

Оригинальное исследование  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-487>



## Разработка методики молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis* с использованием новых VNTR- и INDEL-маркеров

Печковский Г.А.<sup>1✉</sup>, Еременко Е.И.<sup>1</sup>, Рязанова А.Г.<sup>1</sup>, Писаренко С.В.<sup>1</sup>, Шапаков Н.А.<sup>1</sup>, Аксенова Л.Ю.<sup>1</sup>, Семенова О.В.<sup>1</sup>, Тимченко Л.Д.<sup>2</sup>, Куличенко А.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

<sup>2</sup>Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

### Аннотация

**Введение.** *Bacillus anthracis* — возбудитель особо опасного зооноза сибирской язвы — отличается высокой генетической однородностью, что вызывает необходимость совершенствования методов генотипирования.

**Целями** исследования были поиск, описание VNTR- и INDEL-локусов *B. anthracis* и разработка на их основе методики генотипирования посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией результатов.

**Материалы и методы.** Поиск VNTR- и INDEL-маркеров и филогенетический анализ выполняли на выборке из 388 геномов штаммов *B. anthracis*: 322 из GenBank (RefSeq) и 66 — из коллекции Ставропольского противочумного института. Филогенетический анализ проводили на основе SNP корового выравнивания с помощью программы «Parsnp». Поиск маркеров осуществляли с использованием программы «Mauve» и авторских скриптов на языке Python. ПЦР выполняли с помощью набора «ScreenMix-HS».

**Результаты.** Найдены геномные вариации штаммов *B. anthracis* (SNP — 25 664, SNR — 14 387, VNTR — 693, INDEL — 14 667), биоинформатический анализ которых позволил выявить 9 новых VNTR и 6 INDEL молекулярных маркеров, наиболее подходящих для генотипирования. Описаны генетические (аллельные) варианты маркеров. Для найденных маркеров подобраны праймеры и разработан протокол ПЦР с детекцией методом электрофореза в агарозном геле. В результате кластеризации при типировании с использованием VNTR-маркеров штаммы разделялись на 9 кластеров: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.005/006, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.008/009 (штамм 228/269), B.Br.001/002. При типировании с применением INDEL-маркеров штаммы разделялись на 6 кластеров: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), B.Br.001/002 (B.Br.014), а также кластер, включающий представителей нескольких генетических групп: A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.005/006 и B.Br.001/002.

**Заключение.** Использование разработанной методики идентификации переменных VNTR- и INDEL-локусов позволяет достоверно определять филогенетическое положение штаммов *B. anthracis* и перспективно для применения в процессе эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы.

**Ключевые слова:** генотипирование, VNTR, INDEL *Bacillus anthracis*, полногеномное секвенирование, филогенетический анализ

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Печковский Г.А., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Шапаков Н.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Тимченко Л.Д., Куличенко А.Н. Разработка методики молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis* с использованием новых VNTR- и INDEL-маркеров. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):362–371.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-487>

EDN: <https://www.elibrary.ru/kjnhyg>

# Development of a technique for molecular typing of *Bacillus anthracis* strains using new VNTR and INDEL markers

Grigorii A. Pechkovskii<sup>1</sup>✉, Evgeny I. Eremenko<sup>1</sup>, Alla G. Ryazanova<sup>1</sup>,  
Sergey V. Pisarenko<sup>1</sup>, Nikolay A. Shapakov<sup>1</sup>, Lyudmila Yu. Aksenova<sup>1</sup>,  
Olga V. Semenova<sup>1</sup>, Lyudmila D. Timchenko<sup>2</sup>, Alexander N. Kulichenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia;

<sup>2</sup>North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

## Abstract

**Introduction.** *Bacillus anthracis*, the pathogen of a particularly dangerous zoonotic disease known as anthrax, requires strict epidemiological control and is characterized by high genetic homogeneity, which necessitates the development of genotyping methods.

**The aim** of the study were to find and characterize the VNTR and INDEL loci of *B. anthracis* and to develop on their basis a genotyping technique by PCR with electrophoretic detection of the results.

**Materials and methods.** Marker search and phylogenetic analysis were performed on a sample of 388 genomes of *B. anthracis* strains, 322 from the GenBank collection (RefSeq) and 66 from the collection of the Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor. Phylogenetic analysis was performed on the basis of SNP crustal alignment using the Parsnp program. The search for markers was carried out using the Mauve program and author's scripts in Python. PCR was performed using a ScreenMix-HS kit (CJSC "Eurogen", Russia).

**Results.** Genomic variations of *B. anthracis* strains (SNP — 25,664, SNR — 14,387, VNTR — 693, INDEL — 14,667) were found, bioinformatic analysis of which revealed nine new VNTR and six INDEL molecular markers most suitable for genotyping. The genetic (allelic) variants of the markers are described. Primers were selected for the found markers and a PCR protocol with detection by electrophoresis in agarose gel was developed. When typing using VNTR markers was applied, the strains were divided into nine clusters: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.005/006, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.008/009 (strain 228/269), B.Br.001/002. When typing using INDEL markers, the strains were divided into six clusters: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), B.Br.001/002 (B.Br.014), as well as a cluster comprising several genetic lineages: A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.005/006 и B.Br.001/002.

**Conclusion.** The use of the developed methodology for the identification of variable VNTR and INDEL loci makes it possible to reliably determine the phylogenetic position of *B. anthracis* strains and is promising for use in the epidemiological investigation of anthrax outbreaks.

