



## Анализ *in silico* геномов штаммов *Bacillus anthracis* главных генетических линий

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

Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

### Аннотация

**Введение.** Филогенетическая структура глобальной популяции *Bacillus anthracis* представлена главными генетическими линиями А, В и С с неравной распространённостью изолятов, причина которой неизвестна. Определение особенностей геномов штаммов трех линий, которые могут влиять на распространённость, является актуальным.

**Цель** — характеристика особенностей геномов разных генетических линий, потенциально влияющих на их распространённость, с использованием анализа *in silico* представительной выборки штаммов *B. anthracis*

**Материалы и методы.** Изучены полногеномные последовательности 49 штаммов *B. anthracis* и штамма *C1 B. cereus biovar anthracis*. Анализ *in silico* проводили с идентификацией полиморфизмов в программах «BLASTn», «MEGA X», «Tandem Repeat Finder», «Parsnp» из пакета «Harvest Suite».

**Результаты.** Вариабельность геномов определялась однонуклеотидными полиморфизмами, однонуклеотидными повторами, числом tandemных повторов, заменами и инделами. Их количество у штаммов линий В и С было в 1,6–13,4 раза больше, а у штамма *B. cereus biovar anthracis* — в 5–150 раз больше, чем у штаммов *B. anthracis* линии А. Значимые замены в генах домашнего хозяйства и факторов патогенности приводили к изменению аминокислотной последовательности белков также значительно чаще у штаммов *B. anthracis* главных линий В, С.

Молекулярное типирование на основе анализа однонуклеотидных полиморфизмов генов факторов патогенности (MVLST) с индексом дискриминации 0,9633 разделяло штаммы на три главные генетические линии с группами, отличающимися от канонических.

**Заключение.** Главное отличие геномов *B. anthracis* состоит в большом количестве значимых нуклеотидных замен в генах факторов патогенности и «домашнего хозяйства» штаммов главных линий В и С по сравнению с линией А. Изменения в кодируемых ими белках могут определять разную экологическую адаптацию и распространённость, более высокие у линии А. MVLST с высокой дискриминирующей способностью может быть дополнительным методом молекулярного типирования *B. anthracis*.

**Ключевые слова:** *Bacillus anthracis*, генетические линии, факторы патогенности, молекулярное типирование

**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:** Еременко Е.И., Печковский Г.А., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н. Анализ *in silico* геномов штаммов *Bacillus anthracis* главных генетических линий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):155–165. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-385> EDN: <https://www.elibrary.ru/ocpnyx>

## *In silico* analysis of genomes of *Bacillus anthracis* strains belonging to major genetic lineages

Evgeny I. Eremenko<sup>✉</sup>, Grigorii A. Pechkovskii, Alla G. Ryazanova, Sergey V. Pisarenko, Dmitry A. Kovalev, Lyudmila Yu. Aksenova, Ol'ga V. Semenova, Alexander N. Kulichenko

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia

## Abstract

**Introduction.** The global phylogenetic population structure of *Bacillus anthracis* is represented by major genetic lineages (A, B and C) with nonuniform distribution of isolates, which still cannot be explained. Identification of characteristics of genomes of strains from three lineages, which can affect their spread, is of high importance. The aim of the study is to explore genomic characteristics of different genetic lineages, which may have an effect on their distribution, by using the *in silico* analysis of a representative subset of *B. anthracis* strains.

**Materials and methods.** The whole-genome sequences of 49 *B. anthracis* strains and *Bacillus cereus biovar anthracis* CI strain were studied. The *in silico* analysis was performed to identify polymorphisms using BLASTn, MEGA X, Tandem Repeat Finder, Parsnp the Harvest Suite software.

**Results.** The genome variability depended on single nucleotide polymorphisms, single-nucleotide repeats, number of tandem repeats, substitutions and indels. In strains from lineages B and C, they outnumbered 1.6–13.4 times and in the *B. cereus biovar anthracis* strain — 5–150 times those in *B. anthracis* strains from lineage A. Significant substitutions in housekeeping genes and pathogenicity factor genes caused changes in amino acid sequences in proteins significantly more frequently in *B. anthracis* strains from major lineages B and C. Based on the molecular typing and a multi-virulence-locus sequence typing (MVLST) with a discrimination index of 0.9633, strains were classified into three major genetic lineages including groups different from the canonical group.

**Conclusion.** The distinctive feature of *B. anthracis* genomes is that they have a larger number of significant nucleotide substitutions in pathogenicity factor genes and housekeeping genes of strains belonging to major lineages B and C compared to lineage A. Changes in proteins encoded by them can cause differences in ecological adaptation and in prevalence, which are higher in strains of lineage A. MVLST having a high discriminating capacity can be used as an additional method to *B. anthracis* molecular typing.

**Keywords:** *Bacillus anthracis*, genetic lineages, pathogenicity factors, molecular typing

**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:** Eremenko E.I., Pechkovskii G.A., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Kulichenko A.N. *In silico* analysis of genomes of *Bacillus anthracis* strains belonging to major genetic lineages. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3):155–165. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-385> EDN: <https://www.elibrary.ru/ocpnx>

## Введение

Структура глобальной популяции *Bacillus anthracis* представлена тремя главными генетическими линиями — А, В и С с 14 «каноническими» (canSNP) группами. Штаммы возбудителя распределены между ними неравномерно, преобладают представители линии А (около 90%), линия В охватывает примерно 10%, линия С включает всего 3 штамма (менее 1%) [1, 2]. Отдельную линию в группе *B. cereus sensu lato*, включающую *B. anthracis*, составляют штаммы, отнесённые к *B. cereus biovar anthracis*, способные вызывать сибиреязвенную инфекцию [3, 4]. Причины неравномерной распространённости штаммов *B. anthracis* разных генетических линий не установлены. Неизвестно, почему штаммы линии А имеют глобальное распространение, а штаммы линии В настолько ограничены в количестве и распространении.

Одними из объяснений являются адаптивные генетические различия, которые влияют на выживание и размножение либо в окружающей среде, либо в организме хозяина.

