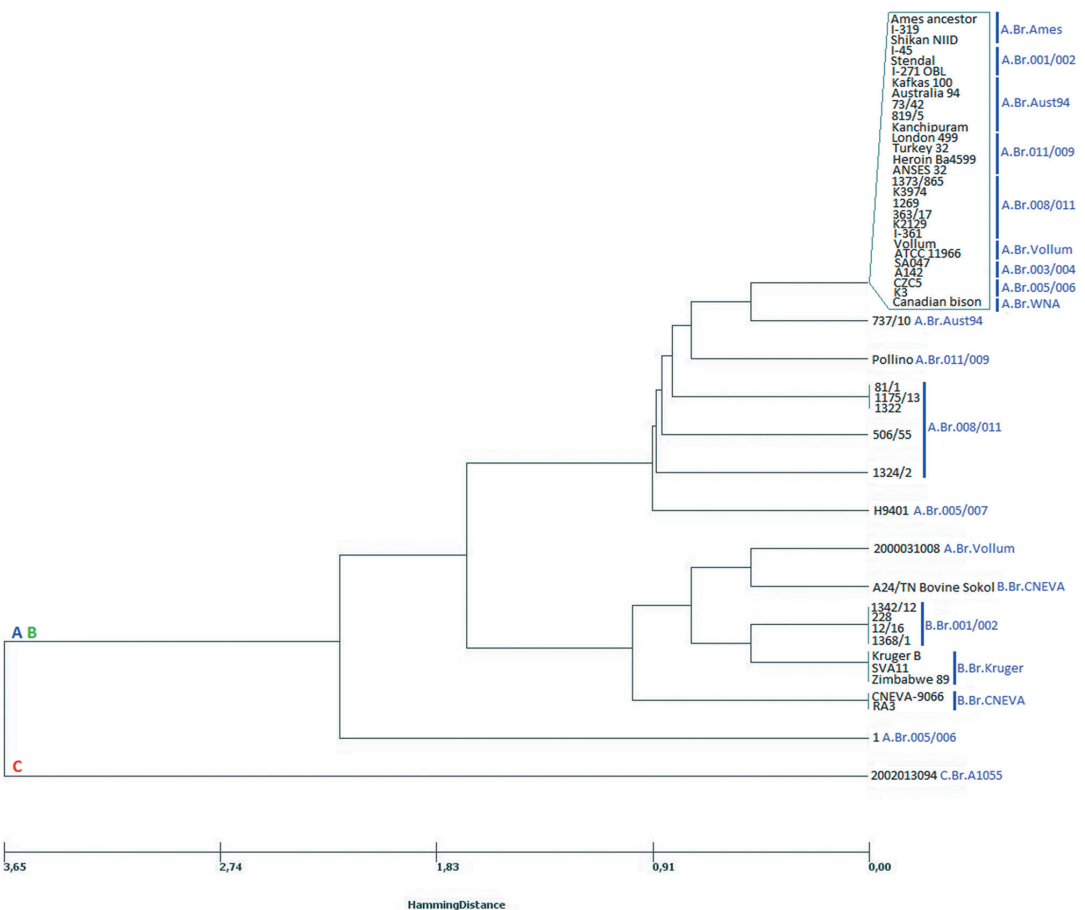


Рис. 2. Дендрограмма филогенетической реконструкции результатов молекулярного типирования 49 штаммов *B. anthracis* по схеме MVLST-pXO2

Fig. 2. Dendrogram visualizing phylogenetic reconstruction of molecular typing results for 49 *B. anthracis* strains, using the MVLST-pXO2 scheme