**Keywords:** genotyping, VNTR, INDEL, *Bacillus anthracis*, whole genome sequencing, phylogenetic analysis

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Pechkovskii G.A., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Shapakov N.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Timchenko L.D., Kulichenko A.N. Development of a technique for molecular typing of *Bacillus anthracis* strains using new VNTR and INDEL markers *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(3):362–371.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-487>

EDN: <https://www.elibrary.ru/kjnhgy>

## Введение

*Bacillus anthracis* — спорообразующая грамположительная палочка, возбудитель сибирской язвы, особо опасной инфекции с глобальным ареалом распространения. В ранних исследованиях попытки определить генетическую вариабельность *B. anthracis* не увенчались успехом, что говорило о высокой генетической мономорфности этого вида [1]. Первым генетическим маркером, пригодным для дифференциации штаммов *B. anthracis*, были тандемные повторы в хромосомном локусе *vrrA* —

последовательно повторяющиеся идентичные фрагменты ДНК (variable number tandem repeats, VNTR) [2]. Аллельные варианты *vrrA* с числом повторов от 2 до 6 позволяли разделить все штаммы на 5 групп [2, 3]. Маркер вошёл в первую схему типирования методом мультилокусного VNTR-анализа MLVA8 (Multiple loci VNTR analysis, MLVA), состоящую из 6 хромосомных и 2 плазмидных VNTR-локусов. VNTR-локусы в целом отличаются от других вариабельных областей тем, что имеют большую частоту изменчивости и большее количество вари-

антов, а также проявлением эффекта гомоплазии, т.е. независимыми или параллельными мутациями у разных генетических линий [4]. Поэтому при генотипировании на основе анализа VNTR-локусов затруднительно изучение внутривидовой эволюции, но при этом данный метод удобен в эпидемиологическом расследовании вспышек сибирской язвы. Активные поиски локусов *B. anthracis* с тандемными повторами привели к открытию 32 VNTR-маркеров в 6 схемах MLVA-генотипирования [5–10].

С целью исследования генетического разнообразия был разработан и апробирован на значительной выборке штаммов метод генотипирования на основе анализа «канонических» SNP (canSNP-типирование) с определением 12 основных генетических линий [8]. Канонические линии наиболее точно отражают эволюционные группы *B. anthracis*, поэтому лучше всего подходят для описания распределения штаммов возбудителя сибирской язвы в мире. В дальнейшем были выполнены масштабные филогенетические исследования с подробным описанием, созданием номенклатуры названий и связей генетических кластеров. Подкластерам канонических линий были присвоены номера или тривиальные имена [11, 12]. В частности, каноническая линия A.Br.008/009 включает в себя подгруппы Tsiankovskii и STI, широко представленные на территории Содружества Независимых Государств.

В 2019 г. в Республике Дагестан произошла вспышка сибирской язвы с изолятами, которые кластеризовались в отдельную филогенетическую группу A.Br.125, принадлежащую STI.

Каноническая линия V.Br.001/002 содержит кластеры Siberia и Europe, составляя V.Br.014, а также кластеры Asia и V.Br.018.

С учётом устоявшихся и вновь идентифицированных обозначений генетических линий и групп в последующем описании мы использовали следующий порядок. Сначала указывается каноническая линия, затем новая подгруппа или кластер в её пределах с устоявшимся обозначением, если таковые идентифицированы. Например, большинство штаммов основной линии A, выделенных на территории России, обозначаются как относящиеся к A.Br.008/009 (Tsiankovskii) или A.Br.008/009 (STI).

К молекулярным маркерам также относятся INDEL (insertion/deletion) — переменные области, не содержащие повторов, которые существуют преимущественно в виде двух генетических вариантов: с делецией или с инсерцией.

Для бактерии *Francisella tularensis* была разработана схема INDEL-типирования, включающая 38 INDEL-локусов. Исследование показало, что применение таких маркеров повышает точность типирования [13]. Методики генотипирования на основе анализа INDEL-локусов также созданы для *Helicobacter pylori*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio*

*cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis* и доказали свою высокую разрешающую способность и надёжность в определении филогенетического положения штаммов [14–17]. В настоящее время система INDEL-генотипирования для *B. anthracis* не разработана.

Целями исследования были поиск, описание VNTR- и INDEL-локусов *B. anthracis* и разработка на их основе методики генотипирования посредством ПЦР с электрофоретической детекцией результатов.

## Материалы и методы

Поиск маркеров и филогенетический анализ выполняли на выборке из 388 геномов штаммов *B. anthracis*: 322 — из коллекции GenBank (RefSeq), 66 — из коллекции геномов патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института, описанных ранее [12]. Номера геномов приведены в Приложении 1 на сайте журнала (<https://doi.org/10.36233/0372-9311-487-s1>). Геномные последовательности штаммов *B. anthracis* из коллекции Ставропольского противочумного института депонированы в «Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов» (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии).

Поиск маркеров осуществляли посредством алгоритма (пайплайна), состоящего из попарного выравнивания полных геномов на референсную последовательность с использованием программы «Mauve» и далее, с помощью авторских скриптов на языке Python, извлечения из выравниваний генетических вариантов, объединения и их анализа.

Верификацию маркеров и определение длин маркеров производили в программе «BLASTn» с помощью фланкирующих последовательностей или определённых праймеров.

