

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ *Bacillus anthracis*

© 2019 г. Е. И. Еременко<sup>1</sup>, \*, А. Г. Рязанова<sup>1</sup>, С. В. Писаренко<sup>1</sup>, Л. Ю. Аксенова<sup>1</sup>,  
О. В. Семенова<sup>1</sup>, Е. А. Котенева<sup>1</sup>, О. И. Цыганкова<sup>1</sup>, Д. А. Ковалев<sup>1</sup>,  
Т. М. Головинская<sup>1</sup>, Д. К. Чмеренко<sup>1</sup>, А. Н. Куличенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ставропольский противочумный институт, Ставрополь, 355035 Россия

\*e-mail: ejer@mail.ru

Поступила в редакцию 25.12.2017 г.

После доработки 14.02.2018 г.

Принята к публикации 26.03.2018 г.

Генетическое типирование возбудителя сибирской язвы применяется в эпидемиологических исследованиях вспышек инфекции и служит инструментом изучения эволюции этого патогенного вида. Изучены аналитические, технические и экономические возможности наиболее распространенных современных методов генетического типирования *B. anthracis* на основе собственных и литературных данных. Установили, что *can*SNP-генотипирование выделяет у 23 штаммов *B. anthracis* 10 генотипов с индексом разнообразия *DI* 0.8261. *DI* для MLST составляет не более 0.5495–0.5790 в зависимости от выборки штаммов. *DI* для MLVA-15, 25 и 31 одинаков и равен 0.9881. Анализ SNP коровой области геномов 181 штамма обеспечивает самую высокую дискриминацию (*DI* = 1). MVLST с *DI*, равным 0.9960, как и SNR-анализ, выявляет различия между генотипами изолятов из одной вспышки. *Can*SNP13-генотипирование вполне достаточно в качестве предварительного этапа генотипирования для разделения штаммов на основные генетические линии. MLST *B. anthracis* нецелесообразно ввиду малой разрешающей способности и трудоемкости, а MVLST, несмотря на высокую разрешающую способность, — из-за длительности и трудоемкости исследования. Идентичность изолятов из одной вспышки сибирской язвы можно подтвердить методами MLVA15–31, тонкие различия между ними — методами анализа SNR и SNP коровой области генома.

**Ключевые слова:** *Bacillus anthracis*, генетическое типирование, индекс разнообразия.

**DOI:** 10.1134/S0016675819010065

Сибирская язва распространена глобально, исключая часть северных регионов, Новую Зеландию и небольшие островные территории. Значимость этой инфекции определяется вспышками природной этиологии, приводящими к падежу скота и заболеванию людей. Молекулярное типирование *B. anthracis* в практических целях призвано определить географическое происхождение штамма и источник инфекции. Теоретические аспекты молекулярного типирования связаны с развитием представлений об эволюции *B. anthracis* как патогенного вида.

Современные методы генетического типирования сибиреязвенного микроба эксплуатируют несколько стратегий.

Одна из них основана на анализе областей генома с вариабельным числом tandemных повторов (VNTR-локусов и SNR-локусов с единичными нуклеотидными повторами — поли A/T трактов). VNTR-типирование *B. anthracis*, начиная с анализа единственного VNTR-локуса *vrrA*,

описанного Andersen et al. [1], получило развитие в схемах многолокусного анализа областей генома с вариабельным числом tandemных повторов (MLVA), различающихся количеством анализируемых локусов, и позволило получить первое представление о генетической структуре глобальной популяции этого патогена [2–6]. Использованию MLVA *B. anthracis* посвящена обширная литература [7–21]. SNR-типирование в силу наиболее высокой разрешающей способности дало возможность различать даже изоляты штамма, выделенные в ходе одной вспышки сибирской язвы [22–27].

Другая стратегия реализуется в методах исследования единичных нуклеотидных вариантов полиморфизма (SNP) — однонуклеотидных замен в разных областях генома. Секвенирование фрагментов нескольких генов “домашнего хозяйства” (MLST) широко используется в генотипировании многих патогенов, наборы анализируемых генов разнообразны, но данные о типировании *B. anthracis* ограничены и представлены в двух базах

данных: *Bacillus cereus* MLST Databases (<https://pubmlst.org/bcereus/>) и *Bacillus cereus* group MLST + AFLP + MLEE Oslo Typing Databases (<http://mlst-oslo.uio.no/>). Анализ 13 локусов с так называемыми “каноническими” SNP (canSNP-анализ) дает возможность определить принадлежность штамма к одной из 12 подгрупп трех основных генетических линий А, В и С [28]. Увеличение числа анализируемых canSNP до 27 оказалось полезным для быстрого отнесения изолята к одной из возросшего числа подгрупп основных генетических линий и определения его филогенетического положения в субструктуре популяции *B. anthracis* [29]. Полногеномное секвенирование (WGS) дает возможность идентифицировать множество SNP при сравнении геномов нескольких штаммов. Коровый геном (ядро генома) определяют как совокупность нуклеотидных последовательностей (или генов), которые присутствуют в каждом геноме выборки, его определяют путем попарного выравнивания полногеномных последовательностей всех геномов выборки с помощью специализированного программного обеспечения. SNP коровой области генома представляют собой единичные нуклеотидные полиморфные варианты, локализованные в гомологичных нуклеотидных последовательностях всех геномов выборки. Существуют также программы, позволяющие на основе коровых SNP провести филогенетический анализ [30, 31]. Анализ SNP полного генома *B. anthracis* использован в ряде работ [32–35].

Многолокусное секвенирование нескольких генов факторов патогенности, получившее название MVLST (Multivirulence-locus sequence typing), было применено для типирования *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* и *Staphylococcus aureus* [36]. Такой подход, выявляющий вариабельность, вносимую SNP и инсерциями/делециями (инделами), использован нами для анализа последовательностей генов факторов патогенности *B. anthracis* [37, 38].

Для многих методов типирования существуют или создаются базы данных, позволяющие сравнивать генотипы штаммов, созданы компьютерные программы для биоинформационного и филогенетического анализов.

