

УДК 579.69

## АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КЛИМАТА<sup>1</sup>

© 2022 г. Ю. О. Гончарова<sup>1</sup>, \*, А. Г. Богун<sup>1</sup>, И. В. Бахтеева<sup>1</sup>, Г. М. Титарева<sup>1</sup>, Р. И. Миронова<sup>1</sup>, Т. Б. Кравченко<sup>1</sup>, Н. А. Остарков<sup>2</sup>, А. В. Брушков<sup>3,4</sup>, В. С. Тимофеев<sup>1</sup>, С. Г. Игнатов<sup>1</sup>, \*\*

<sup>1</sup>Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Серпухов, р. п. Оболенск, Московская обл., 142279 Россия

<sup>2</sup>Востокгосплан Минвостокразвития РФ, Хабаровск, 680000 Россия

<sup>3</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>4</sup>Тюменский Государственный университет, Тюмень, 625003 Россия

\*e-mail: iulia.belay@yandex.ru

\*\*e-mail: ignatov@obolensk.org

Поступила в редакцию 11.02.2022 г.

После доработки 18.02.2022 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

Климатические изменения приводят к появлению рисков возникновения особо опасных инфекций. На примере изучения аллельного полиморфизма генов факторов патогенности возбудителя сибирской язвы показана возможность оценки патогенного потенциала бактерий, что является необходимым условием оценки микробиологических рисков. Впервые исследован аллельный полиморфизм *capBCADE*-оперона (гены *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*), кодирующего белки биосинтеза капсулы *Bacillus anthracis*, и генов *acrA* и *acrB*, кодирующих регуляторы экспрессии этого оперона. У штаммов исследуемой выборки описан ряд однонуклеотидных замен (SNP): 5 SNP в гене *capB*, 3 в *capC*, 4 в *capA*, 14 в *capD*, 2 в *capE*, 15 в *acrB*, а также 7 SNP и одна инсерция в гене *acrA*. В результате выборка разбита на сиквенс-типы по каждому гену и 17 генотипов, которые являются комбинациями выявленных сиквенс-типов. Трансляция *in silico* обнаруженных аллелей исследуемых генов позволила выявить у белков CapB и CapA по 3 изоформы, у белков CapC и CapE – по 2 изоформы, 6 изоформ у белка CapD, 5 у AcrA и 4 у AcrB. Обнаружено, что SNP *capC* 351A → G является маркером штаммов группы A.Br.Aust94. Штаммы группы A.Br.Vollum согласно результатам делятся на две подгруппы. Штаммы эволюционных линий В и С отличались от штаммов линии А наличием SNP *acrA* 853G → A. Обнаружен ранее не описанный варибельный тандемный нуклеотидный повтор – VNTR (Variable Number Tandem Repeat) в гене *acrA* и показана возможность его использования для дифференцирования и генотипирования штаммов *B. anthracis*.

**Ключевые слова:** *Bacillus anthracis*, аллельный полиморфизм генов, *capBCADE*-оперон, MLVA-генотипирование

**DOI:** 10.31857/S0555109922040055

Сценарии изменения климата прогнозируют повышение среднегодовой температуры воздуха во всем мире. Эти климатологические изменения могут иметь важные последствия возникновения микробиологических рисков. Из-за особенностей радиационно-теплового баланса Арктика больше, чем другие регионы, подвержена климатическим изменениям. Арктическая экосистема, резервуар генетического микробного разнообразия, представляет собой практически неограниченный ис-

точник микроорганизмов, которые могут взаимодействовать с людьми. Повышение температур, таяние вечной мерзлоты и морского льда и связанные с ними преобразования биосферы, в частности, ускорение микробиологических процессов, могут привести к тому, что ранее географически ограниченные заболевания смогут неожиданно возникать в экономически активных арктических зонах. Возникают риски высвобождения из вечной мерзлоты микроорганизмов, к встрече с которыми люди могут быть не готовы, в том числе возбудитель сибирской язвы. В настоящее время имеется мало информации о встречаемости в арктической зоне

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0555109922040055 для авторизованных пользователей.

фенотипов, проявляющих вирулентность. Исследуемые микробные фенотипы позволяют оценить факторы, влияющие на вирулентность штаммов в окружающей среде Арктики, а также потенциальные риски, связанные с изменениями в полярных районах в свете изменения климата [1].

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* — является спорообразующей грамположительной бактерией, которая главным образом поражает копытных млекопитающих, но может передаваться и другим теплокровным животным, в том числе и человеку [2].

Отличительной особенностью *B. anthracis* является наличие двух плазмид вирулентности — рХО1 и рХО2, обуславливающих специфичность возбудителя в отношении организма хозяина и несущих генетические детерминанты основных факторов патогенности [3]. На плазмиде рХО1 расположены гены *pagA*, *lef* и *суа*, кодирующие компоненты сибиреязвенного токсина — протективный антиген, летальный и отечный факторы [4]. На плазмиде рХО2 расположен оперон *capB-CADE*, кодирующий ферменты синтеза капсулы *B. anthracis*, состоящей из поли- $\gamma$ -D-глутаминовой кислоты [5]. Гены *cap*-оперона располагаются в следующем порядке: *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE* и кодируют соответствующие белки у *B. anthracis*: CapB, CapC, CapA, CapD, CapE [6]. Предположительно, эти белки ответственны за биосинтез капсулы, а также транспорт и прикрепление остатков D-глутаминовой кислоты на поверхности бактериальных клеток [7, 8]. На плазмиде рХО2 также локализованы гены *асрА* и *асрВ*, которые кодируют белки АсрА и АсрВ с частично перекрывающейся функцией. АсрА и АсрВ независимо положительно контролируют транскрипцию *cap*-оперона и многих других генов [5, 9]. Штаммы *B. anthracis*, имеющие в составе генома обе плазмиды, являются вирулентными для людей и животных.

Способность к формированию спор обуславливает важные особенности жизненного цикла *B. anthracis*. В состоянии споры бактериальные клетки способны пребывать в жизнеспособном состоянии десятки и сотни лет [2]. Помимо формирования почвенных очагов на месте гибели больных сибирской язвой животных, существует риск получения зараженного спорами животного сырья, такого как шерсть или шкуры, и распространения его на большие расстояния антропогенным путем. Все это привело к повсеместному распространению сибирской язвы в районах с развитым животноводством. Кроме того, существует гипотеза об антропогенном распространении спор сибирской язвы вместе с перемещением домашнего скота во времена монгольского нашествия [10].

Особенно важным является увеличение рисков появления вспышек сибирской язвы в Арктической зоне РФ, связанных с климатическими изменениями. Длительная сохраняемость спор в почве и на предметах обихода приводит к возможности возникновения вспышек данного заболевания (особенно при изменении климата), а в некоторых случаях и крупных эпизоотий, как это произошло летом 2016 г. на полуострове Ямал. Данная вспышка стала причиной гибели более 2000 северных оленей и одного человека, а также привела к заболеванию 10 человек [10, 11]. Еще одним интересным событием являлось обнаружение мумий пещерных львят в Якутии, под которыми на различной глубине в почве были выявлены как минимум три штамма вида *B. anthracis* [10].