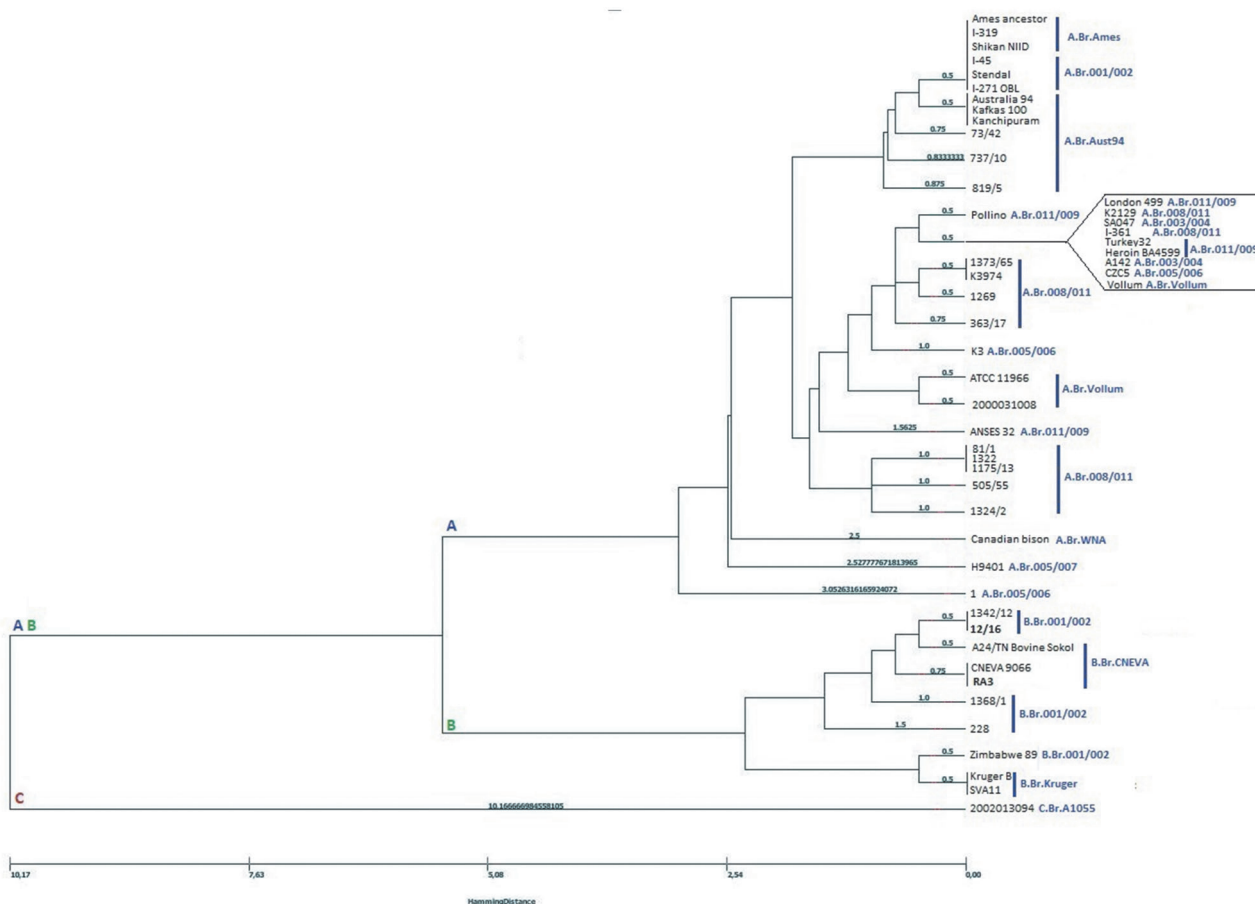


Рис. 3. Дендрограмма филогенетической реконструкции результатов молекулярного типирования 49 штаммов *B. anthracis* по схеме MVLST-pXO1pXO2

Fig. 3. Dendrogram visualizing phylogenetic reconstruction of molecular typing results for 49 *B. anthracis* strains, using the MVLST-pXO1pXO2 scheme

энхансина), *plC* (фосфолипазы C), *nos* (синтазы оксида азота), *luxS* (автоиндуктора сигнальных молекул «чувства кворума»), *trpA* (субъединицы альфа триптофансинтазы), *trpD* (антранилаг фосфорибозилтрансферазы), кодируемые которыми белки, имевшие по литературным и нашим данным отношение к вирулентности, были расценены как невирулентные в программе «VirulentPred: Prediction of prokariotic virulent protein». Дополнительно в схему включены гены сортазы *B srtB* и секретируемого гемофора *isdX2*.