С целью сопоставления филогенетических групп с генетическими маркерами выполняли построения филогенетической дендрограммы на основе SNP корового выравнивания с помощью программы «Parsnp» из пакета «Harvest suite» с референсным геномом *B. anthracis* Ames Ancestor (GCF\_000008445.1). Из коровых SNP удаляли позиции, имеющие неизвестный нуклеотид «N». Далее SNP из файла VCF конвертировали в файл FASTA. Филогенетическое дерево строили в программе «MEGA XI» методом максимального правдоподобия с моделью замен Tamura-Nei [18].

Сопоставление длин генетических вариантов маркеров с филогенетической дендрограммой и визуализацию данных осуществляли в среде языка R с библиотеками ggtree и ggplot2.

Конструирование праймеров осуществляли с использованием программы «Primer-BLAST», их синтез проводили в Ставропольском противочумном институте.

Пробоподготовку культур *B. anthracis* проводили согласно с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Экстракцию ДНК *B. anthracis* осуществляли с применением набора «ДНК-сорб-В» («ИЛС»).

Для верификации данных в ПЦР с электрофоретической детекцией использовали представительную филогенетическую выборку из секвенированных штаммов. ПЦР выполняли с помощью набора «ScreenMix-HS» («Евроген»). Количество праймеров в реакции равнялось 0,3 мкМ. Использовали следующий режим термоциклирования: первый этап (активация) — 95°C, 5 мин — 1 цикл, второй этап — денатурация 95°C, 20 с, отжиг 60°C, 20 с, элонгация 72°C, 60 с — 40 циклов, третий этап (финальная элонгация) — 72°C, 5 мин — 1 цикл. Электрофорез проводили в 2% агарозном геле с применением стандарта молекулярных размеров 100 п. н. («СибЭнзайм»).

Кластеризацию данных, полученных по результатам ПЦР с электрофоретической детекцией, выполняли методом single (Nearest Point Algorithm) на языке Python с библиотекой scipy.

## Результаты и обсуждение

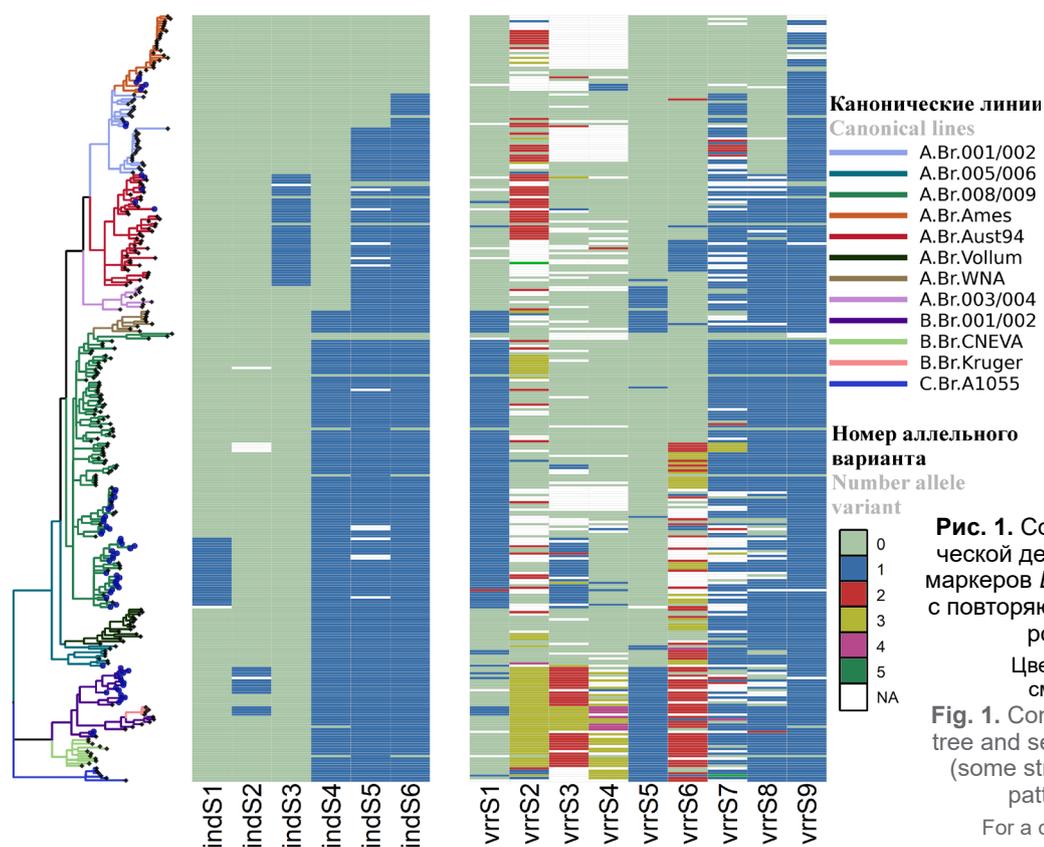
Исследование включало два этапа. На первом этапе выполняли поиск и описание маркерных локусов, на втором — осуществляли эксперименталь-

ное подтверждение и апробацию методики типирования с использованием найденных маркеров.

В результате работы алгоритма были обнаружены следующие геномные вариации: SNP — 25 664, SNR — 14 387, VNTR — 693, INDEL — 14 667.

Поиск маркеров среди всех найденных вариаций производили поэтапно с фильтрацией по ряду критериев. Разница размеров вариантов переменных локусов должна быть не менее 15 п. н. Отбирали преимущественно такие локусы, у которых хотя бы один генетический вариант в наборе штаммов *B. anthracis* из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института был отличен от вариантов остальных штаммов. Исключали уже описанные переменные локусы. С учётом критериев было найдено 537 переменных областей.