Климатические изменения приводят к необходимости изучения причин возникновения вспышек и всестороннего исследования микроорганизма с целью предотвращения заболеваемости. Одной из сторон таких исследований является изучение вероятного происхождения штамма, вызвавшего заболевание. Для выяснения происхождения того или иного штамма микроорганизмов используется ряд молекулярных методов диагностики (филогенетические исследования).

В случае с возбудителем сибирской язвой важно учитывать, что микроорганизм возник относительно недавно (примерно 12–26 тыс. лет назад) [12] и большую часть жизненного цикла проводит в состоянии споры. Вследствие этого вид *B. anthracis* отличается слабовыраженным генетическим полиморфизмом, что не позволяет разделить его на подвиды и составляет большую сложность для филогенетических исследований. Кроме того, *B. anthracis* вместе с другими представителями рода *Bacillus* является членом группы *Bacillus cereus*, в состав которой входят девять крайне близкородственных на генетическом уровне видов [13]. Все это приводит к необходимости дифференцирования возбудителя сибирской язвы от других видов, а также выявления различий между штаммами.

В настоящее время существует ряд методов генотипирования, позволяющих составить генетический портрет штамма. К одним из основных относятся *can*SNP-генотипирование, основанное на определении нуклеотида в одном из 14 положений на хромосоме в геноме *B. anthracis* — так называемых канонических SNP (*can*SNP). С помощью этого метода глобальная популяция возбудителя сибирской язвы была разделена на три основные эволюционные линии — А, В и С, среди которых выделяют 14 *can*SNP-групп, имеющих в некоторых случаях привязку к географическому региону [14, 15]. Вторым по значимости методом можно назвать подход MLVA-генотипирования

(Multiple Locus VNTR Analysis – мультилокусный анализ вариабельных нуклеотидных тандемных повторов), основанный на определении числа тандемных повторов в ряду описанных VNTR-локусов (Variable Number Tandem Repeat – вариабельные тандемные нуклеотидные повторы), большинство из которых расположено на хромосоме [16]. При этом предложено использовать несколько локусов, имеющих плазмидную локализацию, хотя они имеют небольшую длину повтора, равную двум-трем парам нуклеотидов (п.н), что обуславливает необходимость дорогостоящего оборудования для определения числа таких повторов в локусе. В совокупности эти методы позволяют быстро и с высоким разрешением получить информацию о филогенетическом положении исследуемого штамма [14].

Поскольку *B. anthracis* является патогенным микроорганизмом, закономерно возникает вопрос о необходимости всестороннего изучения факторов его патогенности. Например, роль различных аминокислотных остатков в последовательностях белков-факторов патогенности и полиморфизм генов, кодирующих эти факторы, в глобальной популяции вида. Такой подход позволил бы не только внести вклад в изучение структур белков-факторов патогенности, но и применить полученные данные для генотипирования штаммов на основе полиморфизма изучаемых генов. В настоящий момент нет работ, в которых был бы описан полиморфизм генов факторов патогенности, расположенных на плазмиде рХО2, у штаммов *B. anthracis*.

Цель работы – описание полиморфизма генов *capBCADE*-оперона, кодирующих белки биосинтеза капсулы, и генов *aspA* и *aspB*, кодирующих регуляторные белки биосинтеза капсулы, на основе данных полногеномного секвенирования *B. anthracis*, а также использование результатов для генотипирования, дифференцирования и филогенетических исследований штаммов.

## МЕТОДИКА

**Штаммы.** В работе исследованы 77 штаммов *B. anthracis* и 2 штамма *B. cereus*, имеющих различное географическое происхождение (табл. 1). При этом 37 штаммов были выделены на территории России и сопредельных государств, и депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Другие 40 штаммов *B. anthracis*, 1 штамм *B. cereus* biovar *anthracis* и 1 штамм *B. cereus*, геномы которых депонирова-

ны в базе данных GenBank, были включены в выборку в качестве аутгруппы. Для всех исследуемых штаммов *B. anthracis* ранее была определена canSNP-группа.

**Праймеры.** В качестве ПЦР-праймеров для амплификации локуса VNTR<sub>capA</sub> использовали VNTR<sub>capAF</sub> – 5'-ATAGGGAAACAACATAATATAAA-3' и VNTR<sub>capAR</sub> – 5'-TATTTGCTTGCAAAGATTCCSTA-3'.

**Полногеномное секвенирование.** Культуры штаммов *B. anthracis* выращивали на твердой питательной среде ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ, Россия) в течение 12 ч при 37°C. Геномная ДНК была выделена с помощью набора “Genomic DNA Purification Kit” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Библиотеки были подготовлены с помощью набора “Nextera DNA Library Preparation Kit” (“Illumina”, США). Полногеномное секвенирование осуществляли с использованием приборов “MiSeq” (“Illumina”, США) и “Ion Torrent PGM” (“Thermo Fisher Scientific”, США) и соответствующих наборов реагентов: “Miseq Reagent Kit v3” (“Illumina”, США), “Ion PGM Reagents 400 Kit”, “Ion 318 Chip Kit” (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Обеззараживание материала проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 и МУ 1.3.2569-2009.

**Биоинформатический анализ.** Сборки нуклеотидных последовательностей исследуемых генов по результатам полногеномного секвенирования осуществляли с использованием программного пакета Lasergene (“Dnastar”, США) (dnastar.com). В качестве референсного генома, на последовательность которого осуществляли сборку, использовали геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: GCA\_000008445.1).

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

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

Филогенетический (кластерный) анализ проводили с помощью программного пакета MEGA 7.0. Филогенетические деревья (дендрограммы) были построены с использованием метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Для филогенетического анализа использовали слитые *in silico* последовательности исследуемых генов.

**MLVA-генотипирование.** MLVA-генотипирование (multiple locus variable number tandem repeats analysis) проводили согласно протоколу, описан-