При эпидемиологическом расследовании вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 г. нами для генотипирования изолятов *B. anthracis* использованы все упомянутые методы, кроме MLST [37, 38]. Полученные результаты дали определенное представление о возможностях этих методов, однако необходимо более полное исследование с расширением набора штаммов и анализируемых методов. Дискриминирующие возможности вариантов MLVA *B. anthracis* описаны только в работе Thierry et al. [6] и с цитатой из этой статьи в только что опубликованном обзоре

Тимофеева и др. [21], но относительно других методов генотипирования таких данных нет.

Цель исследования — оценить аналитические, технические и экономические возможности методов генетического типирования *B. anthracis* на основе собственных и литературных данных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Штаммы и геномы микроорганизмов*

Использовали 13 штаммов *B. anthracis* (№ 1–13) и полные нуклеотидные последовательности секвенированных нами 19 штаммов (№ 1–19) из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (табл. 1), а также нуклеотидные последовательности штаммов из базы данных GenBank и MLVA-генотипы из базы данных MLVA-bank for Microbes Genotyping (<http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/655>). Выборки из геномов 23, 57, 101, 181 и 540 штаммов *B. anthracis* формировали для сравнения получаемых значений индекса разнообразия в зависимости от объема выборки и степени молекулярного разнообразия штаммов (табл. 2). В выборку из 23 генетически разнообразных штаммов входили геномы 13 штаммов из коллекции Ставропольского противочумного института и 10 штаммов — из GenBank, представляющие 10 из 12 canSNP13-подгрупп. Эта выборка была также составной частью выборок из 181 и 540 геномов. Выборку из 181 генома формировали доступные полные геномы штаммов из GenBank и геномы секвенированных нами 19 штаммов. Выборку из 540 MLVA31-генотипов составляют, помимо выборки из 23 штаммов, все представленные в базе данных MLVA-bank for Microbes Genotyping. Выборки из 57 и 101 штамма включают все MLST-генотипы штаммов *B. anthracis* из баз данных *Bacillus cereus* MLST Databases и *Bacillus cereus* group MLST + AFLP + MLEE Oslo Typing Databases соответственно.

### *Молекулярное типирование*

Для MLVA-генотипирования использовали схемы MLVA7 [6], MLVA8 [2], MLVA15 [28], MLVA25 [4], MLVA31 [5], праймеры и параметры ПЦР-амплификации, приведенные в цитируемых работах. Размеры ампликонов определяли гель-электрофорезом и секвенированием по Сэнгеру.

CanSNP13-генотип (ГТ) штаммов из нашей коллекции определяли методом сайт-специфической амплификации в ПЦР в режиме реального времени с LNA-модифицированными зондами [39], используя последовательности ПЦР-праймеров, зондов и схему генотипирования, описанные в работе [28]. LNA-модификация и синтез

Таблица 1. CanSNP13-генотипы 23 штаммов *B. anthracis*

№ п.п.	Штамм <i>B. anthracis</i>	Место выделения	Год выделения	Доступ в GenBank	CanSNP13-генотип
1	1342/12	Россия, ЯНАО	2016	Нет	B.Br. 001/002
2	1339/24	Россия, ЯНАО	2016	»	B.Br. 001/002
3	1051/35	Россия, г. Уфа	1935	»	B.Br. 001/002
4	14/41	Россия, Дагестан	1963	»	B.Br. 001/002
5	1284	Россия, г. Омск	2010	»	B.Br. 001/002
6	140П	Россия, Тверская область	1979	»	B.Br. 001/002
7	81/1	Россия, Ставропольский край	1969	»	A.Br.008/009
8	1266	Россия, Ставропольский край	2006	»	A.Br.008/009
9	1269	Россия, РСО-А	2007	»	A.Br.008/009
10	1(СО)	Россия, РСО-А	1968	»	A.Br.008/009
11	1307	Россия, Ставропольский край	2013	»	A.Br.008/009
12	1322	Россия, Ставропольский край	2013	»	A.Br.008/009
13	И-271	Россия, Якутская АССР	1980	»	A.Br.001/002
14	312/163	Азербайджан	1978	»	A.Br.Aust94
15	737/10	Грузия	1984	»	A.Br.Aust94
16	1	Украина	1967	»	A.Br.005/006
17	228/269	Российская Федерация	1977	»	A.Br.008/009
18	140Псар-б/м	Вариант штамма 140П	1980	»	A.Br.008/009
19	12/16	Россия, Дагестан	1957	»	B.Br. 001/002
20	Ames Ancestor	США, Техас	1981	NC_007530.2; NC_007322; NC_007323.3	A.Br.Ames
21	HYU01	Корея	2009	NZ_CP008846.1; NZ_CP008847.1; NZ_CP009339.1	B.Br. 001/002
22	Canadian bison	Канада	Неизвестен	NZ_CP010322.1; NZ_CP010321.1; NZ_CP010320.1	A.Br.WNA
23	Ohio ACB	США	»	NZ_CP009341.1; NZ_CP009340.1; NZ_CP009339.1	A.Br.Aust94
24	K3	ЮАР	»	NZ_CP009331.1; NZ_CP009330.1; NZ_CP009329.1	A.Br.005/006
25	2002013094	США	1956	NZ_CP009902.1; NZ_CP009901.1; NZ_CP009900.1	C.Br.A1005
26	Vollum 1B	США	1951	NZ_CP009328.1; NZ_CP009327.1; NZ_CP009326.1	A.Br.Vollum
27	CNEVA-9066	Франция	Неизвестен	AAEN01.1.fsa_nt.gz	B.Br.CNEVA
28	SVA11	Швеция	»	NZ_CP006742.1; NZ_CP006743.1; NZ_CP006744.1	B.Br.001/002
29	A16	Китай	»	NZ_CP009331.1; NZ_CP009330.1; NZ_CP009329.1	A.Br.001/002

**Таблица 2.** Дискриминирующие возможности MLVA, анализа canSNP, SNP коровой области генома, MLST и MVLST *B. anthracis*