Вслед за этим исследовали частоту встречаемости аллельных вариантов локусов штаммов в определённых генетических линиях, для этого сопоставляли длины генетических вариантов маркеров с филогенетической дендрограммой, построенной на SNP корового генома (рис. 1). Большинство вариантов локусов встречались только у 1 штамма или минимального количества штаммов. Значительную группу составляли варианты, разделяющие основные генетические линии А, В, и С, в том числе ранее найденный INDEL indE1 размером 38 п. н. [19], что логично, т. к. это наиболее эволюционно далёкие генетические линии.



**Рис. 1.** Сопоставление филогенетической дендрограммы и выбранных маркеров *B. anthracis* (часть штаммов с повторяющимся паттерном маркеров были удалены).

Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

**Fig. 1.** Comparison of the phylogenetic tree and selected markers *B. anthracis* (some strains with repeated marker patterns were removed).

For a color version of the picture, see the journal's website.

Было отобрано 56 VNTR- и INDEL-локусов (табл. 1). Из них выбирали наиболее филогенетически значимые и оптимальные для проведения электрофореза. Таким образом, в итоге было выбрано 9 VNTR-маркеров и 6 INDEL-маркеров, наиболее подходящих для генотипирования (рис. 1). Особенность найденных INDEL заключается в повторях, фланкирующих INDEL, при этом один из повторов включается в делецию, а другой — нет. По этой причине можно предположить образование сложной структуры между цепями ДНК при репликации, из-за которой полимеразный комплекс может ошибочно удваивать цепь ДНК, вырезая часть последовательности. При этом невозможна обратная вставка INDEL, что, вероятно, уменьшает эффекты гомоплазии.

Инделлы indS1 (ген *FAD-binding oxidoreductase*), indS2 (ген гипотетического протеина *WP\_000829051.1*) и indS6 (ген *cell surface protein*), локализованные в кодирующих белки генах, являются геномными вариациями без сдвига рамки считывания. Индел indS4 локализуется в регионе между генами *GBAA\_RS02140* (ABC transporter ATP-binding protein) и *GBAA\_RS02145* (ABC-F family ATP-binding cassette domain-containing protein). IndS5 локализуется в регионе между генами *GBAA\_RS03470* (hypothetical protein) и *GBAA\_RS03475*

(alanine:cation symporter family protein). Индел indS3 сдвигает рамку считывания гена, кодирующего белок SPFH/Band 7/PHB domain protein.

Генетический вариант индела indS1 с делецией характерен для кластера A.Br.008/009 (Tsiankovskii). Индел indS2 необычен тем, что существуют 3 генетических варианта данного локуса: инсерция и 2 варианта делеций. Разницей между двумя делециями является сдвиг в 9 пар нуклеотидов. Один вариант характерен для подгрупп Siberia и Europe canSNP группы V.Br.001/002, другой характерен для штаммов группы V.Br.Kruger. Вариант локуса indS3 с делецией встречается у штаммов группы A.Br.Aust94, за исключением штамма 9080-G, выделенного в Грузии, и штамма Kanchipuram из Индии. Варианты инделов с делецией indS4, indS5, indS6 встречаются у кластеров A.Br.004, A.Br.001 и группы A.Br.Ames соответственно.

Количество аллельных вариантов выбранных VNTR-маркеров варьируют от 2 до 6 с длиной повтора от 30 п. н. до 196 п. н. (рис. 1). Локус *vrrS1* имеет вариант 425 п. н., встречающийся у A.Br.008/009 и A.Br.WNA, а также один уникальный вариант длиной 337 п. н., специфичный для штамма 228/269. Генетические варианты локуса *vrrS2* встречаются у групп A.Br.008/009 и A.Br.Aust94. Два VNTR-маркера — *vrrS3* и *vrrS4* —

**Таблица 1.** Описание найденных молекулярных маркеров *B. anthracis*

**Table 1.** Description of the identified molecular *B. anthracis* markers

Маркер Marker	Координаты локуса в геноме по референсному штамму Ames Ancestor (GCF_000008445.1) Coordinates of the locus in the genome according to the Ames Ancestor reference strain (GCF_000008445.1)	Репликон Replicon	Номер аллельного варианта (длина генетического варианта, п. н.) The number of the allele variant (the length of the genetic variant, bp)
indS1	1276500–1276764	Хромосома   Chromosome	1 (265, 266), 2 (241)
indS2	1904893–1905267	Хромосома   Chromosome	1 (373–375), 2 (312)
indS3	1944246–1944531	Хромосома   Chromosome	1 (286), 2 (253)
indS4	402388–402715	Хромосома   Chromosome	1 (328), 2 (423–424)
indS5	655408–655662	Хромосома   Chromosome	1 (255), 2 (272, 284–285)
indS6	4691499–4691775	Хромосома   Chromosome	1 (277), 2 (388–389)
<i>vrrS1</i>	1721221–1721733	Хромосома   Chromosome	1 (513), 2 (425)
<i>vrrS2</i>	4489063–4489484	Хромосома   Chromosome	1 (422), 2 (381), 3 (299,307), 4 (217), 5 (258) 6 (338–340)
<i>vrrS3</i>	8316–8860	pXO2	1 (544–546), 2 (301–302), 3 (464), 4 (383)
<i>vrrS4</i>	8916–9269	pXO2	1 (354–355), 2 (263–264), 3 (444), 4 (534), 5 (174)
<i>vrrS5</i>	3155556–3155727	Хромосома   Chromosome	1 (172), 2 (142)
<i>vrrS6</i>	1092722–1092959	Хромосома   Chromosome	1 (238), 2 (198), 3 (318–319), 4 (398), 5 (278)
<i>vrrS7</i>	5088417–5088723	Хромосома   Chromosome	1 (306–307), 2 (190), 3 (229), 4 (385), 5 (346), 6 (268) (385)
<i>vrrS8</i>	5031546–5031803	Хромосома   Chromosome	1 (258, 263–265), 2 (354, 359–366)
<i>vrrS9</i>	3742896–3743541	Хромосома   Chromosome	1 (646), 2 (450)
indNS1	130607–131099	pXO1	1 (454, 456), 2 (494–495)
indNS2	596340–596832	Хромосома   Chromosome	1 (352), 2 (492–493)