Эффективность размножения в организме хозяина зависит от адаптивных генетических различий факторов патогенности. Патогенность *B. anthracis* связана с основными факторами: двумя би-

нарными экзотоксинами, летальным и отёчным, и d-глутамилполипептидной капсулой [2]. Компоненты экзотоксинов, летальный, отёчный факторы и протективный антиген (ПА) кодируются генами *lef*, *cyt* и *pagA*, расположенными на плазмиде рХО1 [5]. Оперон *capBCDAE* для продукции капсулы кодируется плазмидой рХО2 [2]. Утрата любой из двух плазмид приводит к авирулентности штаммов. Вместе с тем по вирулентности для лабораторных животных штаммы, несущие обе плазмиды, существенно различаются. Известна аттенуация вакцинного штамма Carbosap, не связанная с утратой плазмид рХО1 и рХО2, которая определяется делециями хромосомной области, содержащими более 50 генов, функция которых, как установлено или предполагается, может быть связана с вирулентностью [6]. Обнаруженные различия в вирулентности штаммов, синтезирующих полноценный токсин и типичную капсулу, предполагают наличие дополнительных факторов патогенности. На их роль претендуют многие продукты сибиреязвенного микроба:

- белок GerXC, кодируемый плазмидным геном *gerXC* и необходимый для прорастания спор *in vivo* [7];
- фосфолипаза С (ген *plC*) [8];
- синтаза оксида азота (ген *nos*) [9];

- бифункциональная лизилфосфатидилглицерол флиппаза/синтетаза (ген *mprF*) [10];
- металлопротеаза семейства энхансина (локус *GBAA\_RS16775*), гомолог которого впервые описан у бакуловирусов [11, 12];
- металлопротеаза иммунный ингибитор А (ген *inhA*) [12];
- автоиндуктор сигнальных молекул «чувства кворума» LuxS (ген *luxS*) [13];
- антролизин O Alo (холестеринзависимый цитоллизин) (ген *alo*) [14];
- энтеротоксин EntFM (ген *entFM*) [13].

У некоторых штаммов *B. anthracis* отмечен комплекс фенотипических признаков, отличающих их от типичных вирулентных штаммов, один из которых — неспособность расти на минимальной синтетической среде без добавления триптофана, сниженная вирулентность для кроликов. Генетическая основа этих изменений не определена [16].

В литературе есть сведения о влиянии аминокислотных замен в белке летального фактора на его каталитическую активность и связывание с ПА [17–19]. Эти данные получены в экспериментах с внесением мутаций в описанные гены и оценкой их влияния на вирулентность мутантных штаммов в сравнении со штаммами дикого типа. Аллельный полиморфизм для гена ПА, имеющего 6 аллельных типов у природных штаммов дикого типа [20], описан и для других генов факторов патогенности [21–23]. Однако вариабельность хромосомных генов, кодирующих продукты, для которых установлено или предполагается влияние на вирулентность *B. anthracis*, остается не изученной. Не установлены количественные и качественные отличия полиморфизмов, свойственных геномам штаммов определённых генетических линий.

Схема молекулярного типирования *B. anthracis* на основе полиморфизма генов факторов патогенности (MVLST) не включала хромосомные гены.

Актуальность проведённой работы определяется отсутствием данных, которые дадут новое понимание патогенеза сибирской язвы, помогут выявить потенциальные мишени для разработки новых средств лечения и профилактики этой инфекции, будут способствовать развитию представлений об эволюции возбудителя сибирской язвы и методов его молекулярного типирования.

**Целью** данной работы была характеристика особенностей геномов разных генетических линий, потенциально влияющих на их распространённость, с использованием анализа *in silico* представительной выборки штаммов *B. anthracis*.

## Материалы и методы

Исследованы полные геномы 49 диплоидных штаммов, включая 19 изолятов *B. anthracis* из коллекции патогенных микроорганизмов Ставро-

польского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора и 30 изолятов из базы данных GenBank, относящихся к главным генетическим линиям А, В, С и 14 canSNP-группам, а также геном штамма CI *B. cereus biovar anthracis*.

Идентификаторы Genbank<sup>1</sup> для геномов:

GCF\_000008445.1, GCF\_009831565.1, GCF\_000167335.1, GCF\_003063965.1, GCF\_003064045.1, GCF\_003860145.1, GCF\_000793525.1, GCF\_000832965.1, GCF\_000310045.1, GCF\_000167235.1, GCF\_000534935.2, GCF\_000258885.1, GCF\_000278385.1, GCF\_000832465.1, GCF\_001273005.1, GCF\_001273085.1, GCF\_000167295.1, GCF\_002896575.1, GCF\_014249775.1, GCF\_003227955.1, GCF\_000831505.1, GCF\_000832745.1, GCF\_003064005.1, GCF\_000008165.1, GCF\_000583105.1, GCF\_000833275.1, GCF\_022221345.1, GCF\_000743805.1, GCF\_900014355.1, GCF\_002356575.1, GCF\_000143605.1.

Анализ геномов проводили *in silico*, используя геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: NC\_007530.2; NC\_007322.2; NC\_007323.3) в качестве референсного. Идентификацию полиморфизмов осуществляли в программах «BLASTn», «BLASTp», «MEGA X», «MAUVE», «Tandem Repeat Finder». Выравнивание объединённых последовательностей генов факторов патогенности, трансляцию нуклеотидных последовательностей генов выполняли в программе «MEGA X». Для полногеномного анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) использовали программу «Parsnp» из пакета «Harvest Suite» для множественного выравнивания геномных последовательностей. В качестве входных данных принимали геномы 50 штаммов, описанных выше, которые были выровнены с хромосомной нуклеотидной последовательностью эталонного генома *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: NC\_007530.2) с использованием «Parsnp» (параметры -c -e -u -C 1000). Обнаруженные SNP были извлечены в файл VCF с помощью «HarvestTools v. 1.0». Отредактированный файл использовался в качестве входного файла в «HarvestTools» для компиляции файла FASTA.

Филогенетическая реконструкция была построена в «MEGA X» с использованием метода максимальной вероятности (Neibor-Joining) в соответствии с моделью Tamura-Nei, достоверность достигалась при значении bootstrap 1000, а также методом goeBURST Full MST в программе «PHYLOViZ 2.0» для определения клональных комплексов. Визуализацию дендрограмм осуществляли в программе «FigTree». Определение индекса дискриминиру-

<sup>1</sup> URL: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/833/275/>

щей способности Hanter–Gaston проводили в соответствии с [24].