Схема генотипирования	23 штамма		57 штаммов		101 штамм		181 штамм		540 штаммов	
	DI	число генотипов	DI	число генотипов	DI	число генотипов	DI	число генотипов	DI	число генотипов
canSNP13, 27	0.8260	10	Не определяли		Не определяли		Не определяли		Не определяли	
MLST Oxford 7	0.5790	3	0.5495	8						
MLST T-H7	Не определяли		Не определяли		0.4778	7				
MLVA7	0.9585	16			Не определяли				0.6738	61
MLVA8	0.9644	17							0.8611	80
MLVA15	0.9881	20							0.8622	95
MLVA25	0.9881	20							0.8743	149
MLVA31	0.9881	20							0.8748	154
MVLST	0.9960	22							Не определяли	
SNP коровой области генома	Не определяли						1	181		

олигонуклеотидов выполнены фирмой “ДНК-синтез” (Россия). CanSNP27-ГТ определяли, ориентируясь на координаты canSNP-локусов в геноме референс-штамма *B. anthracis* Ames Ancestor и праймеры из работы [29]. Сравнивали получаемые *in silico* ампликоны этого штамма и исследуемых штаммов с помощью ресурса NCBI BLASTn ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)). CanSNP13-ГТ для последовательностей штаммов из GenBank определяли *in silico*, пользуясь online ресурсом MLVA-bank for Microbes Genotyping по адресу <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/insilico.php>. MLVA ГТ типированных нами штаммов сравнивали с представленными в online базе данных MLVA-bank for Microbes Genotyping по адресу <http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/655>. Филогенетический анализ результатов MLVA проводили в программе FYLOViZ 2.0. Коровый геном по данным черновой сборки полногеномного секвенирования (ПГС) был получен путем множественного выравнивания полных геномных последовательностей секвенированных нами 19 штаммов и 162 штаммов из GenBank в программе REALPHY (<https://realphy.unibas.ch/cgi/realphy>). MVLST и анализ SNR-локусов по данным ПГС штаммов из нашей коллекции, а также геномов штаммов из GenBank проводили *in silico*, сравнивая с последовательностями генов штамма

*B. anthracis* Ames Ancestor с использованием ресурса NCBI BLASTn, праймеров к четырем SNR-локусам HM1, HM2-2, HM6 и HM13 [24]. MLST штаммов *B. anthracis* проводили *in silico* с фрагментами генов *glp*, *gmk*, *ilv*, *pta*, *pur*, *pyc*, *tpi* схемы Priest et al. (2004), поскольку она представлена в двух базах данных: *Bacillus cereus* MLST Databases (<https://pubmlst.org/bcereus/>) и *Bacillus cereus* group MLST + AFLP + MLEE Oslo Typing Databases (<http://mlstoslo.uio.no/>). Для филогенетического анализа методами MVLST и MLST последовательности каждого из генов всех штаммов выравнивали в программе CLC Sequence Viewer Version 7.0, матрицы соответствующих генов объединяли в одну последовательность в программе Unipro UGENE v1.20.0, дендрограммы с алгоритмом UPGMA строили в программе MEGA 7. Филогенетическое дерево по результатам анализа SNP корового генома построили методом байесовского филогенетического анализа. Дискриминирующую способность схем молекулярного типирования определяли по индексу разнообразия Симпсона (DI) в описании Hunter & Gaston [40].

Секвенирование по Сэнгеру и капиллярный фрагментный анализ проводили в автоматическом ДНК-анализаторе ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), полногеномное се-

квенирование (ПГС) – с помощью секвенатора Ion Torrent PGM.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *CanSNP-генотипирование*

Результаты определения *canSNP13*-ГТ 23 штаммов *B. anthracis* приведены в табл. 1. Они были представлены десятью *canSNP13*-ГТ. Штаммы из нашей коллекции относились к ГТ A.Br.008/009, B.Br.001/002 и A.Br.001/002, кроме них ГТ B.Br.001/002 имели штаммы HYU01 (Корея) и SVA11 (Швеция), а ГТ A.Br.001/002 – штамм A16 из Китая. Индекс разнообразия для этой схемы генотипирования и выборки штаммов составлял 0.8261 (табл. 2). *CanSNP27*-генотипирование выявило также 10 *canSNP27*-ГТ. Филогенетический анализ обнаружил минимальные различия в топологии дендрограмм *canSNP13* и *canSNP27*, прикорневого деления на три основные генетические линии не отмечалось (рис. 1, 1).