Таблица 1. Перечень исследуемых штаммов и географические точки их выделения

Штамм *	Штаммы из рабочей коллекции			Штаммы из GenBank				
	Географическое происхождение	capSNP-группа	Штамм	Географическое происхождение	capSNP-группа	Географическое происхождение	capSNP-группа	Номер доступа в GenBank**
1	2	3	4	5	6	7		
I-271	ЯНАО	A.Vr.001/002	14RA5914	Германия	A.Vr.001/002	Германия	A.Vr.001/002	GCA_002277915.1
34(738)	Казахстан	A.Vr.001/002	A16	Китай	A.Vr.001/002	Китай	A.Vr.001/002	GCA_000512835.2
52/33	Чечено-Ингушетия	A.Vr.001/002	Stendal	Германия	A.Vr.001/002	Германия	A.Vr.001/002	GCA_001543225.1
1273	Волгоградская обл.	A.Vr.008/011	Tangail-1	Бангладеш	A.Vr.001/002	Бангладеш	A.Vr.001/002	GCA_001654475.1
53169	Н/Д	A.Vr.008/011	BFV	Ямайка	A.Vr.001/002	Ямайка	A.Vr.001/002	GCA_000742875.1
I(14) Stavgorol	Украина	A.Vr.008/011	BA1015	США	A.Vr.003/004	США	A.Vr.003/004	GCA_000832665.1
1030/213	Карачаево-Черкессия	A.Vr.008/011	K3	ЮАР	A.Vr.005/006	ЮАР	A.Vr.005/006	GCA_000832465.1
1056/51	Ставропольский край	A.Vr.008/011	CZC5	Замбия	A.Vr.005/006	Замбия	A.Vr.005/006	GCA_000534935.2
219/6	Узбекистан	A.Vr.008/011	A0135	Танзания	A.Vr.005/006	Танзания	A.Vr.005/006	SRR2968157
367/17	Тулская обл.	A.Vr.008/011	H9401	Корея	A.Vr.005/007	Корея	A.Vr.005/007	GCA_000258885.1
46/27	Чечено-Ингушетия	A.Vr.008/011	A2075	Танзания	A.Vr.005/006	Танзания	A.Vr.005/006	SRR2968187
47/28	Чечено-Ингушетия	A.Vr.008/011	A2079	Танзания	A.Vr.005/006	Танзания	A.Vr.005/006	SRR2968188
48/29	Чечено-Ингушетия	A.Vr.008/011	Larissa	Греция	A.Vr.008/011	Греция	A.Vr.008/011	GCA_001277955.1
531/17	Калмыкия	A.Vr.008/011	Turkey32	Турция	A.Vr.008/011	Турция	A.Vr.008/011	GCA_000833275.1
546/714	Воронежская обл.	A.Vr.008/011	A1144	Аргентина	A.Vr.011/009	Аргентина	A.Vr.011/009	GCA_000875715.1
555/288	Оренбургская обл.	A.Vr.008/011	Pollino	Италия	A.Vr.011/009	Италия	A.Vr.011/009	GCA_000831505.1
644/268	Украина	A.Vr.008/011	London 499	Великобритания	A.Vr.011/009	Великобритания	A.Vr.011/009	GCA_003227955.1
68/12	Азербайджан	A.Vr.008/011	Shikan-NIID	Япония	A.Vr.Ames	Япония	A.Vr.Ames	GCA_002356575.1
7(992)	Новгородская область	A.Vr.008/011	Ames Ancestor	США	A.Vr.Ames	США	A.Vr.Ames	GCA_000008445.1
8(2099)	Татарстан	A.Vr.008/011	A0248	США	A.Vr.Ames	США	A.Vr.Ames	GCA_000022865.1
914/213	Чечено-Ингушетия	A.Vr.008/011	A2012	США	A.Vr.Ames	США	A.Vr.Ames	GCA_000006155.2
LP50/3YA	Якутия	A.Vr.008/011	Ohio ACB	США	A.Vr.Aust94	США	A.Vr.Aust94	GCA_000832505.1

Таблица 1. Окончание

Штамм *	Штаммы из рабочей коллекции			Штаммы из GenBank			
	Географическое происхождение	sanSNP-группа	Штамм	Географическое происхождение	sanSNP-группа	Номер доступа в GenBank***	
LP51/4YA	Якутия	A.Br.008/011	Kanchipuram	Индия	A.Br.Aust94	GCA_014249775.1	
1183	Кабардино-Балкарская республика	A.Br.008/011	K1285	Намибия	A.Br.008/011	SRR2071843	
1298	Волгоград	A.Br.008/011	A3716	Намибия	A.Br.Aust94	SRR2968149	
1173	Ставропольский край	A.Br.Aust94	SK-102	США	A.Br.Vollum	GCA_000832565.1	
1259	Ставропольский край	A.Br.Aust94	Vollum 1B	США	A.Br.Vollum	GCA_000832445.1	
1199	Дагестан	A.Br.Aust94	Vollum	США	A.Br.Vollum	GCA_000742895.1	
331/214	Азербайджан	A.Br.Aust94	CDC 684	США	A.Br.Vollum	GCA_000021445.1	
822/7	Чечено-Ингушетия	A.Br.Aust94	Canadian bison	Канада	A.Br.WNA	GCA_000833125.1	
11(1940)	Туркменистан	A.Br.Vollum	BA1035	ЮАР	V.Br.001/002	GCA_000832725.1	
15(1345)	Таджикистан	A.Br.Vollum	HYU01	Корея	V.Br.001/002	GCA_000725325.1	
157(B-1107)	Эстония	V.Br.001/002	SVA11	Швеция	V.Br.001/002	GCA_000583105.1	
I-364	Сибирь	V.Br.001/002	Turol 4675	Австрия	V.Br.CNEVA	GCA_001936375.1	
LP53/5YA	Якутия	V.Br.001/002	RA3	Франция	V.Br.CNEVA	GCA_000832745.1	
Yamal-2	Ямал	V.Br.001/002	BF1	Германия	V.Br.CNEVA	GCA_000295695.2	
44	Н/Д***	V.Br.CNEVA	17OD930	Швейцария	V.Br.CNEVA	GCA_006088855.1	
			Pasteur	Н/Д	A.Br.011/009	GCA_000832585.1	
			2002013094	США	C.Br.001	GCA_000832965.1	
			2000031021	США	C.Br.001	GCA_000742655.1	
			<i>B. cereus</i> BC-AK	Китай	—	GCA_002117465.1	
			<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	Кот-д'Ивуар	—	GCA_000143605.1	

\* Перечислены штаммы *B. anthracis*, если не указан другой вид; \*\* номер доступа к последовательности генома или к архиву с необработанными результатами полного секвенирования; \*\*\* Н/Д — нет данных.

ному в работе [17] с использованием сконструированных в данной работе праймеров.

ПЦР осуществляли для амплификации VNTR-локуса с использованием набора “Taq DNA Polymerase” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Состав ПЦР-смеси: 10× ПЦР-буфер; MgCl<sub>2</sub> – 2.5 мМ; дНТФ – 0.2 мМ; праймеры – по 10 пмоль каждого на реакцию; Taq-ДНК-полимераза – 1 ед.; в качестве источника матрицы добавляли по 1 мкл раствора ДНК исследуемых штаммов в ТЕ-буфере (5–20 нг); H<sub>2</sub>O – до 25 мкл. В качестве отрицательного контроля амплификации использовали ТЕ-буфер. Амплификацию проводили на приборе “T100 Thermal Cycler” (“Bio-Rad”, США).

Определение длины амплифицированного фрагмента проводили методом гель-электрофореза, рассчитывая результаты путем подсчета числа повторов в VNTR-локусе. Гель-электрофорез проводили в 3%-ном агарозном геле (“Хеликон”, Россия) в 0.5×TBE-буфере с последующим окрашиванием в водном растворе бромистого этидия (100 мг/л). Результаты регистрировали с использованием трансиллюминатора “ECX-F15.L” (“Vilber Lourmat”, Франция) при длине волны 254 нм и системы гель-документирования “Взгляд” (“Хеликон”, РФ), а также программного обеспечения “IC Measure” (“Imaging Source Europe GmbH”, Германия).