Окончание табл. 1 | End of the Table 1

Маркер Marker	Координаты локуса в геноме по референсному штамму Ames Ancestor (GCF_000008445.1) Coordinates of the locus in the genome according to the Ames Ancestor reference strain (GCF_000008445.1)	Репликон Replicon	Номер аллельного варианта (длина генетического варианта, п. н.) The number of the allele variant (the length of the genetic variant, bp)
indNS3	122138–122690	pXO1	1 (551–555), 2 (485, 487)
indNS4	77192–77540	pXO1	1 (330), 2 (349), 3 (619)
indNS5	482012–482157	Хромосома   Chromosome	1 (146, 149), 2 (504)
indNS6	385564–385837	Хромосома   Chromosome	1 (271–276), 2 (305–308)
indNS7	1372136–1372298	Хромосома   Chromosome	1 (163), 2 (181)
indNS8	2559203–2559485	Хромосома   Chromosome	1 (282–284), 2 (335–336)
indNS9	3855034–3855252	Хромосома   Chromosome	1 (219), 2 (231), 3 (239–241)
indNS10	4303573–4303825	Хромосома   Chromosome	1 (253), 2 (310–311)
indNS11	4965875–4966088	Хромосома   Chromosome	1 (214), 2 (321)
indNS12	1209302–1209701	Хромосома   Chromosome	1 (253), 2 (399–401)
indNS13	2728738–2729257	Хромосома   Chromosome	1 (229), 2 (519–520)
indNS14	486258–486638	Хромосома   Chromosome	1 (285), 2 (381)
indNS15	1287411–1287701	Хромосома   Chromosome	1 (201), 2 (291)
indNS16	910496–910796	Хромосома   Chromosome	1 (301), 2 (490, 491)
indNS17	2533966–2534193	Хромосома   Chromosome	1 (228), 2 (634–636)
indNS18	2593388–2593616	Хромосома   Chromosome	1 (228–230), 2 (283)
indNS19	3352013–3354229	Хромосома   Chromosome	1 (193, 194), 2 (2124), 3 (2207, 2215–2218, 2223)
indNS20	3829833–3830053	Хромосома   Chromosome	1 (220–221), 2 (251)
indNS21	4811428–4811664	Хромосома   Chromosome	1 (236–237), 2 (600, 602)
indNS22	29253–29436	pXO1	1 (184), 2 (269)
indNS24	1146673–1147101	Хромосома   Chromosome	1 (256), 2 (270–272), 3 (427–430)
indNS25	2224848–2225376	Хромосома   Chromosome	1 (270), 2 (418), 3 (529–530, 537)
indNS26	2687438–2687847	Хромосома   Chromosome	1 (240–241), 2 (410, 408–410), 3 (429) 4 (580)
indNS27	3304833–3305473	pXO1	1 (245, 257), 2 (640–641)
vrNS1	226241–226786	Хромосома   Chromosome	1 (545–547), 2 (694, 697–699), 3 (845–847), 4 (997–998), 5 (1146), 6 (1296–1298)
vrNS2	1333990–1334961	Хромосома   Chromosome	1 (343), 2 (554, 552), 3 (700), 4 (758, 762–763), 5 (779), 6 (971–974), 7 (1182–1183), 8 (1393)
vrNS3	2014690–2015095	Хромосома   Chromosome	1 (277), 2 (364), 3 (406, 409), 4 (535)
vrNS4	4233686–4234066	Хромосома   Chromosome	1 (237), 2 (273, 279), 3 (306, 309, 322), 4 (381), 5 (417), 6 (345)
vrNS5	4351696–4351908	Хромосома   Chromosome	1 (213), 2 (231)
vrNS6	4598742–4598948	Хромосома   Chromosome	1 (195, 207), 2 (171, 183)
vrNS7	811781–812154	Хромосома   Chromosome	1 (284), 2 (302), 3 (320), 4 (374), 5 (428), 6 (482)
vrNS8	1395847–1396186	Хромосома   Chromosome	1 (340), 2 (385)
vrNS9	1238148–1238579	Хромосома   Chromosome	1 (361, 366), 2 (398), 3 (430–433), 4 (465), 5 (498)
vrNS10	2264930–2265251	Хромосома   Chromosome	1 (244), 2 (283), 3 (322), 4 (361), 5 (439), 6 (517)
vrNS11	4352078–4352327	Хромосома   Chromosome	1 (220), 2 (235), 3 (250, 251), 4 (264–266), 5 (295), 6 (310)
vrNS12	4927425–4927645	Хромосома   Chromosome	1 (181), 2 (221)
vrNS13	4769700–4770199	Хромосома   Chromosome	1 (499–501), 2 (352–353)
vrNS15	1151194–1151463	Хромосома   Chromosome	1 (148), 2 (269–270), 3 (291), 4 (392–393, 396), 5 (514, 520)
vrNS16	2006677–2007157	Хромосома   Chromosome	1 (481), 2 (433, 435–436), 3 (526), 4 (301), 5 (345–347), 6 (390–391), 7 (255–257)

