

© Коллектив авторов, 2023
УДК 575.22:579.852.11
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18007>
ISSN – 2073-8137

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН

О. В. Бобрышева, С. В. Писаренко, Д. А. Ковалев, Е. И. Еременко,
А. Г. Рязанова, О. В. Семенова, Д. В. Ульшина, А. Н. Куличенко

Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,
Российская Федерация

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *BACILLUS ANTHRACIS* STRAINS ISOLATED IN THE REPUBLIC OF DAGESTAN

Bobrysheva O. V., Pisarenko S. V., Kovalev D. A., Eremenko E. I.,
Rjazanova A. G., Semenova O. V., Ul'shina D. V., Kulichenko A. N.

Stavropol Plague Control Research Institute of the Rospotrebnadzor, Russian Federation

Представлены данные молекулярно-генетического анализа штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышек сибирской язвы в Республике Дагестан. Для проведения филогенетического анализа были использованы геномные последовательности 6 штаммов *B. anthracis* и 266 геномных последовательностей *B. anthracis* из международной базы данных GenBank. В результате генетического анализа установлено, что штаммы, изолированные в 1957 и 1963 годах, относятся к главной генетической линии В, ветвь В.Br.002 и имеют высокую степень генетического родства со штаммами из Западной Сибири, что свидетельствует об их общем происхождении. Изоляты, выделенные в 2019 году, принадлежат к группе TEA Br.008/011, ветвь А.Br.118. Данные штаммы образуют отдельную ветвь и тесно связаны с кладой «STI». Полученные данные могут быть использованы при дифференциации штаммов во время расследования вспышек сибирской язвы.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, полногеномное секвенирование, полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов, сравнительная геномика

The objective was to present the data of the molecular genetic analysis of *Bacillus anthracis* strains isolated during outbreaks of anthrax in the Republic of Dagestan. For phylogenetic analysis, genomic sequences of 6 *B. anthracis* strains and 266 *B. anthracis* genomic sequences from the international GenBank database were used. As a result of genetic analysis, it was found that the strains isolated in 1957 and 1963 belong to the main genetic line B, branch B.Br.002 and have a high degree of genetic relationship with strains from Western Siberia, which indicates their common origin. Isolates distinguished in 2019 belong to the TEA Br.008/011 group, A.Br.118 branch. These strains form a separate branch and are closely related to the «STI» clade. The data obtained can be used in the differentiation of strains during the investigation of outbreaks of anthrax.

Keywords: *Bacillus anthracis*, genome-wide sequencing, genome-wide analysis of single nucleotide polymorphism, comparative genomics

Для цитирования: Бобрышева О. В., Писаренко С. В., Ковалев Д. А., Еременко Е. И., Рязанова А. Г., Семенова О. В., Ульшина Д. В., Куличенко А. Н. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2023;18(1):29-32. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18007>

For citation: Bobrysheva O. V., Pisarenko S. V., Kovalev D. A., Eremenko E. I., Rjazanova A. G., Semenova O. V., Ul'shina D. V., Kulichenko A. N. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *BACILLUS ANTHRACIS* STRAINS ISOLATED IN THE REPUBLIC OF DAGESTAN. *Medical News of North Caucasus*. 2023;18(1):29-32. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18007> (In Russ.)

КРС – крупный рогатый скот
canSNP – «канонический» однонуклеотидный полиморфизм
SNP – однонуклеотидный полиморфизм

WGS – полное секвенирование генома
wgSNPs – полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов

Bacillus anthracis – патогенный грамположительный спорообразующий микроорганизм, вызывающий особо опасное инфекционное заболевание. Способность бактериального агента продуцировать споры обеспечивает его устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды [1].

Сибирская язва – зоонозная инфекция, основным источником которой для человека являются больные или павшие животные. Факторами передачи, как правило, являются выделения больного животного, его кровь, мясо, продукты животноводства, сырье (кожа, шерсть, кости) и объекты окружающей среды. Заражение человека в подавляющем большинстве случаев

происходит при контакте с больными сельскохозяйственными животными при их убое, разделке туш и шкур, обработке мяса. Сибирская язва – инфекция, которая продолжает ежегодно регистрироваться в мире повсеместно и представляет серьезную проблему для ветеринарии и здравоохранения многих стран [1, 2]. Эндемичными считаются регионы Африки, Центральной Азии, Ближнего Востока и Южной Америки, в Европе и США случаи заболевания регистрируются редко.