Размер фрагмента определяли с помощью маркера молекулярных масс “EZ Load 20 bp Molecular Ruler” (“Bio-Rad”, США) с использованием программы “PhotoCamptMw 99.04” (“Vilber Lourmat”, Франция).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Аллельный полиморфизм.** В работе были исследованы 77 штаммов возбудителя сибирской язвы, в том числе штаммы, выделенные на месте крупной эпизоотии среди северных оленей на полуострове Ямал (Россия) летом 2016 г. и штаммы, выделенные из вечной мерзлоты из почвы в Якутии [10, 11]. При этом в выборку также были включены штаммы *B. cereus*, содержащие рХО2-подобные плазмиды (*B. cereus* bv. *anthracis* CI и BC-AK). Такие штаммы способны вызывать схожее с сибирской язвой заболевание у человека и человекообразных обезьян [18–20].

Для штаммов исследуемой выборки на основе данных полногеномного секвенирования осуществлена сборка последовательностей генов, локализованных на плазмиде вирулентности рХО2, а именно генов *capBCADE*-оперона (*capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*), ответственного за синтез капсулы возбудителя сибирской язвы, а также генов *acrA* и

*acrB*, кодирующих регуляторные белки биосинтеза капсулы.

По результатам работы были выявлены и описаны мутации, а выборка разбита на сиквенс-типы (ST). В исследуемой выборке, состоящей из 79 штаммов, было выявлено 9 ST гена *capD* (D = 0.3546 [0.2178–0.4915]), по 5 ST генов *capA* (D = 0.2691 [0.1436–0.3947]), *acrA* (D = 0.3636 [0.2347–0.4925]) и *acrB* (D = 0.1654 [0.0542–0.2767]), 4 ST гена *capC* (D = 0.2293 [0.1073–0.3514]), 3 ST гена *capB* (D = 0.0731 [–0.0066–0.1529]), и 2 ST гена *capE* (D = 0.0491 [–0.0173–0.1155]). Выявленные ST, с указанием их отличий от ST референсного генома, которые заключаются в наличии ряда мутаций, перечислены в табл. S1–S6. Для каждого гена сиквенс-тип, к которому относится референсный штамм Ames Ancestor, обозначен как ST1. Далее нумерация велась в порядке уменьшения численности входящих в них штаммов *B. anthracis*, после чего нумеровались ST, к которым относятся штаммы *B. cereus*. При этом все ST отличались между собой нуклеотидными заменами либо инсерцией, как в случае с геном *acrA*.

Для оценки фенотипического проявления выявленного нуклеотидного полиморфизма, то есть того, является ли нуклеотидная замена в каждой выявленной позиции синонимичной или приводит к аминокислотной замене соответствующего белка, либо его инактивации из-за появления стоп-кодона, была проведена *in silico* трансляция нуклеотидных последовательностей в аминокислотные (табл. S7–S12). Координаты аминокислотных замен указаны нами для полной последовательности транслированных белков, не учитывая их пост-трансляционную модификации, которая описана только для белка CapD и заключается в отщеплении N-концевой сигнальной последовательности размером 28 аминокислотных остатков [21]. В литературе не описаны кристаллические структуры белков, кодируемых исследуемыми генами, за исключением CapD [21, 22], поэтому аминокислотные замены описаны без указания локализации в том или ином домене белка.

Распределение исследованной выборки по последовательностям транслированных белков CapB, CapC, CapA, CapD, AcrA и AcrB указано в табл. S13–S18. Распределение штаммов осуществляли аналогично тому, как это было сделано для ST-нуклеотидных последовательностей. Всего выявлено 6 изоформ белка CapD, 5 изоформ белка AcrA, 4 изоформы белка AcrB, по 3 изоформы белков CapB и CapA, и по 2 изоформы белков CapC и CapE.

В таблицах не приводятся данные для гена *capE*, так как исследованная по последовательно-

**Таблица 2.** Распределение исследуемых штаммов по генотипам на основе комбинации сиквенс-типов генов *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*, *acrA* и *acrB*

MLVST <sub>pXO2</sub> -GT	Штаммы	Кол-во штаммов
GT1	Ames Ancestor, CZC5, London_499, 14RA5914, A16, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, Ohio ACB, K3, Turkey32, BFV, Kanchipuram, A0248, A2012, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, LP50/3ya, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1273, 46/27, 52/33, 546/714, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 47/28, 48/29, 914/213, 1298	49
GT2	BF1, 17OD930, RA3, Tyrol 4675	4
GT3	1259, 331/214, 822/7, 1173	4
GT4	LP53/5YA, I-364, Yamal_2	3
GT5	Vollum 1B, Vollum, CDC 684	3
GT6	1(14)Stavropol, 555/288, 644/268	3
GT7	BA1035, SVA11	2
GT8	2000031021, 2002013094	2
GT9	44	1
GT10	Tangail-1	1
GT11	H9401	1
GT12	SK-102	1
GT13	Pollino	1
GT14	HYU01	1
GT15	157(B-1107)	1
GT16	<i>B. cereus</i> bv. <i>anthracis</i> CI	1
GT17	<i>B. cereus</i> BC-AK	1

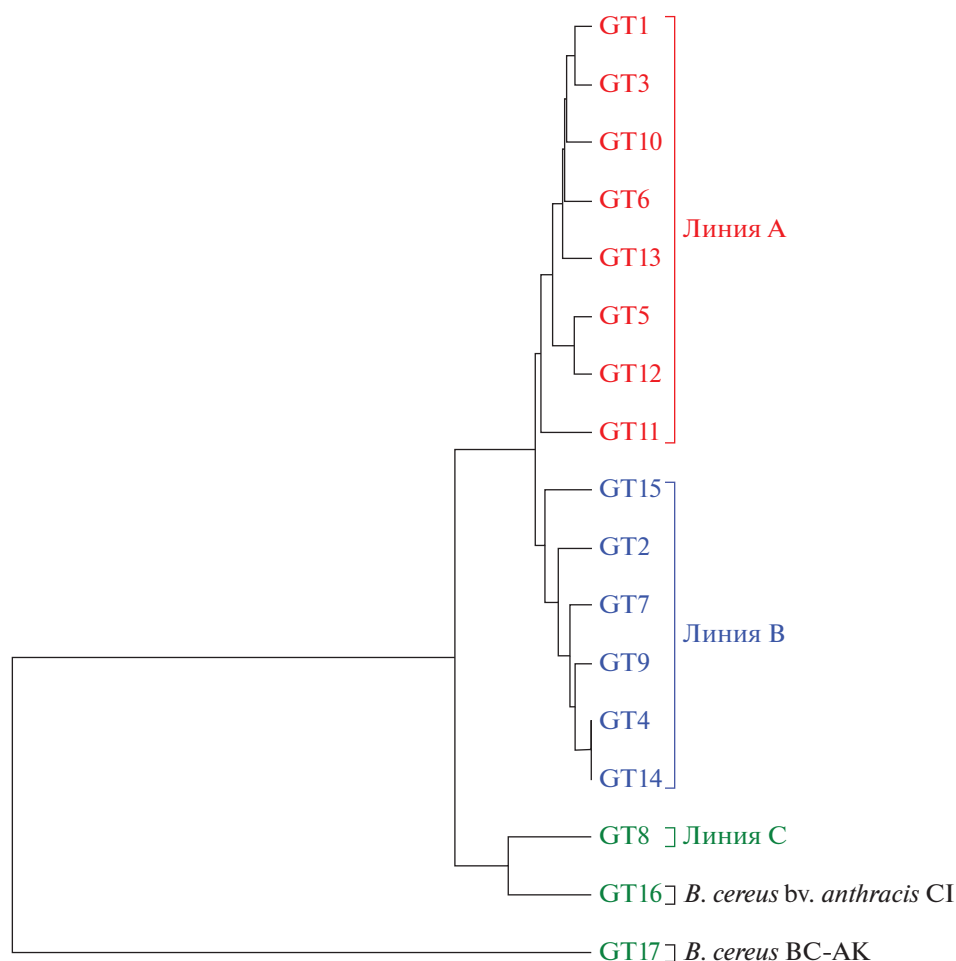
сти этого гена выборка оказалась мономорфной, за исключением штамма *B. cereus* BC-AK, у которого обнаружено две SNP – 49T → G (17L → V) и 138C → T (синонимичная). Такая низкая вариабельность может быть отчасти объяснена небольшой длиной гена *capE* (всего 144 п.н.), поскольку при равной частоте возникновения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