### *MLST*

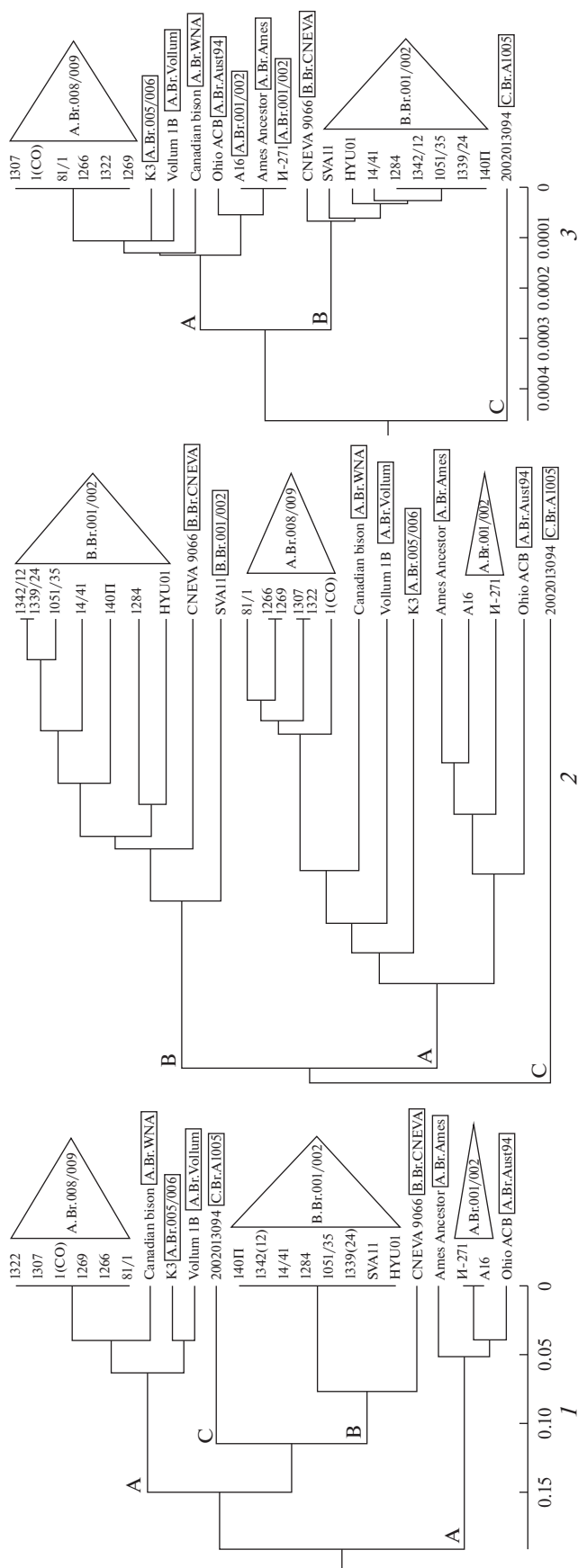
Генотипирование на основе генов *glp*, *gmk*, *ilv*, *pta*, *pur*, *rus*, *tpi* провели *in silico* с использованием баз данных *Bacillus cereus* MLST Databases (Oxford 7) и *Bacillus cereus* group MLST + AFLP + MLEE Oslo Typing Databases (Т-Н7). В первой базе данных находилось 57 штаммов, генотипирование выделило восемь MLST-генотипов, *DI* для которых составил 0.5495. Применив эту схему для 23 штаммов из табл. 1, получили три MLST-генотипа с *DI* 0.5790. Во второй базе данных был 101 штамм, относящийся к семи генотипам с *DI* 0.4778 (табл. 2).

### *MLVA*

Результаты показали, что для выборки из 23 штаммов различия *DI* были заметными между двумя группами: MLVA7–8 и MLVA15–31, при этом MLVA7 и MLVA8 между собой различались незначительно (0.9585 – 16 ГТ и 0.9644 – 17 ГТ у 23 штаммов соответственно). Схемы MLVA15, MLVA25 и MLVA31 обладали равной дискриминирующей силой с *ID* 0.9881 и позволяли дифференцировать 20 MLVA-ГТ у 23 штаммов (табл. 2).

MLVA31, 25 и 15 выявили идентичность ГТ у изолятов, выделенных в ходе одной вспышки инфекции. MLVA8 и MLVA7 определяли идентичными ГТ не только изолятов из одной вспышки, но

Рис. 1. Кластерный анализ 23 штаммов *B. anthracis* по данным: 1 – *canSNP13*-генотипирования; 2 – MLVA31; 3 – MVLST. Дендрограммы построены по алгоритму UPGMA. А, В и С – основные генетические линии *B. anthracis*. В прямоугольниках и треугольниках приведены обозначения “канонических” SNP13-генотипов.





**Рис. 2.** Кластерный анализ 540 штаммов *B. anthracis* по данным MLVA31. Дендрограмма построена по алгоритму UPGMA. Отмечены 23 штамма, генотипы которых определены анализом *san*SNP, MLVA31 и MVLST. Крупным планом выделены кластеры дендрограммы, имеющие топологию, совпадающую с топологией ветвей соответствующих штаммов в дендрограмме MLVA31 23 штаммов (рис. 1).

также изолятов разного географического происхождения и времени выделения. Имелись отличия в топологии дендрограмм MLVA: прикорневое разделение ГТ на три общепризнанные основные линии А, В и С [7, 14] прослеживалось для MLVA31, MLVA25 и MLVA15 (рис. 1, 2), топология дендрограмм MLVA7 и MLVA8 не соответствовала этому делению.

Для выборки из 540 штаммов, в которую кроме генотипов тех же 23 штаммов вошли MLVA31-генотипы изолятов разного географического про-

исхождения (США, Корея, ЮАР, Канада, Швеция, Китай, Турция, Греция, Пакистан, Германия, Бангладеш, Австрия, Бразилия, Ямайка, Грузия, Намибия), представленные в базе данных MLVAbank for Microbes Genotyping, максимальный показатель *DI* соответствовал MLVA31, минимальный – MLVA7. По данным MLVA31 идентифицировано 154 ГТ. Дендрограмма MLVA31 для 540 штаммов также сохраняла деление на три генетические линии (рис. 2).

## MVLST

Исследовали 11 переменных структурных и регуляторных генов хромосомной (*htrA*, *mpvF*, *gerSA*, *gerSC*) и плазмидной (*pagA*, *lef*, *суа*, *асрА*, *асрВ*, *атхА*, *сарА*) локализации, имеющих отношение к факторам патогенности *B. anthracis*.

SNP встречались во всех генах, кроме *атхА*, больше всего их было в генах *суа*, *lef* и *pagA*. Инделов не было в генах *pagA*, *htrA* и *mpvF*. По совокупности полиморфных вариантов наиболее переменными были гены *суа* и *lef*, т.е. структурные гены отечного и летального факторов токсинов сибиреязвенного микроба. Трансверсия А–Т в позиции 981 гена *pagA* характерна для штаммов из нашей коллекции с *canSNP13*-генотипом А.Вг.008/009 и была ранее идентифицирована в последовательности этого гена у нескольких штаммов [41]. Всего в 11 генах 23 штаммов отмечено 70 вариантов полиморфизма – 36 SNP и 34 индела. Более всего отличался от референс-штамма Ames Ancestor штамм *B. anthracis* 2002013094, имевший 20 полиморфных вариантов (18 SNP и 2 индела). MVLST также позволил выявить различия между генотипами изолятов из одной вспышки, показатель *DI* для 23 штаммов приближался к единице и составлял 0.9960 (табл. 2). Филогенетический анализ поддерживал классическое распределение ГТ между тремя основными генетическими линиями (рис. 1, 3).