Проблема сибирской язвы существует и в России. Наиболее часто заболевают сельскохозяйственные животные, но регистрируются и случаи инфицирования среди населения Сибири, Северного Кавказа. В частности, в Республике Дагестан насчитывается около 420 стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов, которые сформировались в большинстве случаев (77,4 %) до 1969 года. С 1944 года до настоящего времени в Республике Дагестан зарегистрировано более 1000 случаев заболевания людей сибирской язвой [3].

В октябре 2019 года в Новолакском районе Республики Дагестан несколько жителей села Новокули заразились сибирской язвой. Прошлые исследования генетических особенностей штаммов *B. anthracis*, изолированных в Республике Дагестан в 1957–1979 гг., основанные на результатах *cap*SNP-анализа, свидетельствуют о принадлежности изолятов к генетическим группам А.Br008/009 и В.Br001/002 [4]. Анализ данных MLVA-8-генотипирования выявил наличие четырех MLVA-генотипов среди *B. anthracis*, выделявшихся ранее на территории республики [5]. Представлялось важным проведение молекулярно-генетического исследования полученных штаммов сибирской язвы с использованием полногеномного секвенирования.

Цель работы – изучение молекулярно-генетических свойств штаммов *B. anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Республике Дагестан в 2019 году, на основе данных полногеномного секвенирования.

Материал и методы. В работе использовались штаммы *B. anthracis*, выделенные на территории Республики Дагестан от больных с диагнозом сибирская язва (12/16, 14/41, 1374/873), из мяса КРС (1373/865),

а также из почвы в местах вынужденного убоя КРС (1375/874, 1376/875). Идентификацию, культивирование и анализ свойств штаммов проводили с использованием стандартных методов лабораторной диагностики в соответствии с МУК 4.2.2941-11.

Подготовка ДНК библиотек, секвенирование геномов и анализ данных. Полногеномное секвенирование ДНК шести изолятов *B. anthracis* проводили с помощью Ion PGM (Life Technologies, США). Подготовку ДНК библиотек с длиной ридов 400 п. н. для полногеномного секвенирования осуществляли с помощью набора реагентов Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США) в соответствии с протоколом производителя.

Качество данных, полученных в ходе секвенирования, оценивали с помощью программного обеспечения FastQC 0.11.3 [6]. Чтения, имеющие средний показатель качества $Q < 20$, были отфильтрованы с помощью программы Trimmomatic версия 0.33. Сборка геномов осуществлялась с использованием Newbler v 3.0 [7]. Качество сборки геномов оценивали с помощью программы Quast 5.0. В качестве референсной геномной последовательности для оценки качества сборки геномов был выбран геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (GCA_000008445.1). Аннотация геномов была выполнена с помощью PROKKA [8]. Поиск генов, кодирующих факторы вирулентности и обуславливающих устойчивость к антибактериальным препаратам, проводили с использованием ABRicate v. 0.8.13.

Полногеномный SNP-анализ. Генотипирование *B. anthracis* на основе полногеномного SNP-анализа было выполнено с помощью Parsnp [9]. Полученные SNP-профили использовались для построения филогенетической реконструкции по методу максимального правдоподобия в соответствии с моделью Tamura – Nei [10] в программе Mega10. Для визуализации филогенетического дерева использовали программу Figtree.

Результаты и обсуждение. По основным фенотипическим свойствам и диагностическим признакам исследуемые штаммы возбудителя сибирской язвы, выделенные в Республике Дагестан в разное время, не отличались от типовых штаммов *B. anthracis* (табл. 1).

Таблица 1

Перечень штаммов *B. anthracis*, использованных в работе

Параметры	Штаммы					
	1373/865	1374/873	1375/874	1376/875	14/41	12/16
Дата выделения	Окт. 2019	Окт. 2019	Окт. 2019	Окт. 2019	Дек. 1963	Июнь 1957
Место выделения	Новолакский район	Новолакский район	Новолакский район	Новолакский район	Хасавюртовский район	Бабаюртовский район
Объект выделения	Мясо крупного рогатого скота	Фрагмент струпа	Почва	Почва	Содержимое язвы больного	Содержимое карбункула больного
pXO1	+	+	+	+	+	+
pXO2	+	+	+	+	+	+
Капсулообразование	+	+	+	+	+	+
Щелочная фосфатаза	-	-	-	-	-	-
Гемолиз	-	-	-	-	-	-
Лецитиназная активность	-	-	-	-	-	-
Лизис фагом Гамма	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» – положительный; «-» – отрицательный.