## Результаты

### Анализ полиморфизмов хромосомной области генома *B. anthracis* и *B. cereus biovar anthracis*

Вариабельность хромосомной области *B. anthracis* и *B. cereus biovar anthracis* определялась SNP, однонуклеотидными повторами (SNR), тандемными повторами, заменами и инделами (инсерциями/делециями). Основными полиморфизмами в хромосомной области генома были SNP (табл. 1). Заметны отличия в количестве полиморфизмов у штаммов разных генетических линий.

Для главных генетических линий *B. anthracis* определены хромосомные маркерные (специфичные) SNP (табл. 2).

Отмечается выраженная разница в относительном количестве маркерных SNP у штаммов линий В и С по сравнению с линией А.

Большинство маркерных SNPs для линий А и В локализовались преимущественно в генах жизнеобеспечения, из которых 4 гена имели отношение к споруляции и прорастанию спор.

### Анализ SNP генов факторов патогенности

Аналізу подвергли 19 вариабельных генов, кодирующих продукты, имеющие отношение к патогенности (табл. 3).

Характер вариабельности генов определялся наличием SNP, VNTR и INDELS. Больше всего всех SNP и несинонимичных SNP в пересчёте на 1 геном было у штамма *B. cereus biovar anthracis*, затем по мере уменьшения — у штамма *B. anthracis* линии С, штаммов линии В, штаммов линии А. Делеция в гене *trpA* приводила к образованию псевдогена и отсутствию функционального белка у части штаммов линии В. У штамма *B. cereus biovar anthracis* мутация со сдвигом рамки считывания вела к образованию псевдогена и отсутствию релаксазы MobI (плазмида капсулообразования pIC-XO2). Есть заметные различия в количестве SNP как в разных генах, так и у штаммов разных генетических линий.

### Анализ полиморфизма белков факторов патогенности штаммов разных генетических линий

**Летальный фактор.** В белке летального фактора замены *E709G* и *E681K* локализируются в пределах домена 4, содержащего каталитический центр, на расстоянии 10 и 37 аминокислот соответственно от сайта связывания цинка, замены *A299T*, *L298M* и *R543Q* — в домене 2, *E66K* и *V246I* — в домене 1.

**Отёчный фактор.** У всех штаммов линии В отмечены замены *D180G* и *318T*. У штамма линии С и штамма CI *B. cereus biovar anthracis* есть замены *K278E*, *I318T* и *N789K*. У штамма CI *B. cereus biovar anthracis* — замена *V694A*. Замены *D180G*, *K278E* локализируются в пределах PABD, *I318T* — в сегмен-

**Таблица 1.** Полиморфизмы хромосомной области геномов штаммов *B. anthracis* и *B. cereus biovar anthracis*

**Table 1.** Polymorphisms of chromosome genomes of *B. anthracis* and *B. cereus biovar anthracis* strains

Главная генетическая линия Major lineage	Штамм Strain	Количество полиморфизмов в сравнении с референс-штаммом <i>B. anthracis</i> Ames Ancestor Quantity of polymorphisms comparing with <i>B. anthracis</i> strain Ames Ancestor					
		SNP	SNR	тандемные повторы tandem repeats	замены substitutions	инделлы indels	всего total
A	Australia 94	411	142	23	8	64	648
A	Vollum	609	233	32	12	68	954
B	SVA11	1693	418	73	16	109	2309
C	2002013094	2381	576	99	134	414	3604
<i>B. cereus biovar anthracis</i>	CI	76 714	1075	188	7857	1783	87 617

**Таблица 2.** Маркерные SNP хромосомной области геномов *B. anthracis*

**Table 2.** Marker SNPs for chromosome genomes of *B. anthracis*

Главная генетическая линия Major lineage	Количество маркерных SNP Quantity of marker SNP	Отношение маркерные SNPs/геном линии Ratio marker SNPs/genome	Локализация SNP   SNP localization	
			ген gene	межгенное пространство intergene space
A	180	4,73	152	28
B	183	18,3	141	42
C	594	594	Не определяли Not tested	Не определяли Not tested

**Таблица 3.** SNP в генах факторов патогенности штаммов *B. anthracis* разных генетических линий  
**Table 3.** SNPs in pathogenicity factors genes of *B. anthracis* strains of different lineages

Ген Gene	Отношение количество SNP/геном, у штаммов линий   Ratio quantity of SNPs/genome in strains of lineages							
	А (n = 38)		В (n = 10)		С (n = 1)		<i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> (n = 1)	
	всего total	несинони- мичные nonsynonimic	всего total	несинони- мичные nonsynonimic	всего total	несинони- мичные nonsynonimic	всего total	несинонимичные nonsynonimic
<i>суа</i>	7/0,18	4/0,1	3/0,3	2/0,2	6	4	6	4
<i>lef</i>	2/0,05	2/0,05	2/0,2	2/0,2	4	3	10	8
<i>pagA</i>	4/0,1	2/0,05	3/0,3	2/0,2	3	2	4	3
<i>atxA</i>	1/0,02	0	0	0	0	0	1	1
<i>capA</i>	3/0,07	2/0,05	1/0,1	1/0,1	1	1	1	0
<i>capC</i>	2/0,05	0	0	0	1	1	1	0
<i>capD</i>	3/0,07	3/0,07	2/0,2	0	3	3	4	4
<i>acpA</i>	1/0,02	0	1/0,1	1/0,1	1	1	3	2
<i>ger XC</i>	1/0,02	1/0,02	2/0,2	2/0,2	1	1	1	1
<i>mprF</i>	2/0,05	1/0,02	2/0,2	2/0,2	2	1	23	1
<i>entFM</i>	2/0,05	2/0,05	1/0,1	1/0,1	0	0	17	5
<i>GBAA_RS16775</i>	1/0,02	1/0,02	2/0,2	2/0,2	0	0	132	31
<i>pIC</i>	0	0	1/0,1	1/0,1	1/0,1	1/0,1	9	3
<i>alo</i>	3/0,07	3/0,073	0	0	0	0	57	23
<i>nos</i>	0	0	2/0,2	2/0,2	0	0	32	9
<i>luxS</i>	0	0	0	0	1	1	8	0
<i>trpA</i>	0	0	3/0,3	1/0,1	0	0	18	5
<i>trpD</i>	0	0	1/0,1	1/0,1	1	0	15	4
<i>GBAA_RS06415 (trpG)</i>	0	0	1/0,1	1/0,1	1	1	14	5

те СА корового домена ACD, *V694A* и *N789K* — в спиральной области отёчного фактора.