Филогенетические реконструкции MVLST-pXO1-, MVLST-pXO1pXO2- и MVLST-15-генотипирования давали дендрограмму с прикорневым делением на ветви C и общую ветвь AB с последующим разделением на главные генетические линии A и B. Дендрограмма филогенетической реконструкции MVLST-pXO2 также имела прикорневое деление на ветвь C и общую ветвь AB без дальнейшего четкого подразделение на главные линии A и B. Филогенетические отношения штаммов при генотипировании по всем схемам отличались от полученных на основе wgs-SNP-типирования, как и при использовании MVLST-19 [4].

Метод мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), основанный на анализе варибельности по-

следовательностей генов «домашнего хозяйства», применяемый для типирования многих возбудителей бактериальных инфекций, оказался недостаточно эффективным для возбудителя сибирской язвы. Это может объясняться медленными темпами эволюции в силу особенностей жизненного цикла и генетической мономорфностью *B. anthracis*. Высокая дискриминирующая способность MVLST-типирования сибирезявленного микроба может свидетельствовать о существенно большей изменчивости генов вирулентности по сравнению с генами «домашнего хозяйства» и позволяет выделить генетические группы, отличающиеся от канонических SNP-групп.

Известны примеры использования метода MVLST-типирования возбудителей чумы, холеры, туберкулеза, листериоза, сальмонеллеза, стафилококковой инфекции. Этот метод может быть дополнительным методом молекулярного типирования возбудителя сибирской язвы, позволяющим дифференцировать штаммы на основе детерминант патогенности.

Схема MVLST-15 при меньшем числе анализируемых генов по сравнению с MVLST-19 обеспечивает более высокую дискриминирующую силу, так как разделяет 49 штаммов *B. anthracis* на 40 генотипов с индексом дискриминации $D=0,9864$, тогда