По результатам полногеномного секвенирования среднее покрытие геномов составляло 76–95x, количество контигов фрагментированных геномов варьировало от 59 до 102 (>500 п. н.). Общий размер сборки геномов секвенированных штаммов – от 5434125 до 5452965 п. н., что составляет 98,63–98,79 % от референсного генома Ames Ancestor (GCA_000008445.1). В результате проведенного анализа можно сделать вывод, что исследуемые штаммы обладают типичным генетическим профилем, характерным для патогенных штаммов *B. anthracis* (табл. 2). В частности, было обнаружено наличие генов, обуславливающих резистентность к макролидам, карбапенемам, бета-лактамам антибиотикам, фосфомицину, ванкомицину и стрептоцитину. Однако, несмотря на наличие генов резистентности, штаммы чувствительны к большинству антибиотиков, включая бета-лактамы антибиотиков, ванкомицин, аминогликозиды, проявляют умеренную устойчивость к цефатоксиму и цефтриаксону и устойчивы только к фосфомицину, полимиксину и триметоприму. Чувствительность к антибактериальным препаратам объясняется тем, что гены устойчивости к препаратам у *B. anthracis* репрессированы, в отличие от аналогичных генов *B. cereus*. В частности, два хромосомных гена, *bla1* и *bla2*, кодирующие β-лактамазы пенициллиназу и цефалоспоринолазу соответственно, отвечающие за устойчивость к пенициллину и цефалоспорином, у *B. anthracis* слабо транскрибируются и их экспрессия недостаточна для придания устойчивости к β-лактамам антибиотикам. Кроме того, индукции β-лактамазной активности и устойчивости к пенициллину при воздействии сублетальных доз β-лактамов антибиотиков в процессе роста у *B. anthracis* не происходит, в отличие от *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis*, проявляющих индуцибельную β-лактамовую резистентность [11].

для филогенетической реконструкции по методу максимального правдоподобия.

Структура филогенетического дерева представлена тремя ветвями, которые соответствуют главным генетическим линиям А, В и С. Изоляты 1373/865, 1374/873, 1375/874 и 1376/875, выделенные в 2019 году, принадлежат к группе TEA Br.008/011, ветвь А.Br.118 (рис.). Геномы всех четырех изолятов в высокой степени однородны, о чем свидетельствуют 5 SNP, отличающих штаммы друг от друга. Поиск специфичных SNP позволил выявить 29 нуклеотидных полиморфизмов, отличающих эти изоляты от всех других штаммов выборки. Установлено, что изоляты 1373/865, 1374/873, 1375/874 и 1376/875 тесно связаны со штаммами клады «STI». Чтобы исключить вероятность того, что эти изоляты представляют отдельную ветвь клады «STI», был проведен поиск общих SNP, специфичных как для исследуемых штаммов, так и для штаммов клады «STI». В результате было обнаружено только 3 SNP, которые удовлетворяли условиям поиска. Это свидетельствует о том, что исследуемые изоляты формируют отдельную филогенетическую ветвь, не относящуюся к кладе «STI».

Таблица 2

Гены вирулентности и резистентности

Гены вирулентности	<p><i>nheA</i> – non-hemolytic enterotoxin A <i>nheB</i> – non-hemolytic enterotoxin B <i>nheC</i> – non-hemolytic enterotoxin C <i>BAS3109</i> – thiol-activated cytolysin <i>inhA</i> – immune inhibitor A metalloprotease <i>capA</i> – CapA required for Poly-gamma-glutamate transport <i>capB</i> – CapB involved in Poly-gamma-glutamate synthesis <i>capC</i> – CapC involved in Poly-gamma-glutamate synthesis <i>capE</i> – CapE involved in Poly-gamma-glutamate synthesis <i>dep/cadD</i> – gamma-glutamyltranspeptidase required for polyglutamate anchoring to peptidoglycan <i>cya</i> – calmodulin sensitive adenylate cyclase edema factor <i>pagA</i> –anthrax toxin moiety protective antigen <i>lef</i> – anthrax toxin lethal factor precursor</p>
Гены резистентности	<p><i>bla1</i> – class A beta-lactamase Bla1 <i>fosB</i> – FosB/FosD family fosfomycin resistance bacillithiol transferase <i>fosB2</i> – FosB/FosD family fosfomycin resistance bacillithiol transferase <i>mphL</i> – FosB/FosD family fosfomycin resistance bacillithiol transferase <i>vanZ-F</i> – glycopeptide resistance protein VanZ-F <i>satA</i> – streptothricin N-acetyltransferase SatA <i>BcII</i> – BcII family subclass B1 metallo-beta-lactamase</p>