Распределение штаммов исследуемой выборки по генотипам (GT), каждый из которых включает определенную комбинацию ST изучаемых генов указано в табл. 2. Нумерацию генотипов осуществляли по указанному выше принципу – GT, в который вошел референсный штамм, обо-

значенный как GT1. Последующие GT нумеровались в порядке уменьшения количества штаммов, у которых они были выявлены, последние номера присвоили GT, характерным для *B. cereus*. Всего выявлено 17 GT ( $D = 0.8908 [0.8604–0.9212]$ ).

Филогенетическое дерево, отражающее отношения выявленных GT приведено на рис. 1.

Таким образом, в настоящей работе был описан аллельный полиморфизм генов капсулообразования *B. anthracis* и регуляторных генов экспрессии *cap*-оперона, локализованных на плазмиде pXO2. Были выявлены их ST и кластеризованы штаммы изучаемой выборки по GT, включающие определенный набор ST отдельных генов. То есть по сути, к возбудителю сибирской язвы был применен метод MVLST (Multi-Virulence-Locus Sequences Typ-



**Рис. 1.** UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая филогенетические отношения выявленных GT. Скобками и цветом выделены GT, принадлежащие к различным эволюционным линиям *B. anthracis*: А (красный), В (синий) и С (зеленый) или к виду *B. cereus*.

ing). Ранее этот метод был впервые применен авторами по отношению к данному микроорганизму на основе последовательностей генов токсинообразования, расположенных на плазмиде  $pXO1$ . Такая схема была обозначена как  $MVLST_{pXO1}$ -генотипирование. Соответственно, схему генотипирования, предложенную в данной работе, можно обозначить как  $MVLST_{pXO2}$ , а выявленные GT – как  $MVLST_{pXO2}$ -GT.

Анализ кластеризации исследуемой выборки на основе  $MVLST_{pXO2}$ -GT штаммов показал, что  $MVLST_{pXO2}$ -профили коррелируют с видовой принадлежностью (то есть отличаются у *B. anthracis* и *B. cereus*) и с принадлежностью к эволюционным линиям в рамках вида *B. anthracis*. Однако  $MVLST_{pXO2}$  не позволило четко разделить выборку в соответствии с принадлежностью штаммов к  $canSNP$ -группе. При этом в работе [24] была обнаружена ярко выраженная корреляция меж-

ду  $MVLST_{pXO1}$ -GT и  $canSNP$ -группами штамма, а также, в некоторых случаях их привязка к географической зоне. Надо отметить, что  $MVLST_{pXO2}$ -генотипирование, основанное на последовательностях генов, локализованных на плазмиде  $pXO2$ , обладало меньшей разрешающей способностью ( $D = 0.6148 [0.488–0.7416]$ ), по сравнению с ранее осуществленным аналогичным подходом, основанном на генах плазмиды  $pXO1$  ( $D = 0.8951 [0.8656–0.9245]$ ) [24].

Среди линии А наиболее распространен  $MVLST_{pXO2}$ -GT1, к которому принадлежат штаммы практически всех  $canSNP$ -групп. Другие GT линии А отличались от GT1 одной или двумя SNP и содержали один штамм или объединяли небольшие подгруппы штаммов одной  $canSNP$ -группы.

Исключение составлял корейский штамм H9401 ( $canSNP$ -группа A.Br.005/007), который отличался от  $MVLST_{pXO2}$ -GT1 двумя SNP –  $capD 796G \rightarrow A$



(266V → I) и *acpB* 495A → G (синонимичная). Однако однозначно считать эти два маркера специфичными для группы A.Br.005/007 едва ли возможно, так как они с такой же вероятностью могут оказаться специфичными для штамма H9401 [25]. Проверить наличие этих двух мутаций у других штаммов группы A.Br.005/007 не представлялось возможным, так как на момент написания работы не было обнаружено данных полногеномного секвенирования штаммов этой *can*SNP-группы в открытом доступе.

Кроме штамма H9401 уникальными маркерами обладали еще два штамма. Штамм Tangail-1 (A.Br.001/002) обладает SNP *capB* 230T → C (77V → A). Штамм Pollino (A.Br.011/009) отличается наличием синонимичной SNP *capC* 147T → C.

Как указано выше, в нескольких случаях уникальными маркерами обладали не только отдельные штаммы, но и небольшие группы штаммов в рамках *can*SNP-групп линии A. Так в MVLST<sub>рх02</sub>-GT3 вошли четыре штамма австралийской группы A.Br.Aust94, выделенные в Кавказском регионе – Ставропольском Крае, Чеченской республике и Азербайджане. Эти штаммы образуют отдельный GT благодаря наличию уникальной синонимичной SNP *capC* 351A → G (*capC*-ST2). Однако данный маркер отсутствует у штамма 1199 группы A.Br.Aust94, выделенного в том же регионе – в Дагестане.

Для проверки специфичности SNP *capC* 351A → G для “кавказских” штаммов A.Br.Aust94 было дополнительно проверено ее наличие в геномах 23 штаммов этой группы, выделенных в различных регионах за пределами Кавказа (табл. 3). В результате искомым SNP не удалось обнаружить ни у одного штамма дополнительной выборки. Таким образом, можно предположить, что подгруппа A.Br.Aust94 *capC* 351A → G сформировалась именно на территории Кавказа, где и циркулирует совместно с “родительской” формой, и SNP *capC* 351A → G может быть использован как маркер, наличие которого свидетельствует о регионе происхождения штамма.

*Can*SNP-группа A.Br.Vollum в исследованной выборке разделилась на три GT. Два штамма, выделенных в Средней Азии принадлежат GT1, общим для линии A. Четыре американских штамма, принадлежащих GT5 ( $n = 3$ ), отличались от GT1 наличием уникальной SNP *acpB* 1381 A → G (461I → V). Для GT5 характерно наличие только этой SNP. У GT12 ( $n = 1$ ) помимо нее обнаруживается уникальная SNP *acpB* 563C → T (188S → L). При дополнительном поиске этих SNP мы обнаружили девять штаммов дополнительной выборки группы A.Br.Vollum различного географического происхождения, принадлежащих GT1 ( $n = 4$ ) и

GT5 ( $n = 8$ ) (табл. 4). Таким образом, можно как минимум говорить о том, что группа A.Br.Vollum разделилась на две подгруппы, обладающие разными GT: GT1 (сюда входят оба штамма этой группы, выделенные на территории бывшего СССР) и GT5. GT12, видимо, является штаммоспецифичным генотипом.