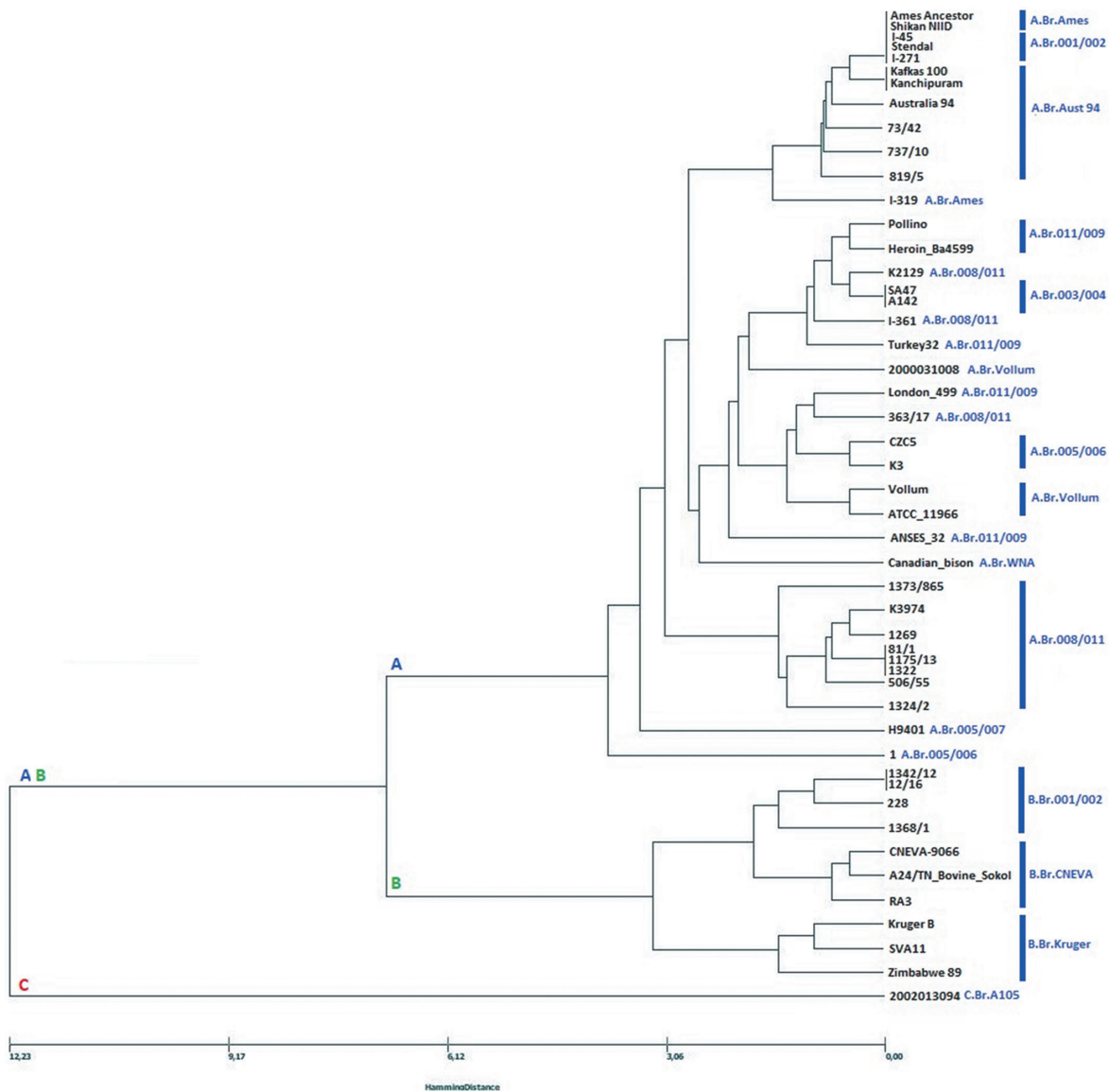


Рис. 4. Дендрограмма филогенетической реконструкции результатов молекулярного типирования 49 штаммов *B. anthracis* по схеме MVLST-15

Fig. 4. Dendrogram visualizing phylogenetic reconstruction of molecular typing results for 49 *B. anthracis* strains, using the MVLST-15 scheme

как показатели MVLST-19 составляли 33 генотипа и $D=0,9633$ соответственно.

Таким образом, полученные результаты показывают, что оптимальной может быть схема MVLST-15, так как она обеспечивает лучшую дискриминацию штаммов *B. anthracis*, используя меньший набор локусов при сохранении классической филогенетической структуры возбудителя сибирской язвы.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Куличенко А.Н. Оценка эпидемиологической и эпизоотологической обстановки по сибир-

ской язве в 2016 г., прогноз на 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; (1):21–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-21-23.

2. Rasko D.A., Worsham P.L., Abshire T.G., Stanley S.T., Bannan J.D., Wilson M.R., Langham R.J., Decker R.S., Jiang L., Read T.D., Phillippy A.M., Salzberg S.L., Pop M., Van Ert M.N., Kenefic L.J., Keim P.S., Fraser-Liggett C.M., Ravel J. *Bacillus anthracis* comparative genome analysis in support of the *Amerithrax investigation*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011; 108(12):5027–32. DOI: 10.1073/pnas.1016657108.

3. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U’Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.

4. Еременко Е.И., Печковский Г.А., Рязанова А.Г., Писаренко Н.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н. Анализ *in silico* геномов штаммов *Bacillus anthracis* главных генетических линий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023; 100(3):155–65. DOI: 10.36233/0372-9311-385.

5. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.

6. Sirard J.C., Guidi-Rontani C., Fouet A., Mock M. Characterization of a plasmid region involved in *Bacillus anthracis*

toxin production and pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000; 290(4-5):313–6. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80030-2.

7. Heffernan B.J., Thomason B., Herring-Palmer A., Shaughnessy L., McDonald R., Fisher N., Huffnagle G.B., Hanna P. *Bacillus anthracis* phospholipases C facilitate macrophage-associated growth and contribute to virulence in a murine model of inhalation anthrax. *Infect. Immun.* 2006; 74(7):3756–64. DOI: 10.1128/IAI.00307-06.

8. Shatalin K., Gusarov I., Avetisova E., Shatalina Y., McQuade L.E., Lippard S.J., Nudler E. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105(3):1009–13. DOI: 10.1073/pnas.0710950105.

9. Samant S., Hsu F.-F., Neyfakh A.A., Lee H. The *Bacillus anthracis* protein MprF is required for synthesis of lysylphosphatidylglycerols and for resistance to cationic antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 2009; 191(4):1311–9. DOI: 10.1128/JB.01345-08.

10. Lepore L.S., Roelvink P.R., Granados R.R. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol.* 1996; 68(2):131–40. DOI: 10.1006/jipa.1996.0070.

11. Read T.D., Peterson S.N., Tourasse N., Baillie L.W., Paulsen I.T., Nelson K.E., Tettelin H., Fouts D.E., Eisen J.A., Gill S.R., Holtzapple E.K., Okstad O.A., Helgason E., Rilstone J., Wu M., Kolonay J.F., Beanan M.J., Dodson R.J., Brinkac L.M., Gwinn M., DeBoy R.T., Madpu R., Daugherty S.C., Durkin A.S., Haft D.H., Nelson W.C., Peterson J.D., Pop M., Khouri H.M., Radune D., Benton J.L., Mahamoud Y., Jiang L., Hance I.R., Weidman J.F., Berry K.J., Plaut R.D., Wolf A.M., Watkins K.L., Nierman W.C., Hazen A., Cline R., Redmond C., Thwaite J.E., White O., Salzberg S.L., Thomason B., Friedlander A.M., Koehler T.M., Hanna P.C., Kolstø A.-B., Fraser C.M. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature.* 2003; 423(6935):81–6. DOI: 10.1038/nature01586.

12. Jones M.B., Blaser M.J. Detection of a luxS-signaling molecule in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 2003; 71(7):3914–9. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3914-3919.2003.

13. Shannon J.G., Ross C.L., Koehler T.M., Rest R.F. Characterization of Anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infect. Immun.* 2003; 71(6):3183–9. DOI: 10.1128/IAI.71.6.3183-3189.2003.

14. Tran S.-L., Guillemet E., Gohar M., Lereclus D., Ramarao N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *J. Bacteriol.* 2010; 192(10):2638–42. DOI: 10.1128/JB.01315-09.

15. Xie G., Keyhani N.O., Bonner C.A., Jensen R.A. Ancient origin of the tryptophan operon and the dynamics of evolutionary change. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67(3):303–42. DOI: 10.1128/MBR.67.3.303-342.2003.

16. Еременко Е.И. Система приобретения связанного с гемом железа у *Vacillus anthracis*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2017; 35(1):3–7. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-1-3-7.

17. Куличенко А.Н., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Варфоломеева Н.Г., Жиров А.М., Волынкина А.С., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Богун А.Г., Бахтеева И.В., Кисличкина А.А., Миронова Р.И., Титарева Г.М., Скрыбин Ю.П., Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю., Колбасов Д.В. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; (1):94–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99.