были обнаружены на плазмиде pXO2. Отдельные генетические варианты *vrrS3* встречаются у A.Br.008/009 (Tsiankovskii), B.Br.KrugerB и основной линии В соответственно. Локус *vrrS4* разделяет штаммы на линии А и В. Аллельный вариант 142 п. н. *vrrS5* встречается одновременно у штаммов линии В, групп A.Br.WNA и A.Br.003/004. Варианты *vrrS6* характерны для части штаммов группы A.Br.008/009, кластера A.Br.004 и линии В. Генетический вариант *vrrS7* 307 п. н. специфичен для группы A.Br.Ames. Вариант 258 п. н. *vrrS8* присущ группам A.Br.Ames и A.Br.001/002. Генетический вариант 646 п. н. *vrrS9* специфичен для штаммов A.Br.Ames, выделенных в Северной Америке.

Варибельные локусы могут быть сгруппированы по принадлежности к определённым генетическим кластерам. Так, схожей принадлежностью к группе A.Br.Aust94 обладают варианты инделов *indS3*, *indNS27* и VNTR — *vrrNS7*. Инделы *indS4* и *indNS11* характерны для A.Br.004, *indNS17* и *vrrS9* — для штаммов A.Br.Ames, выделенных в Северной Америке. Варианты инделов *indNS5*, *indNS9*, *indNS10* встречаются у штаммов групп A.Br.Ames и A.Br.001/002.

Для основной линии В характерными локусами являются *indNS1*, *indNS12*, *indNS19*, *indNS2*, *indNS3*, *indNS13*, *indNS14* и *vrrNS12*. Характерными локусами как для линии В, так и линии С являются *indNS18*, *indNS21*, *indNS4*, *indNS6*, *indNS7* и *indNS8*.

Часть из невыбранных маркеров также могли бы использоваться при типировании. Например, *vrrNS1* имеет высокую варибельность, но длинный повтор 150 п. н. и большую разницу по длине между минимальным и максимальным генетическим вари-

антом, что затруднительно для электрофоретической детекции при проведении ПЦР. VNTR *vrrNS15* вариабелен в пределах группы A.Br.008/009. Тандемные повторы *vrrNS16*, *vrrNS2*, *vrrNS4* не имеют строгой специфичности.

Для найденных маркеров были подобраны праймеры (табл. 2) и разработан протокол ПЦР с детекцией результатов методом электрофореза в агарозном геле (рис. 2, рис. 3). Отобранные маркеры имели длину нуклеотидной последовательности, достаточную для надёжного определения генетических вариантов локусов (табл. 3).

Часть штаммов не имеют плазмиды pXO2, соответственно локусы *vrrS3* и *vrrS4* у них также отсутствуют.

В результате кластеризации при INDEL-типировании штаммы разделялись на 6 кластеров: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), B.Br.001/002 (B.Br.014), а также кластер, включающий представителей нескольких генетических групп: A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.005/006 и B.Br.001/002. Кластер выделяется в отдельную группу, т. к. для штаммов этих линий не определены специфические INDEL-маркеры (рис. 4).

В результате кластеризация при VNTR-типировании штаммы разделялись на 9 кластеров: A.Br.Ames, A.Br.001/002, A.Br.Aust94, A.Br.005/006, A.Br.008/009 (Tsiankovskii), A.Br.008/009 (STI), A.Br.008/009 (A.Br.125), A.Br.008/009 (штамм 228/269), B.Br.001/002 (рис. 4). Штамм 228/269 входит в группу A.Br.008/009 (Tsiankovskii).

Дискриминирующая способность, определённая с использованием индекса разнообразия Hanter–

**Таблица 2.** Праймеры к VNTR- и INDEL-локусам *B. anthracis*  
**Table 2.** Primers to VNTR and INDEL loci *B. anthracis*

Название   Name	Прямой праймер   Forward primer	Обратный праймер   Reverse prime
<i>indS1</i>	TATTGGGCAGCAGCATTTGG	ATGAGTTGTACGGGACGCAA
<i>indS2</i>	TGGAGGGGTTGTCAAGCG	GCGTAACTCGGAGACCATGTA
<i>indS3</i>	AGCAACAGAAAAATGGGGCG	AATCGCTCTTGCTTCCCCTT
<i>indS4</i>	AGAAGGAACAAAAGGAAAAGTAGAG	CAACATGCTCGCCCTTCAAT
<i>indS5</i>	GGTCTATACGGCACACTCCA	GCTTCCAATATTTCCCCTCC
<i>indS6</i>	AGCCCCTTCTTCGGGTGAT	CGATGAAGATGTAAGACAGCCC
<i>vrrS1</i>	TCGTCCTGGAGCATCTTTCA	CCAAATCGCCCCTAGACCAA
<i>vrrS2</i>	GTTGTTTCATACGTCTATCCCCTTC	GTCCTTTTGGACAGCCTCTCTT
<i>vrrS3</i>	ACTGTAGTTGTCCCTACCCCTT	AGAAGTACAGGTGGGACAGGA
<i>vrrS4</i>	TTTCCTTGGCATGCTTCACT	TGCTGGTATAGAGCCATCTGC
<i>vrrS5</i>	AGCAATGTTTAATTCACCATCAAGT	GTACGCTTTAGTCGGAGACGG
<i>vrrS6</i>	AGGAAGCAGGTTAGCGTTGT	GCGCTATGTGGCGTCTTTTC
<i>vrrS7</i>	AGGAACACTGGTTCAGCCTAT	AGCAGGATCGCTTGCTAGAT
<i>vrrS8</i>	CTGCAATTGCCTTCGCCTTT	GCGAAAAAGAGAAAGCGCTAC
<i>vrrS9</i>	ATGAAGGTGTGACATGCCGT	GTGAAGCTGTAATTGTGGCGT