Отдельно стоит остановиться на маркерах, характерных для линий B и C. Было обнаружено, что штаммы линий B и C среди всей исследуемой выборки отличаются от штаммов линии A наличием общей SNP *acpA* 853G → A.

Штаммы *can*SNP-группы B.Br.CNEVA, выделенные в Центральной Европе, обладают синонимичной SNP *capD* 234T → C. Однако, у единственного штамма этой группы из ГКПМ-Оболенск данная мутация не выявлена. К сожалению, информация о месте выделения этого штамма не сохранилась, поэтому наличие или отсутствие SNP *capD* 234T → C нельзя однозначно считать маркером, указывающим на географическое происхождение штамма. Однако в то же время, наличие этого штамма в “ГКПМ-Оболенск” с большой долей вероятности указывает на то, что данный штамм был выделен именно на территории бывшего СССР. В этом случае есть некоторые основания предполагать, что эта SNP все же обладает некоей филогеографической значимостью. Однако штамм 44 – единственный доступный штамм группы B.Br.CNEVA, у которого местом выделения не значится Центральная Европа, поэтому провести дополнительные исследования распространенности SNP *capD* 234T → C среди штаммов группы B.Br.CNEVA, выделенных за пределами этого региона, не представлялось возможным.

Эволюционная линия C (*can*SNP-группа C.Br.001) в исследованной выборке представлена двумя штаммами (2002013094 и 2000031021), выделенными на территории США. Эти штаммы имеют одинаковые нуклеотидные последовательности по всем исследуемым генам и, следовательно, попадают в один GT по результатам филогенетического анализа слитых последовательностей. По результатам проведенного в работе анализа данные штаммы оказались филогенетически ближе к *B. cereus*, чем другие штаммы исследуемой выборки. С неантрацидными (*B. cereus*) штаммами их объединяют SNP *capC* 239C → T (80T → M), *capD* 208C → T (70H → Y), *capD* 667A → G (223K → E), и *capD* 1135T → A (379F → I).

Одной из задач при написании данной работы являлось рассмотрение возбудителя сибирской язвы как одной из инфекций, возникновение вспышек которой возможно вследствие изменения климата, например, таянии вечной мерзлоты и прорастании спор штаммов, ранее находящихся в

**Таблица 3.** Дополнительная выборка штаммов группы A.Vг.Aust94 различного географического происхождения, исследованная на предмет наличия в геноме SNP *capC* 351A → G.

Номер доступа в GenBank	Наименование штамма	Место выделения
GCA_001677295	K2	Намибия
GCA_001677305	K1	Намибия
GCA_003367985	2000031103 (Strain 32)	Великобритания
GCA_003368005	2007740863 (SK57)	Великобритания
DRR000184	BA_104	Япония
DRR000186	BA_104	Япония
DRR128184	BA105	Япония
ERR930300	1409	Дания
SRR2071849	K2883	Индия
SRR2071866	K4834	Австралия
SRR2339898	2002721539	ЮАР
SRR2340304	2002734039	Великобритания
SRR2968133	A0088	ЮАР
SRR2968144	A0002	Турция
SRR2968145	A0656	КНР
SRR2968146	A0659	КНР
SRR2968155	A0083	Германия
SRR2968160	A0252	Зимбабве
SRR2968165	A0455	Мозамбик
SRR5811187	2000031009	Таиланд
SRR1739963	2000031027	США
SRR2339639	2000032893	США
SRR2339643	2002013170	США

замороженных слоях почвы [10]. Ранее рядом исследователей высказывались предположения о возможном возникновении вспышек ряда заболеваний, в том числе и сибирской язвы, вызванных изменением климата [26–28].

Штаммы, выделенные во время вспышки на Ямале, а также один из штаммов, выделенных из замороженных слоев почвы Якутии, были ранее отнесены к эволюционной линии В. Здесь, а также в предшествующих работах, в геномах этих штаммов был описан ряд мутаций, являющихся филогенетически значимыми маркерами [23, 24]. Интересной представляется находка бактерий си-

бирской язвы в аллювиальных отложениях голоцена в Якутии [10]. Хотя наиболее вероятное генетическая датировка указывала на консервацию этих штаммов в период XIII–XVI веков. Геологическое положение находки – ниже слоя сезонного протаивания, возможно, свидетельствует об их возрасте в несколько тысяч лет. Если последнее справедливо, то бактерии сибирской язвы (вероятно, в виде спор) способны предотвращать накопление мутаций в соответствии с ходом “молекулярных часов” в течение длительного сохранения в вечной мерзлоте, создавая эффект “современной ДНК у древней бактерии” [29]. Исследование таких штам-

**Таблица 4.** Распространение SNP *acpB* 563C → T и SNP *acpB* 1381A → G у дополнительной выборки штаммов группы A.Br.Vollum различного географического происхождения

Номер доступа в GenBank	Наименование штамма	Место выделения	SNP <i>acpB</i> 563C→T	SNP <i>acpB</i> 1381A→G
GCA_003045745	COVASU	Индия	–	+
SRR1739961	2000031008	США	–	+
SRR2339356	2002734255	США	–	+
SRR2339406	2002734264	США	–	+
SRR2339549	2002734276	США	–	–
SRR2339634	2002013132	Пакистан	–	–
SRR2968161	A0363	Норвегия	–	+
SRR2968162	A0380	Ирландия	–	+
SRR2968173	A0615	КНР	–	–
SRR5811120	2002734049	Великобритания	–	–

мов интересно не только с точки зрения опасности появления вспышек, являющихся следствием климатических изменений, но и для лучшего понимания эволюционной истории возбудителя сибирской язвы и других видов бацилл.

При анализе 40 штаммов *B. anthracis* и двух штаммов *B. cereus*, геномы которых депонированы в GenBank (табл. 1), в процессе MVLST<sub>рХО2</sub>-генотипирования у некоторых штаммов линии В и линии С нами была обнаружена инсерция размером девять пар нуклеотидов в гене *acpA*, которая при более детальном рассмотрении оказалась частью несовершенного тандемного повтора АТА\*\*GATA. Причем выявлено, что число повторов у штаммов эволюционной линии А равно трем, а у штаммов линии В, принадлежащих группам В.Br.001/002 ( $n = 3$ ) и В.Br.CNEVA ( $n = 4$ ) и линии С – четырем. Таким образом мы обнаружили ранее не описанный VNTR-локус в геноме возбудителя сибирской язвы на плазмиде рХО2, названный нами VNTRacpA.