**Протективный антиген.** У штаммов линии А отмечены замены *A600V* и *P565S*, у штаммов линии В — замены *I433V* и *A600V*, у штамма линии С и штамма CI *B. cereus* biovar *anthracis* — замены *S66P* и *A600V*. У штамма CI *B. cereus* biovar *anthracis* — замена *S290I*. *S66P* локализуется в домене 1, *I433V* — в домене 2, *P565S* — в домене 3, замена *A600V* — в домене 4 в области связывания с рецептором (L595–T735).

Сравнили гены и белки ПА всех вакцин на основе живых спор штаммов Carbosar, 34F2\_Sterne, A16R, Tsiankovskii-1, STI-1, 55VNIIViM, 228/8 и Brazilian vaccinal, а также химических вакцин на основе ПА авирулентного штамма V770-NP-1R (вакцины США AVA (или BioThrax) и AV7909) и на основе ПА вакцинного штамма 34F2 Sterne (вакцина AVP; Великобритания). Все штаммы принадлежали линии А. У штаммов V770-NP-1R, Carbosar и всех штаммов российского происхождения (Tsiankovskii-1, STI-1, 55VNIIViM, 228/8) есть замены в гене *C→T* в положении 195 и 1799, у штамма Tsiankovskii-1, кроме того, замена 981 *A→T*. У этих же штаммов существует замена *A600V* в области

связывания с рецептором домена 4 ПА. У штаммов 34F2 Sterne, Brazilian vaccinal и A16R замен в гене и белке ПА не обнаружено.

**Синтетаза капсульного полиглутамата CapA:** у штаммов линии А выявлена замена *Q399K*, у штаммов линии В — замена *T345A*, у линии С — замена *V156L*.

**Белок синтеза капсулы CapC:** замена *T80M* у штаммов линии С и *B. cereus*.

**Гамма-глутамилтрансфераза CapD:** у штаммов линии А — замены *I4M*, *V266I* и *S381E*; у штаммов линии В замен нет; у штамма линии С и штамма CI *B. cereus* biovar *anthracis* — замены *H70Y*, *K223E* и *F379I*; у штамма CI *B. cereus* biovar *anthracis* — замена *G499D*. Замена *H70Y* локализуется в цепи L, *F379I* — в цепи S.

**Транскрипционный регулятор синтеза капсулы AcpA:** у штаммов линий В, С и CI *B. cereus* biovar *anthracis* замена *E285K*, у *B. cereus* также замена *Y354H*.

**Транскрипционный транс-активирующий регулятор сибирезявленного токсина AtxA:** замена *I188N* у штамма CI *B. cereus* biovar *anthracis*.

**Антролизин O Alo:** у штаммов группы А.Вг. Vollum замена *S422F*, у штаммов группы А.Вг.

Aust94, выделенных в ЮАР, — замена N221T, у штаммов группы A.Вг.005/006 — замена V416G.

**Металлопротеаза семейства энхансина:** у штаммов линии А — замены P631S; у штаммов линии В — замена L139F, у штаммов линии С — замена D444E, в белке штамма CI *B. cereus biovar anthracis* — 29 замен.

**Белок прорастания спор GerXC:** у линий А и В — замена H29R; у линии В — замена T35I, у линии С и *B. cereus biovar anthracis* — замена E219G.

**Аутоиндуктор-2 продукции белка LuxS:** у линии С — замена D111G.

**Бифункциональная лизилфосфатидилглицерол флиппаза/синтетаза MprF:** у линии А — замена H631R, у линии В — замена L289F, у линий В, С и *B. cereus biovar anthracis* — замена V424I.

**Синтаза оксида азота NOS:** у линии В — замены Q288H и I348F, у *B. cereus biovar anthracis* — 9 замен.

**Фосфолипаза PIC:** у штаммов линий В, С и *B. cereus biovar anthracis* — замена H194Y, у *B. cereus biovar anthracis* — также замены N20S и A59V.

**Субъединица альфа триптофансинтазы TrpA:** у линии В — замены T222K и нефункциональный белок у части штаммов этой линии ввиду делеции и образовании псевдогена, у *B. cereus biovar anthracis* — 5 замен.

**Антрацилат фосфорибозилтрансфераза TrpD:** у линии В — замена N300S, у *B. cereus biovar anthracis* — 4 замены.

**Компонент II аминодезоксихоризмат/антрацилат синтазы TrpG:** у линий В и С — замена N300S, у *B. cereus biovar anthracis* — 5 замен. H70Y локализуется в цепи L, F379I — в цепи S.

Полученные данные о заменах в плазмидных генах и белках факторов патогенности совпадают с опубликованными ранее [22, 23]. Замены в генах дополнительных факторов патогенности хромосомной локализации описаны нами впервые.

Больше всего значимых замен идентифицировано в генах энхансина и антролизина О штамма CI *B. cereus biovar anthracis*. В целом в 19 генах факторов патогенности было 15 значимых замен у 38 штаммов линии А, 20 замен — у 10 штаммов линии В, 20 замен — у 1 штамма линии С, 102 замены — у штамма CI *B. cereus biovar anthracis*. Прослеживается та же закономерность — у штаммов главных линий В и С и, тем более, у штамма *B. cereus biovar anthracis* аминокислотных замен в белках факторов патогенности, которые могут изменять их функциональную активность, значительно больше, чем у штаммов линии А.

#### Молекулярное типирование на основе SNP генов факторов патогенности

В 19 генах факторов патогенности 49 штаммов *B. anthracis* и 1 штамма *B. cereus biovar anthracis*

идентифицированы 409 филогенетически значимых SNP и определены 33 генотипа факторов патогенности.