18. Гончарова Ю.О., Богун А.Г., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Миронова Р.И., Кравченко Т.Б., Остарков Н.А., Брушков А.В., Тимофеев В.С., Игнатов С.Г. Аллельный полиморфизм генов факторов патогенности возбудителя сибирской язвы как метод оценки микробиологических рисков при изменении климата. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2022; 58(4):338–51. DOI: 10.31857/S0555109922040055.

19. Гончарова Ю.О., Хлопова К.В., Евсеева В.В., Кравченко Т.Б., Миронова Р.И., Бахтеева И.В., Соломенцев В.И., Скрыбин Ю.П., Тимофеев В.С. MVLST-анализ штаммов *Bacillus anthracis* эволюционной линии В. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2024; 42(3):12–21. DOI: 10.17116/molgen20244203112.

20. Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Богун А.Г., Хлопова К.В., Тимофеев В.С. Мультилокусное секвенирование штаммов сибирезвеного 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.

21. Garg A., Gupta D. VirulentPred: a SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9:62. DOI: 10.1186/1471-2105-9-62.

22. Hunter P.R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(9):1903–5. DOI: 10.1128/jcm.28.9.1903-1905.1990.

References

1. Ryzanova A.G., Eremenko E.I., Aksanova L.Yu., Semenova O.V., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Kulichenko A.N. [Evaluation of epidemiological and epizootiological situation on anthrax in 2016, the forecast for 2017]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; (1):21–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-21-23.

2. Rasko D.A., Worsham P.L., Abshire T.G., Stanley S.T., Bannan J.D., Wilson M.R., Langham R.J., Decker R.S. Jiang L., Read T.D., Phillippy A.M., Salzberg S.L., Pop M., Van Ert M.N., Kenefic L.J., Keim P.S., Fraser-Liggett C.M., Ravel J. *Bacillus anthracis* comparative genome analysis in support of the *Amerithrax investigation*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108(12):5027–32. DOI: 10.1073/pnas.1016657108.

3. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.

4. Eremenko E.I., Pechkovskiy G.A., Ryzanova A.G., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Aksanova L.Yu., Semenova O.V., Kulichenko A.N. [In silico analysis of genomes of *Bacillus anthracis* strains belonging to major genetic lineages]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology].* 2023; 100(3):155–65. DOI: 10.36233/0372-9311-385.

5. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.

6. Sirard J.C., Guidi-Rontani C., Fouet A., Mock M. Characterization of a plasmid region involved in *Bacillus anthracis* toxin production and pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000; 290(4-5):313–6. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80030-2.

7. Heffernan B.J., Thomason B., Herring-Palmer A., Shaughnessy L., McDonald R., Fisher N., Huffnagle G.B., Hanna P. *Bacillus anthracis* phospholipases C facilitate macrophage-associated growth and contribute to virulence in a murine model of inhalation anthrax. *Infect. Immun.* 2006; 74(7):3756–64. DOI: 10.1128/IAI.00307-06.

8. Shatalin K., Gusarov I., Avetisova E., Shatalina Y., McQuade L.E., Lippard S.J., Nudler E. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105(3):1009–13. DOI: 10.1073/pnas.0710950105.

9. Samant S., Hsu F.-F., Neyfakh A.A., Lee H. The *Bacillus anthracis* protein MprF is required for synthesis of lysylphosphatidylglycerols and for resistance to cationic antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 2009; 191(4):1311–9. DOI: 10.1128/JB.01345-08.

10. Lepore L.S., Roelvink P.R., Granados R.R. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol.* 1996; 68(2):131–40. DOI: 10.1006/jipa.1996.0070.