## Анализ SNP коровой области генома

В анализе использовали полные последовательности геномов 181 штамма *B. anthracis*, 19 из которых были секвенированы в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, остальные, представленные окончательными и черновыми сборками, взяты из GenBank. Идентифицирован 181 ГТ, отличия имели все штаммы, в том числе изоляты 1342/12 и 1339/24, выделенные в ходе одной вспышки сибирской язвы в 2016 г. на Ямале от больного человека и от северного оленя, соответственно. Различия между ними были только в одном SNP в позиции 679227 по референсному геному штамма Ames Ancestor с заменой С → Т у изолята 1339/24. Эта замена приводит к аминокислотной замене Gly → Glu в гене *glpT*, кодирующем транспортер глицерол-3-фосфата. *DI* для этой выборки составлял максимально возможное значение 1 (табл. 2). Филогенетический анализ подтверждал деление ГТ штаммов *B. anthracis* на три основные генетические линии, только шесть штаммов из нашей коллекции относились к линии В, остальные 13 составляли разные кластеры линии А (рис. 3).

## SNR-анализ

Все пары штаммов из одной вспышки (серый фон) имели идентичный MLVA31-генотип, но их SNR-генотипы имели отличия (табл. 3). Харак-

Таблица 3. SNR-аллели штаммов *B. anthracis*

Штамм	SNR-аллели и размеры повторов			
	CL10	CL12	CL35	CL33
1342/12	20A	13A	12A	9A
1339/24	18A	12A	11A	9A
Ames Ancestor	16A	15A	15A	35A
1266	17A	14A	14A	14A
1269	16A	13A	13A	14A
1307	16A	15A	14A	20A
1322	17A	21A	15A	22A

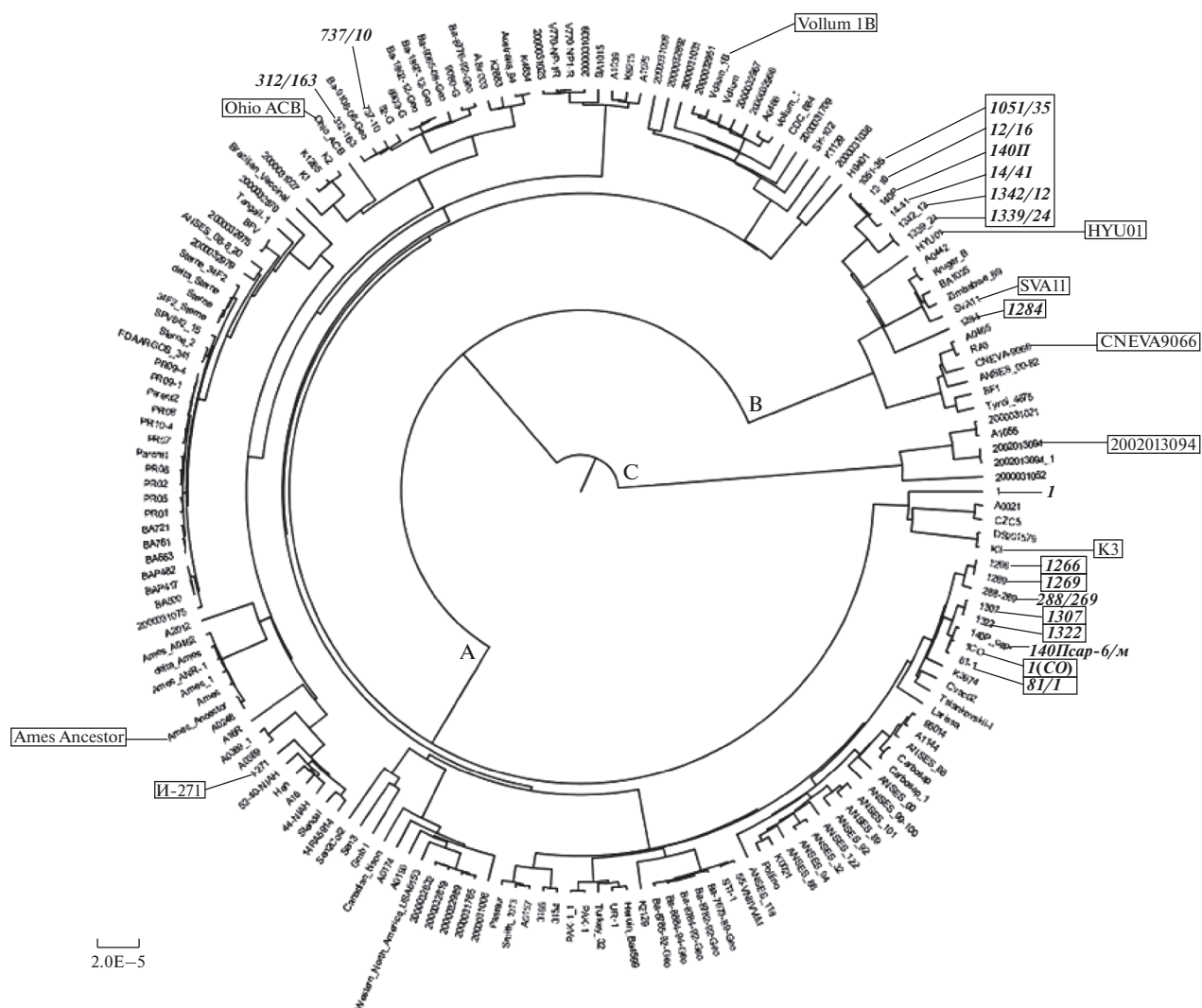
терно, что пары изолятов из одной вспышки были выделены из разных объектов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Дискриминирующие возможности методов молекулярного типирования возбудителя сибирской язвы различны. MLST-типирование в силу самого низкого индекса разнообразия не позволяет адекватно дифференцировать штаммы, трудоемко и целесообразно только для самой общей их генетической характеристики. Данные о MLST-генотипах *B. anthracis* немногочисленны и представлены в двух базах данных MLST *Bacillus cereus*.