Для типирования на основе SNP генов факторов патогенности (MVLST) индекс дискриминирующей способности Hanter–Gaston составил 0,9633 и оказался выше, чем для canSNP-типирования (0,9056), приближаясь к показателю для WGS-SNP-типирования (0,9869). Близкие результаты получены нами при сравнении эффективности MVLST и полногеномного SNP-типирования [25]. Типирование на основе SNP генов факторов патогенности, в отличие от canSNP- и coreWGS-SNP-типирования, позволяет анализировать как хромосомные, так и плазмидные гены.

В дендрограмме на основе SNP генов факторов патогенности также выделяются три общепризнанные главные генетические линии: А, В, С *B. anthracis* и ветвь штамма *B. cereus biovar anthracis*, при этом последняя является базовой для всех трех главных генетических линий *B. anthracis* а ветвь линии С — базовой для линий В и С (рис. 1). Эти данные соответствуют представлению об эволюции *B. anthracis* от предшественника *B. cereus* к линии С и затем к линиям В и С, а также могут указывать на изменчивость генов факторов патогенности как движущую силу эволюции

Филогенетические отношения штаммов, реконструируемые на основе SNP генов факторов патогенности, отличались от таковых на основе полногеномного SNP-типирования.

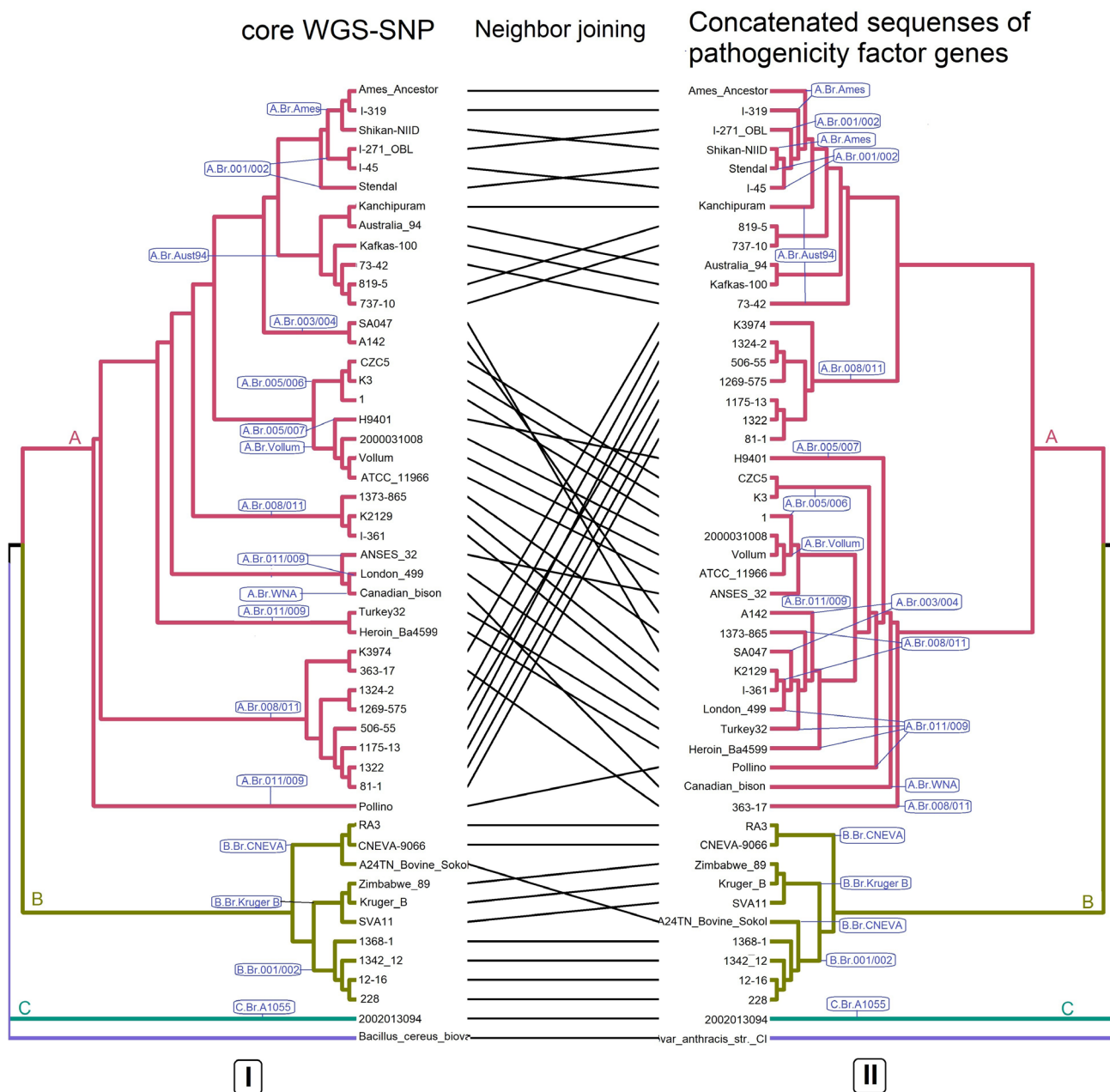
Полное соответствие кластеризации canSNP-групп В.Вг.001/002 и В.Вг.Kruger наблюдали при типировании на основе SNP генов факторов патогенности и на основе SNP полного генома.

При сравнении дендрограмм, полученных по результатам анализа слитых последовательностей генов факторов патогенности и полногеномного SNP-анализа тех же штаммов (рис. 1) показывает, что часть штаммов, относящихся к другим canSNP-группам, кластеризуются со штаммами из групп, не соответствующими их canSNP-групповой принадлежности.

#### Определение клональных комплексов на основе анализа SNP генов факторов патогенности

Определение клональных комплексов (CC) на основе анализа SNP генов факторов патогенности позволило выделить 33 генотипа (GT), объединённых в 5 клональных комплексов для 48 штаммов *B. anthracis* главных линий А и В, а также два отдельных GT для штаммов *B. anthracis* линии С и *B. cereus bv anthracis* (рис. 2). CC1 является наиболее многочисленным комплексом, объединяющим 12 GT 20 штаммов.

Всего в CC1 входят GT 18 штаммов 7 из 14 canSNP главной генетической линии А *B. anthracis*.