В ходе полногеномного SNP-анализа были обнаружены 6431 SNP, которые затем были использованы

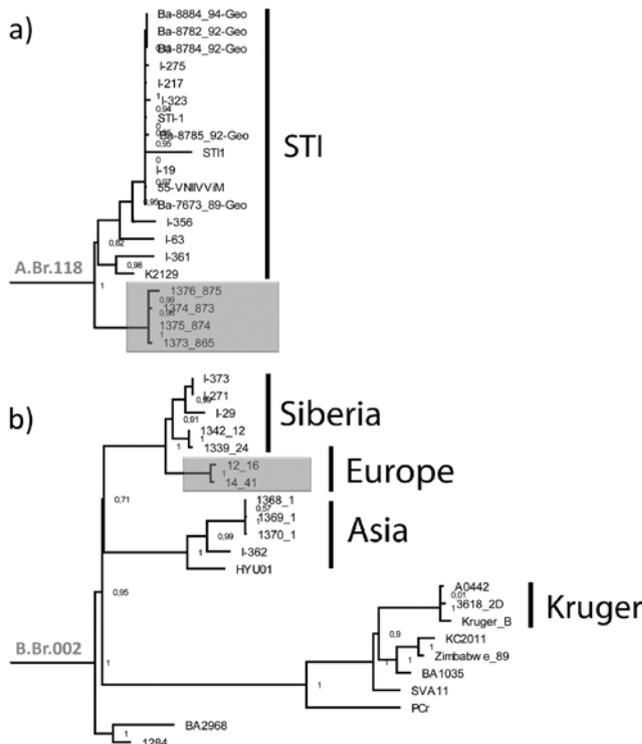


Рис. Фрагмент филогенетической реконструкции на основе анализа wgSNP 266 геномов *B. anthracis*:
 а) структура филогенетической линии А.Br.118;
 б) структура филогенетической линии В.Br.002

Штаммы 12/16 и 14/41 относятся к главной генетической линии В, ветвь В.Br.002 (клада «Europe») (рис.). Они имеют высокую степень генетического родства со штаммами из Западной Сибири (клада «Siberia»), которые были описаны нами ранее [12, 13]. Данная филогенетическая связь подтверждается наличием 32 общих специфичных SNP. При сравнительном анализе SNP выявлена высокая геномная однородность профилей штаммов 12/16 и 14/41 между собой – обнаружены 24 общих SNP, а отличались эти два штамма лишь на 5 SNP.

Установлено, что изоляты *B. anthracis*, выделенные в центральной части Республики Дагестан в разное

время, принадлежат к двум разным субкладам основных генетических линий А и В. Примечательно, что в европейской части России, в том числе и в Республике Дагестан, штаммы линии В не выделялись после 1987 года. Можно предположить, что штаммы субклады В.Br.002, выделенные на территории Республики Дагестан, имеют общее происхождение со штаммами из Западной Сибири.

Заключение. Таким образом, филогенетический анализ является эффективным инструментом в комплексе методов при эпидемиологическом расследовании случаев заболевания сибирской язвой. Целе-