CanSNP-генотипирование имеет невысокий индекс разнообразия, но при этом позволяет дифференцировать штаммы на 12 генетических кластеров, представляющих глобальную структуру популяции *B. anthracis*, технически несложно и может использоваться в качестве быстрого предварительного теста в эпидемиологическом расследовании с целью определить происхождение штамма, вызвавшего вспышку, есть возможность сравнения с международной базой данных *canSNP*-генотипов.

MLVA15, 25 и 31 имеют высокий индекс разнообразия, достаточный для дифференциации и определения идентичности штаммов. В работе Thierry et al. [6] анализ 130 штаммов из французской коллекции позволил идентифицировать 35 ГТ MLVA31 и дал меньшие значения *DI*, чем в



**Рис. 3.** Кластерный анализ 181 штамма *B. anthracis* по данным SNP-типирования коровой области генома. Филогенетическое дерево построено методом байесовского филогенетического анализа. Жирным курсивом отмечены штаммы, секвенированные в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Прямоугольниками выделены штаммы, анализ которых проведен методами анализа *canSNP*, *MLVA31* и *MVLST*.

нашем исследовании, для всех схем *MLVA*. При этом показатель для *MLVA7* (0.8551) оказался выше, чем для *MLVA8* (0.7259), что послужило основанием рекомендовать схему *MLVA7* в качестве возможности быстро получить результаты, хорошо коррелирующие со схемой *MLVA31*, без использования капиллярного электрофореза [6]. В нашей работе схема *MLVA7* всегда была менее дифференцирующей, чем все остальные. Существенно, что в нашей выборке из 540 изолятов *B. anthracis* 491 выделен только в трех странах — Франция, Италия и Намибия, в связи с чем *DI* для всех схем был ниже, чем в выборке из 23 генети-

чески разнообразных штаммов, и ближе к значениям, полученным в работе [6].

Поддерживается и пополняется база данных *MLVAbank for Microbes Genotyping*, содержащая генотипы штаммов из разных стран. Технология *MLVA* хорошо отработана, но анализ 31 *VNTR*-локуса отнимает достаточно много времени и средств. Кроме того, существует определенная сложность с конвертацией размеров аллелей локусов *MLVA*, получаемых при фрагментном анализе в парах оснований, в цифровой код, означающий число повторов, который используется в базе данных *MLVAbank for Microbes Genotyping* [6].



MLST, canSNP-типирование и MLVA не позволяли различить изоляты из одной вспышки. Возможность дифференцировать изоляты из одной вспышки дает MVLST, что может быть связано с тем, что мутации в генах факторов патогенности не являются, в отличие от большинства генов домашнего хозяйства, селективно нейтральными и возникают с более высокой частотой. *DI* этого метода максимальный для выборки из 23 штаммов и составляет 0.9960. Комплексный анализ SNP и делеций/инсерций (SNV), подобный примененному нами MVLST, дал возможность провести генетический эпидемиологический анализ штаммов, выделенных в ходе одной вспышки из разных источников [42]. Практическая реализация MVLST затруднительна в той же мере, что и MLST, из-за необходимости секвенирования нескольких фрагментов каждого из генов и отсутствия баз данных.

Молекулярное типирование на основе анализа высоковариабельных SNR-локусов выявляет тонкие различия между изолятами одного штамма, имеющими один и тот же MLVA-генотип, что подтверждается нашими данными о парах изолятов *B. anthracis* (1342/12 и 1339/24), (1266 и 1269) и (1307 и 1322), каждая из которых выделена в ходе отдельной вспышки сибирской язвы. Аналогичный анализ разделил 47 изолятов из одной вспышки в Южной Дакоте (США) на шесть генотипов [25]. Показано, что 53 изолята одного штамма из эпизоотии летом 2004 г. в Италии дифференцировались на пять генотипов при анализе четырех SNR-локусов [27]. Дифференциация изолятов из одной вспышки при SNR-генотипировании может быть осуществлена методом фрагментного капиллярного анализа.

Сравнение результатов филогенетического анализа данных молекулярного типирования методами MLVA, MVLST, SNP-типирования коровой области генома показывает их совпадение между собой и с полученными результатами других авторов, подтверждая корректность проведенного исследования.

Следует отметить, что штаммы 14/41, 12/16 и 140П, выделенные в европейской части России, в отличие от других выделенных там же штаммов и принадлежащих к основной линии А кластеризовались вместе со штаммами из азиатской части и принадлежали к основной линии В. Эта закономерность проявлялась при всех методах молекулярного типирования и отмечалась нами ранее [43]. Штаммы 14/41, 12/16 и 140П были атипичными по ряду признаков, но типичный штамм 140Псар'б/м, выделенный из популяции штамма 140П при пассировании через организм белых

мышей, входил вместе со штаммами из европейской части в один из кластеров основной линии А (рис. 3).

Полногеномное секвенирование дает исчерпывающую информацию о геноме и в состоянии заменить другие методы молекулярно-генетического типирования, так как на его основе можно определить SNP-, SNR-, MLST-, MVLST- и MLVA-генотипы штаммов *B. anthracis in silico*. Его использование ограничивается только высокой стоимостью оборудования, уже сейчас по материальным затратам и скорости выполнения анализ SNP коровой области генома сопоставим с MLVA, обеспечивая высочайшую степень дискриминации штаммов и становясь основным методом молекулярно-генетического типирования *B. anthracis*.