**Рис. 1.** Сопоставление филогенетической реконструкции результатов методов молекулярного типирования на основе анализа слитых последовательностей генов факторов патогенности и coreWGS-SNP.

**Fig. 1.** Comparison of the phylogenetic reconstruction of the results received using the multilocus sequence typing and coreWGS-SNP.

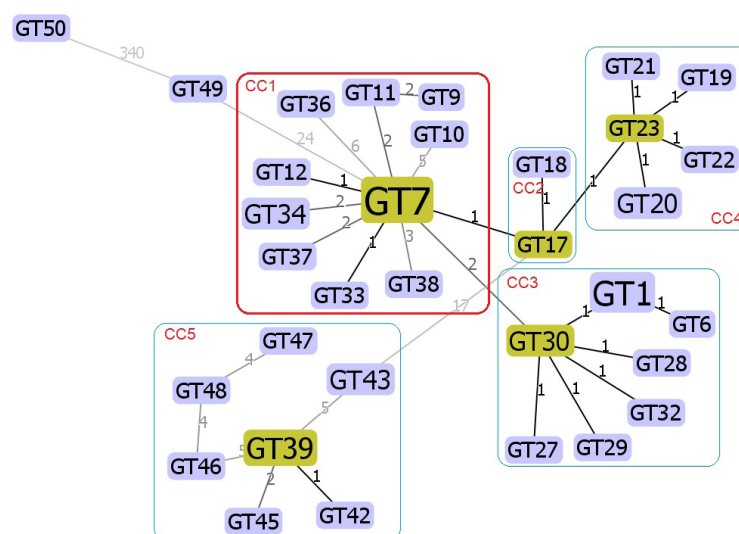
Комплекс CC2 включает 2 GT группы A.Br.008/011 и является промежуточным звеном между комплексами CC1, CC4 со штаммами линий A и комплексом CC5 со штаммами линии B. CC3 включает 7 GT групп A.Br.Aust94, A.Br.001/002 и A.Br.Ames. CC4 содержит 5 GT одной группы A.Br.008/011 главной линии A. CC5 объединяет 7 GT 10 штаммов всех canSNP групп главной линии B *B. anthracis*.

Внутри клональных комплексов генетические дистанции между GT составляют 1–6 ед. Все штаммы *B. anthracis* линии A отделены от штаммов линии B дистанцией 17 ед. (от GT17 до GT43), от

штамма линии C — дистанцией 24 ед. (между GT7 и GT49), штамм *B. cereus biovar anthracis* (GT50) — дистанцией 340 ед. от штамма *B. anthracis* линии C (GT49).

Анализ клональных комплексов подтверждает деление штаммов *B. anthracis* на три главные генетические линии и распределение штаммов по генотипам генов факторов патогенности, не вполне соответствующее принадлежности к каноническим SNP-группам. Прослеживается эволюция факторов патогенности от *B. cereus biovar anthracis* к *B. anthracis* линии C и затем к линиям A и B, ко-

GT	Strains	canSNP group	GT	Strains	canSNP group
GT1	Ames_Ancestor	A.Br.Ames	GT20	1175-13	A.Br.008/011
	Shikan-NIID	A.Br.Ames		1322	A.Br.008/011
	I-319	A.Br.Ames	GT21	1324	A.Br.008/011
	I-45	A.Br.001/002	GT22	363-17	A.Br.008/011
	I-271_OBL_	A.Br.001/002	GT19	506-55	A.Br.008/011
GT6	Stendal	A.Br.001/002	GT11	CZC5	A.Br.005/006
GT30	Kafkas-100	A.Br.AuGT94	GT34	Vollum	A.Br.Vollum
	Australia_94	A.Br.AuGT94		ATCC_11966	A.Br.Vollum
GT27	73-42	A.Br.AuGT94	GT38	Canadian_bison	A.Br.WNA
GT28	737-10	A.Br.AuGT94	GT37	2000031008	A.Br.Vollum
GT29	819-5	A.Br.AuGT94	GT10	1	A.Br.005/006
GT7	SA047	A.Br.003/004	GT36	H9401	A.Br.005/007
	A142	A.Br.003/004	GT9	K3	A.Br.005/006
	London_499	A.Br.011/009	GT43	RA3	B.Br.CNEVA
	K2129	A.Br.008/011		CNEVA-9066	B.Br.CNEVA
	1373-865	A.Br.008/011	GT39	228	B.Br.001/002
	I-361	A.Br.008/011		12-16	B.Br.001/002
	Turkey32	A.Br.011/009		1342_12	B.Br.001/002
	Heroin_Ba4599	A.Br.011/009	GT42	1368-1	B.Br.001/002
GT12	ANSES_32	A.Br.011/009	GT45	A24TN_Bovine_Sokol	B.Br.CNEVA
GT33	Polino	A.Br.011/009	GT46	Kruger_B	B.Br.Kruger B
GT17	K3974	A.Br.008/011	GT48	SVA11	B.Br.001/002
GT18	81-1	A.Br.008/011	GT47	Zimbabwe_89	B.Br.001/002
GT23	1269	A.Br.008/011	GT49	2002013094	C.Br.A1055
GT32	Kanchipuram	A.Br.Aust94	GT50	Bacillus_cereus_ biovar anthracis str. CI	B. c. bv anthr



**Рис. 2.** Клональные комплексы штаммов *B. anthracis*. Дендрограмма построена на основе анализа SNP генов факторов патогенности методом goeBURST Full MST в программе «PHYLOViZ 2.0», цифры на ветвях соответствуют генетическим дистанциям.

**Fig. 2.** Clonal complexes of *B. anthracis* strains. The dendrogram was constructed using multilocus sequence typing and the goeBURST Full MST algorithm in the PHYLOViZ 2.0 program; numbers on the clades correspond to genetic distances.



торая позволяет выделить генетические группы, отличающиеся от канонических SNP-групп.