сообразно продолжить накопление и систематизацию геномных данных изолятов *B. anthracis*, выделенных на территории Республики Дагестан в прошлом. Это будет в значительной мере расширять возможности дифференциации штаммов во время расследования вспышек сибирской язвы в будущем, а также способствовать изучению геномного разнообразия и генетических особенностей штаммов возбудителя сибирской язвы не только в Дагестане, но на Кавказе в целом.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Carlson C. J., Kracalik I. T., Ross N., Alexander K. A., Hugh-Jones M. E. [et al.]. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. *Nat. Microbiol.* 2019;4(8):1337-1343. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0435-4>
2. Hendricks K., Person M. K., Bradley J. S., Mongkolrattanothai T., Hupert N. [et al.]. Clinical Features of Patients Hospitalized for All Routes of Anthrax, 1880-2018: A Systematic Review. *Clin. Infect. Dis.* 2022;75(Suppl.3):S341-S353. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac534>
3. Куличенко А. Н., Буравцева Н. П., Рязанова А. Г., Еременко Е. И. Сибирская язва на Северном Кавказе. Майкоп, 2016. [Kulichenko A. N., Buravtseva N. P., Ryzanova A. G., Eremenko E. I. Anthrax in the North Caucasus. Майкоп, 2016. (In Russ.)]
4. Котенева Е. А., Цыганкова О. И., Калинин А. В., Абрамович А. В. Спектр canSNP-генотипов как показатель внутривидового генетического и фенотипического разнообразия штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных на Северном Кавказе и сопредельных территориях. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2019;14(4):580-583. [Koteneva E. A., Tsygankova O. I., Kalinin A. V., Abramovich A. V. The spectrum of canSNP-genotypes as an indication of intraspecific genetic and phenotypic variety of *Bacillus anthracis* strains isolated in North Caucasus and in its adjacent territories. *Medicinskii Vestnik Severnogo Kavkaza. – Medical News of North Caucasus.* 2019;14(4):580-583. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14144>
5. Еременко Е. И., Рязанова А. Г., Цыганкова О. И., Цыганкова Е. А., Буравцева Н. П., Куличенко А. Н. Генотипическое разнообразие штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных в регионе Кавказа. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012;27(2):74-78. [Eremenko E. I., Ryzanova A. G., Tsygankova O. I., Tsyganova E. A., Buravtseva N. P., Kulichenko A. N. Genotype diversity of *Bacillus anthracis* strains isolated from the Caucasus region. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya. – Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2012;27(2):74-78. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.3103/S0891416812020024>
6. de Sena Brandine G., Smith A. D. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Res.* 2019;8:1874. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21142.2>
7. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M. [et al.]. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012;19(5):455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
8. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
9. Treangen T. J., Ondov B. D., Koren S., Phillippy A. M. The harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol.* 2014;15(11):524. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0524-x>
10. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 1993;10(3):512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
11. Gargis A. S., McLaughlin H. P., Conley A. B., Lascols C., Michel P. A. [et al.]. Analysis of Whole-Genome Sequences for the Prediction of Penicillin Resistance and β -Lactamase Activity in *Bacillus anthracis*. *mSystems.* 2018;3(6):e00154-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00154-18>
12. Pisarenko S. V., Eremenko E. I., Ryzanova A. G., Kovalev D. A., Buravtseva N. P. [et al.]. Phylogenetic analysis of *Bacillus anthracis* strains from Western Siberia reveals a new genetic cluster in the global population of the species. *BMC Genomics.* 2019;20(1):692. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6060-z>
13. Eremenko E. I., Pechkovskii G. A., Pisarenko S. V., Ryzanova A. G., Kovalev D. A. [et al.]. Phylogenetics of *Bacillus anthracis* isolates from Russia and bordering countries. *Infection, Genetics and Evolution.* 2021;92:10489. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104890>

Поступила 15.12.2022

Сведения об авторах:

Бобрышева Ольга Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории биохимии; тел.: 89624488397; e-mail: olc83@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-6338-4476

Писаренко Сергей Владимирович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник; тел.: (8652)260312; e-mail: stavnipchi@mail.ru; ORCID: 0000-0001-6458-6790

Ковалев Дмитрий Анатольевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией; тел.: (8652)260312; e-mail: stavnipchi@mail.ru; ORCID: 0000-0002-9366-5647

Еременко Евгений Иванович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории сибирской язвы; тел.: (8652)260312; e-mail: stavnipchi@mail.ru; ORCID: 0000-0002-1117-1185

Рязанова Алла Геннадьевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией; тел.: (8652)260312; e-mail: stavnipchi@mail.ru; ORCID: 0000-0002-5196-784X

Семенова Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории; тел.: (8652)260312; e-mail: stavnipchi@mail.ru; ORCID: 0000-0003-0274-898X

Ульшина Диана Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии; тел.: (8652)260312; e-mail: stavnipchi@mail.ru; ORCID: 0000-0001-7754-2201

Куличенко Александр Николаевич, академик РАН, директор; тел.: (8652)260312; e-mail: stavnipchi@mail.ru; ORCID: 0000-0002-9362-3949