Gaston [20], для canSNP-типирования составила 0,7, а для типирования на основе анализа новых VNTR- и INDEL-маркеров — 0,79 и 0,84 соответственно.

### Заключение

В результате анализа геномов 388 штаммов *B. anthracis* были найдены и охарактеризованы варибельные области. Найдены новые VNTR- и INDEL-маркеры и изучена их привязка к кластерам глобальной филогении. Разработанный протокол идентификации маркеров методом ПЦР с электрофоретической визуализацией результатов позволяет надёжно определять аллельные варианты маркеров. Найденные 9 VNTR-маркеров и 6 INDEL-маркеров позволяют разделить штаммы *B. anthracis* на 6 и 9 генетических групп при типировании с отдельным анализом этих маркеров и на 10 — при совместном. Методику генотипирования на основе анализа новых VNTR- и INDEL-маркеров рекомендуется использовать в совместном или раздельном варианте как дополнение к существующим схемам генотипирования. Использование разработанной методики идентификации варибельных VNTR- и INDEL-локусов позволяет достоверно определять филогенетическое положение штаммов *B. anthracis* и перспективна для применения в процессе эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Harrell L.J., Andersen G.L., Wilson K.H. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(7):1847–50. DOI: <https://doi.org/1128/jcm.33.7.1847-1850.1995>
- 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;178(2):377–84. DOI: <https://doi.org/1128/jb.178.2.377-384.1996>
- Jackson P.J., Walther E.A., Kalif A.S., et al. Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63(4):1400–5. DOI: <https://doi.org/1128/aem.63.4.1400-1405.1997>
- Pearson T., Busch J.D., Ravel J., et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2004;101(37):13536–41. DOI: <https://doi.org/1073/pnas.0403844101>
- 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;182(10):2928–36. DOI: <https://doi.org/1128/jb.182.10.2928-2936.2000>
- 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;1:2. DOI: <https://doi.org/1186/1471-2180-1-2>
- 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;6:33. DOI: <https://doi.org/1186/1471-2180-6-33>
- Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007;2(5):e461. DOI: <https://doi.org/1371/journal.pone.0000461>

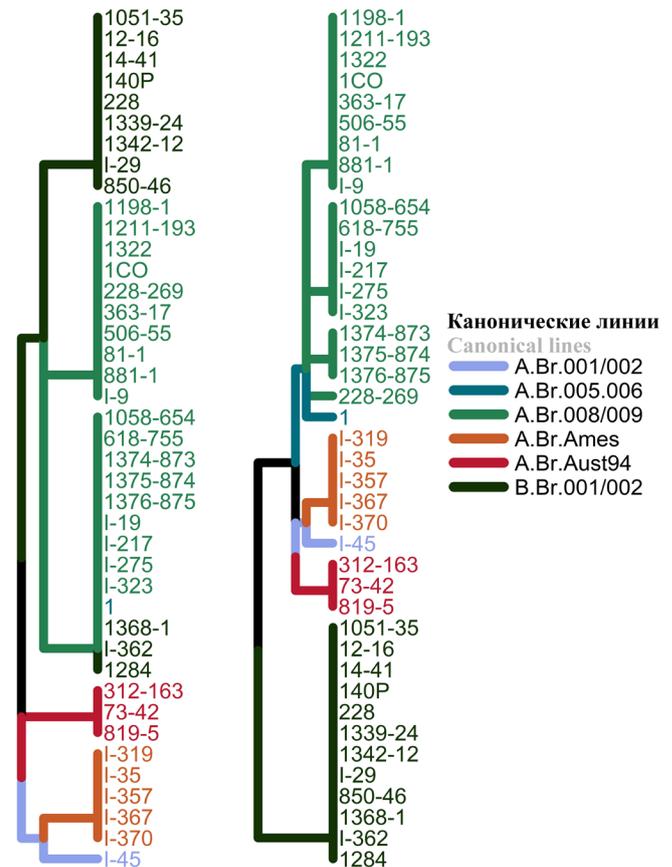


Рис. 4. Кластеризация штаммов *B. anthracis* при INDEL- и VNTR-типировании.

Цветной вариант рисунка см. на сайте журнала.

Fig. 4. Clustering of *B. anthracis* strains based on VNTR and INDEL typing.

For a color version of the picture, see the journal's website.