Результаты филогенетического анализа с представительной выборкой штаммов дают возможность предположить географическое происхождение изолята. Для этого необходимо создание национальной базы данных геномов штаммов *B. anthracis*, поскольку в базе данных GenBank геномы штаммов российского происхождения до последнего времени были представлены только тремя вакцинными штаммами. Большинство штаммов из нашей коллекции, относящихся к линии А, кластеризуются в одной субкладе с российским вакцинным штаммом Ценковского ("Tsiankovskii"), китайским вакцинным штаммом Cvac02 и штаммом K3974 из Словакии, что может указывать на общность происхождения этих штаммов (рис. 3).

Таким образом, разные методы молекулярного типирования *B. anthracis* дают информацию определенного содержания, так как отражают изменения в геноме, связанные с разного рода мутациями, различающимися частотой возникновения и стабильностью. Поэтому выбор схем генотипирования должен определяться целью исследования. Располагая набором методов генотипирования с разной разрешающей способностью и сложностью выполнения, можно остановиться на тех из них, которые наиболее соответствуют цели исследования и наличию необходимого оборудования. MLVA31 обеспечивает высокую дискриминирующую способность, достаточную для определения принадлежности изолятов *B. anthracis* к одной вспышке сибирской язвы, дифференциация между ними возможна с использованием анализа SNP коровой области генома и SNR. Для решения вопроса о происхождении штамма, вызвавшего вспышку, необходимо иметь в своем распоряже-

нии репрезентативную базу данных о генотипах штаммов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andersen G.L., Simchock J.M., Wilson K.H. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 2. P. 377–384.
2. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis* // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 10. P. 2928–2936.
3. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* // BMC Microbiol. 2001. V. 1. № 2. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/2>.
4. Lista F., Faggioni G., Valjevac S. et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis // BMC Microbiol. 2006. V. 6. № 33. P. 1–14. doi 10.1186/1471-2180-6-33
5. Beyer W., Bellan S., Eberle G. et al. Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia // PLoS Negl. Trop. Dis. 2012. V. 6. № 3. P. 1–12.
6. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P. et al. Genotyping of french *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database // PLoS One. 2014. 9(6): 95131. doi 10.1371/journal.pone.0095131
7. Hoffmaster A.R., Fitzgerald C.C., Ribot E. et al. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, united states // Emerg. Infect. Dis. 2002. V. 8. № 10. P. 1111–1116.
8. Fouet A., Smith K.L., Keys C. et al. Diversity among french *Bacillus anthracis* isolates // J. Clin. Microbiol. 2002. V. 40. № 12. P. 4732–4734.
9. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Брюханов А.Ф. и др. Генотипирование штаммов сибиреязвенного микроба на территории стран СНГ // Журн. микробиологии. 2003. № 6. Прилож. С. 51–56.
10. Gierczyński R., Kałużewski S., Rakin A. et al. Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland – the molecular echoes of the past outbreaks // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 239. P. 235–240.
11. Fasanella A., Van Ert M., Altamura S.A. et al. Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in Italy // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. № 7. P. 3398–3401.
12. Ryu C., Lee K., Hawng H.-J. et al. Molecular characterization of Korean *Bacillus anthracis* isolates by amplified fragment length polymorphism analysis and multi-locus variable-number tandem repeat analysis // Applied Environm. Microbiol. 2005. V. 71. № 8. P. 4664–4671.
13. Merabishvili M., Natidze M., Riggava S. et al. Diversity of *Bacillus anthracis* strains in Georgia and of vaccine strains from the former Soviet Union // Applied Environm. Microbiol. 2006. V. 72. № 8. P. 5631–5636.
14. Sue D., Marston C.K., Hoffmaster A.R. et al. Genetic diversity in a *Bacillus anthracis* historical collection (1954 to 1988) // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. № 6. P. 1777–1782.
15. Шушкова Н.А., Мокриевич А.Н., Платонов М.Е. и др. Изучение генетического разнообразия штаммов сибиреязвенного микроба из коллекции ГНЦ ПМБ // Проблемы особо опасных инфекций. 2010. № 104. С. 60–65.
16. Aikembayev A.M., Lukhnova L., Temiraliyeva G. et al. Historical distribution and molecular diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan // Emerging Infect. Dis. 2010. V. 16. № 5. P. 789–796.
17. Okutani A., Tungalag H., Boldbaatar B. et al. Molecular epidemiological study of *Bacillus anthracis* isolated in Mongolia by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for 8 loci (MLVA-8) // Jpn. J. Infect. Dis. 2011. V. 64. P. 345–348.
18. Pilo P., Frey J. *Bacillus anthracis*: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution // Infect. Genet. Evol. 2011. V. 11. № 6. P. 1218–1224. doi 10.1016/j.meegid.2011.05.013
19. Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова О.И. и др. Генотипическое разнообразие штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных в регионе Кавказа // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2012. № 2. С. 26–29.
20. Афанасьев М.В., Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф. и др. Сравнительный мультилокусный VNTR- и SNP-анализ вакцинных штаммов *Bacillus anthracis* // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2014. № 2. С. 36–40.
21. Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Дятлов И.А. Генотипирование *Bacillus anthracis* и близкородственных микроорганизмов // Генетика. 2018. Т. 54. № 1. С. 3–14.
22. Keim P., Van Ert M.N., Pearson T. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales // Infect., Gen. Evol. 2004. № 4. P. 205–213.
23. Stratilo C.W., Lewis C.T., Bryden L. et al. Single-nucleotide repeat analysis for subtyping *Bacillus anthracis* isolates // J. Clin. Microbiol. 2006. V. 44. № 3. P. 777–782. doi 10.1128/JCM.44.3.777–782.2006
24. Kenefic L.J., Beaudry J., Trim C. et al. A high resolution four-locus multiplex single nucleotide repeat (SNR) genotyping in *Bacillus anthracis* // J. Microbiol. Methods. 2008. V. 73. № 3. P. 269–272. doi 10.1016/j.mimet.2007.11.014
25. Kenefic L.J., Beaudry J., Trim C. et al. High resolution genotyping of *Bacillus anthracis* outbreak strains using four highly mutable single nucleotide repeat markers //