### Обсуждение

Количество всех видов полиморфизмов хромосомной области геномов у штаммов *B. anthracis* линий В и С было в 1,6–13,4 раза, а у штамма *B. cereus biovar anthracis* в 5–150 раз больше, чем у штаммов *B. anthracis* линии А. Особенно большие отличия были в количестве замен, SNP, и инделов в геноме штамма *B. cereus biovar anthracis*, соответственно, в 785,7, 150 и 27 раз больше, чем у штаммов *B. anthracis* линии А. Это может объясняться тем обстоятельством, что хромосомная область генома штаммов *B. cereus biovar anthracis* соответствует геному представитель группы *B. cereus sensu lato*, кроме *B. anthracis*, тогда как плазмиды pCI-XO1 и pCI-XO2 мало отличаются от плазмид pXO1 и pXO2 *B. anthracis* [4].

Количество хромосомных специфичных маркерных SNP в пересчёте на геном было в обратном отношении к количеству штаммов линии; так, для единственного штамма главной линии С этот показатель был в 24 раза больше, чем для 10 штаммов линии В, и в 170 раз больше, чем для 38 штаммов линии А. Это может быть следствием более длительной эволюционной истории с накоплением мутаций у генетических линий В и С по сравнению с линией А. Поскольку SNP локализовались преимущественно в генах «домашнего хозяйства», велика вероятность того, что эти мутации были значимыми и могли отрицательно сказаться на экологической адаптации линий В и С и, следовательно, к их ограниченной распространённости.

Вариабельность 19 генов факторов патогенности, из которых 9 кодировались плазмидами pXO1 и pXO2 *B. anthracis* или pCI-XO1 и pCI-XO2 *B. cereus biovar anthracis*, а еще 10 — хромосомой, выражалась в наличии SNP и инделов. Важно отметить, что у штаммов *B. anthracis* линии А, за исключением штамма 2000031008, в отличие от других линий, инделов не зарегистрировано. У штаммов линий В и С в гене *aspA* вставка АТАТАGАТА приводила к вставке 3 аминокислот NID (аспарагин-изолейцин-аспарагиновая кислота) в транскрипционном регуляторе синтеза капсулы АсрА. Эта вставка, единица тандемного повтора, была описана как новый VNTR-локус нами [26] и позднее другими авторами [23]. Делеция в области 107–124 п.н. в гене *trpA* превращала его в псевдоген, лишала субъединицу альфа триптофансинтазы TrpA 35-40 аминокислот с N-конца и делала фермент нефункциональным у большей части изученных нами штаммов линии В. Это могло объяснять зависимость от триптофана данных штаммов [16].

Основным иммуногенным компонентом сибирезвенных вакцин является ПА. Все вакцинные штаммы живых вакцин, а также штаммы, ПА кото-

рых использован в химических вакцинах, относились к главной генетической линии А. У вакцинных штаммов российского происхождения, штаммов V770-NP-1R и Carbosap существует замена аланина на валин в области связывания с рецептором домена 4 ПА, которой нет у вакцинных штаммов из Китая, Бразилии и штамма 34F2 Sterne, используемого для вакцинации скота в западных странах. Эти данные могут быть полезными при разработке новых сибирезвенных вакцин.

Доминирование генотипов линии А в глобальном масштабе свидетельствует о большом репродуктивном успехе (следовательно, приспособленности) и значительном рассеивании на большие расстояния [27]. К.Л. Smith и соавт. полагают, что штаммам линии А, но не линии В, присуща гипотетическая способность вызывать латентную инфекцию у животных, с чем связано их глобальное распространение и ограниченное распространение линии В. Сравнение изолятов линий А и В из Южной Африки показало, что штаммы А были адаптированы к более разнообразным средам, чем штаммы В, которые были ограничены более узкими условиями окружающей среды [28]. Ограниченное количество и географическое распределение более редких линий может возникнуть из-за больших затрат на адаптацию, связанных с нишевой специализацией [29].

Генотипы из линии С и, в меньшей степени, из линии В, по-видимому, имеют очень низкую приспособленность по сравнению с генотипами линии А. Действительно, ветвь линии С имеет значительно более медленные эволюционные темпы, чем ветвь линии А, наводя на мысль о меньшем количестве инфекционных циклов в природе [1].

Различия эволюционных линий по кругу восприимчивых хозяев также могут быть объяснены их разного распространения. Штаммы группы В.Br.CNEVA линии В были зарегистрированы только во Франции, Южной Германии, Швейцарии, Северной Италии, Боснии и Герцеговине, Хорватии, Словении, Словакии и Польше. Они составляют трансальпийскую ось, состоящую из пастбищных долин с богатыми лугами, где традиционно разведение конкретных пород крупного рогатого скота, содержащихся изолировано и не обменивающихся на протяжении веков. Эта географическая изоляция, возможно, могла обеспечить благоприятную среду для выживания спор и размножения *B. anthracis* группы В.Br.CNEVA [2, 30].

### Заключение

Существуют значительные различия в количестве полиморфизмов в геномах представителей главных генетических линий *B. anthracis* А, В и С. Штаммы наименее распространённой линии С имели в 4,5 раза больше, а штаммы линии В с ограниченным распространением в 3 раза больше видов

полиморфизмов, чем штаммы многочисленной линии А. Преимущественная локализация нуклеотидных замен, в том числе значимых, внутри генов как домашнего хозяйства, так и факторов патогенности, могла изменять функции соответствующих белков. Экспансия линии А может объясняться преимуществами в сравнении с линиями В и С, закреплёнными в ходе эволюции. Линия С эволюционно более древняя, базовая по отношению к линиям В и А и наименее приспособленная, ограничена в пространстве отрицательным отбором. Эволюция *B. anthracis*, определяемая изменчивостью факторов патогенности, позволяет выделить генетические группы, отличающиеся от канонических SNP-групп. MVLST ввиду хорошей дискриминирующей способности может быть дополнительным методом молекулярного типирования возбудителя сибирской язвы, позволяющим дифференцировать штаммы на основе детерминант патогенности.

Впервые в нашей работе показано многократное превышение числа полиморфизмов в геномах, включая гены факторов патогенности, у штаммов линий В и С по сравнению с линией А, определены значимые замены в хромосомных и плазмидных генах, потенциально влияющие на вирулентность, установлена высокая дискриминирующая способность схемы MVLST) на основе анализа SNP 19 генов факторов патогенности. Определён механизм зависимости от триптофана некоторых штаммов *B. anthracis* линии В, связанный с мутациями в гене субъединицы альфа триптофансинтазы триптофанового оперона.