11. Read T.D., Peterson S.N., Tourasse N., Baillie L.W., Paulsen I.T., Nelson K.E., Tettelin H., Fouts D.E., Eisen J.A., Gill S.R., Holtzapple E.K., Okstad O.A., Helgason E., Rilstone J., Wu M., Kolonay J.F., Beanan M.J., Dodson R.J., Brinkac L.M., Gwinn M., DeBoy R.T., Madpu R., Daugherty S.C., Durkin A.S., Haft D.H., Nelson W.C., Peterson J.D., Pop M., Khouri H.M., Radune D., Benton J.L., Mahamoud Y., Jiang L., Hance I.R., Weidman J.F., Berry K.J., Plaut R.D., Wolf A.M., Watkins K.L., Nierman W.C., Hazen A., Cline R., Redmond C., Thwaite J.E., White O., Salzberg S.L., Thomason B., Friedlander A.M., Koehler T.M., Hanna P.C., Kolstø A.-B., Fraser C.M. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature.* 2003; 423(6935):81–6. DOI: 10.1038/nature01586.

12. Jones M.B., Blaser M.J. Detection of a luxS-signaling molecule in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 2003; 71(7):3914–9. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3914-3919.2003.

13. Shannon J.G., Ross C.L., Koehler T.M., Rest R.F. Characterization of Anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infect. Immun.* 2003; 71(6):3183–9. DOI: 10.1128/IAI.71.6.3183-3189.2003.

14. Tran S.-L., Guillemet E., Gohar M., Lereclus D., Ramarao N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *J. Bacteriol.* 2010; 192(10):2638–42. DOI: 10.1128/JB.01315-09.

15. Xie G., Keyhani N.O., Bonner C.A., Jensen R.A. Ancient origin of the tryptophan operon and the dynamics of evolutionary

nary change. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67(3):303–42. DOI: 10.1128/MBR.67.3.303-342.2003.

16. Eremanko E.I. [System of acquisition of heme-bound iron in *Bacillus anthracis*]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2017; 35(1):3–7. DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-1-3-7.

17. Kulichenko A.N., Eremanko E.I., Ryazanova A.G., Akseno L.Yu., Kovalev D.A., Pisarenko S.V., Varfolomeeva N.G., Zhironov A.M., Volynkina A.S., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Bogun A.G., Bakhteeva I.V., Kislichkina A.A., Mironova R.I., Titareva G.M., Skryabin Yu.P., Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu., Kolbasov D.V. [Biological properties and molecular-genetic characteristics of *Bacillus anthracis* strains, isolated during the outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (1):94–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99.

18. Goncharova Yu.O., Bogun A.G., Bakhtaeva I.V., Titareva G.M., Mironova R.I., Kravchenko T.V., Ostarkov N.A., Brushkov A.V., Timofeev V.S., Ignatov S.G. [Allelic polymorphism of virulence factor genes of the anthrax pathogen as a method for assessing microbiological risks in climate change]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology]*. 2022; 58(4):338–51. DOI: 10.31857/S0555109922040055.

19. Goncharova Yu.O., Khlopova K.V., Evseeva V.V., Kravchenko T.B., Mironova R.I., Bakhteeva I.V., Solomentsev V.I., Skryabin Yu.P., Timofeev V.S. [MVLST-analysis of *Bacillus anthracis* strains of the evolutionary lineage B]. *Molekulyarnaya*

Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]. 2024; 42(3):12–21. DOI: 10.17116/molgen20244203112.

20. Goncharova Yu.O., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Bogun A.G., Khlopova K.V., Timofeev V.S. [Multilocus sequence typing of anthrax strains isolated in Russia and neighboring countries]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):95–102. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-95-102.

21. Garg A., Gupta D. VirulentPred: a SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9:62. DOI: 10.1186/1471-2105-9-62.

22. Hunter P.R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(9):1903–5. DOI: 10.1128/jcm.28.9.1903-1905.1990.

Authors:

Eremanko E.I., Nikitina A.V., Ryazanova A.G., Pechkovsky G.A. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: anthraxlab.stv@mail.ru.

Об авторах:

Ереманко Е.И., Никитина А.В., Рязанова А.Г., Печковский Г.А. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: anthraxlab.stv@mail.ru.