- Beyer W., Bellan S., Eberle G., et al. Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6(3):e1534. DOI: <https://doi.org/1371/journal.pntd.0001534>
- 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):e95131. DOI: <https://doi.org/1371/journal.pone.0095131>
- Sahl J.W., Pearson T., Okinaka R., et al. A *Bacillus anthracis* genome sequence from the Sverdlovsk 1979 autopsy specimens. *mBio.* 2016;7(5):e01501–16. DOI: <https://doi.org/1128/mBio.01501-16>
- Eremenko E., Pechkovskii G., Pisarenko S., et al. Phylogenetics of *Bacillus anthracis* isolates from Russia and bordering countries. *Infect. Genet. Evol.* 2021;92:104890. DOI: <https://doi.org/1016/j.meegid.2021.104890>
- Larsson P., Svensson K., Karlsson L., et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007;13(11):1725–32. DOI: <https://doi.org/3201/eid1311.070603>
- Сорокин В.М., Водопоьянов А.С., Писанов Р.В. INDEL-типирование — новый метод дифференциации штаммов *Helicobacter pylori*. *Бактериология.* 2020;5(1):8–13. Sorokin V.M., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V. INDEL-typing: a new method of differentiation of *Helicobacter pylori* strains. *Bacteriology.* 2020;5(1):8–13. DOI: <https://doi.org/20953/2500-1027-2020-1-8-13>

15. Леденева М.Л., Водопьянов А.С., Ткаченко Г.А. и др. Выявление INDEL-маркеров в геномах штаммов *Burkholderia pseudomallei* для внутривидового генотипирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;(4): 35–41. Ledeneva M.L., Vodopyanov A.S., Tkachenko G.A., et al. Detection of INDEL-markers in genomes of *Burkholderia pseudomallei* strains for intra-species genotyping. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2017;(4): 35–41. DOI: <https://doi.org/36233/0372-9311-2017-4-35-41> EDN: <https://elibrary.ru/bucgfm>
16. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017;22(4):195–200. Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Oleinikov I.P., Mishan'kin B.N. Indel-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2017;22(4):195–200. DOI: <https://doi.org/18821/1560-9529-2017-22-4-195-200> EDN: <https://elibrary.ru/zhlhhd>
17. Трухачев А.Л., Мелоян М.Г., Воскресенская Е.А. и др. INDEL-типирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022;(4):102–9. Trukhachev A.L., Meloyan M.G., Voskresenskaya E.A., et al. INDEL-typing of *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. DOI: <https://doi.org/21055/0370-1069-2022-4-102-109> EDN: <https://elibrary.ru/rucepz>
18. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(7):3022–7. DOI: <https://doi.org/1093/molbev/msab120>
19. Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В. и др. Новые генетические маркеры для молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;(3):43–50. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., et al. New genetic markers for molecular typing of *Bacillus anthracis* strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(3):43–50. DOI: <https://doi.org/21055/0370-1069-2019-3-43-50> EDN: <https://elibrary.ru/pgefkd>
20. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26(11):2465–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>

#### Информация об авторах

Печковский Григорий Александрович<sup>✉</sup> — м.н.с., лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, [grigorii.pechkovskii@gmail.com](mailto:grigorii.pechkovskii@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Еременко Евгений Иванович — д.м.н., проф., г.н.с., лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8163-1300>

Рязанова Алла Геннадьевна — к.м.н., зав. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Писаренко Сергей Владимирович — к.х.н., в.н.с., лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Шапаков Николай Андреевич — м.н.с., лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

Аксенова Людмила Юрьевна — к.м.н., с.н.с., лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>

Семенова Ольга Викторовна — к.б.н., н.с., лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Тимченко Людмила Дмитриевна — д.вет.н., проф., г.н.с. межфакультетской научно-образовательной лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии Северо-Кавказского федерального университета, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2011-880X>

Куличенко Александр Николаевич — д.м.н., проф., академик РАН, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

**Участие авторов.** Печковский Г.А. — концепция исследования, лабораторные исследования, биоинформационный анализ, написание статьи; Еременко Е.И. — геномные исследования, филогенетический анализ, написание статьи; Рязанова А.Г. — филогенетический анализ, написание статьи; Писаренко С.В. — геномные исследования, редактирование статьи; Шапаков Н.А. — геномные исследования, синтез праймеров; Аксенова Л.Ю., Семенова О.В. — лабораторные исследования; Тимченко Л.Д., Куличенко А.Н. — концепция исследования, редактирование статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

#### Information about the authors

Grigori A. Pechkovskii<sup>✉</sup> — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, [grigorii.pechkovskii@gmail.com](mailto:grigorii.pechkovskii@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Evgeny I. Eremenko — D. Sci. (Med.), Professor, principal researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8163-1300>

Alla G. Ryazanova — Cand. Sci. (Med.), Head, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

Sergey V. Pisarenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Nikolay A. Shapakov — junior researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

Lyudmila Yu. Aksenova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>

Olga V. Semenova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>

Lyudmila D. Timchenko — D. Sci. (Vet.), Professor, principal researcher, Interdepartmental scientific and educational laboratory of experimental immunomorphology, immunopathology and immunobiotechnology, North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2011-880X>

Alexander N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Director, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

**Author contribution.** Pechkovskii G.A. — research concept, laboratory research, bioinformatic analysis, writing an article; Eremenko E.I. — genomic research, phylogenetic analysis, writing an article; Ryazanova A.G. — phylogenetic analysis, writing an article; Pisarenko S.V. — genomic research, editing an article; Shapakov N.A. — genomic research, synthesis of primers; Aksenova L.Yu., Semenova O.V. — laboratory research; Timchenko L.D., Kulichenko A.N. — research concept, article editing. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.