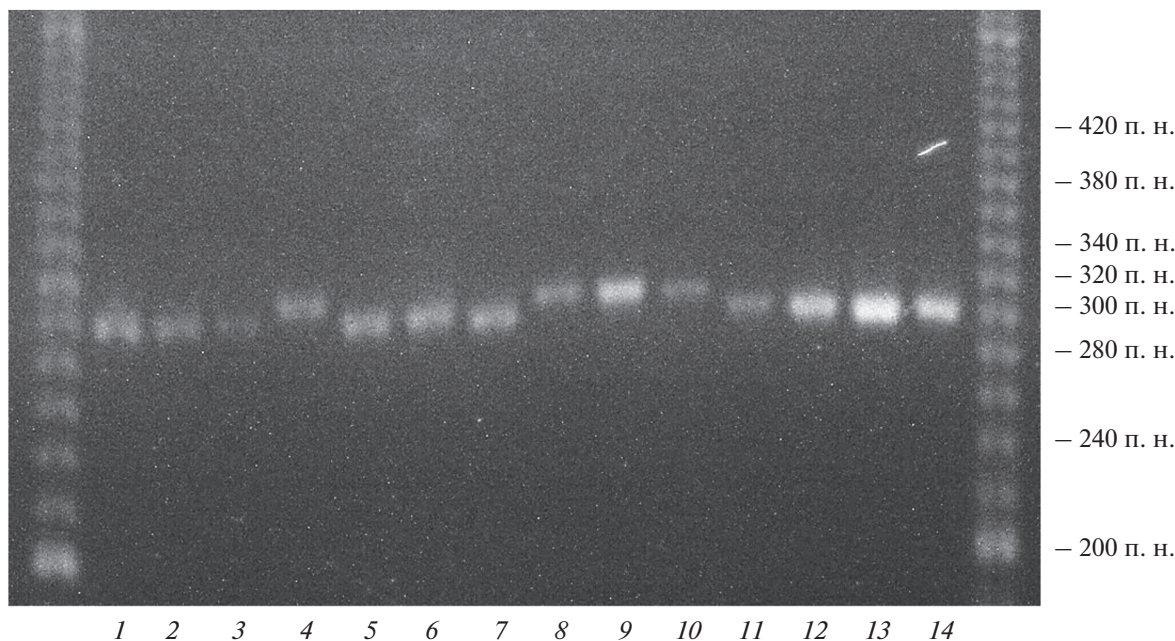
Сама по себе структура тандемных повторов обуславливает специфический характер наиболее вероятных мутаций этих локусов – инсерций и делеций определенной повторяющейся последовательности. Кроме того, частота таких событий значительно превышает среднюю частоту других мутаций в геноме [30, 31]. Поэтому наличие всего двух аллелей данного тандемного повтора в гене *acpA* в выборке из 42 филогенетически различных штаммов указывает на его низкую вариабельность. Можно предположить, что четыре повтора этого мотива были характерны для “предкового генома” вида *B. anthracis* до разделения на географически и генетически обособленные группы. Воз-

можно, снижение его кратности до трех приводило к экспрессии варианта белка AcpA, обеспечивающего штамму селективное преимущество, например, за счет более эффективной регуляции экспрессии факторов патогенности. При этом архаичная форма с четырьмя повторами сохранилась лишь у штаммов линий В и С (табл. S5).

Ранее для MLVA-генотипирования возбудителя сибирской язвы было предложено использовать ряд VNTR-локусов, в том числе расположенных на плазмиде рХО2. Однако локусы, расположенные на данной плазмиде, представляют участки повторов длиной 2–3 п.н., для определения длины которых требуется дорогостоящее оборудование [32]. Обнаруженный нами локус представляет участок, состоящий из 3 или 4 тандемных повторов длиной 9 п.н., что позволяет разделять амплифицированные фрагменты в агарозном геле.

Полученные результаты показали, что выявленный полиморфизм позволяет использовать число повторов в данном локусе как диагностический признак для дифференцирования эволюционных линий, поэтому в настоящей работе была проведена оценка возможности прикладного использования VNTRacpA для MLVA-генотипирования.

К сожалению, использованный в работе принцип сборки нуклеотидных последовательностей на основе данных полногеномного секвенирования не позволил однозначно определить число повторов в регионе VNTRacpA у штаммов из ГКПМ-Оболensk, в том числе относящихся к линии В. Поэтому были сконструированы ПЦР-праймеры, фланкирующие описанный повтор и протестированы на ДНК коллекции штаммов *B. anthracis* из



**Рис. 2.** MLVA-генотипирование штаммов *B. anthracis* из коллекции “ГКПМ-Оболенск” с использованием локуса VNTR<sub>capA</sub>. Номера дорожек соответствуют штаммам: 1 – 555/288; 2 – 7(992); 3 – 1056/51; 4 – 44; 5 – 531/17; 6 – 822/7; 7 – 1173; 8 – Yamal-2; 9 – I-364; 10 – 157(B-1107); 11 – LP50/3YA; 12 – LP50/3YA; 13 – LP51/4YA; 14 – 1183. Дорожки 4, 8, 9 и 10 соответствуют штаммам линии В.

“ГКПМ-Оболенск”, вошедших в исследуемую выборку. Был применен подход MLVA-генотипирования путем амплификации локуса VNTR<sub>capA</sub> и разделения полученных фрагментов в агарозном геле.

На рис. 2 приведен пример применения локуса VNTR<sub>capA</sub> для MLVA-типирования штаммов *B. anthracis* и дифференцирования эволюционных линий А и В. Результаты анализа с уверенностью позволили дифференцировать штаммы эволюционных линий А и В и подтвердить гипотезу о наличии двух аллелей тандемного повтора, каждая из которых специфична для двух эволюционных линий возбудителя сибирской язвы. Однако в результате проведенного анализа было выявлено, что теоретическая длина амплифицированных фрагментов отличалась от наблюдаемой. Так, теоретическая длина фрагмента, содержащего 3 тандемных повтора, составляла 245 п.н., а четыре – 254 п.н. (рис. 2). Наблюдаемые длины соответствующих фрагментов составляли 300 и 309 п.н.

\* \*

В результате проделанной работы показано, что разделение исследованной выборки на MVLST<sub>рхО2</sub>-GT соответствует ее разделению на основные эволюционные линии вида *B. anthracis*. SNP *capC* 351A → G является маркером штаммов группы А.Br.Aust94, циркулирующих в Кавказском регионе. Штаммы группы А.Br.Vollum со-

гласно результатам MVLST<sub>рхО2</sub>-генотипирования делятся на две подгруппы, одна из которых выявлена на территории бывшего СССР. Отсутствие SNP *capD* 234T → С у штаммов группы В.Br.CNEVA вероятно является маркером, указывающим на географическое происхождение штамма на территории бывшего СССР. Показана возможность применения локуса VNTR<sub>capA</sub> для дифференцирования штаммов возбудителя сибирской язвы эволюционных линий А и В путем MLVA-генотипирования. Такой подход позволяет получить результат в короткие сроки и избежать ошибок при сборке результатов секвенирования. Выявленные микробные генотипы позволяют оценить факторы, связанные с вирулентностью в окружающей среде, а также потенциальные риски, вызванные изменениями климата.

Материал подготовлен в рамках секторальной программы Роспотребнадзора.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mogrovejo-Arias D., Brill F.H.H., Wagner D.* // Environ. Earth Sci. 2020. V. 79. P. 109.
2. *Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В., Никифоров В.В.* Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: ЗАО МП “ГИГИЕНА”, 2008. 416 с.