- Let. Appl. Microbiol. 2008. V. 46. № 5. P. 600–603. doi 10.1111/j.1472-765X.2008.02353.x
26. *Stratilo C.W., Bader D.E.* Genetic diversity among *Bacillus anthracis* soil isolates at Fine geographic scales // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. № 18. P. 6433–6437.
  27. *Garofolo G., Ciammaruconi A., Fasanella A. et al.* SNR analysis: molecular investigation of an anthrax epidemic // BMC Veter. Res. 2010. 6:11. <http://www.biomed-central.com/1746-6148/6/11>.
  28. *Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y. et al.* Global genetic population structure of *Bacillus anthracis* // PLoS One. 2007. V. 2(5). P. 1–10. e461. doi 10.1371/journal.pone.0000461
  29. *Girault G., Thierry S., Cherchame E., Derzelle S.* Application of high-throughput sequencing: Discovery of informative SNPs to subtype *Bacillus anthracis* // Adv. Biosc. Biotech. 2014. № 5. P. 669–677. <http://dx.doi.org/doi/10.4236/abb.2014.57079>.
  30. *Yamashita A., Sekizuka T., Kuroda M.* GcoGSA-BA: A global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* // Health Security 2015. V. 13. № 1. P. 64–68. doi 10.1089/hs.2014.0076
  31. *Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., Thomsen M.C. et al.* SnpTree – a web-server to identify and construct SNP trees from whole genome sequence data // BMC Genomics 2012. V. 13(Suppl. 7):S6.
  32. *Keim P., Grunowc R., Vipond R. et al.* Whole genome analysis of injectional anthrax identifies two disease clusters spanning more than 13 years // EBioMedicine. 2015. V. 2. № 6. P. 1613–1618. eCollection 2015. doi 10.1016/j.ebiom.2015.10.004
  33. *Derzelle S., Aguilar-Bulteta L., Freya J.* Whole genome SNP analysis of bovine *B. anthracis* strains from Switzerland reflects strict regional separation of simmental and swiss brown breeds in the past // Vet. Microbiol. 2016. V. 196. P. 1–8. <http://dx.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.014>.
  34. *Antwerpen M.H., Sahl J.W., Birdsall D. et al.* Unexpected relations of historical anthrax strain // mBio. 2017. 8:e00440-17. <https://org/doi/10.1128/mBio.00440-17>.
  35. *Derzelle S., Girault G., Roest H.I. et al.* Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in the Netherlands: Investigating the relationship to the worldwide population using whole-genome SNP discovery // Infect., Gen. Evol. 2015. V. 32. P. 370–376. <http://dx.org/10.1016/j.mecgid.2015.03.030>.
  36. *Sabat A.J., Budimir A., Nashev D. et al.* Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance // Euro Surveill. 2013. V. 18. № 4. P. 1–14. pii=20380. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2038>.
  37. *Куличенко А.Н., Еременко Е.И., Рязанова А.Г. и др.* Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 1. С. 94–99. doi 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99
  38. *Попова А.Ю., Куличенко А.Н., ред.* Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Ижевск.: ООО “Принт-2”, 2017. 311 с.
  39. *Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Еременко Е.И.* Анализ санSNP генотипов штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных на территории Северного Кавказа и Закавказья // Материалы VI Всерос. научно-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора “Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины”. Ставрополь, 2014. 57 с.
  40. *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. V. 26. № 11. P. 2465–2466.
  41. *Okinaka R.T., Henrie M., Hill K.K. et al.* Single nucleotide polymorphism typing of *Bacillus anthracis* from Sverdlovsk tissue // Emerging Infect. Dis. 2008. V. 14. № 4. P. 653–656. doi 10.3201/eid1404.070984
  42. *Ågren J., Finn M., Bengtsson B., Segerman B.* Microevolution during an anthrax outbreak leading to clonal heterogeneity and penicillin resistance // PLoS One. 2014. V. 9. № 2. P. 1–14 : e89112. doi 10.1371/journal.pone.0089112
  43. *Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А. и др.* Генотипические особенности штаммов *Bacillus anthracis* с разным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью // Проблемы особо опасных инфекций. 2010. № 104. С. 53–56.

## Comparative Analysis of Genetic Typing Methods for *Bacillus anthracis*

E. I. Eremenko<sup>a,\*</sup>, A. G. Ryazanova<sup>a</sup>, S. V. Pisarenko<sup>a</sup>, L. Yu. Aksenova<sup>a</sup>,  
O. V. Semenova<sup>a</sup>, E. A. Koteneva<sup>a</sup>, O. I. Tsygankova<sup>a</sup>, D. A. Kovalev<sup>a</sup>,  
T. M. Golovinskaya<sup>a</sup>, D. K. Tchmerenko<sup>a</sup>, and A. N. Kulichenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, 355035 Russia

\*e-mail: [ejer@mail.ru](mailto:ejer@mail.ru)

Molecular typing of the anthrax used in epidemiological investigations and serves as a tool to study the evolution of the pathogenic species. Analytical, technical and economic capabilities of the most use modern ge-

notyping methods for *B. anthracis* were studied. It was established that canSNP-genotyping resolved 23 strains of *B. anthracis* into 10 genotypes with diversity index  $DI$  0.8261.  $DI$  for MLST was not more than 0.5495–0.5790 depending on set of strains.  $DI$  to MLVA-15, 25 and 31 was the same and equals 0.9881. Analysis of core genome region SNP of 181 strains provided highest discriminative power ( $DI = 1$ ). MVLST with  $DI$  equal to the 0.9960 as well as SNR analysis revealed differences between genotypes isolates from one outbreak. Conclusion: CanSNP13-genotyping is quite enough as a preliminary stage to resolve strains into main genetic lineages. MLST of *B. anthracis* due to the low resolution and complexity, and MLVST, in spite of the high resolution because of the duration and labor intensity of research, are impractical. Identity of isolates from one anthrax outbreak can be established using the MLVA15-31, subtle differences between them - by SNR and core genome SNP analysis.

**Keywords:** *Bacillus anthracis*, genotyping, diversity index.