Необходимо изучение варибельности генов, связанных с прорастанием спор и спорообразованием, которые также могут влиять на адаптацию и распространение генетических линий *B. anthracis*.

Таким образом, одним из объяснений преимущественного распространения главной генетической линии А *B. anthracis* может быть значительно меньшее количество мутаций в геноме по сравнению с линиями В и, особенно, С и лучшая адаптация к условиям существования в окружающей среде и в организме хозяина.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- 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. USA*. 2004;101(37):13536–41. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0403844101>
- Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018;64:115–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.024>
- Leendertz F.H., Ellerbrok H., Boesch C., et al. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature*. 2004; 430(6998):451–2. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02722>
- Klee S.R., Brzuszkiewicz E.B., Nattermann H., et al. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One*. 2010;5(7):e10986. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010986>
- Okinaka R.T., Cloud K., Hampton O., et al. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J. Bacteriol.* 1999;181(20):6509–15. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6509-6515.1999>
- Harrington R., Ondov B.D., Radune D., et al. Genome sequence of the attenuated Carbosap vaccine strain of *Bacillus anthracis*. *Genome Announc.* 2013;1(1):e00067-12. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomea.00067-12>
- Sirard J.C., Guidi-Rontani C., Fouet A., Mock M. Characterization of a plasmid region involved in *Bacillus anthracis* toxin production and pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000;290(4-5):313–6. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80030-2](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80030-2)
- Heffernan B.J., Thomason B., Herring-Palmer A., et al. *Bacillus anthracis* phospholipases C facilitate macrophage-associated growth and contribute to virulence in a murine model of inhalation anthrax. *Infect. Immun.* 2006;74(7):3756–64. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00307-06>
- Shatalin K., Gusarov I., Avetisova E., et al. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008;105(3):1009–13. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0710950105>
- Samant S., Hsu F.F., Neyfakh A.A., Lee H. The *Bacillus anthracis* protein MprF is required for synthesis of lysylphosphatidylglycerols and for resistance to cationic antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 2009;191(4):1311–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01345-08>
- Lepore L.S., Roelvink P.R., Granados R.R. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol.* 1996;68(2):131–40. DOI: <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0070>
- Read T.D., Peterson S.N., Tourasse N., et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*. 2003;423(6935):81–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature01586>
- Jones M.B., Blaser M. Detection of a luxS-signaling molecule in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 2003;71(7):3914–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3914-3919.2003>
- Shannon J.G., Ross C.L., Koehler T.M., Rest R. Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infect. Immun.* 2003;71(6):3183–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.71.6.3183-3189.2003>
- Tran S.L., Guillemet E., Gohar M., et al. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *J. Bacteriol.* 2010; 192(10):2638–42. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01315-09>
- 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; (2):53–6. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Tsygankova E.A., et al. Genotypic peculiarities of *Bacillus anthracis* strains with different manifestation of pathogenicity-associated features. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;(2):53–6. EDN: <https://elibrary.ru/mstsjx>
- Cao S., Guo A., Wu G., et al. Residue histidine 669 is essential for the catalytic activity of *Bacillus anthracis* lethal factor. *J. Bacteriol.* 2010;192(21):5799–805. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.00485-10>
- Klimpel K.R., Arora N., Leppla S.H. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol. Microbiol.* 1994;13(6):1093–100. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00500.x>

19. Tonello F., Naletto L., Romanello V., et al. Tyrosine-728 and glutamic acid-735 are essential for the metalloproteolytic activity of the lethal factor of *Bacillus anthracis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;313(3):496–502.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.134>
20. Price L.B., Hugh-Jones M., Jackson P.J., Keim P. Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 1999;181(8):2358–62.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.181.8.2358-2362.1999>
21. 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):94–9.  
Kulichenko A.N., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., et al. Biological properties and molecular-genetic characteristics of *Bacillus anthracis* strains, isolated during the outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets autonomous district in 2016. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2017;(1):94–9.  
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-94-99>  
EDN: <https://elibrary.ru/yixyqj>
22. Goncharova Y., Bahtejeva I., Titareva G., et al. Sequence variability of pXO1-located pathogenicity genes of *Bacillus anthracis* natural strains of different geographic origin. *Pathogens.* 2021;10(12):1556.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10121556>
23. Goncharova Y.O., Bogun A.G., Bahtejeva I.V., et al. Allelic polymorphism of anthrax pathogenicity factor genes as a means of estimating microbiological risks associated with climate change. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022;58(4):382–93.  
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0003683822040056>
24. 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>
25. Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В. и др. Сравнительный анализ методов генетического типирования *Bacillus anthracis*. *Генетика.* 2019;55(1):40–51. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., et al. Comparative analysis of genotyping methods for *Bacillus anthracis*. *Russian Journal of Genetics.* 2019;55(1):35–44.  
DOI: <https://doi.org/10.1134/S102279541901006X>  
EDN: <https://elibrary.ru/jshcda>
26. 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/10.21055/0370-1069-2019-3-43-50>  
EDN: <https://elibrary.ru/pgefkd>
27. 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/10.1371/journal.pone.0000461>
28. Smith K.L., DeVos V., Bryden H., et al. *Bacillus anthracis* diversity in Kruger National Park. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(10):3780–4.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.10.3780-3784.2000>
29. Kassen R., Llewellyn M., Rainey P.B. Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation. *Nature.* 2004;431(7011):984–8.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02923>
30. Derzelle S., Aguilar-Bulteta L., Frey 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;196:1–8.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.014>

#### Информация об авторах

Еременко Евгений Иванович<sup>✉</sup> — д.м.н., профессор, г.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, [ejer@mail.ru](mailto:ejer@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>

Печковский Григорий Александрович — м.н.с. лаб. сибирской язвы Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

Рязанова Алла Геннадиевна — 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>

Ковалев Дмитрий Анатольевич — к.х.н., зав. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

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>

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

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

#### Information about the authors

Evgeny I. Eremenko<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Prof. Chief Scientist, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, [ejer@mail.ru](mailto:ejer@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>.

Grigoriy A. Pechkovskii — junior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>

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>

Dmitry A. Kovalev — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Lyudmila Yu. Aksenova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>

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

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

**Author contribution.** 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.