3. *Bourgogne A., Drysdale M., Hilsenbeck S.G., Peterson S.N., Koehler T.M.* // *Infect Immun.* 2003. V. 71. № 5. P. 2736–2743.
4. *Wu G., Feng C., Cao S., Guo A., Liu Z.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 168. № 5. P. 1302–1310.
5. *Raynor M.J., Roh J.H., Widen S.G., Wood T.G., Koehler T.M.* // *Mol. Microbiol.* 2018. <https://doi.org/10.1111/mmi.13961>
6. *Candela T., Fouet A.* // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 60. № 5. P. 1091–1098.
7. *Makino S., Watarai M., Cheun H.I., Shirahata T., Uchida I.* // *J. Infect. Dis.* 2002. V. 186. P. 227–233.
8. *Makino S., Uchida I., Terakado N., Sasakawa C., Yoshikawa M.* // *J. Bacteriol.* 1989. V. 171. № 2. P. 722–730.
9. *Drysdale M., Bourgogne A., Hilsenbeck S.G., Koehler T.M.* // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 2. P. 307–315.
10. *Timofeev V., Bahtejeva I., Mironova R., Titareva G., Lev I., Christiany D. et al.*, // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 5. e0209140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209140>
11. *Симонова Е.Г., Картавая С.А., Тутков А.В., Локтионова М.Н., Раичич С.Р., Толпин В.А. и др.* // *Пробл. особо опасных инф.* 2017. № 1. С. 89–93.
12. *Kolstø A.B., Tourasse N.J., Økstad O.A.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 2009. V. 63. P. 451–476.
13. *Carroll L.M., Kovac J., Miller R.A., Wiedmann M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. V. 83. № 17. e01096-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01096-17>
14. *Keim P., Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Huynh L.Y., Wagner D.M.* // *Infect. Genet. Evol.* 2004. V. 4. № 3. P. 205–213.
15. *Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J. et al.* // *PLoS One.* 2007. V. 2. e461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>
16. *Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al.*, // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 2928–2936.
17. *Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V. et al.* // *BMC Microbiol.* 2001. V. 1. P. 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-1-2>
18. *Klee S.R., Ozel M., Appel B., Boesch C., Ellerbrok H., Jacob D. et al.* // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. № 15. P. 5333–5344.
19. *Leendertz F.H., Yumlu S., Pauli G., Boesch C., Couacy-Hymann E., Vigilant L. et al.* // *PLoS Pathog.* 2006. V. 2. № 1. e8. doi
20. *Hoffmann C., Zimmermann F., Biek R., Kuehl H., Nowak K., Mundry R. et al.* // *Nature* 2017. V. 548. № 7665. P. 82–86.
21. *Wu R., Richter S., Zhang R.G., Anderson V.J., Missiakas D., Joachimiak A.* // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 3. P. 24406–24414.
22. *Khavrutskii I.V., Legler P.M., Friedlander A.M., Wallqvist A.* // *Biochemistry.* 2014. V. 53. № 44. P. 6954–6967.
23. *Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Тутарева Г.М., Миронова Р.И., Кисличкина А.А., Майская Н.В. и др.* // *Бактериология.* 2019. Т. 4. № 2. С. 7–12.
24. *Goncharova Y., Bahtejeva I., Titareva G., Kravchenko T., Lev A., Dyatlov I., Timofeev V.* // *Pathogens.* 2021. V. 10. № 12. 1556. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121556>
25. *Derzelle S., Aguilar-Bultet L., Frey J.* // *Infect. Genet. Evol.* 2016. V. 46. P. 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.019>
26. *Hellberg R.S., Chu E.* // *Crit. Rev. Microbiol.* 2016. V. 42. № 4. P. 548–572.
27. *Rossati A.* // *Int. J. Occup. Environ. Med.* 2017. V. 8. № 1. P. 7–20.
28. *Maksimovic Z., Cornwell M.S., Semren O., Rifatbegovic M.* // *Rev. Sci. Tech.* 2017. V. 36. № 3. P. 959–963.
29. *Nickle D.C., Learn G.H., Rain M.W., Mullins J.I., Mittler J.E.* // *J. Mol. Evol.* 2002. V. 4. № 1. P. 134–137.
30. *Bichara M., Wagner J., Lambert I.B.* // *Mutat. Res.* 2006. V. 598. № 1–2. P. 144–163.
31. *Fan H., Chu J.Y.* // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2007. V. 5. № 1. P. 7–14.
32. *Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C. et al.* // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 6. e95131.

## Allelic Polymorphism of Genes of Pathogenicity Factors of the Anthrax Causative Agent as a Method for Assessing Microbiological Risks during Climate Change

**Y. O. Goncharova<sup>a,\*</sup>, A. G. Bogun<sup>a</sup>, I. V. Bahtejeva<sup>a</sup>, G. M. Titareva<sup>a</sup>, R. I. Mironova<sup>a</sup>,  
T. B. Kravchenko<sup>a</sup>, N. A. Ostarkov<sup>b</sup>, A. V. Brushkov<sup>c,d</sup>, V. S. Timofeev<sup>a</sup>, and S. G. Ignatov<sup>a,\*\*</sup>**

<sup>a</sup> State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, 142279 Russia

<sup>b</sup> Vostokgosplan of the Ministry for the Development of the Russian Far East, Khabarovsk, 680000 Russia

<sup>c</sup> Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119991 Russia

<sup>d</sup> Tyumen State University, Tyumen, 625003 Russia

\*e-mail: iulia.belay@yandex.ru;

\*\*e-mail: ignatov@obolensk.org

Climate changes lead to the emergence of the risk of particularly dangerous infections. The recent outbreak of anthrax in the Arctic (Yamalo-Nenets autonomous region) indicates the relevance of the emergence of in-

fectious diseases under climate change. On the example of studying the allelic polymorphism of genes of pathogenic factors of the anthrax bacterium, the possibility of assessing the pathogenic potential of bacteria is shown, which is a necessary condition for assessing microbiological risks. In this work, the allelic polymorphism of the *capBCADE*-operon (genes *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*) encoding the proteins of the capsule biosynthesis of *Bacillus anthracis*, and the genes *acpA* and *acpB* encoding the expression regulators of this operon have been studied for the first time. A number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) were described in the strains of the studied sample: 5 SNPs in the *capB* gene, 3 in *capC*, 4 in *capA*, 14 in *capD*, 2 in *capE*, 15 in *acpB*, as well as 7 SNPs and one insertion in the *acpA* gene. As a result, the sample is divided into sequence types for each gene and 17 genotypes, which are combinations of the identified sequence types. Translation *in silico* of the detected alleles of the studied genes revealed 3 isoforms in CapB and CapA proteins, 2 isoforms in CapC and CapE proteins, 6 isoforms in CapD protein, 5 in AcpA and 4 in acpB. SNP *capC* 351A → G is a marker of strains of the A.Br.Aust94 group. According to the results, the strains of the A.Br.Vollum group are divided into two subgroups. Strains of evolutionary lines B and C differ from strains of line A by the presence of SNP *acpA* 853G → A. In addition, a previously undescribed variable tandem nucleotide repeat – VNTR (Variable Number Tandem Repeat), was found in the *acpA* gene and the possibility of using it for differentiation and genotyping of *B. anthracis* strains was demonstrated.

*Keywords:* *Bacillus anthracis*, allelic polymorphism of genes, *capBCADE*-operon, MLVA-genotyping